

PREPARAÇÃO DO SORO ANTIBOTULÍNICO TIPO B, PELA HIPERIMUNIZAÇÃO DE CAVALOS, NO INSTITUTO BUTANTAN *

Hisako Gondo HIGASHI**
Hideyo IIZUKA**
Edison Paulo T. OLIVEIRA**
Maria Antonieta da SILVA**

RESUMO: Os autores descrevem o método utilizado na preparação do soro antibotulínico tipo B, em escala industrial, pela hiperimunização de eqüídeos, através do antígeno adsorvido pelo alúmen de potássio.

Empregando o esquema de imunização anteriormente proposto, conseguiram obter mistura de plasma hiperimune que apresentou cerca de 150 UI/ml de antitoxina botulínica tipo B, o qual, após purificado pelo método de Pope modificado, concentrou até o nível antitóxico de 750 UI/ml. Este produto foi diluído convenientemente para que contivesse 500 UI/ml. de antitoxina botulínica tipo B, para atender eventuais surtos de acidente botulínico humano.

Foi verificado também, em animais de laboratório, pelo teste de neutralização cruzada que as antitoxinas tipo A e B, não apresentam reação cruzada com a toxina heteróloga, comportando-se portanto como soros monoespecíficos.

UNITERMOS: Botulismo; preparação de soro antibotulínico; *Clostridium botulinum* tipo B; intoxicação alimentar; toxina, anatoxina e toxóide botulínico tipo B.

INTRODUÇÃO

O botulismo é uma intoxicação devido à ingestão de alimentos cujas más condições de preparo, possibilitam a presença da toxina pré-formada, e que se traduz por síndrome neurovegetativo, freqüentemente fatal. O agente etiológico e o quadro evolutivo da doença, foram descritos e caracterizados pela primeira vez por Van Ermengen^{31, 32} (1897), que o denominou de *Bacillus botulinus*.

Leuchs²⁰, em 1910 isola uma nova cepa de bacilo botulínico, antigenicamente diferente do bacilo de Van Ermengen, sendo este fato confirma-

* Trabalho apresentado na XVII Reunião Anual da SBPC, Belo Horizonte, MG, Brasil.

** Seção de Toxinas e Anatoxinas do Instituto Butantan
Endereço para correspondência: Caixa Postal 65, CEP 05540 — SP, Brasil

do por Dickson em 1918⁸. Holland⁸ classificou tais bacilos no gênero *Clostridium* como *Clostridium botulinum* tipo A e tipo B, respectivamente.

Apesar de serem conhecidos atualmente 7 tipos antigenicamente diferentes de *Clostridium botulinum*^{3, 5}, os acidentes estatisticamente mais freqüentes de botulismo humano, são provocados pelas exotoxinas neuro-paralíticas do tipo A e B^{1, 6, 7, 9, 12, 17, 19, 20, 24, 27}. A doença reveste-se de aspecto grave e dramático pois, seu índice de mortalidade varia de 30 a 90% dos casos^{8, 21}.

Em 1972, pela primeira vez no Brasil, foi preparado o soro antibotulínico tipo A, no Instituto Butantan²³. Todavia, em virtude de não haver imunidade cruzada com a toxina tipo B^{3, 14, 16, 28} e sendo a soroterapia específica o único tratamento efetivamente curativo do botulismo^{8, 15, 18, 33} e considerando a necessidade de dispor do anti-soro tipo B em nosso país; assim sendo, propomos no presente trabalho estudarmos a possibilidade de obtê-lo, através da hiperimunização eqüina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido utilizando, em linhas gerais, os mesmos métodos já descritos anteriormente²³. Todavia, torna-se necessário estabelecer as seguintes considerações:

1. *Cepa utilizada* — n.º 204-IB, proveniente da germoteca do Instituto Butantan e selecionada dentre as amostras de *Clostridium botulinum* tipo B, por ser dotada de elevada toxigenicidade.

