

ESTUDOS SOBRE A PREPARAÇÃO DO SORO ANTIBOTULÍNICO TIPO A*

EDISON PAULO TAVARES DE OLIVEIRA

Seção de Toxinas e Anatoxinas
Instituto Butantan

RESUMO — Não tendo sido produzido ainda no Brasil, os soros antibotulinicos o autor estudou a possibilidade de obtê-los no Serviço de Imunologia do Instituto Butantan pela hiperimunização de cavalos. Iniciou pelo preparo do Soro antibotulínico tipo A, experimentou vários meios de obtenção da toxina respectiva e obteve toxinas dosando ao redor de 800.000 D. M. M. para o camundongo as quais transformadas em anatoxinas para hiperimunizar equinos com esse material.

Verificou que o esquema da hiperimunização é fundamental para a

obtenção de bons títulos neutralizantes e obtiveram finalmente plasma hiperimune contendo 160 U.A/ml. Esse soro após purificação e concentração apresentou um título de cerca de 1.400 UA/ml.

O Soro purificado e concentrado foi diluído para que contivesse 500 UA/ml. que já se encontra disponível para atender eventuais acidentes humanos.

UNITERMOS — Botulismo; envenenamento pela ingestão de conservas, contaminadas com toxina Botulínica.

INTRODUÇÃO

Importância do botulismo.

Dentro do quadro nosológico das intoxicações alimentares encontra-se o botulismo. É um envenenamento ocasionado pela ingestão de conservas alimentícias preparadas sem os devidos cuidados, contaminadas por bactérias anaeróbias pertencentes à espécie *Clostridium botulinum*, secretora do mais potente tóxico conhecido.

Um miligrama de toxina botulínica pura cristalizada contém ao redor de 1 milhão e 200 ml DMM para o cobaio (Van Heyningen, 1950).

Das intoxicações alimentares humanas o botulismo é a mais drástica, sendo a mortalidade causada por ele variável entre 30 a 90 por cento nos casos não tratados e de 20 por cento nos casos tratados (Dumas, 1958).

O único tratamento curativo do botulismo é a soroterapia específica. O êxito da soroterapia reside sempre na precocidade do tratamento, por se tratar de uma toxina com afinidade principal pelo sistema nervoso após a impregnação deste, dificilmente regride o desenvolvimento da sintomatologia característica.

* Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 — Obtenção da toxina botulínica tipo A

3.1.1 — Seleção de cepas toxígenas

Para a obtenção da toxina botulínica tipo A, o primeiro cuidado foi selecionar cepas que apresentassem maior toxigênese. Existiam dez amostras na germoteca do Instituto Butantan, algumas das quais não eram repicadas desde 1937. Todas foram repicadas para meio de Tarozzi (1907); após incubação durante 24 horas a 37°C, foram elas submetidas à bacterioscopia e às provas de pureza, em aerobiose e anaerobiose. Em nenhuma amostra ocorreu, dentro de cinco dias de observação, crescimento em meios aeróbios; somente no meio anaeróbico é que ocorreu crescimento. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri em anaerobiose contendo ágar simples glicosado, adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, afim de observar se os aspectos das colônias eram semelhantes aos descritos para o *C. botulinum* tipo A. Segundo Zeissler (1930), nesse meio de cultura as colônias podem apresentar-se sob cinco aspectos diferentes; as que observamos mostravam somente um desses aspectos: tinham cor cinzenta brilhante, eram salientes e arredondadas e apresentavam bordos irregulares. Amostras colhidas dessas colônias foram submetidas novamente à bacterioscopia: os germes tinham a forma de bastonetes Gram-positivos, com bordos arredondados, isolados ou em pares; observaram-se também, com rara frequência, esporos subterminais, características estas do gênero *Clostridium*.

