

PRODUÇÃO DE PLASMA ANTITETÂNICO HIPERIMUNE, DE ORIGEM EQÜINA

Rosalvo GUIDOLIN*

Celso Pereira CARICATI**

Sally Muller Affonso PRADO***

Mary Dalva Caparroz VANCETTO***

Fernando FRATELLI***

Amélia Keiko NISHIKAWA****

Hisako Gondo HIGASHI*

RESUMO: Com 10 cavalos doados pela Polícia Militar do Estado de São Paulo, previamente vacinados contra o tétano, demonstra-se aplicabilidade de um teste para seleção de animais produtores de plasma antitetânico de títulos elevados. É discutida, também, a vantagem do uso de animais previamente vacinados contra o tétano, quanto ao aspecto econômico na produção do soro antitetânico, uma vez que podem alcançar, na imunização básica e na primeira reimunização, títulos antitóxicos superiores, em média, a 10 vezes em relação aos animais não previamente vacinados.

UNITERMOS: Plasma antitetânico, hiperimunização, seleção de cavalos.

INTRODUÇÃO

O soro antitetânico hiperimune, usado na profilaxia e no tratamento do tétano humano e animal, é geralmente obtido de eqüino hiperimunizado, cujo plasma é tratado com pepsina e purificado por desnaturação pelo calor e precipitação por sulfato de amônio^{1,3,5}.

O alto custo, tanto do cavalo como o da sua manutenção, estimula à pesquisa de esquemas de hiperimunização que visam títulos elevados de anticorpos espe-

* Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan

** Seção de Obtenção de Plasmas Hiperimunes

*** Seção de Vacinas Anaeróbicas

**** Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes

Recebido para publicação em 22.5.92 e aceito em 05.11.92.

cíficos nesses animais a partir da imunização básica (primeira hipermunização). Para atingir esta condição, não basta apenas a aplicação de determinado tipo de esquema, pois verifica-se, sempre, que em qualquer esquema aplicado, ao redor de 40% dos animais submetidos, não respondem com títulos satisfatórios. Faz-se, assim, necessário o uso de outra medida como seja: a seleção de bons animais produtores, de preferência entre aqueles previamente vacinados contra o tétano.

No presente trabalho será relatado um sistema de seleção capaz de proporcionar, a curto prazo, plantel de animais relativamente homogêneo quanto aos títulos de anticorpos tetânicos, com dados obtidos entre 10 cavalos testados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais — cavalos doados pela Polícia Militar (PM) do Estado de São Paulo, com peso e idade médias de 370 quilos e 14 anos, respectivamente. Todos os animais foram vacinados contra o tétano quando prestavam serviços na Polícia Militar. Os animais foram marcados no Instituto Butantan como segue: 906, 910, 918, 936, 958, 961, 973, 991, 998 e 999.

Imunização seletiva: todos os animais receberam, por via intramuscular (IM), uma dose de 20 ml de anatoxina tetânica purificada⁶, contendo 100Lf/ml e adsorvida ao fosfato de alumínio (1mg de Al. por ml de anatoxina).

No 11º dia após a aplicação da vacina foram extraídos 40ml de sangue da veia jugular de cada cavalo e, após coagulação do sangue e separação do soro a 4°C, os soros foram individualmente testados quanto à concentração de anticorpos tetânicos.

Adjuvante: foi utilizado o adjuvante oleoso, emulsão múltipla, preparado segundo Herbert⁴.

Hipermunização básica ou primeira imunização: desenvolvida por aplicação das doses por via IM segundo o esquema abaixo:

Fase 1

Antígeno = Anatoxina purificada titulando 20Lf/ml

Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf*	Adjuvante (ml)	Testes
1	5	100	5	—
2	10	200	—	—
4	15	300	—	—
6	20	400	—	Sangria de prova

* Lf (limite floculante) — é a quantidade de toxina que exibe floculação inicial com 1 U.I. de antitoxina.

Fase 2

Antígeno = Anatoxina purificada titulando 40Lf/ml

Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
8	20	800	—	—
10	30	1200	—	—

Fase 3

Antígeno = Anatoxina purificada titulando 100Lf/ml

Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
12	16	1600	15	—

Fase 4

Antígeno = Toxina purificada titulando 100Lf/ml

Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
14	24	2400	—	—

Fase 5

Antígeno = Toxina purificada titulando 200Lf/ml

Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
17	16	3200	—	—
20	20	4000	—	—
24	25	5000	—	Sangria de prova

Sangrias para produção — Foram extraídos por punção da jugular, 6 litros de sangue de cada animal por sangria e aplicado o sistema de plasmaferese, segundo o quadro abaixo:

GUIDOLIN, R., CARICATI, C.P., PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., NISHIKAWA, A.K., HIGASHI, H.G. Produção de plasma antitetânico hiperimune, de origem eqüina. *Bol. Biotecnol.*, v. 3, p. 17-23, 1992.

