

ANATOXINA DIPHTERICA E SEU VALOR PRATICO PREPARO, PODER ANTIGENICO, EMPREGO NA PRODUCÇÃO DE ANTITOXINA E NA PROPHYLAXIA DA DIPHTERIA,

FELO

DR. JOSE' LEMOS MONTEIRO
(Assistente do Instituto)

INTRODUCÇÃO

Pode-se dizer hoje que a medicina se encontra scientificamente apparelhada para a luta contra a diphteria; a clinica no que diz respeito ao tratamento e a hygiene, quanto a sua prophylaxia.

E a solução deste problema que visa principalmente a protecção da humanidade no que ella possue de mais esperançoso, a sua infancia, é obra incontestavel sahida do silencio e da calma dos laboratorios.

Desde que Bretonneau, em 1821, affirmou a *especificidade* da diphteria e mostrou a identidade de natureza da angina e do croup; que seu discípulo Troussseau sustentou a existencia de um *princípio morbido unico*, um *virus especial*, e depois, principalmente, da descoberta do agente causador da infecção, por Klebs, em 1883 e da sua cultura obtida por Loeffler no anno seguinte, o estudo deste flagello da infancia entrou verdadeiramente no terreno scientifico.

Seguindo os trabalhos de Loeffler, aparecem os de Roux e Yersin, com a descoberta da toxina diphterica; os de Behring e Kita-sato, que evidenciaram as propriedades anti-toxicas dos sôros dos animaes immunisados e finalmente, a sensacional communicação de Roux, feita 10 annos depois da descoberta de Loeffler, em Budapest, sobre o sôro anti-diphterico.

Com o decorrer dos annos, o preparo do sôro anti-diphterico foi se aperfeiçoando e hoje, graças principalmente aos trabalhos americanos, se consegue o sôro concentrado, purificado, constituido quasi que exclusivamente pela porção (pseudo-globulina) que encerra a anti-toxina especifica, cujo valor é medido com rigor, orientando seu emprego e cuja efficacia se acha perfeitamente demonstrada.

Sem tratar dos outros meios de prevenção á diphteria, tambem de valor comprovado, depois dos trabalhos de G. Ramon, sobre a anatoxina diphterica, suas propriedades e emprego, o problema da pro-

philaxia desta infecção parece ter tambem attingido á sua solução practica e a hygiene com uma nova e poderosa arma de combate.

O trabalho que segue e que dividimos em 5 partes, representa o resultado de estudos experimentaes que fizemos com a anatoxina diphterica, da sua applicação na producção do sôro anti-diphterico e do seu emprego na prophylaxia desta infecção.

I Preparo — Influencia da composição do meio de cultura para produção de toxina, na transformação desta em anatoxina, pela adição de formol.

Juntando á toxina diphterica uma pequena quantidade de formalina com o fim de preservá-la durante as manipulações para a dosagem da antitoxina por meio da floculação, G. Ramon verificou que esta não era perturbada. Augmentando a proporção de formalina a 3 ou 4 c.c. por 1.000 e deixando na estufa durante 30 dias, constatou que o poder floculante continuava intacto e que todo o poder tóxico da toxina havia desaparecido, persistindo suas propriedades imunisantes.

A este producto capaz de "facular em presença da antitoxina como a toxina de que provem, dotado de perfeita inocuidade para os animaes, que pôde produzir uma immunidade solida e uma abundante formacão de anti-toxina", Ramon denominou *anatoxina*. (').

Nas suas numerosas publicações sobre a anatoxina diphterica, com a qual vem obtendo tão animadores resultados, Ramon não nos dá com detalhes a technica do seu preparo. Apenas se sabe que emprega toxinas preparadas com caldo Martin e adiciona formalina na proporção de 3,5 por 1.000 deixando a mistura na estufa a 37.^o, 38.^o durante cerca de 30 dias.

A falta de enumeração de todos os detalhes de technica, pôde, perfeitamente, explicar resultados diversos obtidos por outros experimentadores no estudo da anatoxina e de suas propriedades (floculação, poder antigenico, etc.).

Em muitos institutos se emprega outros meios, além do caldo Martin, para o preparo da toxina diphterica.

Como já havíamos verificado para os toxoides (anatoxina) tetanicos ("") a influencia que apresenta a composição do meio de cultura na sua formação pela adição de formalina á toxina obtida, resolvemos, preliminarmente, fazer identica verificação quanto a transformação da toxina diphterica em anatoxina, quando obtida de meios de cultura de composição diversa.

Lançamos mão de toxinas de actividades (D. M. M. para cobayas de 250 grs.) mais ou menos iguaes e oriundas de caldo não fermentado e de caldo fermentado pelo bacillo coli.

Juntamos formalina (formol a 40 %) em diferentes proporções e deixamos as misturas na estufa a 37.^o, verificando sua actividade para a cobaya de tempos em tempos.

Nos protocollos de experiencia que seguem, mostraremos os resultados obtidos com a toxina preparada com caldo não fermentado.

(') Empregamos no decorrer deste trabalho o termo anatoxina, reconhecendo, porém, a maior propriedade do de "toxoide", proposto por Ehrlich nos seus ainda hoje admiraveis trabalhos sobre a constituição da toxina diphterica. (Berl. klin. Woch. 1903, n. 35 e 37).

(") Dr. J. Lemos Monteiro — Preparo de toxoides tetanicos pelo metodo da formalina. Annaes Paulistas de Med. e Cir. N. 1 Vol. XII, 1921.

Toxina 8 ('), de 7-11-924, preparada com caldo duplo, de carne de vitella, peptona de Witte, Ph=7, 6. ("") Bacillo diphterico Park 8. D. M. M.= $<0,0025$ e $>0,0016$ cc..

I—Toxina 8+formalina a 1 por 1000—estufa a 37.^o

Dias de permanencia a 37. ^o	Quantidade inject.	Data da injeccão	Cobaya n. ^o	Peso - grms.	RESULTADO
3	1 cc.	10/11/24	255	245,0	† 13 h. de 11/11/24
10	5 cc.	17/11/24	243	250,0	› n. 18/19/11/24
61	1 cc.	7/1/25	383	250,0	› n. 8/9/1/26
93	5 cc.	9/2/25	344	250,0	› 10 h. 10/2/25
159	5 cc.	6/4/25	60	240,0	› 16 h. 7/4/26
235	5 cc.	22/6/25	296	250,0	› 14 h. 23/6/25

Não foi feita nova verificação depois deste elevado numero de dias de permanencia a 37.^o.

II — Toxina 8+formalina a 2 por 1000 — Estufa a 37.^o

Dias de permanencia a 37. ^o	Quantidade inject.	Data da injeccão	Cobaya n. ^o	Peso - grms.	RESULTADO
3	5 cc.	10/11/24	325	250,0	† n. 10/11/11/24
10	5 cc.	17/11/24	179	240,0	› 14 h. 18/11/24
34	5 cc.	11/12/24	107	235,0	› 9 h. 12/12/24
61	1 cc.	7/1/25	137	250,0	› n. 8/9/1/25
93	5 cc.	9/2/25	350	250,0	› 10 h. 10/2/25
159	5 cc.	6/4/25	367	240,0	› 9 h. 7/4/25
235	5 cc.	22/6/25	58	250,0	› 14 h. 23/6/25

Não foram feitas verificações em datas posteriores.

III — Toxina 8+formalina a 3 por 1000 — Estufa a 37.^o

Dias de permanencia a 37. ^o	Quantidade inject.	Data da injeccão	Cobaya n. ^o	Peso - grms.	RESULTADO
1	5 cc.	8/11/24	82	250,0	† n. 9/10/11/24
3	5 cc.	10/11/24	276	240,0	› 15 h. 11/11/24
5	5 cc.	12/11/24	25	240,0	› n. 13/14/11/24
10	5 cc.	17/11/24	286	250,0	› n. 18/19/11/24
15	5 cc.	22/11/24	49	240,0	› n. 23/24/11/24
24	5 cc.	1/12/24	78	250,0	› n. 2/3/12/24
34	5 cc.	11/12/24	86	250,0	› n. 12/13/12/24
40	2,5 cc.	17/12/24	359	250,0	› 13 h. 19/12/24
61	2,5 cc.	7/1/25	417	250,0	› 15 h. 9/1/25
93	5 cc.	9/2/25	411	250,0	› n. 10/11/2/25
124	5 cc.	2/3/25	61	250,0	› 16 h. 4/3/25

Não foram feitas verificações em datas posteriores.

(') Todas as toxinas, depois das culturas serem filtradas apenas em papel filtro, são conservadas na geladeira, sob uma camada de toluol, sem addicção de outro qualquer antiseptico.

(") Reacção determinada pelo methodo de A. Godoy.

IV — Toxina 8+formalina a 4 por 1000 — Estufa a 37.^o.

Dias de permanencia a 37. ^o	Quantidade inject	Data da injecção	Cobaya n. ^o	Peso - grams.	RESULTADO
1	5 cc.	8/11/24	37	250,0	† n. 9/10/11/24
3	5 cc.	10/11/24	274	250,0	» 8 h. 12/11/24
5	5 cc.	12/11/24	65	250,0	» n. 13/14/11/24
10	5 cc.	17/11/24	285	250,0	» n. 19/20/11/24
15	5 cc.	22/11/24	429	250,0	» n. 24/25/11/24
24	5 cc.	1/12/24	97	240,0	» 16 h. 2/12/24
25	5 cc.	2/12/24	207	240,0	» n. 4/5/12/24
34	5 cc.	11/12/24	63	240,0	» n. 13/14/12/24
40	5 cc.	17/12/24	400	250,0	» n. 20/21/12/24
40	2,5 cc.	17/12/24	150	250,0	» n. 21/22/12/24
40	1 cc.	17/12/24	239	250,0	viva por mais 20 d. observação.
50	5 cc.	27/12/24	153	255,0	† n. 29/30/12/24
50	2,5 cc.	27/12/24	161	250,0	form. de escarra e † n. 41 51125
61	5 cc.	7/1/25	262	250,0	† 8 h. 12/1/25
61	2,5 cc.	7/1/25	213	250,0	» n. 11/12/1/25
93	5 cc.	9/2/25	177	250,0	oed. escarra e † n. 14/15/2/25
124	5 cc.	2/3/25	356	250,0	oed. escarra, cicatrização e † n. 17/18/3/25
124	2,5 cc.	2/3/25	199	250,0	oed. escarra, cicatrização e † 14 h. 2/4/25

Nota-se sempre, após as inoculações, a formação de oedema no ponto de inoculação, abrangendo as zonas vizinhas. A morte da cobaya prolongado-se alguns dias, observa-se a formação de necrose e de uma escarra; muitas vezes esta lesão se cicatriza antes que a morte se dê, se a attenuação não foi completa para a evitar.

Nestes ensaios, todos os animais eram necropsiados para a verificação dos fenômenos da intoxicação diphterica.

As cobayas números 356 e 199, do protocolo IV, inoculadas respectivamente com 5 e 2,5 c. c. da anatoxina preparada com 4% de formalina e mantida na estufa a 37.^o durante 124 dias, pela necropsia não apresentavam signaes de intoxicação diphterica; haviam tido oedema após a inoculação, escarra, que se cicatrizou e aparentavam bom estado de saúde, sendo que, provavelmente, a morte tenha sido devida a causa diversa.

Nestas condições, pode-se concluir que a attenuação, embora incompleta em virtude das lesões locaes que provoca, se tenha dado no fim de 124 dias de permanencia a 37.^o de uma toxina preparada com caldo duplo, não fermentado, pela addicção de formalina na proporção de 4%.

Mostraremos agora os resultados obtidos empregando-se toxinas preparadas com caldo fermentado pelo bacillo coli communior e cuja technica assim pôde ser resumida: carne de vitella, 500,0 grs., agua 1000 c. c.. Maceração durante a noite na geladeira. Passar no panno. Ajustar a reacção para + 1 a phenolphthaleina. Juntar 10 c. c. de uma cultura em caldo, de 24 horas, de bacillo coli communior para cada

litro. Deixar na estufa durante 48 horas. Juntar uma clara de ovo batida para cada 2 litros (tempo dispensável) e ferver durante 20 minutos. Justar a reacção a +0,5 a ph.. Juntar peptona de Witte: 2 % e chloreto de sodio: 0,5 %. Ferver para dissolver. Verificar a reacção final e ajustar para Ph.=7, 8 ou 8. Filtrar e distribuir 800 a 1000 c. c. em frasco de Erlenmeyer de 3 litros. Esterilizar no autoclave.

Toxina 17, de 2-3-25, preparada com caldo fermentado pelo bacillo coli communior, de carne de vitella, peptona de Witte, Ph.=7,8, bacillo diphtherico Park 8 — D. M. M. = <0,0025 e > 0,0016 c. c..