As cepas por nós experimentadas continham as seguintes indicações no fichário correspondente:

n.º 381-I.B. — Recebida do Dr. Toledo Melo. Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo. Indicações: “*Clostridium botulinum* tipo A, Grupo IX — Amostra 33, recebida da Dra. Hilda Heller em 3.12.31. San Francisco, Califórnia, U.S.A. — amostra 198 do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo”.

n.º 387-I.B. — Recebida do Dr. Toledo Melo. Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo. Indicações: “*Clostridium botulinum* tipo A, recebida da Dra. Hilda Heller em 3.12.31. Isolado em 1931 da cultura de sangue do coração de cobaia. Amostra HER 204 do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo — 10.5.37”.

n.º 388-I.B. — Recebida do Dr. Toledo Melo. Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo. Indicações: “*Clostridium botulinum* tipo A, recebida da Dra. Hilda Heller em 3.12.31. Isolado por I. C. Hall, de um surto em Prince, Colorado, U.S.A., em 1931. Amostra 205 — Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo — 10.5.32”.

n.º 389-I.B. — Recebida do Dr. Toledo Melo. Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo. Indicações: "*Clostridium botulinum* tipo A, recebida da Dra. Hilda Heller em 3.12.31. Isolado nesse laboratório, de uma lata de conserva vinda da Itália em 1929. Amostra 206 — Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo — 10.5.32".

n.c 391-I.B. — Recebida do Dr. Toledo Melo. Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo. — Indicações: "*Clostridium botulinum* tipo A — Grupo VII, recebida da Dra. Hilda Heller em 3.12.31. Isolado em 1930 do trigo vindo de S. Joaquim Valley, California, U.S.A. Amostra HAJ 207 do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo — 10.5.37".

n.º 392-I.B. — Recebida da Dra. Ida A. Bengtson, National Institute of Health, Washington, D.C., U.S.A. Indicações: "*Clostridium botulinum* tipo A. Cepa isolada de azeitonas — 9.6.37. Data 27.7.37".

n.º 394-I.B. — Recebida da Dra. Ida A. Bengtson, National Institute of Health, Washington, D.C., U.S.A. Indicações: "*Clostridium botulinum* tipo A".

n.º 395-I.B. — Recebida do Dr. J. B. Gunnison, que a obteve da coleção do Dr. K. F. Meyer. University of California, San Francisco, U.S.A., 3.8.37. Indicações: *Clostridium botulinum* tipo A".

n.º 62-I.P. — Recebida do Instituto Pasteur, Paris, enviada pelo Prof. A. R. Prévot em 1962. Indicações: "*Clostridium botulinum* tipo A".

n.º 193-I.P. — Recebida do Instituto Pasteur, Paris, enviada pelo Prof. A. R. Prévot, em 1962. Indicações: "*Clostridium botulinum* tipo A".

3.1.2 — Preparo do meio de cultura

O poder da toxigênese varia grandemente de uma raça para outra; algumas raças são muito ativas, enquanto outras são quase atóxicas. O meio de cultura desempenha também papel preponderante para a produção de toxina (Gunnison & Meyer, 1929).

Para determinar o poder toxigênico de cada cepa, utilizamos um meio de cultura apropriado para produção de toxina proposto por Wadsworth (1947).

Foram preparados cinco litros de meio de cultura, segundo a fórmula original com pequenas alterações ditadas pela nossa experiência em trabalhos dessa natureza. Ficou assim constituído o preparo do meio:

Carne de vitela	5000 g
Peptona (Oxóide)	50 g
Cloreto de sódio	25 g
Água	5000 g
Glicose 50%	200 ml

- a) A carne deve ser desembaraçada de gorduras e aponevroses e moida a seguir.
- b) Adicionar um volume de água correspondente ao peso da carne.
- c) Deixar em maceração uma noite na geladeira, entre 4°C a 6°C.
- d) Retirar da geladeira, levar ao fogo e ferver por cinco minutos.
- e) Decantar e filtrar em algodão de vidro; espremer a carne residual em pano, filtrar o suco em algodão de vidro, juntar ao filtrado e reacertar com a mesma água, o volume para 5000 ml.
- f) Dissolver o sal e a peptona em 500 ml de caldo e adicionar ao volume total do meio; misturar e acertar o pH a 8,4.
- g) Aquecer em vapor fluente por cinco minutos, deixar esfriar e reacertar o volume.
- h) Filtrar em papel xarope.
- i) Acertar o pH de 7,6 a 7,8.
- j) Distribuir em balões de fundo chato de 500 ml, contendo 450 ml de meio e cobrir com uma camada de mais ou menos um centímetro de espessura de "Vaspar" (vaselina e parafina), com um ponto de fusão ao redor de 30°C.
- k) Proceder à esterilização fracionada a 100°C, durante meia hora, por três dias consecutivos.
- l) Após a última esterilização, retirar os frascos da autoclave e resfriar bruscamente em água fria até a temperatura de aproximadamente 45°C.