2. *Inoculum* — era preparado em 20 ml do meio de Tarozzi³⁰, incubados a 37°C durante 24 horas.

3. *Toxina botulínica tipo B* — para o preparo da toxina, foi utilizado o meio de cultura proposto por Wadsworth³⁴, modificado²³. Acertando o pH para 7.8, o meio era dispensado em volumes de 2.250 ml, em frascos Erlenmeyer de 3.000 ml de capacidade. Após a esterilização, era resfriado bruscamente, até a temperatura de cerca de 45°C. No momento da semeadura, adicionava-se esterilmente, 90 ml de solução de glicose a 50% e, após a inoculação de 20 ml de sementeira em cada frasco, eram incubados a 37°C, durante um período de 9 dias, quando ocorria a toxigênese máxima. Retirados da estufa, colhiam-se as amostras de cada frasco e procediam-se às provas biológicas e a bacterioscopia.

3.1 *Titulação da toxina* — as amostras de toxina botulínica colhidas de cada frasco, após centrifugadas a 2000 rpm durante 30 minutos eram tituladas preliminarmente em camundongos, segundo Nigg e cols.²². Em seguida, determina-se o seu título em DL₅₀, conforme a recomendação da O.M.S. (1963).

4. *Toxinotipia* — utilizamos o método preconizado pelo Instituto Pasteur²⁶ para a confirmação do tipo da cepa utilizada, através da soro-proteção monoespecífica^{4, 18, 20, 33}.

5. *Anatoxina botulínica tipo B* — para o preparo da anatoxina, as toxinas devem apresentar títulos adequados, isto é, superior a 10⁵ DMM em camundongos, visando melhor poder antigênico²³. Para a destoxificação, a cultura tóxica era tratada com formol na concentração final de

0,5% e incubada a 37°C, por um período de 3 a 4 semanas, acompanhada de agitação constante²³. A verificação preliminar do estado de destoxificação era realizada em camundongos, inoculando-se 1 ml do produto em lotes de 5 animais, e, observando-se a sua inocuidade durante um período de uma semana. A seguir, o produto destoxicado era testado em lotes de cobaias de 250 a 300 gramas de peso, inoculados com 5 ml e observados durante 30 dias. Comprovada a inocuidade da anatoxina, o produto era então filtrado.

5.1 *Clarificação e filtração* — nesta fase do processamento a anatoxina sofria o processo de pré-filtração esterilizante, através do filtro Millipore, cujas membranas eram dispostas de maneira que a porosidade decrescia progressivamente de 1,5 μ até 0,45 μ de diâmetro efetivo. O filtrado era estocado a 4°C, ao abrigo da luz.

6. *Toxóide botulínico tipo B* — para o preparo de toxóide, o produto inócuo e estéril era precipitado pela solução estéril a 10% de sulfato duplo de alumínio e potássio, com agitação constante, resultando numa concentração final de 1,5% do adsorvente. Concomitantemente, a queda do pH era corrigida a 5,5 pela adição de uma solução concentrada de hidróxido de sódio a 40%, permanecendo em repouso, durante 24 horas a fim de completar a adsorção do toxóide. O precipitado antigenicamente ativo era lavado com solução fisiológica estéril, a 0,85% de cloreto de sódio, por três a quatro vezes, até resultar um sobrenadante completamente límpido.

7. *Preparo de soro antibotulínico tipo B* — o soro antitóxico era preparado, imunizando-se cavalos em duas etapas. Inicialmente, os animais selecionados recebiam a imunização de base, seguida de um período de repouso de pelo menos 30 dias e, finalmente, eram submetidos à hiperimunização⁴.

7.1 *Imunização de base* — nesta fase, os cavalos recebiam o estímulo primário, consistindo na administração via intramuscular, na região dorsal, de doses progressivamente crescentes de antígeno, durante um período de seis semanas, recebendo um total de 1795 ml do produto²³. Na última semana da imunização de base, efetuava-se a sangria exploradora de cada animal. Os eqüídeos que apresentassem boa resposta antigênica, eram separados para a obtenção de soros. Os cavalos que demonstrassem teor de antitoxina superior a 100UI/ml, eram sangrados na proporção de 4% em relação ao seu peso corporal, fracionados em duas vezes, com intervalo de dois dias entre as sangrias.