A formalina utilizada é do mesmo fabricante (Allemby's) da usada nas experiencias anteriores e juntada á toxina em diferentes proporções, sendo as misturas mantidas na estufa a 37.^o e feitas as verificações de tempos em tempos.

Em resumo, verificamos que a toxina juntada de formalina a 2 % ainda se apresenta toxica para a cobaya de 250,0 grs. de peso no fim de 102 dias de permanencia a 37^o, a morte se dando em 2 ½ dias.

Com 3 % de formalina a attenuação era completa em 60 dias a 37.^o provocando escarra que se cicatrizava, ficando a cobaya viva por mais de 30 dias de observações.

Com 4 % de formalina a attenuação se deu em 26 dias, apresentando a cobaya os symptomas locaes, menos accentuados; com 30 dias a 37.^o os symptomas locaes eram ligeiros, apenas oedema nos dias seguintes á injecção.

Com maiores proporções de formalina 5 a 10 % a attenuação da toxina era mais ou menos rapida, conforme a proporção ajuntada, dando-se em 5 a 10 dias, notando-se ainda os accidentes locaes.

Toxina 21 — de 6-6-25, preparada nas mesmas condições que a anterior — D. M. M. = 0,0025.

Com esta toxina repetimos os ensaios; eis os resultados obtidos com as proporções de formalina a 3 e 4 %.

V — Toxina 21+formalina a 3 por 1000 — Estufa a 37.^o

Dias de permanencia a 37. ^o	Quantidade inject.	Data da injecção	Cobaya n. ^o	Peso - grms.	RESULTADO
25	2,5 cc.	17/7/25	423	260,0	oed. † 14 h. 20/7/25
25	5 cc.	17/7/25	422	250,0	oed. » n. 19/20/7/25
30	2,5 cc.	22/7/25	253	260,0	oed. » 14 h. 26/7/26
30	5 cc.	22/7/25	48	250,0	oed. » 14 h. 24/7/25
40	5 cc.	2/8/25	78	250,0	oed. » n. 7/8/8/25
60	5 cc.	22/8/25	65	250,0	oed. escarra, cicatrização † n. 19/20/9/25.

VI — Toxina 21+formalina a 4 por 1000 — Estufa a 37.^o

Dias de permanencia a 37. ^o	Quantidade inject.	Data da injecção	Cobaya n. ^o	Peso - grms.	RESULTADO
25	2,5 cc.	17/7/25	315	260,0	oed. † n. 19/20/7/25
25	5 cc.	17/7/25	254	260,0	oed. » n. 29/30/7/25
30	2,5 cc.	22/7/25	538	240,0	oed. viva por 15 dias de observações.
30	5 cc.	22/7/25	67	250,0	oed. viva por 15 dias de observações.

Destes resultados se conclue que a proporção de formalina, mais conveniente a se juntar á nossa toxina, para sua transformação em anatoxina, é de 4 °/oo e permanencia durante 30 dias na estufa a 37°.

Destas duas series de experiencias se verifica que a attenuação da toxina e sua transformação em anatoxina pela addicção de formalina e permanencia na estufa, se processa differentemente conforme a toxina empregada, ou melhor, conforme a composição do caldo de cultura que se utilizou para seu preparo.

Com uma toxina obtida de um caldo não fermentado, de D. M. M. <0,0025, e. >0,0016 c. c., formalina a 4 °/oo e permanencia a 37°, só se obtem a sua attenuação no fim de 124 dias. Este longo periodo de permanencia a 37°, prejudicará certamente as propriedades antigenicas do producto obtido.

Já com o caldo fermentado, isempto, por isto, de assucares e, portanto, de composição chimica diversa, a toxina obtida, de D. M. M. identica, se attenua, transformando-se em anatoxina, com a mesma proporção de formalina, no fim de 30 dias de permanencia a 37°. Este espaço de tempo não prejudica as propriedades antigenicas da anatoxina, como mostraremos no decorrer deste trabalho.

Prolongando por mais alguns dias a permanencia na estufa (entre 30 e 40 dias) verificamos que as reacções locaes são muito menores, quasi nullas.

Attenuação e transformação da toxina estabilizada.

Nas experiencias descriptas foram empregadas toxinas recentemente preparadas.

Sabemos que a toxina diphtherica é instável, se alterando e attenuando com o tempo, até que adquira no fim de alguns meses de permanencia na geladeira ou no frigo, uma certa estabilidade quanto a sua actividade toxica.

Repetimos as verificações utilizando toxinas velhas, mais estaveis pela permanencia de, pelo menos, 6 meses na geladeira.

Com a toxina 18, preparada com caldo fermentado, de carne de vitella, peptona de Witte, Ph. 7,8, bacillo diphtherico Park 8, de D. M. M. <0,0025 c. c., quando do seu preparo e que cahiu a 0,0033 c. c., por occasião da sua utilização, depois de 6 meses de geladeira, verificamos a maior rapidez do tempo de attenuação. Esta se deu em menos de 20 dias com a proporção de formalina a 4 °/oo. O seu valor antigenico foi, como se verá adiante, mais accentuado que com as anatoxinas preparadas com a toxina recente.

Com a toxina 21, preparada nas mesmas condições de D. M. M. <0,0025 e que cahiu a 0,005 c. c., por occasião de ser utilizada depois de uma permanencia na geladeira durante 10 meses, juntada formalina a 4 °/oo, a attenuação se processou em cerca de 40 dias.

Esta diferença pode ser attribuida á diversidade da procedencia do formol utilizado nas duas verificações ou ás condições proprias a cada toxina.

As reacções locaes consecutivas foram accentuadas com estas duas anatoxinas, principalmente com a primeira. Com ambas verificamos o apparecimento de phenomenos tardios de paralysia nas cobayas inoculadas com 5 c. c.. Depois de resistirem 15 dias de observação, a morte sobreveiu no 20.^o ou no 21.^o dia, precedida por paralysia dos membros. Attribuimos o facto á possivel existencia de quantidades apreciaveis de toxonas ainda não de todo transformadas pela acção do formol neste lapso de tempo e que são tambem elaboradas pelo bacillo e cuja producção varia, conforme o meio cultural e condições proprias ao germe.

Estes accíidentes tardios, devidos ás toxonas (Ehrlich) ('') são muito caracteristicos e aparecem do 14.^o ao 20.^o dia, conforme a dose, e, ás vezes, na 3.^a semana, se apresentam repentinamente e o animal morre em poucos dias.

A necropsia das cobayas em que o facto foi verificado, não revelou signaes de intoxicação diphtherica, indicando que a toxina já se havia transformado em toxoide.

A transformação das toxonas, mais abundantes nas toxinas velhas, parece pois não se dar pela acção do formol ou mais lentamente que a da toxina. Algumas cobayas após o apparecimento destes phenomenos tardios de paralysias que duravam cerca de 24 a 48 horas se restabeleciaiam, apresentando-se vivas por mais de 30 dias de observação.

Nas cobayas inoculadas com 1 ou 2 c. c. sómente, não se observam estes accidentes tardios, pelo facto das toxonas, porventura existentes serem em menor proporção que com as doses maiores (5 c. c.), quando foram verificados.

Embora alguns pesquisadores discordem e duvidem da existencia das toxonas (Arrhenius e Madsen, Ramon e outros) os trabalhos de Ehrlich e seus colaboradores são muito demonstrativos e seus argumentos bastante fortes no que diz respeito á composição da toxina diphtherica.

Para se diminuir o mais possivel os accidentes locaes consecutivos a injecção da anatoxina, reduzindo-os a reacções proteinicas e alergicas (Zoeller) ha conveniencia de só se utilizar para fins prophylacticos, as anatoxinas sempre preparadas com toxinas recentes e só depois de 6 meses de permanencia na geladeira.

Para fins experimentaes, como immunisaçao de cavallos, o seu emprego pode ser feito immediatamente, pois os accidentes locaes em animaes não acarretarão consequencias de importancia.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Para a attenuaçao da toxina e sua transformação em anatoxina, Ramon ('') utilizou o aldehyde formico, podendo tambem ser obtida pela addicção de outras substancias chimicas.

Com a technica antiga de se juntar o liquido de Gram á toxina,

(') Paul Ehrlich — The constituents of diphtheria toxin, em Studies in immunity, de Ehrlich — Bolduan. 1910.

(') G. Ramon — Compt. R. Ac. Sciences. T. CLXXLX, 1924.

nas primeiras doses para a immunização de animaes, attenuando sua toxidez, chegava-se a identico proposito.

Berthelot e Ramon ("") estudaram diversos agentes de transformação das toxinas em anatoxinas, entre as quaes a acroleina, aldehyde crotonico, aldehyde ethylico e hexamethyleno-tetramina. Pensam ser melhor que o formol para a transformação da toxina tetanica, o aldehyde ethylico que, juntado na porção de 4 a 5 % de uma solução de 58 por 1.000 e após 5 a 6 semanas, produz uma coloração rosea. Com a toxina diphterica, os melhores resultados obtiveram com o aldehyde formico.

Joannides ("") obtem com leite, em contacto durante 6, 12, 24, 48 horas a 37.º com a D. M. M. de toxina diphterica, a sua attenuação para a cobaya e a não destruição do poder antigenico. Esta attenuação é tanto mais profunda quanto maior fôr o contacto com o leite.

Pretende verificar se esta acção do leite sobre a toxina tenha outra causa ou se é devida a uma acção anatoxigena desta substancia.

Pico e Miravent ("") com um producto da hydrolyse da glycose, possuindo função aldehyde, injectado juntamente com um certo numero de doses mortaes de toxina diphterica, conseguem a sobrevivencia dos animaes, não observando reacções locaes e preveem o tratamento chimio therapico das toxiemias.

Devemos mencionar o interessante trabalho de Backer, Kraus e Lowenstein ("") que tratando o toxoide diphterico pelo acido acetico fraco ou pelo alcohol, conseguem precipitados que, separados e dissolvidos em solução physiologica, apresentam ainda suas propriedades antigenicas, produzindo reacções locaes menores que com o producto primitivo e cujo emprego no homem pretendem ensaiar.

Ainda mencionaremos os trabalhos de Larson e Eder (1) que praticaram a immunização antidiptérica com toxina tornada atoxica pela adição de ricinoleato de sodio.

Varias são, pois, as substancias que tornam atoxica uma toxina, mantendo suas propriedades antigenicas. No presente trabalho foi empregado o aldehyde formico, segundo a indicação de Ramon, porém, variando o meio de cultura para a obtenção da toxina diphterica, portanto, a sua composição chimica.

Com a toxina obtida de um caldo duplo, não fermentado, a sua attenuação com formalina a 4 % e permanecendo na estufa a 37.º só se processou num lapso de tempo excessivamente longo e que provavelmente prejudicará o poder antigenico da anatoxina, sendo neces-

(**) A. Berthelot et G. Ramon — Compts. Rend. Ac. Sc. n.º 4, T. 180, pagina 540 — 1925.

(***) Joannides — Compts. R. Soc. Biologie. n.º 33, T. XCIII — 1925.

(****) Cezar E. Pico et J. M. Miravent — Compts. R. Soc. Biol. n.º 7, Tomo XIV, pag. 484 — 1926.

(*****) Backer, St., Kraus, R., und Lowenstein, E., Zur Frage der aktiven Schutzinpfung gegen Diphterie mittels Toxoide. Zeitsch. f. Immun. und exp. Therapie 45,1 pag. 86.

(1) W. P. Larson y Howard Eder. — The J. of Am. Med. Ass. (Ed. Hespanhola) pag. 497, n.º 8, vol. 15. 1926.

sarias novas pesquisas para, com maiores proporções de formalina e uma vez verificado que não accarretam inconvenientes, determinar-se o optimo a se juntar para a transformação de tales toxinas em tempo menor.

Com toxina obtida de caldo fermentado, isemto de assucares, conseguiu com a proporção de formalina a 4 °/oo e permanencia a 37.°, a transformação em anatoxina no prazo indicado por G. Ramon (30 a 40 dias).

Para que as reacções locaes se reduzam a accidentes de ordem proteinica e de allergia, ha conveniencia de se utilizar para fins prophylacticos a anatoxina depois de varios meses do seu preparo, só se empregando immediatamente para fins experimentaes e immunisaçao de animaes para a producção de antitoxina.

Destes resultados pode-se chegar ás seguintes conclusões:

I — A composição do meio de cultura para a producção de toxina tem influencia na sua transformação em anatoxina pela addicção de formol e permanencia a 37.°.

II — Seria de vantagem a uniformisação da technica para a producção de toxina nos diferentes institutos para que os resultados experimentaes decorrentes se tornem semelhantes e identicos os productos obtidos, como a anatoxina, que tenham applicação practica de inestimavel valor.