3.1.3 — *Preparo do inoculum*

Prévot & Brygoo (1953) verificaram não haver necessidade de aquecimento prévio do *inoculum*. Seguindo esta orientação, cada cepa foi semeada em 20 ml de meio Tarozzi; após crescimento de 24 horas e conteúdo de cada tubo era utilizado como *inoculum* para cada balão do meio. No momento da sementeira, era também adicionada esterilmente 18 ml da solução de glicose e os balões eram incubados a 37°C, durante um período de dez dias. Retirados da estufa, colhiam-se amostras de cada balão e faziam-se as provas de pureza.

3.1.4 — *Titulação da toxina*

Inicialmente fizemos ensaios preliminares aproximados dos títulos das toxinas botulínicas em DMM em camundongos, segundo Nigg *et alii* (1942) para em seguida procedermos, conforme a recomendação da OMS (1963), a precisar os títulos tóxicos pela determinação do LD 50. Para a toxina botulínica, esta é a menor quantidade de toxina que, quando inoculada intraperitonealmente em camundongo de 18 a 20 gramas, causa a morte de cerca de 50% dos animais em 96 horas.

As amostras para a titulação eram colhidas de cada balão separadamente e centrifugadas a 2.000 r.p.m., durante meia hora, em centrífuga refrigerada a 0°C.

Littauer (1951) conseguiu, com certa precisão, a estabilidade da toxina botulínica tipo A trabalhando à baixa temperatura e empregando, para a sua diluição, uma solução tampão de gelatina fosfatada dipotássica em pH 6,6, conforme preconizado por Stevenson *et alii* (1947). Supõe-se que a adição da gelatina dá à toxina estabilidade provavelmente similar àquela conferida por uma solução concentrada de proteína hidrolisada aminóide (Sommer & Sommer, 1928).

Em seguida, o decantado era diluído em solução de gelatina fosfatada, fazendo-se duas diluições para cada amostra: uma de 1:10.000, correspondente ao título de 20.000 DMM/ camundongo; e, outra, de 1:60.000, correspondente ao título de 120.000 DMM/ camundongo.

De cada diluição inoculamos, individualmente, 0,5 ml em lotes de 4 camundongos, com o peso de 18 a 20 gramas. A observação da morte dos camundongos era feita e anotada a partir de 24 horas até o máximo de observação, que foi de 96 horas, conforme preconizado por Nigg *et alii* (1947). Os resultados encontram-se na Tabela I.

De cada balão semeado foi feito um repique em Tarozzi e repetimos mais uma vez todo o processo, desde a preparação do *inoculum* até a titulação. Os resultados desta segunda prova encontram-se na Tabela II.

3.1.5 — *Toxinotipia*

Não há neutralização entre as toxinas de tipo A e as de tipo B, como alguns autores acreditaram existir (Legroux & Jeramec, 1953). Prévot & Brygoo (1952) demonstraram que essas duas toxinas não apresentavam, na realidade, semelhança antigênica, como ocorre com outros tipos de toxinas botulínicas.

Utilizamos o método preconizado pelo Instituto Pasteur, que permite fazer rapidamente o diagnóstico do tipo (Prévot, 1955).

Tomamos as toxinas a determinar o tipo (as oriundas das raças n.ºs 388-I.B. e 389-I.B. previamente dosadas) e fizemos uma diluição contendo 10 DMM em 0,2 ml. Essa dose era misturada a 0,2 ml. de soro padrão autobotulínico tipo A, contendo 1/10 U.A. de soro padronizado proveniente do "Serum of the Medical Research Council, London". O volume era completado a 0,5 ml, com solução tamponada de gelatina fosfatada. As misturas eram preparadas em quantidade para 5 camundongos e deixadas em contato à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida eram inoculados 0,5 ml em cada um de 4 camundongos. Como controle eram utilizados dois camundongos inoculados por via intraperitoneal com 10 DMM contidas em um volume de 0,5 ml. Havendo sobrevivência dos camundongos inoculados com misturas de soro e toxina dos controles, o tipo está determinado, conforme mostra a Tabela III.