Dia	Sangria nº	Plasmaferese
31	1	—
33	2	Aplicada
35	3	Aplicada

Recebimento do sangue, separação do plasma e plasmaferese — O sangue foi colhido em bolsas plásticas duplas e interligadas, com capacidade para 6 litros, das quais a 1.^a bolsa continha 400ml de solução anticoagulante (1,47% de dextrose, 4,8% de citrato de sódio e 1,47% de ácido cítrico). As bolsas foram esterilizadas pelo fabricante* por radiação gama de cobalto. Imediatamente após a coleta, as bolsas foram armazenadas em câmara a 4°C e o plasma foi transferido, 24 horas após, para a segunda bolsa. As hemácias que permaneceram na bolsa nº 1 foram ressuspensas com 1000ml de solução salina a 0,85% NaCl esterilizada a 121°C/30 minutos e a suspensão foi reinoculada pela veia jugular, no mesmo animal doador. A reinfusão das hemácias foi completada em aproximadamente 20 minutos.

Reimunização dos cavalos — Após um período de recuperação de 30 dias, contados a partir da última sangria, os animais foram reimunizados por via IM, como segue:

Antígeno = Anatoxina purificada titulando 200Lf/ml

Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
1	5	1000	5	—
7	5	1000	—	—
10	15	3000	—	Sangria de prova

Os volumes de sangue, separação do plasma e plasmaferese foram conduzidos como descritos para a hiperimunização básica.

Testes — A atividade antitóxica foi ensaiada segundo o método estabelecido pelo US National Institutes of Health⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, encontram-se os resultados das atividades neutralizantes do soro de cada cavalo testado, segundo o esquema de hiperimunização descrito, após as fases de: imunização seletiva; Fase 1, Fase 5 e reimunização.

* JR Indústria e Comércio de Produtos Hospitalares — Campinas — S.P.

Tabela 1

Atividade neutralizante individual, expressa em unidades internacionais (U.I.) por ml, determinadas após o término das fases seletivas 1, 5 e de reimunização.

CAVALO Nº	IMUNIZAÇÃO SELETIVA	FASE 1	FASE 5	REIMUNIZAÇÃO
906	> 9,0	55,0	200	200
910	< 1,0	< 27,0	NT	60
918	> 9,0	84	> 500	+
936	> 9,0	84	> 500	2.100
958	> 9,0	84	180	1.250
961	> 9,0	55	> 500	+
973	> 9,0	180	> 550	2.000
991	> 9,0	84	450	1.180
998	> 9,0	84	530	600
999	< 9,0	84	NT	200

NT — Não testado

+ — Morreu

AGRADECIMENTOS

Outras informações sobre este trabalho podem ser obtidas no Departamento de Pesquisas e Desenvolvimento da Fazenda São José, Rio Claro, SP.

Verifica-se, claramente, que — nas condições da experiência — atingiram títulos elevados os cavalos que apresentaram atividade soro-neutralizante da toxina tetânica, na fase de imunização seletiva, superior a 9,0 U.I./ml. A finalidade básica do teste seletivo é a de selecionar precocemente os animais para atingir rendimentos satisfatórios em número de unidades circulantes no plasma a partir da hiperimunização básica e primeira reimunização. Um grupo de 40 cavalos não previamente vacinados contra o tétano, destinado à produção normal de soro antitetânico, submetido ao mesmo esquema de hiperimunização e testado na mesma fase (1ª reimunização) dos experimentais, apresentou título antitóxico médio igual a 600 U.I./ml de soro.

Ressalta-se que o custo de manutenção dos cavalos é relativamente alto, estimado atualmente ao redor de Cr\$ 25.000,00 por dia e o tempo decorrido desde o início da hiperimunização básica até o final da primeira reimunização é de aproximadamente 100 dias. Nesse período, segundo a nossa experiência (Tab. 1), pelo menos três entre 10 animais não apresentaram títulos antitóxicos recomendáveis para que fossem sangrados e, consequentemente, os seus soros não seriam aproveitados.