II. PROPRIEDADES ANTIGENICAS

A principal propriedade da anatoxina é a de conservar as propriedades antigenicas ou immunisantes da toxina de onde proveio, deixando de possuir a sua toxidez.

Mostramos já a technica de que lançamos mão para preparar a anatoxina diphterica partindo das toxinas por nós obtidas.

Assignalaremos agora as experiencias que fizemos com o fim de verificar as propriedades antigenicas destas anatoxinas.

Empregamos para isto algumas das cobayas que haviam sido injectadas para a verificação da atoxidez das anatoxinas e outras novas, que injectamos com 1, 2 e 3 doses variaveis de anatoxina, verificando, alguns dias após, a sua resistencia para um certo numero de D. M. M. de toxina, e com coelhos immunisados pesquisamos a producção de antitoxina no sôro, o mesmo fazendo tambem nas cobayas.

Em primeiro lugar mostraremos os resultados obtidos com anatoxinas preparadas com toxina recente e formalina a 4 %, e depois os obtidos com toxina velha e formalina na mesma proporção.

Resistencia das cobayas immunisadas com anatoxina, obtida de toxina recente + formalina, a um certo numero de D. M. M. de toxina.

Cobaya 104 — injectada com 1 c. c. de anatoxina. 10 dias após recebe 5 D. M. M. de toxina.

Resultado: † em 3 dias.

Cobaya 118 — injectada com 1 c. c. de anatoxina. 10 dias após recebe 5 D. M. M. de toxina.

Resultado: † em 3 dias.

Cobaya 242 — injectada com 1 c. c. de anatoxina. 10 dias após recebe 10 D. M. M. de toxina.

Resultado: † em 3 dias.

Cobaya 338 — (Protocollo IV) injectada com 2,5 c. c. de anatoxina. No fim de 15 dias recebe 10 D. M. M. de toxina.

Resultado: † em 2 dias.

Cobaya 67 — (Protocollo IV) injectada com 5 c. c. de anatoxina. Após 15 dias recebe 10 D. M. M. de toxina.

Resultado: viva, por mais de 20 dias de observação.

Vê-se que, com uma só dose de 5 c. c. de anatoxina, se conseguiu a resistencia da cobaya contra 10 D. M. M. de toxina. Uma só injecção de 2,5 c. c. e de 1 c. c. não protegeram o animalzinho contra 10 D. M. M.; uma só injecção de 1 c. c. não protege contra 5 D. M. M..

Não verificamos a resistencia das cobayas inoculadas com uma só dose de 1 c. c. para menor numero de doses mortaes de toxina, nem

para 5 D. M. M., da inoculada com 2,5 c. c., sendo provavel que resistissem a injecção de 1 a 5 D. M. M..

Em todo caso, verificou-se que com uma só injecção com 5 c. c. de anatoxina, se protege a cobaya contra 10 D. M. M. de toxina pura.

Vejamos a resistencia das cobayas injectadas com 2 doses de anatoxina:

Cobaya 248 — recebe 2 injecções de anatoxina, sendo a primeira de 1 c. c., e a segunda de 2 c. c., 5 dias após.

8 dias depois da ultima injecção recebe 5 D. M. M. de toxina.

Resultado: viva por mais de 15 dias de observação.

Cobaya 368 — recebe 2 injecções de anatoxina, sendo a primeira de 1 c. c., e a segunda de 2 c. c., 5 dias após. Depois de 8 dias recebe 10 D. M. M. de toxina.

Resultado: viva por mais de 15 dias de observação.

Verifica-se que com 2 injecções (de 1 a 2 c. c. espaçadas de 5 dias) de anatoxina se proteja a cobaya contra 5 e 10 doses mortaes de toxina.

Identico resultado obtivemos com 3 doses de anatoxina, 1 c. c., 2 c. c., e 3 c. c., espaçadas de 5 a 7 dias, e a verificação da resistencia feita 10 dias depois da ultima injecção.

Resistencia das cobayas immunisadas com anatoxina, obtida de toxina velha + formalina, a um certo numero de D. M. M. de toxina.

Após a injecção de 1 só dose de anatoxina:

Cobaya 336 — injectada com 0,5 c. c. de anatoxina em 8-10-925. Em 23-10-925, recebe 5 D. M. M. de toxina.

Resultado: viva por mais de 20 dias de observações.

Cobaya 237 — injectada em 8-10-925 com 1 c. c. de anatoxina. Em 23-10-25 recebe 5 D. M. M. de toxina.

Resultado: viva por mais de 20 dias de observações.

Cobaya 400 — injectada em 8-10-25 com 2 c. c. de anatoxina. Em 23-10-25 recebe 5 D. M. M. de toxina.

Resultado: † a 5/6-11-25. Pela necropsia não se verifica signal algum de intoxicação diphtherica, sendo outra a causa da morte.

Uma só injecção, mesmo de 0,5 c. c., desta anatoxina protege a cobaya contra 5 D. M. M. de toxina.

A immunisaçao com 2 injecções de anatoxina deu o seguinte resultado:

Cobaya 499 — Primeira inoculação de 0,5 c. c. de anatoxina em 8-10-25; segunda inoculação de 1 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 5 D. M. M. de toxina.

Resultado: viva por mais de 20 dias de observação.

Cobaya 330 — Primeira inoculação de 0,5 c. c. em 8-10-25; 2.ª de 1 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 10 D. M. M..

Resultado: viva por mais de 20 dias de observações.

Cobaya 390 — Como a anterior e identico resultado.

Cobaya 447 — Primeira inoculação 0,5 c. c. em 8-10-25; segunda de 1 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 100 D. M. M. de toxina.

Resultado: viva por mais de 20 dias de observações.

Cobaya 464 — Primeira inoculação de 1 c. c. em 8-10-25; 2.ª de 2 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 5. D. M. M. de toxina.

Resultado: † 9 h. 17-11-25. Pela necropsia não se observam signaes de intoxicação diphterica, sendo outra a causa da morte.

Cobaya 206 — Primeira inoculação de 1 c. c. em 8-10-25; 2.ª de 2 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 10 D. M. M..

Resultado: viva por mais de 20 dias de observação.

Cobaya 352 — Primeira inoculação de 1 c. c. em 8-10-25; 2.ª de 2 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 100 D. M. M. de toxina.

Resultado: viva por mais de 20 dias de observação.

Verifica-se destes resultados que com duas injecções espaçadas de 20 dias, tanto de 0,5 e 1 c. c. como de 1 e 2 c. c. se protegem a cobaya até contra 100 D. M. M. de toxina.

Evidente é, pois, o valor immunisante da anatoxina.

Verificação de produção de anti-toxina.

Para esta verificação experimental empregamos o coelho, fazendo a verificação da presença de anti-toxina pelo methodo de Ehrlich, sempre mais seguro e rigoroso, embora impraticavel nas verificações de proporções minimas do anticorpo, só possiveis com os methodos intradermicos, como o de Roemer, porém menos rigorosos na sua interpretação. Eis o protocollo de um dos coelhos experimentados.

Coelho 143, com 1.530 gr. de peso.

Verificação da presença de anti-toxinas naturaes:

Sangria exploradora em 10-8-25. — Dosagem do sôro (10-8-25): Dosa — 0,5 u. i..

Não ha no sôro 0,5 u. i.. Provavelmente não o haveria de todo, visto como o pombo (1) inoculado para a verificação de 0,5 u. i. (com 2 c. c. de sôro) morreu em menos de 24 horas.

(1) Para a dosagem do sôro anti-diphtherico empregamos o pombo, em vez da cobaya, pela maior facilidade da sua obtenção e por termos confirmado verificações anteriores feitas em nosso Instituto (Dorival C. Penteado e J. B. Arantes e outros). Ha evidente vantagem na substituição da cobaya pelo pombo adulto para a dosagem do sôro anti-diphtherico, segundo o methodo de Ehrlich.

E' necessario, porém, que o L⁺ da toxina padrão seja determinado para o pombo; a diferença do L⁺ entre os 2 animaes é muito pequena, cerca de 0,03 c. c. a mais para o pombo.

Primeira injecção, sub-cutanea de 1 c. c. de anatoxina (preparada com toxina recente) em 10-8-25.

Dosagem do sôro em 14-8-25 (4 dias após) : Dosa — 0,5 u. i..

Segunda injecção de 2 c. c. de anatoxina em 14-8-25.

Dosagem do sôro em 19-8-25 (5 dias após) : Dosa — 0,5 u. i..

Terceira injecção de 5 c. c. de anatoxina em 19-8-25.

Dosagem do sôro em 29-8-25 (10 dias após) : Dosa — 0,5 u. i..

Após a 3.^a injecção o sôro apresenta 0,5 u. i. por c. c..

Quarta injecção de 10 c. c. de anatoxina em 29-8-25.

Dosagem do sôro em 9-9-25 (11 dias após) : Dosa: + 2 u. i. e — 5 u. i..

Verifica-se que o valor anti-toxico do sôro vai aumentando, apresentando após a 4.^a injecção mais de 2 u. i. por c. c.. Se as primeiras inoculações fossem mais espaçadas é possível que este resultado fosse attingido muito antes, com menor numero de inoculações.

Em outro coelho (n.^o 230, com 1400 grs. de peso) praticamos 3 inoculações de anatoxina (de 1, 2 e 5 c. c.), preparada com toxina velha, com 15 dias de intervallo entre cada uma. 15 dias após a ultima injecção o sôro apresenta mais de 1 u. i. por c. c..

Destas immunisações experimentaes fica evidente que a anatoxina preparada com formalina a 4% permanencia a 37.^o durante 30 dias, provoca a formação de antitoxina, em quantidade apreciavel, no coelho, após algumas inoculações.

Verificação, nas cobayas inoculadas com anatoxina, da presença de antitoxina em proporção capaz de conferir-lhes immunidade.

Kellogg-test.

Para a verificação da presença de antitoxina diphtherica no sôro dos animaes inoculados com as anatoxinas por nós preparadas, além da sua dosagem, segundo o methodo de Ehrlich, nos sôros dos coelhos immunisados, como vimos acima, mais demorada, exigindo maior quantidade de sôro para as proporções minimas de u. i. e por isto, de pratica mais difficult em cobayas, lançamos mão de um outro methodo, extremamente pratico e que nos dá indicações sobre a influencia immunisante do antigeno empregado.

O methodo de dosagem de Roemer ou a reacção de Schick poderiam dar as indicações desejadas, porém resolvemos empregar nestas verificações o methodo de Kellogg (intra-cutaneous guinea-pig test).

Este methodo de dosagem baseia-se no facto já estabelecido de que a presença no sangue de 1/30 u. i. protege o individuo contra a infecção diphtherica.

E' esta a proporção de u. i. que determina o Schick negativo.

Fizemos, nas cobayas immunisadas, a pesquisa segundo a technique de Kellogg, da presença desta proporção de antitoxina, capaz de conferir immunidade ao homem.

O mesmo deveria acontecer com os animaezinhos, quando immunisados, e se as testemunhas reagissem differentemente.

A reacção de Kellogg (¹) não apresenta as numerosas causas de erros que ás vezes difficultam a interpretação da reacção de Schick, visto como, para sua prática se emprega o soro a ser verificado e um animal intermediário, cuja sensibilidade em relação à diphtheria é sempre a mesma.

Um estudo mais detalhado sobre a técnica da reacção e seus resultados é assumpto de outro trabalho nosso que se encontra na pagina 137 deste volume, e confirma as observações de Kellogg (¹).

Diremos, em resumo, que a reacção consiste na injeccão intradermica, em uma cobaya, de uma mistura em partes iguais de sôro a se dosar e de uma diluição de toxina contendo 1/30 do L⁺ por c. c.; injecta-se 0,1 do sôro + 0,1 da diluição do L⁺, ficando a diluição deste de 1/300. Se o sôro tiver 1/30 de u. i., a quantidade injectada representará 1/300 de u. i., da mesma forma.

No caso da reacção negativa, nada se notará na zona de inoculação ou apenas vermelhidão sem necrose, indicando que a proporção de toxina livre foi neutralizada pela proporção correspondente de anti-toxina existente no sôro; na reacção positiva, a proporção de antitoxina livre no sôro, sendo menor que 1/30 de u. i. ou não existindo de todo, se notará no ponto de inoculação uma necrose, que aparece n 2.^o ou 3.^o dia.

Por este método fizemos as verificações da presença de, pelo menos, 1/30 de u. i., porção necessária para considerá-las immunizadas, nas cobayas inoculadas com diferentes doses das anatoxinas preparadas.

Daremos alguns exemplos destas verificações:

Cobaya 336 — inoculada com 0,5 de anatoxina. Sangria de 1 c. c., 12 dias após. Com o seu sôro é praticada a reacção de Kellogg, cujo resultado foi negativo, indicando sua immunidade.