3.1.6 — *Conservação das cepas*

As amostras de *Clostridium botulinum* tipo A usadas para produção de toxina devem ser conservadas à baixa temperatura e em meios especiais de

manutenção, pois facilmente perdem seu poder toxigênico (Stevenson *et alii*, 1947).

Após as provas de pureza e toxinotipia, as amostras selecionadas foram transferidas para o meio de manutenção. Utilizamos o meio recomendado por Wadsworth (1947) para esse fim, cuja composição é a seguinte:

Infusão de carne concentrada

(carne 900 g — água 1000 ml)	500 g
Ágar	5 g
Cloreto de Sódio	5 g
Peptona (Oxoide)	10 g
Água	500 g
Glicose	10 g/kg

Dissolver o ágar na água pela autoclavação, a peptona e o sal na infusão. Misturar. Completar o peso total. Ajustar o pH para 7, 8. Filtrar por aspiração, quando ainda quente, através de algodão de vidro. Pesar o filtrado obtido e adicionar a glicose. Distribuir conforme especificado em tubos de 16 por 133 mm e autoclavar trinta minutos a vapor fluente.

Os tubos assim preparados, após resfriados eram colocados na estufa a 37°C. onde permaneciam durante cinco dias, sendo então transferidos para a geladeira e mantidos à temperatura de 4°C a 6°C.

Stevenson *et alii* (1947) loc. cit. observaram que as culturas quando mantidas a 4°C, preservam sua toxigênese e a conservavam durante cerca de tres meses. Findo esse prazo, precisam ser repicadas para manter ativo seu poder toxigênico.

As cepas por nós selecionadas e conservadas como acima descrito eram, quando necessário, repicadas para o meio de Tarozzi e, após 24 horas de crescimento, utilizadas como inóculo para os meios de produção de toxina.

3.2 — Determinação do tempo necessário para a toxigênese máxima nas nossas condições de trabalho.

Procuramos inicialmente verificar qual era o tempo necessário para se obter a toxigênese máxima para uma das cepas selecionadas (388-I.B.), utilizando sempre o mesmo meio de cultura.

Para isso usamos três balões, contendo 1000 ml de meio de cultura. Usamos a técnica já descrita na secção 3.1.2 “Obtenção da toxina botulínica tipo A”. Os meios eram semeados usando-se um tubo de inóculo para cada balão. Os balões eram incubados a 37°C.

Passamos a colher amostras dos meios a partir do terceiro dia, com intervalos de tres dias, até o vigésimo primeiro dia. Os balões era cuidadosamente agitados antes da colheita da amostra para homogenizar a distribuição da toxina no meio. Em seguida, de cada um era retirada uma amostra de 10 ml e centrifugada a 4.0°C a 2000 r.p.m. durante trinta minutos. No sobre-

nadante era titulada a toxina. Os resultados estão consubstanciados nas Tabelas IV a X

3.3 — Influencia da variação da concentração dos componentes do meio de cultura na toxigênese

Procuramos verificar a influencia que poderia ocorrer na toxigênese modificando-se a concentração dos componentes do meio de cultura já descrito na secção 3.1.2.

Tentamos uma verificação nesse sentido variando a quantidade dos componentes do meio, isto é, carne, peptona e glicose, com exceção do cloreto de sódio, cuja concentração era mantida a mesma. Tomamos três balões: o número (1), contendo cinqüenta por cento da quantidade dos componentes do meio básico; o número (2), as quantidades normais dos componentes do meio básico e, o número (3), o dobro das quantidades do balão número (2).

Empregamos a mesma técnica e os mesmos ingredientes no preparo do meio de cultura para cada balão.

Nos balões (1) e (2), o volume do meio era de 2500 ml e, no balão (3), cujos componentes entravam em dobro, o volume foi dividido em duas porções, cada qual com 1250 ml.