Em seguida, os animais entravam em fase de repouso, durante um espaço de tempo de 30 dias, no mínimo^{2,4}.

7.2 *Hiperimunização* — nesta fase, cada animal recebia um total de 1.000 ml do antígeno, fracionados em séries progressivamente crescentes de duas injeções semanais, durante um período de quatro semanas^{2,23}.

O processo de hiperimunização era repetido após cada período de sangria e repouso do animal.

O sangue era recolhido em solução anticoagulante de citrato de sódio, e ao plasma separado, era adicionado uma solução preservativa de fenol obtendo-se uma concentração final de 0,4% e em seguida, conservado em geladeira, até o momento da purificação e concentração^{10,23}.

As amostras da mistura de plasma obtidas após a hiperimunização de eqüinos eram dosadas segundo o método preconizado pela Organização Mundial de Saúde, em Unidades Internacionais, frente ao Soro Padrão Antibotulínico tipo B, padrão internacional⁴. Todas as misturas de plasma eram concentradas e purificadas de acordo com o método de Pope²⁵, modificado por Furlanetto & Santos¹⁰.

Finalmente, o soro dialisado era novamente titulado frente ao padrão internacional, para possibilitar a sua diluição a fim de conter 500UI/ml de antitoxina botulínica tipo B, de acordo com os requisitos mínimos da Organização Mundial de Saúde.

8. Soro e toxina padrão

8.1 *Soro padrão* — utilizamos o soro antibotulínico tipo B, padrão internacional, proveniente do International Laboratory for Biological Standards, Statens Serum Institute, da Organização Mundial de Saúde, Copenhagen, acondicionado, sob forma liofilizada, em ampolas contendo 87 mg de antitoxina equivalente a 500 UI. Portanto, uma unidade internacional do atual padrão é a atividade específica que está encerrada em 0,174 mg de antitoxina eqüina hiperimune liofilizada⁴.

8.2 *Toxina botulínica padrão tipo B* — foi preparada no laboratório e padronizada ao nível de 1 L[†] (unidade de limite morte), frente ao soro padrão antitobutulínico tipo B, e sendo conservada sob a forma líquida e glicerinada⁴.

Para todos os ensaios biológicos realizados, o diluente utilizado era a solução tampão de gelatina fosfatada, contendo 0,2% de gelatina e 1% de fosfato dissódico, cujo pH era ajustado de 6,6 e esterilizado em autoclave. Os camundongos (18 — 22 g) e os cobaios (250 — 300 g) utilizados, sem distinção de sexo, eram provenientes do Biotério Geral do Instituto Butantan.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescente surto em níveis internacionais, de casos de botulismo humano de tipo B^{1, 9, 12, 17, 20} tornou-se urgente a necessidade de se produzir, no Brasil, o soro antibotulínico tipo B, a fim de estarmos preparados contra eventuais acidentes. O presente trabalho, pioneiro no Brasil, possibilitou ampliar a nossa independência tecnológica, no campo da produção de soros antibotulínicos.

A experiência acumulada no preparo de soro antibotulínico do tipo A²³, acrescida de algumas modificações facilitou grandemente, o estabelecimento das condições que permitissem, através de ensaios experimentais, a obtenção de soro antibotulínico tipo B.

Quanto à seleção da melhor cepa a partir das existentes em estoque na germoteca do Instituto Butantan, a de n.^o 204-IB, revelou ser a mais toxigênica, pois o título das toxinas obtidas, após 3 a 4 passagens, foi de 8×10^5 DMM/camundongo (tabela 1), quando cultivadas em meio de cultura proposto por Wadsworth modificado^{23, 34}, ocorrendo a toxigênese máxima no nono dia, a 37°C. A partir desse período, foi detectado o decréscimo gradual e constante do nível da exotoxina, fato já anteriormente verificado por Stevenson e cols.²⁹.