As nossas observações (não publicadas), acumuladas em 40 anos de vivência sobre o assunto, relativas a muitas centenas de animais hiperimunizados, nos autorizam a informar que cavalos com títulos relativamente baixos, 300 ou 400

U.I./ml, após a primeira reimunização, têm probabilidades de atingir títulos ao redor de 1.000 a 1.200 U.I./ml na 3^a ou 4^a reimunização. Isto representa aproximadamente mais 90 dias de trabalho que, acrescidos aos 100 dias mencionados, atinge a meio ano deficitário para 30 ou 40% dos animais.

As anatoxinas tetânicas muito potentes, aplicadas de acordo com a dose recomendada para a imunização seletiva, em cavalos não previamente vacinados contra o tétano, podem induzir, em alguns animais, títulos iguais ou superiores às nove unidades internacionais requeridas para a seleção (Dr. Petenella — Sclavo — Comunicação Pessoal — 1981). Ocorre, todavia, que antígenos assim qualificados, não encontram-se facilmente disponíveis nos laboratórios produtores brasileiros.

Nestas condições, a alternativa possível é a de estimular junto aos fornecedores de cavalos a vacinação contra o tétano de animais jovens (seis a 12 meses de idade) os quais, ao redor dos quatro anos de idade, poderão ser selecionados para a produção de plasma antitetânico hiperimune. Neste particular, no decorrer da década de 1930, diversos autores^{2,8,9} demonstraram a vantagem da utilização de cavalos previamente vacinados contra o tétano, há, pelo menos, seis meses antes do início da hiperimunização antitetânica, no que diz respeito aos títulos antitóxicos alcançados. Relatam esses autores que, títulos de até 100 vezes maiores, podem ser obtidos em relação aos animais não previamente vacinados.

Recentemente em nosso laboratório, verificamos que a inoculação de 20ml de anatoxina purificada, com 100Lf/ml, em 48 cavalos com em média, 400 quilos de peso e quatro anos de idade, não previamente vacinados contra o tétano, não induziu a títulos superiores a uma U.I./ml no 11º dia após à aplicação, (imunização seletiva) em 10 animais apanhados ao acaso (dados não publicados). Assim, o teste de seleção, nestas condições, é inconclusivo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Major PM Rui Cesar Melo, Comandante Interino do Regimento "9 de Julho" pela doação dos cavalos.

ABSTRACTS: In 10 horses granted by Military Police of São Paulo State, previously vaccinated against tetanus, the application of a test in order to have selected animals of high tetanus antibodies titre in the plasma production is demonstrated. Also the advantage to use previously antitetanus vaccinated animals is discussed regard to the economical aspect in antitetanus production because these animals are able in the basic immunization ad first reimmunization to reach an antitoxic titres 10 times (average) higher than the non previously vaccinated animals.

KEYWORDS: Antitetanus plasma, hiperimmunization, horse selection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, C.G. The distribution of diphtheria antitoxin in pepsin-digested horse antisera. *Biochem. J.*, v. 59, p. 47-52, 1955.
2. DESCOMBEY, P. Sur une technique de production de l'antitoxine tétanique et ses résultats. *Ann. Inst. Pasteur*, v. 45, p. 373-375, 1930.

GUIDOLIN, R., CARICATI, C.P., PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., NISHIKAWA, A.K., HIGASHI, H.G. Produção de plasma antitetânico hiperimune, de origem eqüina. *Bol. Biotecnol.*, v. 3, p. 17-23, 1992.

3. HARMS, A.K.J. Purification of antitoxin plasma by enzyme treatment and heat denaturation. *Biochem. J.*, v. 42, p. 390-397, 1948.
4. HERBERT, W. J. Multiple emulsions: a new form of mineral — oil antigen adjuvant. *Lancet*, v. 16, p. 771, 1965.
5. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. *Minimum requirements: tetanus toxin*, 4. rev. Washington: U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1952.
6. POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the protein. *Brit. J. exp. Pathol.*, v. 20, p. 132-149, 1939.
7. PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., PRAL, M.M., OLIVEIRA, J.M., HIGASHI, H.G. Purificação industrial do toxóide tetânico por gel filtração. *Bol. Biotecnol.*, v. 3, p. 11, 1992.
8. RAMON, G., DESCOMBEY, P., LEMÉTAYER, E. Sur l'immunisation antitoxique active et sur la production intensive de l'antitoxine tétanique chez cheval. *Ann. Inst. Pasteur*, v. 46, p. 444-456, 1931.
9. RAMON, G., LEMÉTAYER, E., MUSTAFA, A. Sur une méthode de production rapide et intensive de l'antitoxine tétanique. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v. 124, p. 895-898, 1937.