Cobaya 237, inoculada com 1 c. c. de anatoxina e cobaya 400 inoculada com 2 c. c., sangradas no 12.^o dia, tiveram também o Kellogg test negativo. O mesmo resultado constatamos com as cobayas 499, 330, 390, 447, 464, 206 e 352, que haviam sofrido duas inoculações de anatoxinas (as 4 primeiras de 0, 5 e 1 c. c., com intervallo de 15 dias e as restantes de 1 e 2 c. c., com o mesmo intervallo), a reacção praticada 10 e 12 dias após a ultima inoculação.

As diversas cobayas normais, testemunhas, com cujos sôros se praticava a reacção e que não haviam recebido injeções de anatoxina, apresentavam sempre a reacção de Kellogg positiva, característica.

Só este facto serve de base para que se possa concluir da influencia immunisante da anatoxina, embora não se precise o grau e o limite da immunização obtida, o que em todo caso também foi verificado, como foi visto.

(¹) W. H. Kellogg — The intra-cutaneous guinea-pig test for human susceptibility and immunity to diphtheria. The J. of Am. Med. Ass. n.^o 11, vol. 80. 1923. pag. 748.

(²) W. H. Kellogg-Schould. The Schick test be abandoned? Am. J. of Public Health, n.^o 10. Vol. XV. 1925.

Discussão e conclusões.

A verificação das propriedades antigenicas da anatoxina diphtherica tem sido feita por todos os experimentadores que se dedicaram ao seu estudo.

No presente trabalho, ficaram tambem evidenciadas estas propriedades nas anatoxinas preparadas.

As verificações foram feitas quer pesquisando a resistencia das cobayas á inoculação de um certo numero de D. M. M. de toxina, quer dosando a antitoxina no sôro de coelhos immunisados e, por fim, pesquisando-se a presença de, pelo menos, 1/30 de u. i. no sôro das cobayas inoculadas com uma ou mais doses diversas.

Em conclusão, as anatoxinas preparadas nas condições indicadas apresentam evidentes propriedades antigenicas, verificadas em animaes de laboratorio.

III. DOSAGEM E VERIFICAÇÃO DO PODER ANTIGENICO

Não se deve, em rigor, fixar um limite de tempo de permanência a 37.^o para que a toxina juntada de formalina, se transforme em anatoxina utilizavel na pratica.

Vimos que este periodo é variavel por condições inherentes á composição do caldo de cultura e da propria toxina.

Um periodo de 30 a 40 dias é, em geral, sufficiente para aquelle desideratum, sempre que utilizamos toxinas recentes preparadas com caldo fermentado pelo bacillo coli communior.

Um elevado poder toxicoo da toxina, uma vez que não esteja em relação com o seu valor antigenico é desnecessario. As D. M. M. das toxinas usadas variavam sempre entre 0,0025 e 0,0016 de c. c., e as anatoxinas com ellas preparadas evidenciaram intactas suas propriedades antigenicas.

Em virtude mesmo da possibilidade de variações nas suas propriedades é que é necessario e indispensavel verificar, além da atoxidez de cada partida de anatoxina preparada, principalmente para fins prophylacticos, tambem o seu valor antigenico.

Para a antitoxina, nos encontramos perfeitamente apparelhados e com methodos mais ou menos seguros pelos quaes se indicará seu poder curativo expresso em unidades antitoxicas.

De maior necessidade se torna a verificação de um producto que vae servir, não para remediar o mal declarado, porém para prevenir os individuos que lhe são sujeitos.

Só assim o seu emprego, inspirando confiança, se generalisará.

O poder antigenico das toxinas é variavel, por inumeras circumstancias; o mesmo se poderá dizer das anatoxinas, que dellas provêm.

Dosagem *in vitro*. Floculação.

A dosagem do poder antigenico de uma anatoxina, expressa em unidades antitoxicas, proposta por G. Ramon, apresenta as mesmas vantagens e desvantagens do metodo proposto por este autor para a dosagem da antitoxina. Baseia-se na floculação da anatoxina em presença de um sôro anti-toxico.

Se apresenta algumas vantagens sobre o ponto de vista economico e facilidade da sua pratica, por ser uma dosagem *in vitro*, apresenta tambem os inconvenientes de uma reacção baseada em phenomenos de ordem physico-chimica, variaveis por inumeras circumstancias.

Estas considerações se originaram dos resultados por nós obtidos em grande numero de dosagens de antitoxinas diphterica e tetanica que praticamos comparativamente com os methodos de dosagem de Ehrlich e de Rosenau e Anderson e que concordam com os obtidos por numerosos autores.

Verificamos para um mesmo sôro a variabilidade dos resultados da dosagem, pela sua simples permanencia em dias seguidos na gel-

deira. São as condições physio-chimicas, reacção, etc., variando com o tempo e outros factores, que modificam o phénomeno da floculação, embora fosse sempre a mesma a toxina utilizada para a reacção.

Quanto a anatoxina, verificamos com diversas partidas, a sua floculação em presença da antitoxina, embora de menor intensidade e mais tardivamente tanto nas reacções praticadas a 37.^o como na temperatura de 55.^o, em banho-maria.

Verificação do poder antigenico *in vivo*.

Sendo discutivel o facto de que pelo seu poder floculante se possa medir o valor antigenico de uma anatoxina, propomos um methodo de verificação *in vivo*.

Com este methodo se poderá evidenciar de um modo seguro o poder antigenico de uma anatoxina, embora não se possa precisar o valor deste poder. Se verificará a qualidade, embora não se indique a quantidade.

Para fins praticos, é o bastante, uma vez que esta qualidade se manifeste sob certas condições.

Este methodo de verificação do poder antigenico da anatoxina consiste na inoculação, em cobayas de 250 grammas de peso, das duas primeiras doses de anatoxina utilizada na vaccinação, de 0,5 e 1 c. c. com 15 a 20 dias de intervallo e na pratica da reacção de Kellogg, com sôro dos animaes inoculados, no fim de igual numero de dias.

As anatoxinas que nestas doses tornem o Kellogg negativo nas cobayas inoculadas, apresenta sufficiente poder antigenico para a sua utilização na pratica.

A verificação tambem pôde ser feita com o sôro da cobaya inoculada com 5 c. c., com o fim de se verificar a atoxidez da anatoxina depois de sua permanencia na estufa e que permanece viva por mais de 15 dias de observação.

Nas anatoxinas com sufficiente poder antigenico, esta dose, em uma só injecção, provoca o Kellogg negativo, da mesma forma que as duas doses assinaladas.

Quando esta unica dose de 5 c. c. ou as duas doses de 0,5 e 1 c. c. não modificam o resultado da reacção de Kellogg, que continua positiva, a anatoxina é destituída do necessário poder antigenico para sua utilização pratica.

Contra este processo seguro, pois que é praticado *in vivo*, utilizando-se um animal intermediario, sensivel, se poderá dizer que é demorado.

Este facto não o desvaloriza, embora não o seja quando se o practica com a cobaya utilizada para a verificação da atoxidez da anatoxina. Além disto, sabemos que as propriedades da anatoxina não se alteram facilmente com o tempo, podendo o producto esperar, até com vantagem, o resultado da verificação, antes de ser entregue aos serviços de prophylaxia.

Para mostrar sua marcha, indicaremos duas verificações praticadas segundo o methodo:

Anatoxina 18 a — (preparada com toxina de 6 meses mais formalina a 4 %, estufa a 37.^o durante 13 dias).

a) Verificação da atoxidez: Cobaya 16, com 250,0 gr. inoculada em 2-12-25, com 5 c. c..

Resultado: Viva durante 15 dias de observação (reacção local intensa).

b) Verificação do poder antigenico: 1.^o na cobaya 16 sangrada em 17-12-25. Kellogg test praticado com seu sôro: cobaya 131, lado esquerdo.

Resultado: negativo (immunisada).

2.^o Após duas inoculações na cobaya 426:

a 1.^a, de 0,5 em 2-12-25,

a 2.^a de 1 c. c. em 17-12-25. (')

Kellogg test praticado com seu sôro em 4-1-26. Cobaya 253, lado esquerdo.

Resultado: negativo (immunisada).

Anatoxina 31 — (preparada com toxina recente mais formalina a 4 °/oo, estufa a 37.^o durante 32 dias.

a) Verificação da atoxidez: cobaya 240 com 250 gr. inoculada em 6-2-926 com 5 c. c..

Resultado: viva após 18 dias de observação.

b) Verificação do poder antigenico:

1.^o na cobaya 240, sangrada em 20-2-26.

Kellogg test praticado com o seu sôro: cobaya 303, lado esquerdo.

Resultado: negativo (immunisada).

2.^o Após duas inoculações, na cobaya 75, com 250 grs. a 1.^a de 0,5 c. c., em 6-2-26; a 2.^a de 1 c. c. em 20-2-26 ("').

Kellogg test praticado com o seu sôro em 9-3-26: cobaya 161, lado direito.

Resultado: negativo (immunisada).

Todas as partidas de anatoxina eram submettidas, antes do seu emprego quer para a immunisaçao de cavalos para a producção de antitoxina, quer para uso prophylactico, á mesma verificação, e seriam desprezadas, o que não nos aconteceu até agora, as em que o Kellogg teste se mantinha (como em cobayas normaes) positivo após uma inoculação de 5 c. c. ou duas de 0,5 e 1 c. c. de anatoxina, segundo o modo indicado.

(') Após a primeira injecção, antes de se praticar a segunda a cobaya é sangrada no coração em 1 c. c. de sangue. Com o sôro se praticou o Kellogg test (cobaya 131, lado direito) que foi negativo, mostrando que a immunidade ocorreu após a 1.^a injecção de 0,5 c. c. de anatoxina.

("") Antes de praticar a segunda injecção esta cobaya tambem foi sangrada no coração em 1 c. c. de sangue. Com o seu sôro praticou-se o Kellogg test (cobaya 303 lado direito) que deu resultado positivo, indicando que ainda não se achava immunisada após a 1.^a injecção de 0,5 c. c.

Discussão e conclusões.

G. Ramon ('') indica como método de dosagem do poder antigenico de uma anatoxina a reacção de flocação, tomando por base um sôro padrão e exprime este valor em "unidades antigenicas ou anatoxicas representadas pelo numero de unidades anti-toxicas capazes de saturar, *in vitro*, 1 c. c. de anatoxina, isto é, capazes de fazer aparecer neste c. c. a flocação inicial".

Assignala este autor a regularidade e precisão e a superioridade de uma reacção physico-chimica sobre um processo biológico, variável por diferenças individuais dos animais experimentados.

Embora não se desconheça estas variações de um processo biológico, o mesmo se poderá dizer de um processo physico-chímico.

Ionescu-Mihaesti e Dambovicioanu (''), mostraram a influência da reacção do meio sobre a neutralização da toxina diphtherica pela anti-toxina correspondente e pesquisaram (confirmando experiências antigas de Morgenroth e Calmette e recentes de Porter) os limites exactos de concentração em ions H entre os quais a antitoxina pode agir em presença da toxina correspondente e a neutralizar.

Plotz e Schoen ('') mostram as mudanças das reacções dos sôros mantidas em diferentes condições.

Verificaram que o sôro normal de cavalo conservado a 37.^o torna-se cada vez mais alcalino nos dias seguintes e que esta alcalinidade progride até atingir um maximo, onde se mantém com ligeiras variações; com sôros conservados a 0.^o esta variação é pouco accentuada, conservado a 16.^o — 18.^o o aumento de Ph é muito mais sensível e a marcha da alcalisação mais rápida.

Mostram ainda que estas mudanças são influenciadas também pela superfície do sôro em contacto com o ar, sendo que a alcalinização é mais rápida quanto maior for a superfície do contacto; além disto a altura da coluna do sôro no tubo influencia. Os autores explicam o caso por uma decomposição dos carbonatos do sôro e um desprendimento de gás carbônico. Nos tubos fechados a lampada, o contrário verificaram, isto é uma tendência a acidificação.

Estas variações physico-chímicas dos sôros podem explicar as diferenças de resultados em reacções sôro-lógicas decorrentes de fenômeno da mesma natureza.

Verificamos também as mudanças de resultados com a flocação da toxina e sôros anti-diphtericos, de sangrias exploradoras, praticada em dias seguidos de permanência do sôro na geladeira, como vimos.

Assim sendo, causas diversas também influem nos resultados das reacções baseadas em fenômenos physico-chímicos. Este facto como os para as reacções biológicas, não diminuem o valor do método de Ramon, sempre que as condições experimentais sejam idênticas, para a dosagem da antitoxina.

Para a anatoxina, porém, tomando um sôro *in natura* como pa-

(') G. Ramon — Annales de l'Institut Pasteur — n.º 1 T. XXXIX. 1925.

(") C. Ionescu-Mihaesti e Dambovicioanu. C. R. Soc. Biol. n.º 25. T. XCI. 1924.