TABELA 1

Titulação de três amostras de toxina botulínica tipo B, inoculados por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g

Frasco N. ^o	Toxina		Tempo de observação em horas			
	Diluída 1:	Título DMM	24	48	72	96
1	100.000	200.000	4/4*	—	—	—
	200.000	400.000	4/4	—	—	—
	400.000	800.000	2/4	2/4	3/4	4/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	1/4	1/4
2	100.000	200.000	2/4	4/4	—	—
	200.000	400.000	1/4	3/4	4/4	—
	400.000	800.000	1/4	1/4	3/4	4/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	100.000	200.000	4/4	—	—	—
	200.000	400.000	2/4	3/4	4/4	—
	400.000	800.000	2/4	3/4	3/4	4/4
	800.000	1.600.000	0/4	1/4	1/4	1/4

* Em todas as tabelas apresentadas, o denominador indica o número de animais inoculados e o numerador, o número de animais mortos

A tabela 2, representa o resultado da prova de toxinotipia do *Clostridium botulinum*, cepa n.^o 204-IB, usando-se como referência, a antitoxina botulínica tipo B, padrão Internacional, fornecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

O processo de filtração da toxina e anatoxina, pode acarretar grande prejuízo da qualidade tóxica e antigênica do produto, quando se empregam filtro Seitz, com placas esterilizantes EKS ou velas esterilizantes Madler²³. Esta perda reduz-se a níveis satisfatórios mediante o uso de filtros Millipore, utilizando membranas filtrantes HAWP-293 de 0,45 μ , de porosidade efetiva.

TABELA 2

Toxinotipia do *Clostridium botulinum*, cepa n.^o 204-IB, frente a antitoxina botulínica tipo B, padrão internacional, inoculados por via intraperitoneal (0,5 ml da mistura de toxina e antitoxina) em camundongos de 18 a 22 g

Toxina 50 DMM/ml	Soro-padrão 0,5 UI/ml	Solução de gelatina fosfatada	Animal inoculado N. ^o	Tempo de observação em horas			
				24	48	72	96
1 ml	1 ml	0,5 ml	1	SS	SS	SS	SS
			2	SS	SS	SS	SS
			3	SS	SS	SS	SS
			4	SS	SS	SS	SS
1 ml	—	1,5 ml	5	†			
			6	†			
			7	†			
			8	†			

SS = sem sintoma

† = morte do animal

Quanto ao nível de formol necessário e suficiente para promover completa destoxificação da toxina botulínica tipo B, os ensaios realizados demonstraram que ele oscilava, sob nossas condições de trabalho, entre

as concentrações de 0,5 a 0,6% embora outros investigadores tenham encontrado concentrações que variam entre os extremos de 0,3 a 1%^{26, 27}.

O alúmen foi utilizado como adjuvante, por ser o mais empregado na adsorção da fração antigênica das anatoxinas botulínicas destinadas à hiperimunização de cavalos^{2, 4, 11, 13, 22, 27}.

Na tabela 3, está representado o resultado de um dos ensaios referentes à dosagem da mistura de plasma antibotulínico tipo B. O cavalo imunizado com a anatoxina botulínica precipitado pelo alúmen de potássio, apresentou título antitóxico que atingiu o nível de 150 UI de antitoxina por milímetro de soro.