Local: Acervo da Biblioteca
Instituto Butantan

Data: 08 de novembro de 1992

MINISIMPOSIUM

SISTEMA COMPLEMENTO: pesquisas de interface

OPENING REMARKS

MINI-SIMPÓSIO

SISTEMA COMPLEMENTO: pesquisas de interface

The organization of the mini-symposium "SISTEMA COMPLEMENTO: pesquisas de interface" was directed by Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva, a well-known complementologist. Dr. Michel Kinet, from the Immunobiology Laboratory, Hopital Broussais, Paris, France, will give the opening lecture.

Organizador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva

Local: Auditório da Biblioteca
Instituto Butantan

Data: 05 de novembro de 1992

Data: 05 de novembro de 1992

Local: Auditório da Biblioteca — Instituto Butantan

14:00 h. — "Role of complement in *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigotes clearance".

Lilia F. Umekita

Laboratório de Imunopatologia — Instituto Butantan.

14:30 h. — "Manipulation of the complement system by microorganisms and man".

Michael Kirschfink

Institut für Immunologie — Universitaet Heidelberg — Germany.

15:00 h. — "Primary complement deficiencies".

Anete Sevcovic Grumach

Unidade de Imunopatologia, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina — USP.

15:30 h. — "Manipulation of the complement system by animal venoms".

Denise Vilarinho Tambourgi e Ana Cláudia Mello Rocha Campos.

Departamento de Imunologia — Instituto de Ciências Biomédicas Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan.

16:00 h. — "The role of complement in the pathogenesis of HIV infection".

Michel D. Kazatchkine

Unité d'Immunopathologie — Hôpital Broussais-Paris, França.

16:10 h. — General discussion.

Role of complement in trypanosome clearance by bloodstream trypanosomes

Michael Kirschfink*

The organization of this small meeting on "The Complement (C) System: the interface research" was made possible by the fortunate concurrence of several happenings: a) the joining in São Paulo, at the same time, of two internationally recognized complementologists, Dr. Michel D. Kazatchkine, Unité d'Immunobiologie, Hôpital Broussais, Paris, France, and Dr. Michael Kirschfink, Institut für Immunologie, Universität Heidelberg, Germany. The first, presently is performing exciting work on the role of C in enhancing infection of target cells with human HIV, while the second is deeply involved in the manipulation of C system by microorganisms and man; b) the simultaneous emergence in laboratories of the "Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo" and "Instituto Butantan", of interesting results related respectively, with the clearance of the trypomastigote forms from the blood of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and the expression of some C activities after treatment of human normal serum with snake or spider venoms; c) the recent establishment at the "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", of a laboratory specifically devoted to analyze the participation of individual components of C system in human diseases; and, d) maybe the most important, the enthusiastic acceptance by all invited speakers to attend, at the last hour, our invitation to participate of this meeting. Needless-to-say, the meeting was enjoyable and profitable, since it provided an opportunity to bring up-to-date informations concerned with the topics developed by the speakers.

The organizer warmly thanks the Editors of "Memórias do Instituto Butantan" for publishing the conferences, the Instituto Butantan employees directly or indirectly involved in the meeting organization and the "Laboratório Sandoz do Brasil" for the generous support.

The organizer warmly thanks the Editors of "Memórias do Instituto Butantan" for publishing the conferences, the Instituto Butantan employees directly or indirectly involved in the meeting organization and the "Laboratório Sandoz do Brasil" for the generous support.

to arrest the disease process.

A variety of synthetic compounds have been tested for their impact on the complement system. Many of the known synthetic complement inhibitors are toxic, not complement specific or require unrealistically high concentrations to inhibit complement in vivo [7].

Due to the high specificity and the absence of toxic side effects, the introduction of endogenous complement inhibitors like C1-inhibitor or C3-inhibitor (C3-inh) appears to be a logical approach to block the complement system *in vivo* (Table 2).

* Institut für Immunologie, Complement und Zytolyse, Universitätsklinik, D-6900 Heidelberg, FRG.

Correspondence to: M. Kirschfink, DM, Institut für Immunologie, Universitätsklinik, D-6900 Heidelberg, FRG.