("") Harry Plotz e M. Schoen — Annales de l'Inst. Pasteur. n.º 10 T. XXXVIII. 1924.

drão, e podendo as condições physico-chimicas deste variarem, desde que não se encontre em condições que o evitem (como nos sôros padrões para a dosagem *in vivo* da antitoxina) o mesmo não acontece.

Estes motivos explicam, no estudo da reacção da floculação, ao lado dos resultados mais ou menos semelhantes aos de Ramon, obtidos por Schmidt (1), Renaux (2), Scholz (3), Stanhope Bayne-Jones (4) e outros, as divergências maiores notadas por outros pesquisadores, como Sordelli e Serpa (5), Carvalho Lima (6), Moloney e Beecher (7), Gleny e Okell (8), Gleny, Pope, Waddington e Wallace (9) e outros.

Moloney e Beecher pensam que a unidade anatoxica ou antigenica creada por G. Ramon não representa o valor antigenico do toxoide (anatoxina), visto como este valor não é constante para o mesmo toxoide, dependendo do sôro usado para a sua determinação. Isto porque o tubo de floculação inicial, como verificaram, não representa de facto a mistura neutralizada, concluindo que "ha uma pequena evidencia de qualquer relação precisa entre o poder de floculação de um toxoide e seu valor antigenico". Mostram a identidade do phénomeno da floculação com o da agglutinação e que um sôro agglutinante anti-diphtherico (não contendo anti-toxina) reunido á toxina, apresenta tambem o phénomeno e acham que a floculação pode ser devida a um antígeno e anticorpo outros que a toxina e antitoxina, sendo que esta reacção é alterada quantitativamente por outras substancias existentes no caldo filtrado ou no sôro (coloides não específicos, agglutininas, etc.).

O methodo de dosagem da antitoxina pela floculação, proposto por G. Ramon é de incontestável valor, podendo nos dar indicações sobre a "avidez" de um sôro, segundo um recente trabalho de Madsen e Schmidt (') que seria tanto maior quanto menor fôr o tempo de floculação e estaria em relação com o valor curativo do sôro, servindo ainda para nos orientar quanto á marcha de uma immunisaçao experimental, não se devendo, porém, dispensar, para as dosagens definitivas e para os sôros entregues ao consumo, a verificação *in vivo*, pelo methodo oficialmente adoptado.

Por todas as considerações feitas é que procuramos fazer, também por um methodo biológico as verificações do poder antigenico da anatoxina.

- (1) S. Schmidt — C. R. Soc. Biol. n.º 15 T. CX — 1924.
- (2) E. Renaux — C. R. Soc. Biol. n.º 20 T. LXXXIX — 1923.
- (3) W. Scholz — Central f. Bakt. T. XCI — 1923.
- (4) Stanhope Bayne-Jones — The J. of Immunology n.º 6 T. IX — 1924.
- (5) A. Sordelli e Serpa — C. R. Soc. Biol. n.º 31 T. XCI — 1924.
- (6) Carvalho Lima — Annaes Paulistas de Med. e Cir. n.º 2 Vol. XV — 1924.
- (7) P. J. Moloney and C. Beecher — The J. of Path. and Bact. n.º 4 T. XXVIII — 1925.
- (8) A. T. Gleny e Okell — The J. of Pathology and Bacteriology T. XXVII — 1924.
- (9) A. T. Gleny, C. G. Pope, H. Waddington e U. Wallace — The J. of Path. and Bact. n.º 3 — T. XXVIII — 1925.

(') Th. Madsen e S. Schmidt — Sur l'avidité du serum anti-diphérique. — Annales de l'Institut Pasteur, n.º 4 T. XL — 1926.

Em conclusão, o methodo descripto consiste na inoculação de uma só ou de duas doses menores (0,5 e 1 c. c. espaçadas de 15 dias) de anatoxina em cobayas e 250 grs. de peso, verificando, tambem 15 dias após a presença de, pelo menos de 1/30 de u. i. no sôro, por meio da reacção intra-cutanea de Kellogg. Esta reacção, para a qual se emprega uma diluição do L_½ e não da D. M. M. (como para o Schick test), praticada em animal intermediario, de sensibilidade sempre igual, apresenta o desejado rigor, nos fornecendo indicações seguras sobre o poder antigenico, embora sómente qualitativamente, da anatoxina.

**IV. EMPREGO NA PRODUÇÃO DE ANTI-TOXINA
DIPHTERICA. (1)**

De posse de todos estes resultados experimentaes e entusiasmados com os brilhantes resultados obtidos pelo illustre bactereologista do Instituto Pasteur (""), resolvemos iniciar a immunisaçao de cavallos, com as anatoxinas por nós preparadas, para a produçao de anti-toxina diphterica.

Para confirmar seus resultados, seguimos, na pratica da immunisaçao, um dos protocollos indicados por G. Ramon.

Os resultados que obtivemos foram tambem os mais animadores.

Para melhor evidencial-os, transcrevemos os protocollos dos 11 animaes immunisados e faremos, por fim, um estudo comparativo dos resultados obtidos com igual numero de animaes immunisados pelo methodo que commumente usamos.

Nestes protocollos assignalamos as temperaturas dos animaes, obtidas na vespera e no dia seguinte á injecção. A dosagem do sôro foi sempre praticada segundo o methodo de Ehrlich e para concluirmos do valor anti-toxico definitivo do sôro nos guiamos pelo resultado da ultima dosagem, praticada no 10.^o dia após a ultima injecção de anatoxina e quando em condições de soffrer a sangria definitiva.

Eis os protocollos das immunisações praticadas:

I — CAVALLO N. 23 | *Idade: 8 annos.*
| *Procedencia: Nacional (Haras Paulista).*

ANNO 1926	INOCULAÇÃO		SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
	Mez	Dia		M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,5	57,8	570	Dosa — 1 u.
"	9	—	—	58,2	58,1	—	a. (ant. da im.)
"	10	—	—	57,5	57,6	—	
"	11	10 c. c. anatoxina 28	—	57,4	57,9	580	
"	12	—	—	57,0	57,8	570	
"	14	—	—	57,5	58,1	569	
"	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,5	58,1	569	dosa — 1 u. a.
"	16	—	—	58,0	57,9	—	
"	17	—	—	57,1	57,6	—	
"	18	50 c. c. anatoxina 28	—	57,2	58,0	569	
"	19	—	—	58,1	57,8	567	

(1) Esta parte do trabalho foi communicada á 4.^a Conferencia Sul Americana de Microbiologia e Hygiene, reunida em Buenos Aires, em Julho do corrente anno.

(") G. Ramon. Sur l'anatoxine diphtherique et sur les anatoxines en general. Annales de l'Institut Pasteur, n.^o 1 T. XXXIX. 1925.

(Continuação)

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
Mez	Dia			M.	T.		
Janeiro	21	—	—	38,5	37,5	365	
"	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,5	37,9	370	Dosa + 1 ua.
"	23	—	—	39,0	38,6		
"	28	—	—	37,7	37,0	—	
"	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	38,1	356	dosa + 100 u
"	30	—	—	38,4	38,6	—	
Fevereiro	4	—	—	37,5	37,9	357	
"	5	200 c. c. anatoxina 50	Exploradora	37,5	38,0	353	dosa + 400 u
"	6	—	—	38,5	38,5	—	
"	9	—	—	37,6	38,0	—	
"	10	250 c. c. anatoxina 50	Exploradora	37,9	38,0	—	dosa 500 u. a.
"	11	—	—	37,4	38,5	357	
"	14	—	—	38,1	38,8	—	
"	15	300 c. c. anatoxina 51	Exploradora	38,0	38,8	356	dosa 500 u. a
"	16	—	—	38,6	38,9	—	
"	24	—	—	37,2	37,6	—	
"	25	1 ^a sangria definitiva	5 litros	37,5	37,8	357	dosa 400 u. a.

II — CAVALLO N. 29 *{ Idade: 5 annos.
Procedencia: Nacional (Haras Paulista)}*

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
Mez	Dia			M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	38,5	37,9	360	dosa — 1 u. a. (antes imm.).
"	9	—	—	38,1	38,4	—	—
"	10	—	—	38,0	38,1	—	—
"	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,9	38,0	358	—
"	12	—	—	38,1	38,5	354	—
"	14	—	—	39,8	38,4	349	—
"	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,9	38,5	359	dosa — 1 u. a.
"	16	—	—	38,1	37,8	—	—
"	17	—	—	37,4	37,9	—	—
"	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,8	38,4	359	—
"	19	—	—	38,1	38,5	356	—
"	21	—	—	38,1	38,0	356	—
"	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,5	360	dosa + 1 u. a.
"	25	—	—	38,4	38,6	—	—
"	28	—	—	37,6	38,0	—	—
"	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,5	360	dosa + 10 u. a. e — 100 u. a.
"	30	—	—	38,1	38,6	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,6	38,0	350	—
"	5	200 c. c. anatoxina 50	Exploradora	37,8	37,9	349	dosa 400 u. a.
"	6	—	—	38,5	39,4	—	—
"	9	—	—	38,0	38,7	—	—
"	10	250 c. c. anatoxina 50	Exploradora	38,0	38,4	362	dosa 500 u. a.
"	11	—	—	38,3	39,5	359	—
"	14	—	—	37,6	37,9	—	—
"	15	300 c. c. anatoxina 51	Exploradora	37,2	39,6	355	dosa + 600 u.
"	16	—	—	39,0	39,5	—	—
"	24	—	—	37,4	37,9	—	—
"	25	1 ^a sangria definitiva	5 litros	37,6	38,4	357	dosa 700 u. a.

III — CAVALLO N. 30 { *Idade: 5 annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista)

ANNO 1926	Mez	Dia	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
					M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,5	57,9	560	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).	
"	9	—	—	58,1	58,1	—	—	
"	10	—	—	58,0	58,1	—	—	
"	11	10 c. c. anatoxina 28	—	57,6	57,9	555	—	
"	12	—	—	58,4	58,5	552	—	
"	14	—	—	57,6	58,0	545	—	
"	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,8	58,0	549	Dosa—1 u. a.	
"	16	—	—	58,1	58,3	—	—	
"	17	—	—	57,8	58,0	—	—	
"	18	50 c. c. anatoxina 28	—	57,8	58,3	551	—	
"	19	—	—	58,5	58,1	550	—	
"	21	—	—	57,5	57,8	549	—	
"	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,8	58,0	560	Dosa—1 u. a.	
"	25	—	—	58,4	59,0	—	—	
"	28	—	—	57,5	57,4	557	—	
"	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,9	58,1	557	Dosa+10 u.. a. e — 100 ua	
"	30	—	—	58,0	58,6	—	—	
Fevereiro	4	—	—	57,5	57,7	554	—	
"	5	200 c. c. anatoxina 50	Exploradora	57,4	57,8	549	dosa 500 u. a.	
"	6	—	—	58,4	58,5	—	—	
"	9	—	—	57,6	57,9	—	—	
"	10	250 c. c. anatoxina 50	Exploradora	57,8	57,9	562	dosa—500 ua	
"	11	—	—	58,1	58,6	550	—	
"	14	—	—	57,6	57,8	—	—	
"	15	300 c. c. anatoxina 51	Exploradora	57,8	59,0	—	dosa 300 u. a.	
"	16	—	—	58,5	59,0	542	—	
"	24	—	—	57,6	57,8	—	—	
"	25	1 ^a sangria definitiva	5 litros	57,8	58,5	550	dosa 300 u. a.	