TABELA 3

Resultado da dosagem da mistura de plasma antibotulínico tipo B, frente a toxina botulínica tipo B, inoculada por via intraperitoneal (0,5 ml da mistura de toxina e antitoxina em camundongos de 18 a 22 g)

Plasma antibotulínico			Toxina padrão (L [†] = 0,22 ml) ml	Solução de gelatina fosfatada ml	Tempo de observação em horas			
UI/ml	Diluição 1:	Volume ml			24	48	72	96
50	5	0,5	1,1	0,9	0/4	0/4	0/4	0/4
100	10	0,5	1,1	0,9	0/4	0/4	0/4	0/4
150	15	0,5	1,1	0,9	0/4	0/4	0/4	0/4
200	20	0,5	1,1	0,9	2/4	3/4	4/4	—
Soro padrão								
50	5	0,4	1,1	1,0	2/4	3/4	4/4	—
		0,5	1,1	0,9	0/4	1/4	2/4	2/4
		0,6	1,1	0,8	0/4	1/4	1/4	1/4

A tabela 4 apresenta o resultado da dosagem de soro antibotulínico tipo B, que após a purificação e concentração atingiu níveis ao redor de 750 UI/ml.

Este soro, purificado e concentrado é finalmente diluído para apresentar 500 UI/ml de antitoxina botulínica, de acordo com as recomendações emanadas da XV Seção de "Expert Committee on Biological Standardization" da O.M.S.

TABELA 4

Resultado da dosagem do soro antibotulínico tipo B purificado, frente a toxina botulínica padrão tipo B, realizada em camundongos, via intraperitoneal (0,5 ml da mistura toxina-antitoxina)

Soro antibotulínico			Toxina padrão (L [†] = 0,22 ml) ml	Solução de gelatina fosfatada ml	Tempo de observação em horas			
UI/ml	Diluição 1:	Volume ml			24	48	72	96
500	50	0,5	1,1	0,9	0/4	0/4	0/4	0/4
750	75	0,5	1,1	0,9	0/4	0/4	0/4	0/4
1000	100	0,5	1,1	0,9	0/4	1/4	2/4	3/4
1250	125	0,5	1,1	0,9	2/4	4/4	—	—
Soro padrão								
50	5	0,4	1,1	1,0	3/4	3/4	3/4	4/4
		0,5	1,1	0,9	1/4	3/4	3/4	3/4
		0,6	1,1	0,8	0/4	0/4	0/4	0/4

As toxinas e antitoxinas botulínicas tipo A e B, são monoespecíficas^{4, 14, 18, 20}, fato facilmente comprovável, de maneira segura e rápida, através de testes de neutralização cruzada, "in vivo" (tabela 5).

TABELA 5

Especificidade das antitoxinas botulínicas tipo A e B, pelo teste de reação cruzada*

Antitoxina tipo	UI por camundongo	Não protegeu contra toxina do tipo
A	5	B
B	5	A

* Dose individual de 0,5 ml da mistura toxina-antitoxina, pela via intraperitoneal, em camundongos de 18 a 22 g, sendo toxina botulínica ao nível de $L^{\frac{1}{2}}/10$ para tipo A e $L^{\frac{1}{2}}$ para tipo B

Com esta contribuição, pretendemos fornecer subsídios para enriquecimento do nosso arsenal soroterápico, a fim de possibilitar um atendimento imediato em eventuais casos de intoxicação botulínica provocada pela poderosa toxina tipo B.

CONCLUSÕES

1. Utilizando-se *Clostridium botulinum* tipo B, cepa IB-204, selecionada da germoteca do Instituto Butantan, em função de sua toxigenicidade, foi preparada toxina botulínica tipo B, dosando cerca de 8×10^5 DMM/camundongo;

2. destoxicificada e transformada em anatoxina pela ação do formol a 0,5%, a anatoxina foi precipitada pelo alúmen a 1,25%, resultando em toxóide botulínico tipo B, altamente antigênico;

3. este antígeno foi empregado para hiperimunização de cavalos através de hiperimunização, sendo a resposta anticorpogênica da ordem de 150 UI de antitoxina botulínica hiperimune, tipo B, por ml de soro;

4. a mistura de plasmas resultante de diversas hiperimunizações, permitiu obter um soro purificado que foi concentrado até atingir ao redor de 750 UI/ml, o qual possibilitou sua diluição até o nível de 500 UI de antitoxina botulínica tipo B, produto para fins terapêuticos, destinado ao atendimento de eventuais acidentes botulínico humano.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Dr. Flávio Zelante do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, à Sra. Sybille Heller e Sra. Carmen Aleixo do Nascimento do Instituto Butantan, pelas valiosas colaborações prestadas.