Cada qual dos balões contendo o meio de cultura foi semeado utilizando-se como inóculo 20 ml de cultura de 24 horas em meio de Tarozzi, com a cepa *C. botulinum* tipo A n.º 388-I.B. e incubado a 37°C durante 6 dias. O balão n.º 3, após a retirada de amostra para titulação, era em seguida adicionado de igual volume também de meio concentrado, totalizando assim um volume de 2500 ml e mantido por mais 6 dias de incubação quando era então retirada nova amostra para titulação.

Os balões contendo os meios eram retirados da estufa, colhendo-se em seguida as amostras para as provas de pureza e para titulação da toxina. Cada amostra utilizada para a dosagem era centrifugada e, o sobrenadante, diluído em solução de gelatina fosfatada em alíquotas e titulado em camundongos. Realizamos essa observação com três partidas de meio de cultura preparadas em ocasiões diversas. Os resultados estão inseridos nas Tabelas de n.ºs XI, XII e XIII.

Procuramos ainda verificar o resultado quando utilizado o meio de cultura contendo o dobro dos valores dos componentes, sem dividirmos em duas porções. Observamos os mesmos critérios adotados para as experiências acima.

Após doze dias colhemos amostras da série de três balões. Os resultados estão inseridos na Tabela XIV.

3.4 — Verificação da toxigênese botulínica tipo A no meio de Prévot & Brygoo

Procuramos testar um meio considerado por Prévot & Brygoo (1951) como ótimo para a cultura de clostrídios e, principalmente, para a obtenção de suas toxinas. Este meio é conhecido como meio de V. F.

Fórmula e preparo do meio

Água destilada	4000 ml
Carne de vitela	800 g
Fígado de boi	200 g
HCl (p. a.)	40 ml
Pepsina (Oxóide) 1/500	2,5 g
Glicose	60 g

Misturar a carne e o fígado finamente moidos. Adicionar os dois terços do volume total de água aquecida a 45°C. Dividir o terço restante em duas partes: uma para diluição do HCl e, outra, para a pepsina, os quais são adicionados em seguida ao volume total da mistura. Incubar em estufa a 48°C, durante vinte horas, interromper a digestão pelo aquecimento rápido a 60°C por cinco a dez minutos. Deixar esfriar, filtrar através de algodão de vidro e ajustar o pH do filtrado para 7,7 a 7,8 com solução de NaOH a 40%.

Submeter o filtrado a vapor fluente por quinze minutos. Retirar da autoclave, deixar esfriar em meio ambiente e colocar na geladeira durante vinte e quatro horas. Em seguida, filtrar através de papel xarope e reajustar o pH para 7,6 a 7,8. Distribuir o filtrado em frascos de Erlenmeyer de 5000 ml, contendo 3000 ml de meio de cultura cada um e cobrir com mais ou menos um cm de altura com "Vaspar". Autoclavar a 110°C por trinta minutos.

Retirar da autoclave e resfriar rapidamente, mergulhando os balões em tanque de água fria, até que o meio fique com a temperatura de aproximadamente 45°C.

Foi preparada uma partida para 4 balões.

No momento de semear, adicionar 300 ml de solução de glicose a 20% em cada frasco e incubar em estufa a 37°C.

Para cada balão contendo 3000 ml de meio de cultura usamos um inóculo de 20 ml de meio de Tarozzi com cultura de 24 horas, da cepa n.º 388-I.B. e incubamos durante nove dias. Em seguida, de cada balão colhia-se uma amostra, que era centrifugada a 2000 r.p.m., durante trinta minutos. Separado o sobrenadante, era ele diluído em solução de gelatina fosfatada. Os resultados são apresentados na Tabela XV.

Preparamos nova partida de meio de cultura, usando as mesmas técnicas, com a mesma cepa. Distribuimos o produto em sete balões, cada um contendo 3000 ml. Semeamos nas mesmas condições anteriores e observamos o mesmo tempo de incubação. As titulações estão expostas na Tabela XVI.