IV — CAVALLO N. 31 { *Idade: 4 annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926	Mez	Dia	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
					M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	57,8	350	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).	
"	9	—	—	58,1	58,3	—	—	
"	10	—	—	57,8	58,0	—	—	
"	11	10 c. c. anatoxina 28	—	57,6	57,8	340	—	
"	12	—	—	58,3	57,8	333	—	
"	14	—	—	58,1	58,5	333	—	
"	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,8	57,8	340	dosa—1 u. a.	
"	16	—	—	58,2	58,2	—	—	
"	17	—	—	58,1	58,2	—	—	
"	18	50 c. c. anatoxina 28	—	57,8	58,1	350	—	
"	19	—	—	58,1	58,5	333	—	
"	21	—	—	58,0	58,6	335	—	
"	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,8	58,2	340	dosa+1 u. a.	
"	25	—	—	58,6	59,1	—	—	

(Continuação)

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
Mez	Dia			M.	T.		
Janeiro	28	—	—	38,0	38,6	—	—
	29	150 cc. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,0	540	Dosa + 100 ua.
	30	—	—	38,5	39,1	—	—
Fevereiro	4	—	—	38,1	37,8	537	—
	5	200 anatoxina 30 c. c.	Exploradora	38,1	38,8	—	dosa + 800 ua
	6	—	—	38,7	39,5	—	—
	9	—	—	38,0	37,5	536	—
	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	38,0	37,8	536	dosa 900 u. a.
	11	—	—	39,0	39,9	530	—
	14	—	—	38,1	38,5	—	—
	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,6	38,9	—	dosa — 900 u
	16	—	—	38,5	38,9	547	—
	24	—	—	37,8	38,0	—	—
	25	1 ^a sangria definitiva	5 litros	37,9	38,5	530	dosa 500 u. a

V -- CAVALLO N. 37 { *Idade: 5 annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
Mez	Dia			M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,0	379	Dosa — 1 u. a. (ant. da im.).
	8	—	—	38,5	38,0	—	—
	10	—	—	37,8	38,0	—	—
	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,6	37,9	565	—
	12	—	—	37,8	37,9	558	—
	14	—	—	37,8	37,3	555	—
	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,1	559	dosa — 1 u. a.
	16	—	—	38,2	38,0	—	—
	17	—	—	37,9	37,8	—	—
	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,4	38,4	563	—
	19	—	—	38,5	38,5	556	—
	21	—	—	37,6	38,4	559	—
Fevereiro	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	38,0	38,0	367	dosa + 1 u. a.
	25	—	—	38,1	39,5	—	—
	28	—	—	37,7	38,1	—	—
	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,5	560	dosa + 100 u
	30	—	—	38,4	38,9	—	—
	4	—	—	38,1	37,4	560	—
	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,6	38,3	559	dosa 400 u. a.
	6	—	—	38,8	38,6	—	—
	9	—	—	37,9	38,8	570	—
	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,7	38,0	561	dosa + 600 u
	11	—	—	38,6	38,8	569	—
	14	—	—	37,6	37,8	—	—
	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,8	39,4	—	dosa 700 u. a.
	16	—	—	38,2	38,1	541	—
	24	—	—	37,6	37,9	—	—
	25	1 ^a sangria definitiva	5 litros	37,5	38,5	550	dosa 450 u. a.

VI — CAVALLO N. 38 { *Idade: 4 ½ annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926	Mez	Dia	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
					M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	57,8	500	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).	
"	9	—	—	58,2	58,5	—	—	
"	10	—	—	58,0	58,1	—	—	
"	11	10 c. c. anatoxina 28	—	57,5	57,6	500	—	
"	12	—	—	57,8	57,9	500	—	
"	14	—	—	58,0	57,6	—	—	
"	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	57,9	290	dosa—1 u. a.	
"	16	—	—	58,1	58,5	—	—	
"	17	—	—	57,8	58,3	—	—	
"	18	50 c. c. anatoxina 28	—	57,8	58,0	299	—	
"	19	—	—	57,8	58,3	305	—	
"	21	—	—	58,0	58,2	515	—	
"	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,5	57,9	503	dosa—1 u. a.	
"	25	—	—	59,0	58,6	—	—	
"	28	—	—	57,6	57,8	—	—	
"	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	58,3	510	dosa +5 e — 100 u. a.	
"	50	—	—	58,5	58,6	—	—	
Fevereiro	4	—	—	57,6	58,4	500	—	
"	5	200 c. c. anatoxina 50	Exploradora	58,0	58,1	510	dosa—100 u. a.	
"	6	—	—	58,6	58,8	—	—	
"	9	—	—	57,8	57,9	—	—	
"	10	250 c. c. anatoxina 50	Exploradora	57,6	57,9	509	dosa—100 u.	
"	11	—	—	58,5	58,6	500	—	
"	14	—	—	57,6	57,8	—	—	
"	15	500 c. c. anatoxina 51	Exploradora	57,8	59,0	—	dosa—100 u.	
"	16	—	—	58,4	58,5	290	—	
"	24	—	—	58,0	57,9	—	—	
"	25	—	Exploradora	57,6	58,3	299	dosa 80 u. a.	

VII — CAVALLO N. 39 { *Idade: 4 ½ annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926	Mez	Dia	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
					M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	57,9	565	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).	
"	9	—	—	57,6	57,9	565	—	
"	10	—	—	57,8	58,1	—	—	
"	11	10 c. c. anatoxina 28	—	57,7	58,4	—	—	
"	12	—	—	57,8	58,0	551	—	
"	14	—	—	58,1	58,4	552	—	
"	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	57,6	550	dosa—1 u. a.	
"	16	—	—	58,0	57,8	—	—	
"	17	—	—	58,0	58,1	—	—	
"	18	50 c. c. anatoxina 28	—	57,7	58,3	550	—	
"	19	—	—	57,9	58,0	545	—	
"	21	—	—	58,0	58,0	555	—	
"	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	57,6	560	dosa +1 u. a.	
"	25	—	—	58,5	58,5	—	—	

(Continuação)

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
Mez	Dia			M.	T.		
Janeiro	28	—	—	57,6	57,8	—	—
	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,7	58,1	565	dosa +10 e — 100 u. a.
Fevereiro	50	—	—	58,4	58,4	—	—
	4	—	—	57,6	57,8	561	—
" 5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	57,9	58,0	370	dosa 100 u. a.	
	6	—	—	58,5	58,4	—	—
" 9	—	—	—	57,6	57,8	560	—
	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	57,6	58,0	372	dosa 500 u. a.
" 11	—	—	—	58,6	58,7	370	—
	14	—	—	58,0	58,0	—	—
" 15	300 c. c. anatoxina 30	Exploradora	57,8	59,6	—	dosa +600 u.a.	
	16	—	—	58,5	59,1	562	—
" 24	—	—	—	57,8	57,9	—	—
	25	1 ^a sangria definitiva	5 litros	57,8	58,6	559	Dosa 1000 u. a,

VIII — CAVALLO N. 40 { *Idade: 4 ½ annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
Mez	Dia			M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,4	57,6	290	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).
	9	—	—	58,0	58,4	—	—
" 9	—	—	—	58,0	58,1	—	—
	11	10 c. c. anatoxina 28	—	57,6	57,9	297	—
" 12	—	—	—	58,1	58,0	290	—
	14	—	—	57,5	57,8	290	—
" 15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,8	59,5	289	dosa—1 u. a.	
	16	—	—	58,0	58,5	—	—
" 17	—	—	—	57,5	57,8	—	—
	18	50 c. c. anatoxina 28	—	57,9	58,4	290	—
" 19	—	—	—	58,6	58,5	290	—
	21	—	—	57,6	57,6	290	—
" 22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,8	58,0	290	dosa +1 u. a.	
	25	—	—	58,4	58,8	—	—
" 28	—	—	—	57,4	57,6	—	—
	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	58,1	—	dosa +10 e — 100 u. a.
Fevereiro	30	—	—	59,0	58,6	—	—
	4	—	—	57,6	57,8	—	—
" 5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	58,1	58,3	290	dosa 400 u. a.	
	6	—	—	58,6	58,1	—	—
" 9	—	—	—	57,5	57,6	—	—
	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	57,5	58,0	272	dosa—400 u. a.
" 11	—	—	—	58,5	59,9	289	—
	14	—	—	57,8	58,0	—	—
" 15	300 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,8	59,5	—	dosa +400 u. a.	
	16	—	—	58,8	59,5	—	—
" 24	—	—	—	57,6	57,7	—	—
	25	1 ^a sangria definitiva	4 litros	57,4	58,2	280	dosa 500 u. a.

IX — CAVALLO N. 41 { *Idade: 5 ½ annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
			M.	T.		
Mez	Dia					
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,0	276
"	9	—	—	38,1	38,4	—
"	10	—	—	37,7	38,4	—
"	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,8	38,0	285
"	12	—	—	38,0	38,2	272
"	14	—	—	37,4	37,6	286
"	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,7	38,8	280
"	16	—	—	38,2	38,0	dosa 1 u. a
"	17	—	—	37,6	38,5	—
"	18	50 c. c. anatoxina 28	—	38,8	38,8	280
"	19	—	—	38,5	38,1	285
"	21	—	—	38,0	37,8	282
"	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,4	290
"	25	—	—	38,4	38,5	—
"	28	—	—	37,6	38,0	—
"	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,1	294
"	30	—	—	38,0	38,4	Dosa +10 e — 100 u. a.
Fevereiro	4	—	—	37,6	38,1	287
"	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,5	38,0	dosa 400 u. a.
"	6	—	—	38,5	38,4	—
"	9	—	—	37,4	37,6	295
"	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,5	38,0	dosa 500 u. a.
"	11	—	—	38,0	38,0	285
"	14	—	—	37,5	37,6	280
"	15	500 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,6	39,4	dosa 400 u. a.
"	16	—	—	38,4	38,4	—
"	24	—	—	37,6	37,8	—
"	25	1ª sangria definitiva	4 litros	37,3	38,0	279
						dosa 500 u. a.

X — CAVALLO N. 42 { *Idade: 3 ½ annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
			M.	T.		
Mez	Dia					
Janeiro	8	5 c.c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	37,8	521
"	9	—	—	38,0	38,5	Dosa 1 u. a. (ant. da im.).
"	10	—	—	37,8	37,8	—
"	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,4	37,6	529
"	12	—	—	38,5	37,6	512
"	14	"	—	37,6	37,9	518
"	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	38,5	516
"	16	—	—	38,1	38,8	dosa 1 u. a.
"	17	—	—	37,9	38,0	—
"	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,5	38,1	594
"	19	—	—	37,6	38,1	519
"	21	—	—	38,5	38,5	515
"	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	37,6	519
"	25	—	—	38,1	39,1	—

(Continuação)

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
Mez	Dia			M.	T.		
Janeiro	28	—	—	58,0	58,1	—	—
	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,4	58,0	517	dosa—1 u. a.
	30	—	—	58,1	58,8	—	—
Fevereiro	4	—	—	57,4	57,8	510	—
	5	200 c. c. anatoxina 50	Exploradora	57,7	58,2	520	dosa—10 u. a.
	6	—	—	58,4	58,7	—	—
	9	—	—	57,4	57,6	—	—
	10	250 c. c. anatoxina 50	Exploradora	57,6	58,2	527	Dosa 5 u. a.
	11	—	—	58,1	58,5	520	—
	14	—	—	57,6	57,8	—	—
	15	500 c. c. anatoxina 51	Exploradora	57,8	59,5	—	Dosa—10 u. a.
	16	—	—	58,6	58,5	—	—
	24	—	—	57,5	57,8	—	—
	25	—	Exploradora	57,8	58,1	290	Dosa 8 u. a.

XI — CAVALLO N. 43 { *Idade: 5 annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso kilos	Observações
Mez	Dia			M.	T.		
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,6	58,0	508	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).
	9	—	—	58,2	58,4	—	—
	10	—	—	57,4	58,1	—	—
	11	10 c. c. anatoxina 28	—	57,4	57,6	515	—
	12	—	—	57,8	58,5	510	—
	14	—	—	57,8	58,0	515	—
	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,5	58,1	518	Dosa—1 u. a.
	16	—	—	58,2	58,0	—	—
	17	—	—	58,2	58,4	—	—
	18	50 c. c. anatoxina 28	—	57,5	58,5	519	—
	19	—	—	58,1	58,5	507	—
	21	—	—	57,6	58,0	515	—
	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,5	57,8	516	dosa—1 u. a.
	25	—	—	58,3	58,5	—	—
	28	—	—	58,0	57,6	—	—
	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	57,5	58,1	520	dosa + 5 e — 100 u. a.
	30	—	—	58,5	58,8	—	—
Fevereiro	4	—	—	57,6	58,4	514	—
	5	200 c. c. anatoxina 50	Exploradora	57,9	58,0	520	dosa—100 u. a.
	6	—	—	58,4	58,5	—	—
	9	—	—	57,6	57,8	515	—
	10	250 c. c. anatoxina 50	Exploradora	57,9	58,4	520	Dosa + 100 ua
	11	—	—	58,3	58,5	520	—
	14	—	—	57,6	57,8	"	—
	15	500 c. c. anatoxina 51	Exploradora	57,6	59,5	—	dosa 150 u. a.
	16	—	—	58,5	58,5	—	—
	24	—	—	57,6	57,8	—	—
	25	—	Exploradora	57,8	58,1	590	dosa 150 u. a.

Resumindo, os resultados obtidos com a immunisaçāo de cavalos pela anatoxina foram os seguintes:

Cavallo N. 23 — Idade 8 annos — Nacional — Dosou 400 u. i. por cc.

»	»	29	»	5	»	»	700 u. i.	»	»
»	»	30	»	5	»	»	300 u. i.	»	»
»	»	31	»	4	»	»	500 u. i.	»	»
»	»	37	»	5	»	»	450 u. i.	»	»
»	»	38	»	4 $\frac{1}{2}$	»	»	80 u. i.	»	»
»	»	39	»	4 $\frac{1}{2}$	»	»	1000 u. i.	»	»
»	»	40	»	4 $\frac{1}{2}$	»	»	500 u. i.	»	»
»	»	41	»	5 $\frac{1}{2}$	»	»	300 u. i.	»	»
»	»	42	»	3 $\frac{1}{2}$	»	»	8 u. i.	»	»
»	»	43	»	5	»	»	150 u. i.	»	»

Este resultado corresponde a uma média de 398,9 unidades antitoxicas por c. c. de sôro.