SUMMARY: The authors describe the methodology for the preparation of *Clostridium botulinum* type B antitoxins, on industrial scale, by hyperimmunization of horses with potassium alum absorbed antigen.

Using a new immunization schema, the authors attained a mixture of hyperimmune plasma, presenting approximately 150 UI/ml botulinus antitoxin, type B, which after ammonium sulphate purification, according to the modified method of Pope, was concentrated to the antitoxic level of 750 UI/ml. This concentrate was conveniently diluted to contain 500 UI/ml of *Clostridium botulinum* type B antitoxin to be employed during an eventual outbreak of human botulism.

By cross neutralization tests, it was also verified that the types A and B antitoxins exhibit no cross-reaction with heterologous toxin, therefore behaving as monoespecific sera.

KEYWORDS: Botulism; preparation of botulinus antitoxin; *Clostridium botulinum* type B; food poisoning; toxin, toxoid and type B botulin toxoid.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKER Jr., W.H.; WEISSMANN, J.B.; DOWELL Jr., V.R.; GUTMANN, L. & KAUTER, D.A. Type B botulism outbreak caused by a commercial food product. *JAMA*, 237:(5): 456-9, 1977.
2. BARR, M. & GLENNY, A.T. Some practical applications of immunological principles. *J. Hyg. (Lond.)*, 44:135-42, 1945.
3. BIER, O.G. *Bacteriologia e Imunologia e suas aplicações à medicina e higiene*. 18 ed., São Paulo, Melhoramentos, 1977.
4. BOWMER, E.J. Preparation and assay of the International Standards for *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E antitoxins. *Bull. Org. mond. Santé*, 29:701-9, 1963.
5. CICCARELLI, A.S.; WHALEY, D.H.; McCROSKEY, L.M.; GUIMENEZ, D.F.; DOWELL Jr., V.R. & HATHEWAY, C.L. Cultural and physiological characteristics of *Clostridium botulinum* type G and the susceptibility of certain animals to its toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34(6): 843-8, 1977.
6. DOLMAN, C.E. Human botulism in Canada. *Canad. Med. Ass. J.*, 110(2): 191-7, 1974.
7. DOLMAN, C.E.; TOMECH, M.; CAMPBELL, C.C.R. & LAING, W.B. Fish eggs as a cause of human botulism: two outbreaks in British Columbia due to types A and B botulism toxins. *J. Infect. Dis.*, 106:5, 1960.
8. DUMAS, J. Bactériologie médicale. Paris, Flammarion, 1951 p. 692-706.
9. FUKUDA, T.; KITAO, T.; TANIKAWA, H. & SAKAGUCHI, G. An outbreak of type B botulism occurring in Miyazaki Prefecture. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 23:243-8, 1970.
10. FURLANETTO, R.S. Purificação e concentração de soro antiloxoscélico. In: *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico*. São Paulo, 1961 p. 64-5. (Tese).
11. GLENNY, A.T.; POPE, C.G.; WADDINGTON, H. & WALLACE, U. Immunological notes. XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Path. Bact. (London)*, 29:38-9, 1926.
12. GONZALES, C. & GUITIÉRREZ, C. Intoxication botulique humaine par *Clostridium botulinum* B. *Ann. Inst. Pasteur*, 123:799-803, 1972.
13. HOTTEL, G.A. & MIGG, G. Studies on botulism toxoids types A and B. II. Methods for determining antigenicity in animals. *J. Immunol. (Baltimore)*, 55:255-62, 1947.