3.5 – Influencia do tipo de filtração na perda do título da toxina tipo A

Na produção de toxina botulínica em volumes necessários à hiperimunização, a cultura após a incubação, era, no início dos nossos trabalhos, filtrado em placas Seitz EKS. Verificamos logo que tal procedimento levava a grandes perdas no título da toxina. Supondo que a placa Seitz adsorvia a toxina passamos a utilizar velas Mandler esterilizantes preconizadas por Nigg *et alii* (1946) montadas em forma de cachos com 4 velas de 12 cm de com-

primento e 2 cm de diâmetro, para a filtração de 15 litros. Posteriormente, visto a dificuldade de obter velas Mandler passamos a usar velas Berkefeld N, de 20 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, conjugadas aos pares, para filtrar também 15 litros. Em todos os casos amostras eram colhidas antes da filtração e centrifugadas a 2000 r.p.m. durante 15 minutos para fins de titulação, afim de comparar os títulos antes e depois da filtração. Os resultados estão reunidos na Tabela XVII.

3.6 — Preparo da anatoxina botulínica tipo A

Para transformação das toxinas em anatoxinas, escolhemos aquelas que apresentavam títulos razoáveis, isto é, acima de 100.000 DMM/camundongo.

A quantidade de formalina usada por outros investigadores no preparo das anatoxinas variava entre 0,3% a 1% (Polson *et alii* 1946; Hottle *et alii*, 1947; Prévot *et alii*, 1953).

Procuramos verificar nas nossas condições de trabalho qual a quantidade de formalina suficiente para a destoxificação que preservava melhor antigenicidade. Utilizamos quantidades iguais de toxina, às quais foram adicionadas porcentagens variáveis de formol (0,3, 0,4, 0,5, 0,8 e 1%) e incubamos a 37°C por tempo variável e com agitação diária.

Para cada partida de anatoxina procedíamos à verificação da destoxificação das anatoxinas primeiramente realizados em camundongos de 18 a 20 g de peso. Retirávamos amostras das anatoxinas, após tempos variáveis da ação do formol a 37°C e inoculávamos 1 ml por via intraperitoneal, em lotes de cinco animais. Caso os animais não apresentassem sintomas de toxemia botulínica no prazo de dez dias, passávamos à prova subsequente, que era feita em cobaias de 250 a 300 g de peso, em lotes de cinco animais, inoculados com 5 ml do mesmo material por via subcutânea. A prova prévia feita em camundongos indicava de antemão se havia toxicidade residual ou não.

As cobaias eram observadas durante 40 dias, após o que eram sangradas por punção cardíaca. Os soros obtidos de cada lote eram misturados em partes iguais e a mistura titulada em unidades antitóxicas internacionais, conforme descrito na secção 2.4. Os resultados estão expostos na Tabela XVIII.

Passamos a utilizar, como rotina, em nosso laboratório para a hiperimunização dos equinos, as anatoxinas de bom poder antigênico, isto é, aquelas que determinavam nas cobaias títulos acima de 2,0 U.A.

3.6.1 — Preparo da anatoxina botulínica tipo A precipitada pelo alúmen

Após provas satisfatórias de inocuidade, antigenicidade e esterilidade, as anatoxinas eram adicionadas de uma solução estéril de sulfato de alumínio e potássio a 10% com agitação constante, resultando numa concentração final de 1,25% de alúmen. Após essa adição o pH baixa de 5,5 a 5,8 para 3,8 a 4,0. Para determinar a precipitação ótima era necessário elevar o pH para 5,0, com uma solução de hidróxido de sódio a 40% e deixar sedimentar durante 24 horas. O precipitado assim obtido contém toda a substância antigênica. Após a sedimentação era desprezado o sobrenadante e o precipitado ressus-

penso ao nível primitivo com solução salina e agitado; em seguida, deixa-se novamente repousar por vinte e quatro horas, quando é novamente retirado por sifonagem o sobrenadante; essa operação é repetida tres a quatro vezes até obter-se um sobrenadante límpido.