Ainda se verifica que:

Dosam menos de 100 u. i. : 2	— 18,1 %
» entre 100 e 300 u. i. : 3	— 27,2 %
» » 300 e 500 u. i. : 4	— 36,3 %
» » 500 e 800 u. i. : 1	— 9,0 %
» » 800 e 1000 u. i. : 1	— 9,0 %
» acima de 1000 u. i. : 0	— —

A duração da immunisaçāo (até a ultima injecção praticada) foi de 38 dias.

A quantidade de anatoxina utilisada para cada animal foi de 1090 c. c..

A titulo de comparação indicaremos os resultados obtidos na immunisaçāo com toxina pura, segundo um methodo baseado no de Dean, em igual numero de animaes, os ultimos tomados no serviço de soro anti-diphterico.

As inoculações segundo este methodo são feitas com intervallos variaveis, de 2 a 6 dias e pelo quadro abaixo se vê a marcha da immunisaçāo:

Agosto 3 — 0,005 cc. toxina	Agosto 28 —	8	»	»
» 5 — 0,01	» 31 —	15	»	»
» 7 — 0,02	Setembro 2 —	30	»	»
» 10 — 0,05	» 4 —	50	»	»
» 12 — 0,1	» 9 —	100	»	»
» 14 — 0,2	» 11 —	150	»	»
» 17 — 0,5	» 15 —	200	»	»
» 20 — 1	» 19 —	250	»	»
» 24 — 2	» 24 —	300	»	»
» 26 — 4	» 29 —	350	»	»
	Outubro 7 — 1 ^a sangria definitiva.			

Os resultados obtidos no final da immunisaçao, isto é, após a inoculaçao de 300 a 400 c. c. de toxina pura, estando o animal (se a dosagem do sôro em sangria exploradora o autoriza) em condições de soffrer a sangria definitiva, foram os seguintes:

Cavallo N. 8 — Idade 20 annos — Nacional — Dosou 500 u. i. por cc.							
» » 10	» 17	»	»	» 100 u. i.	»	»	
Égua » 9	» 5	»	»	» 1200 u. i.	»	»	
» » 12	» 7	»	»	» 100 u. i.	»	»	
» » 17	» 5	»	»	» 450 u. i.	»	»	
» » 18	» 7	»	»	» 300 u. i.	»	»	
» » 19	» 7	»	»	» 200 u. i.	»	»	
Cavallo » 24	» 10	»	»	» 200 u. i.	»	»	
» » 26	» 9	»	»	» 500 u. i.	»	»	
» » 271	» 19	»	»	» 400 u. i.	»	»	
» » 286	» 12	»	»	» 700 u. i.	»	»	

Este resultado corresponde a uma média de 422,7 unidades antitoxicas por c. c. de sôro.

Se notará ainda que:

Dosou menos de 100 u. i. : 1	— 9,0 %
» entre 100 e 300 u. i. : 4	— 36,3 %
» » 300 e 500 u. i. : 4	— 36,3 %
» » 500 e 800 u. i. : 1	— 9,0 %
» » 800 e 1000 u. i. : 0	—
» mais de 1000 u. i. : 1	— 9,0 %

A duraçao da immunisaçao, segundo este methodo, (até a ultima injecçao antes da sangria definitiva), é de 57 dias, mais ou menos. A quantidade de toxina utilisada para cada animal é de 1410 c. c., 885.

Os resultados obtidos por G. Ramon (¹) na immunisaçao pela anatoxina de 150 cavallos, mostram uma média de 500 u. i. por c. c.. A que obtivemos foi de quasi 400 u. i.. Provavelmente a porcentagem attingiria áquelle limite, assim como o obtido por Loiseau e Frasey, citados por G. Ramon, se tivessemos utilisado igual numero de animaes.

De modo que podemos dizer que os nossos resultados confirmam os destes autores e que, com a anatoxina se pôde obter, tanto como com a toxina pura, a produçao de anti-toxina diphtherica nos serviços de sôrotherapia, de um modo relativamente simples, mais rapido e isento de accidentes.

(¹) G. Ramon — Loc. cit..

**VERIFICAÇÃO DOS ANIMAES BONS PRODUCTORES DE
ANTI-TOXINA, MÉTODO DE IMMUNISATION COM
ANATOXINA — TOXINA DIPHTERICA.**

Num trabalho anterior ('') sobre a immunisaçāo anti-tetanica, iniciada com toxoide e continuada com toxina, logo que o animal apresentasse 1 u. i. por c. c. de sōro, mostramos que nos bons productores de anti-toxina tetanica, apōs 5 ou 6 injecções de toxoide, aquella proporção de anti-corpo era attingida, o que não acontece com os máus productores. Estes seriam logo afastados do serviço, evitando-se assim desperdicio de toxina, tempo, material, etc..

Estas variações só correm por conta do factor individual, diferente para cada animal.

Passando os olhos sobre os resultados da immunisaçāo com a anatoxina diphterica nos 11 cavallos assignalados, verifica-se que os que apōs, apenas as 4 primeiras inoculações de anatoxina (de 5, 10, 25 e 50 c. c.), apresentavam +1 u. i. por c. c. de sōro, dosaram no final da immunisaçāo mais de 400 u. i. por c. c.: 1 (n.º 41) que teve apōs as 4 inoculações +1 u. i. dosou no final 300 u. i.; 1 (n.º 30) que só teve +1 u. i. apōs 5 doses, tambem dosou no final 300 u. i.; 2 (n.º 38 e 43) que só tiveram 1 u. i. apōs a 5.^a dose, dosaram no final 80 e 150 u. i., e finalmente 1 (n.º 42) que só apresentou 5 u. i. por c. c. de sōro depois da 7.^a dose, não teve, até o final da immunisaçāo, esta proporção de anti-corpos além de 8 u. i..

Estes resultados de grande importancia pratica confirmam os que obtivemos na immunisaçāo anti-tetanica.

Por elles se verifica a possibilidade de se prever, desde logo, apenas com 4 injecções de anatoxina, e dosagem do sōro do animal apōs uma sangria exploradora, os que serão bons productores de anti-toxina.

Para a confirmação destas suposições, tomamos o cavalo n.º 42, que com anatoxina não chegou a dosar 10 u. i. por c. c. e praticamos sua immunisaçāo, logo a seguir, com toxina pura.

O protocollo abaixo mostra o resultado final obtido:

DATA — 1926	INOCULAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Fevereiro 25	10 cc. toxina	
Março 3	25 » »	
» 8	50 » »	
» 13	100 » »	
» 17	150 » »	
» 23	200 » »	

(') J. Lemos Monteiro — Immunisaçāo anti-tetanica pelo metodo toxoide-toxina. Mem. Inst. But. T. II Fasc. unico. 1925, e Comp. R. Soc. Biol. 4 T. XCII. 1925.

(Continuação)

DATA — 1926	INOCULAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Março 29	250 cc. toxina	
Abril 5	300 » »	
» 12	350 » »	
» 16	400 » »	Dosa — 50 u. i.

Vê-se, pois, que um cavallo que não produza com anatoxina, uma porção considerável de anti-toxina, não terá esta porção aumentada (ou sómente em pequena escala) com o emprego da toxina pura.

Por estas considerações e pelos resultados que temos obtido com a immunisaçao anti-diphtherica pelo methodo baseado no de Dean, com toxina pura, julgamos de maior vantagem na produçao de anti-toxina a pratica de uma immunisaçao mixta, com anatoxina no inicio e toxina no final.

Assim este processo se resumiria: iniciar a immunisaçao com anatoxina, naturalmente de poder antigenico verificado pelo methodo já indicado; após as 4 ou 5 primeiras injecções, praticar uma sangria exploradora e verificar se no sôro se contém + de 1 u. i. por c. c.. Se isto não acontecer despresar o animal para o serviço. Se o sôro contiver mais de 1 u. i. (Ehrlich) continuar a immunisaçao com toxina pura, já em doses maiores, visto que a proporção de anti-toxina existente na totalidade do sôro do animal, é sufficiente para evitar possiveis accidentes.

A immunisaçao assim é mais rapida que com a toxina pura, evitando o periodo mais delicado e demorado das primeiras doses, tendo a grande vantagem de indicar os animaes com os quaes não se perderá tempo e toxina.

Conclusões: —

I. A anatoxina pode ser empregada, com vantagem, na produçao da anti-toxina diphtherica, dando resultados que se approximam aos obtidos com a toxina, em menor espaço de tempo e sem o perigo de accidentes.

II. Fornece indicações mais ou menos certas, após 4 ou 5 injecções sómente, dos animaes bons e máus productores de antitoxina. Nos primeiros, após estas injecções, se encontrará no sôro +1 u. i. por c. c., o que acontecerá nos segundos, sómente após maior numero de doses.

III. E' vantajoso, por isto, adoptar-se para a immunisaçao, a principio a anatoxina, nas 4 ou 5 doses indicadas; se o sôro do animal, em dosagem de sangria exploradora, indicar a presença de +1 u. i. por c. c., continuar com toxina pura, já em doses maiores e que possam ser neutralizadas pela anti-toxina já formada.

V — Emprego na prophylaxia da diphteria. Vaccinação anti-diphtherica.

A medicina se encontra hoje perfeitamente apparelhada na luta contra a diphteria.

Para o mal declarado dispõe do sôro anti-diphterico, cujo valor as estatísticas de todos os paizes atestam e que representa uma das maiores victorias da sôrotherapia.

Não podia, porém, contentar-se em vencer o mal declarado, era preciso prevenir-o, collocar as pessoas, as creanças principalmente, a elle susceptiveis em condições de defesa e de resistencia.

Surgiram os trabalhos tendentes a verificar os individuos susceptiveis e os naturalmente immunizados contra a diphteria (Schick, em 1913 e Kellogg em 1923). Modernamente deve se considerar esta verificação desnecessaria: toda creança em idade susceptivel á infecção diphtherica, a idade pre-escolar, principalmente, deve ser vacinada contra a diphteria.

A vaccinação anti-diphtherica pode ser feita pelas misturas de toxina-antitoxina, segundo os trabalhos de Behring, Park e Zingher e outros.

Estas misturas são, conforme seus preconisadores e os que lhes vêm estudando e empregando, hyper ou hypo-neutralisadas; porém não representam, por motivos varios, e fóra do assumpto deste trabalho assignalar, o ideal que se procurava attingir.

Este ideal, no tocante á vaccinação anti-diphtherica, parece ter sido attingido depois dos admiraveis estudos de Ramon, sobre a anatoxina e dos numerosos outros que delles se originaram.

Os primeiros resultados do emprego da anatoxina na prophylaxia da diphteria foram condensados no relatorio que Louis Martin apresentou á Academia de Medicina de Paris, em Abril de 1924.

Neste relatorio, estuda as memorias: 1.º Da immunidade anti-diphtherica pela anatoxina, investigações clinicas e sorologicas, de Darré, Loisseau e Laffaile; 2.º Os resultados obtidos em creanças, de Roubinovitch, Loisseau e Laffaile e 3.º A vaccinação anti-diphtherica no adulto, de Zoeller.

Em seu trabalho, expõe Martin, o estado actual da questão da immunidade em diphteria. A immunisaçao activa com toxina é perigosa, por causa das grandes variações individuais e se obtém lentamente; a passiva é pouco duradoura; o emprego da mistura toxina-antitoxina dá resultados incertos (80 % ficam vaccinados e 20 % permanecem sensíveis), sómente com a anatoxina de Ramon não se observam estes inconvenientes, por ser inofensiva e por permittir a producção de rapida quantidade de anti-toxina.

De 130 creanças com reacção de Schick positiva, susceptiveis, pois, a diphteria e que receberam 0,5 c. c. de anatoxina, verificaram Roubinovitch, Loisseau e Laffaile que, após 15 a 30 dias, 49 estavam vaccinadas; praticando uma 2.ª injecção de anatoxina, verificaram

que 87,5 % ficaram vaccinadas e que, após uma 3.^a injecção, a porcentagem dos vaccinados attingiu a 98,5 %.

Zoeller obtem identicos resultados no adulto.

Baseado nestes resultados, Martin aconselha para o caso das collectividades (collegios, quarteis, etc.): vaccinar duas vezes os individuos ameaçados de diphtheria, com 0,5 e 1 c. c. de anatoxina, com intervallo de 15 dias; praticar o Schick 15 dias após a ultima injecção, e fazer uma 3.^a dose de 1,5 c. c. de anatoxina nos ainda susceptiveis.