14. JOHNSON, H.M.; SMITH, B.; HALL, H.E. & LEWIS, K.H. Serological specificity of types A and B botulinal toxins and antitoxins. *Proc. soc. exp. Biol. Med.*, 126: 856-61, 1967.
15. JOUGLARD, J.; AIRAUDO, C.B.; SAINTY, J.M.; GRIGORIAN, G. & OHRESSER, P. Traitment du botulisme en réanimation. *Sem. Hôp. Paris*, 48(51): 3405-10, 1972.
16. KEMPNER, W. & POLLACK, B. Die Wirkung des botulinus toxins und seines spezifischen antitoxins auf die Nervenzellen. *Dsch. med. Wschr.* (Leipzig), 23:505-7, 1897.
17. KOSAKI, S.; MIYAZAKI, S. & SAKAGUCHI, G. Development of antitoxin with each of two complementary fragments of *Clostridium botulinum* type B derivative toxin. *Infect. Immunol.*, 18(3): 761-6, 1977.
18. LAMANNA, C. The most poisonous poison. *Science*, 130: (3378):763-72, 1959.
19. LEGROUX, R.; LEVADITI, J.C. & JÉRAMEC, C. Le botulisme en France pendant l'occupation (1940-1944). *Presse Méd.* (Paris), 10:139-40, 1947.
20. LEUCHS, J. Beitrag fur Kernntnis des toxins und antitoxins des *B. botulinus*. u. *Hyg. Infektkrankh.* (Leipzig), 65:55-84, 1910.
21. MEYER, K.F. The status of botulism as a world health problem. *Bull. Org. Mond. Santé*, 15:281-98, 1956.
22. NIGG, G.; HOTTEL, G.A.; COREILL, L.L.; ROSENWALD, A.S. & BEVERIDGE, G.W. Studies on botulism toxoids, types A and B. I. Production of precipitated toxoids. *J. Immunol.* (Baltimore), 55:245-54, 1947.
23. OLIVEIRA, E.P.T. Estudos sobre a preparação de soro antibotulínico tipo A. *Mem. Inst. Butantan*, 36:1-40, 1972.
24. PEREIRA FILHO, M.J. Diagnóstico biológico do surto de botulismo humano do Pronto Socorro de Porto Alegre. *Med. Cirurg.* (Porto Alegre), 19(2): 52-111, 1958.
25. POPE, C.G. Disaggregation of protein by enzymes. *Brit. J. exp. Path.*, 19: 245-51, 1938.
26. PREVOT, A.R. *Biologies des maladies dues aux anaerobes*. Paris, Flammarion, 1955. p. 159-221.
27. REAMES, H.R.; KADULL, P.J.; HAUSEWRIGTH, R.D. & WILSON, J.B. Studies on botulinus toxoids types A and B. III. Immunization of man. *J. Immunol.* (Baltimore), 55:309-24, 1947.
28. SMITH, D.T.; CONNANT, N.F. & OVERMAN, J.R. — *Zinsser Microbiology*. 13th. ed. New York, Appleton, Century — Crofts, 1964.
29. STEVENSON, J.W.; HELSON, V. & REED, G.B. A casein digest medium for toxin production by *Clostridium Canad.* *J. Res. ser. E. Med. Sci.* (Ottawa), 25:9-13, 1947.
30. TAROZZI, G. Observazioni sulla natura dei fenomeni che determinano la esigenza anaerobia nella culture dei germe anaerobia. *Atti R. Accad. Fisiocr.* (Siena), 17:1901-7, 1907.
31. VAN ERMENGEN, E. Recherchés sur des accidents à caractères botuliniques provoqués par du jambon. *Archs. int. Pharm. Ter.* (Bruxelas), 3: 213-350, 449-601, 1897.
32. VAN ERMENGEN, E. Recherchés sur des empoisonnements. *Ann. Soc. méd. Gand.*, 75: 28-30, 1899.
33. VAN HEYNINGEN, W.E. *Bacterial toxins*. Oxford, Blackwell, 1950. p. 14-9.
34. WADSWORTH, A.B. *Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health*. 3rd. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947. p. 190, 205, 636-8.