3.6.2 — *Prova de antigenicidade da anatoxina precipitada pelo alúmen*

Baseamo-nos na observação de Rice *et alii* (1947) que consiste na inoculação de 1 ml de anatoxina precipitada pelo alúmen a um lote de cinco cobaias de 250 a 300 g, por via subcutânea. Após quarenta dias, os animais são sangrados por punção cardíaca em 5 a 10 ml; os plasmas são misturados em partes iguais e a mistura dosada em camundongos de 18 a 20 g, em número de quatro para cada título (1 U.A., 2 U.A., 4 U.A., 8 U.A., 16 U.A.).

Os títulos encontrados variaram entre 1 U.A. a 16 U.A. Considerávamos como boa a resposta antigênica quando encontrávamos títulos acima de duas unidades. Após quarenta e oito horas, as cobaias sangradas eram inoculadas com 100.000 DMM de toxina botulínica tipo A com o intuito de ratificar o resultado da prova anterior.

Selecionadas as anatoxinas precipitadas pelo alúmen, isto é, aquelas que apresentavam maior antigenicidade, passamos a utilizá-las na hiperimunização de equinos para obtenção de antitoxina botulínica.

3.7 — *Hiperimunização de cavalos para obtenção da antitoxina botulínica tipo A*

Iniciamos com um esquema de hiperimunização preconizado por Weinberg & Goy (1925), empregando anatoxina de antigenicidade comprovada. Começamos aplicando em 4 cavalos uma dose vacinante de 10 ml. Após 15 dias pusemos em prática o esquema de hiperimunização, com inoculações subcutâneas, principiando com a dose de 30 ml para cada animal.

De 15 em 15 dias continuamos aplicando as seguintes doses individuais: 60 ml, 110 ml, 200 ml, 300 ml e 500 ml.

Sete dias após a última inoculação, fizemos a sangria exploradora na veia jugular, para aferição do grau de resposta. A titulação do plasma de cada cavalo foi feita separadamente pelo teste de neutralização, cuja técnica, está descrita no "Boletim de L'Organization Mondiale de la Santé (1963)".

Visto que esse esquema de hiperimunização não proporcionou resultados satisfatórios — os plasmas dosaram entre 10-40 U.A., outros esquemas foram tentados.

Dentre os esquemas de hiperimunização por nós ensaiados o que melhores resultados nos proporcionou foi aquele decalcado de nossa experiência no Instituto Butantan, para a hiperimunização em difteria com algumas modificações que não compete discutir aqui.

Nesse sistema as inoculações de antígeno eram administradas em pequenas quantidades diariamente durante as três primeiras semanas; na quarta semana as inoculações eram administradas em dias alternados e, na quinta e

sexta semanas, eram feitas apenas duas inoculações, de acordo com o seguinte protocolo:

Início de imunização

1.ª semana

1.º dia	5 ml Anatoxina pp. alúmen
2.º dia	5 ml " " "
3.º dia	5 ml " " "
4.º dia	10 ml " " "
5.º dia	10 ml " " "
6.º dia	10 ml " " "

2.ª semana

1.º dia	20 ml Anatoxina pp. alúmen
2.º dia	20 ml " " "
3.º dia	20 ml " " "
4.º dia	40 ml " " "
5.º dia	40 ml " " "
6.º dia	40 ml " " "

3.ª semana

1.º dia	60 ml Anatoxina pp. alúmen
2.º dia	60 ml " " "
3.º dia	60 ml " " "
4.º dia	80 ml " " "
5.º dia	80 ml " " "
6.º dia	80 ml " " "

4.ª semana

1.º dia	100 ml Anatoxina pp. alúmen
2.º dia	100 ml " " "
3.º dia	100 ml " " "
6.º dia	150 ml " " "

5.ª semana

2.º dia	150 ml Anatoxina pp. alúmen
5.º dia	150 ml " " "

6.ª semana

2.º dia	200 ml Anatoxina pp. alúmen
5.º dia	200 ml " " "

Ao fim da primeira imunização cada cavalo havia recebido um total de 1.795 ml de antígeno; todos suportaram bem esse esquema de hiperimunização e não apresentaram reações de maior importância.