Aconselha ainda a vaccinação das creanças aos 2 annos de idade, quando são menos sensiveis ás proteinas, têm menor reacção e nas quaes a diphtheria é sempre mais grave.

Numerosos trabalhos e estatisticas puizeram em evidencia o valor deste meio de prophylaxia da diphtheria.

Martin, Loisseau e Lafaile (¹) pensam que para producção de uma quantidade notavel de anti-toxina após a injecção de anatoxina, são necessarias pelo menos duas doses, espeçadas de 3 semanas. A primeira injecção provoca pouca anti-toxina, mesmo si se aumenta a quantidade injectada e a segunda ficará quasi que sem influencia si se reduz o intervallo.

A immunisaçao pela anatoxina foi praticada pelos autores em diversas collectividades, que se pode dividir em dois grupos:

1.^o — Com controle de immunisaçao pela prova de Schick (Institut des Sourds-Muets d'Asnières, Seine, 275 creanças de 8 a 18 annos; Préventoriun de Cantelen, Seine Inferiure, 163 creanças, depois 65 novos). No primeiro estabelecimento fizeram duas injecções de 0,5 e 1 c. c.; 21 a 29 dias após a 2.^a injecção havia 96,1 % de Schick negativos, 1,3 % de reacções fracas e 2, 6 % de reacções ainda positivas. No segundo estabelecimento verificaram 80 % de Schick negativos, 23 dias após a 2.^a injecção.

Os individuos de reacções positivas receberam uma 3.^a dose; sómente um permaneceu com a reacção positiva, o que dá 99,4 % de reacções negativas, num espaço de 74 dias após a 1.^a injecção. Quanto aos 65 novos a reacção tornou-se negativa em 57 dias após duas injecções e nos outros 8 após trez doses.

2.^o — Vaccinação num meio contaminado; parada das epidemias: a) num pequeno asylo de creanças russas, em Peggy (Seine) haviam 12 casos de diphtheria em 5 meses, sendo que 7 das creanças haviam recebido algumas semanas antes uma injecção preventiva de sôro. Nenhum caso novo depois que se praticou a immunisaçao pela anatoxina. b) A diphtheria era endemica, desde muitos annos, em 5 communas do Pas-de-Calais. Vaccinação de 380 creanças com 3 injecções, além de outras com 1 ou 2 injecções. Depois de 18 meses dois casos sómente ocorreram em uma das comunnas, em creanças não vaccinadas.

Assignalam numa creança de 5 annos uma diphtheria benigna

(¹) L. Martin, G. Loisseau et A. Laffaille — Essais d'immunisation des collectivités avec l'anatoxine diphtherique. Bull. et Mem. Soc. Medic. des Hôpitaux de Paris. T. XLIX, n.^o 21 — 1925.

entre a 2.^a e a 3.^a injeção. Cura rápida sem tratamento soroterápico e sem sequelas.

Em moços de 18 a 25 anos, 56 sobre 85 apresentaram após a 1.^a injeção reacções mais ou menos vivas, porém passageiras. É preferível praticar-se antes a prova de Schick nos adultos e só vacinar os de reacção positiva. Isto é dispensável nas crianças, que apresentam menos reacções consecutivas às injeções.

Zingher ('') fez, com anatoxina preparada por G. Ramon, vacinações em três grandes escolas. Verificou-se o Schick negativo em 98 % após as 3 doses; 86,4 % após 2 e 60 % após a 1.^a dose. Com a mistura toxina-antitoxina obteve o Schick negativo em 91 % dos casos (3 injeções de 1 c. c. da mistura a 1/10 L †). As reacções locais com a anatoxina foram ligeiras e mais accentuadas com a mistura.

Riquier e Vaillant (''), no XII.º Congresso de Hygiene, reunido em Paris, em Outubro de 1925, apresentam um trabalho em que mostram uma estatística de 700 vacinações em crianças, com a anatoxina. Em 94 % dos casos não houve reacção ou apenas reacção local: em 4 % ligeira reacção febril e em 2 % uma reacção febril durante 24 a 48 horas. Depois das vacinações praticadas desapareceu a difteria endémica na localidade.

Ponce de Léon ('') Praticou o Schick em 400 crianças de 0 a 12 anos, encontrando 52 % de reacções negativas. Nas 192 crianças que apresentaram o Schick positivo fez a 1.^a dose de 0,5 de anatoxina. 20 dias após, 42 tiveram o Schick negativo ou sejam 22 % de vacinados. Nos restantes 150 praticou a 2.^a dose de 1 c. c. de anatoxina; após 20 dias 146 tiveram o Schick negativo ou sejam 98 % de vacinados. Os 4 restantes que persistiam com Schick positivo, receberam a 3.^a dose de 1,5 c. c. de anatoxina e se mostraram todos vacinados no dia de 20 a 22 dias após, havendo uma proporção de 100 % de vacinados com as 3 doses.

Nasso (''), após 2 injeções intervalladas de 20 dias, em 108 crianças, observou 90,8 % de immunisadas.

Zoeller aconselha dar maior espaço entre as injeções (20 dias) e verificou a persistência de imunidade depois de 1 ano nos vacinados; o mesmo constataram Lereboullet e Joannon.

Numerosas outras estatísticas poderiam ser assinaladas, o que é desnecessário, para demonstrar o valor deste método de vacinação e prophylaxia da difteria, perfeitamente aceitável, sem acidentes e cuja generalização vem se impondo cada vez mais.

(') A. Zingher — Proceedings of the Society for exp. biol. and med. pag. 462 T. XXII — 1925.

(') Riquier e Vaillant — Extr. da "Presse Médicale", n. 99, 1925, pag. 1639.

(") Ponce de Léon — Boletin del Consejo Nacional de Higiene de Montevideo, Nov. de 1925.

('') Ivo Nasso — Tentative de immunizzazione anti-difterica com l'anatoxina di Ramon — Pediatria, T. XXXIII, n. 24, 1925.

VACCINAÇÃO ANTI-DIPHTHERICA EM SÃO PAULO

Em consequencia destes resultados e dos nossos estudos experimentaes, começamos a empregar na vaccinação anti-diphtherica a anatoxina por nós preparada em Butantan.

Primeiramente vaccinamos os alumnos das duas escolas mixtas de Butantan e outras creanças em numero de 80, de 3 a 14 annos de idade. Praticamos geralmente duas doses, com intervallo de 20 a 30 dias. As reacções sobrevindas foram geralmente locaes, principalmente após a 1.^a dose, notando apenas reacções geraes em duas creanças, que se apresentaram gryppadas, podendo ser a reacção febril sobrevinda devida a este estado.

Pelas verificações feitas pelo Kellogg-test em diversas creanças vaccinadas, os resultados da vaccinação foram evidentes, pelo que este methodo de vaccinação começou a ser applicado em maior escala pelo Serviço Sanitario de S. Paulo.

A principio no Centro de Saude Modelo, annexo ao Instituto de Hygiene e depois, pela Inspectoria de Prophylaxia das Doenças Infecciosas ('), nas creanças existentes nos fócos de onde eram removidos casos de diphtheria.

Embora iniciado o serviço, não ha muito tempo, foram vaccinadas até agora um total de mais de 400 creanças.

Com o fim de verificar os resultados das vaccinações após as diferentes doses, praticamos a reacção de Kellogg, ao em vez da prova de Schick. Nas verificações feitas neste sentido, embora não muito numerosas, constatamos que as creanças com Kellogg positivo, o apresentavam negativo, 15 a 20 dias após a 1.^a dose n'uma proporção de 60 %; após 2 doses, mais de 80 % e após as 3 doses, todos os vaccinados que foram verificados pela reacção de Kellogg se apresentaram immunizados (100 %).

Se estes dados de applicação practica da anatoxina não podem causar impressão deante das vastas e numerosas estatistics já publicadas, em outros paizes, servirão, em todo caso, para mostrar que entre nós tambem se cuida com interesse e dedicação de todos os problemas que tem em vista o progresso da sciencia e que não despreza as suas conquistas em prol da humanidade.

CONCLUSÕES GERAES

As conclusões finaes a que se pode chegar com o presente trabalho são as seguintes:

(') No Centro de Saude Modelo as vaccinações estão sendo praticadas pelo Dr. Dalmacio Azevedo, e na Inspectoria de Prophylaxia, pelo Dr. Rubens Tavares.

Tendo vaccinado algumas creanças com coqueluche, o Dr. Dalmacio Azevedo verificou uma acção extremamente favoravel da anatoxina sobre este estado morbido, tendo conseguido, até agora, uma estatistica de 34 casos de melhorias accentuadas, (após 1 ou 2 injecções) e de cura definitiva em alguns.

Seja esta acção uma simples proteinotherapy, é um meio therapeutico que deve ser ensaiado, para melhores conclusões, o que já está sendo feito por esse distinto collega.

I — Sendo a attenuação da toxina a sua transformação em anatoxina pela addicção de formalina, variavel, conforme a composição do caldo de cultura, é de conveniencia a uniformisação entre os diferentes institutos da technica para o preparo do caldo para a producção de toxina.

II — A anatoxina preparada com toxina diphterica addicionada de formalina na proporção de 4 °/oo e permanencia a 37. $^{\circ}$ durante 30 a 40 dias, apresenta evidentes propriedades antigenicas.

III — Estas propriedades podem ser evidenciadas pela inoculação experimental de cobayas e verificação de sua immunidade pelo Kellogg-test.

IV — A anatoxina pode ser empregada, com vantagens, na producção de anti-toxina diphterica, podendo dar indicações sobre a sensibilidade individual, quanto a elaboração de anti-corpos, dos animaes experimentados.

V — Parece ser de maior vantagem adoptar-se para a producção de anti-toxina, um methodo mixto, com anatoxina-toxina diphterica.

VI — A anatoxina, pela sua inocuidade e rapida e persistente immunidade que determina, é de incontestavel valor na vaccinação contra a diphteria, devendo o seu emprego, na prophylaxia desta infecção, generalisar-se o mais possivel.

Butantan, Setembro de 1926.

ANATOXINE DIPHTE'RIQUE ET SA VALEUR PRATIQUE

PREPARATION, POUVOIR ANTIGÉNIQUE, EMPLOI DANS LA
PRODUCTION DE L'ANTI-TOXINE ET DANS LA
PROPHYLAXIE DE LA DIPHTE'RIE

PAR LE

DR. JOSE' LEMOS MONTEIRO

(Assistant de l'Institut).

SOMMAIRE

L'anatoxine diphtérique est appelée à jouer un rôle important dans la lutte contre la diphtérie. Dans ce travail l'auteur étudie successivement la préparation de l'anatoxine, ses propriétés antigéniques, la question du dosage et de la vérification de ce pouvoir antigénique, son emploi dans la production de l'anti-toxine où elle lui a fourni des résultats particulièrement encourageants et enfin son usage dans la vaccination contre la diphtérie.

De cet exposé, il tire les conclusions suivantes:

1.^o L'atténuation de la toxine pour sa transformation en anatoxine par l'addition de formaline est variable suivant la composition du bouillon de culture; il conviendrait donc d'uniformiser, la technique de préparation du bouillon pour la production de toxine entre les différents Instituts.

2.^o L'anatoxine préparée avec la toxine diphtérique additionnée de formaline dans la proportion de 4 °/oo et conservée 30 à 40 jours à 37.^o possède d'évidentes propriétés antigéniques.

3.^o Ces propriétés peuvent être mises en évidence par l'inoculation expérimentale aux cobayes d'une ou plusieurs doses d'anatoxine et vérification, quelque temps après, de la résistance de ces animaux à un certain nombre de D. M. M. ou par le dosage du serum de lapins immunisés. Pour la vérification des propriétés antigéniques de l'anatoxine, l'A. indique une méthode consistant dans l'inoculation d'une ou deux doses données à un cobaye et dans la vérification du degré d'immunité obtenue par moyen de la réaction de Kellogg.

4.^o L'anatoxine peut être employée avec avantage dans la production d'anti-toxine diphtérique, donnant des résultats assez semblables à ceux obtenus avec la toxine pure en moins de temps et sans danger. Elle permet après 4 ou 5 injections de connaître les animaux bons et mauvais producteurs de toxine, le serum des premiers devant présenter après ce temps + 1 u. i..

5.^o Il paraît plus avantageux d'adopter, pour la production d'anti-toxine une méthode mixte, avec anatoxine (4 a 5 doses jusqu'à l'apparition de + 1 u. i., vérifiée par saignée exploratrice), puis toxine pure.

6.^o L'anatoxine par son inocuité et l'immunité rapide et durable qu'elle détermine est d'une incontestable valeur dans la vaccination contre la diphtérie; son emploi dans la prophylaxie de cette infection doit être le plus possible généralisé.