Sete dias após a última dose de antígeno era feita a sangria exploradora; se apresentassem título suficiente de anticorpos os animais eram sangrados (5% do seu peso) três vezes, com intervalo de dois dias entre cada sangria. Em seguida os animais entravam em período de repouso por um espaço de trinta dias. Findo esse tempo eram submetidos à reimunização durante um período de quatro semanas, obedecendo ao seguinte esquema:

1.ª semana

3.º dia	50 ml Anatoxina pp. alúmen
6.º dia	50 ml " " "

2.ª semana

3.º dia	100 ml Anatoxina pp. alúmen
6.º dia	100 ml " " "

3.ª semana

3.º dia	150 ml Anatoxina pp. alúmen
6.º dia	150 ml " " "

4.ª semana

3.º dia	200 ml Anatoxina pp. alúmen
6.º dia	200 ml " " "

Cada animal recebia um total de 1.000 ml de antígeno.

Repetia-se a imunização após cada período de sangria e repouso.

Todos os cavalos eram sangrados em 5% do seu peso. O sangue era recebido sobre uma solução de 17% de citrato de sódio, na proporção de 10% dessa solução, em relação ao volume de sangue a ser colhido. Em seguida, era conservado na geladeira até que houvesse separação do plasma.

O plasma sobrenadante era então decantado, fenolado a 0,4% e, em seguida, colocado e conservado em geladeira, aguardando maiores volumes para serem ajuntados antes da purificação e concentração.

3.8 — Determinação da potencia da antitoxina botulínica tipo A Sôro padrão

Para titulação de nossas antitoxinas utilizamos um soro padrão enviado pela "W.H.O." — "International Laboratory for Biological Standards by Statens Serum Institute", de Copenhage, acondicionado em ampolas sob a forma de pó seco (lioofilizado) contendo 68,0 mg, equivalente a 500 U.A.

Dissolvendo-se o conteúdo da ampola em 10 ml, constituídos por uma parte de solução salina isotônica esteril misturada com duas partes de glicerol neutro e estéril, cada mililitro desse soluto contém 50 unidades internacionais de soro padrão antibotulínico tipo A.

Toxina (Determinação da DL50)

Tomamos 150 ml de uma toxina botulínica tipo A por nós preparada e misturamos a igual quantidade de glicerol neutro, estéril. A mistura era mantida em geladeira a 4°C. O resultado da determinação do título tóxico em DL50 para camundongos encontra-se na Tabela XIX, mostrando conter cerca de 87.900 DL50 por ml.

A toxina foi, em seguida, diluída a 1:8, de modo a conter aproximadamente 1.000 DMM em 0,1 ml afim de determinar o seu limite-morte ou teste-dose.

Determinação do limite-morte

Da mistura da toxina e soro padrão, foram preparadas nove alíquotas. Tomamos quantidades fixas de soro padrão, isto é, 0,5 U.A., e o misturamos com quantidades variadas da toxina utilizada como padrão e diluída a 1:8. O volume final era completado para 2,5 ml com solução de gelatina fosfatada e 0,5 ml de cada mistura inoculada por via intraperitoneal em cada um de quatro camundongos de 18 a 20 g de peso. Os resultados estão expostos na Tabela XX.

Doseamento das misturas de plasma e do soro final

Os plasmas obtidos pela hiperimunização de equinos eram dosados em U.A., segundo o método da OMS, e reunidos em volume suficiente para as operações de purificação e concentração.

Um protocolo exemplificativo encontra-se na Tabela XXI.

O plasma foi diluído 1:180 e desta diluição tomamos volumes correspondentes aos títulos propostos: 0,64 ml, 0,56 ml, 0,50, ml e 0,45 ml. Cada um desses volumes foi misturado com 5 doses testes da toxina contida em 0,7 ml e o volume completado para 2,5 ml com solução de gelatina fosfatada. As soluções assim obtidas foram incubadas à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida era inoculado, por via intraperitoneal, 0,5 ml de cada mistura em camundongos pesando de 18 a 20 g. Para cada título proposto, eram inoculados quatro animais, havendo sempre 0,5 ml de excedente. Os animais permaneciam em observação por 96 horas.

Todas as misturas de plasmas foram concentradas e purificadas segundo o método de Pope, adaptado e modificado por Furlanetto & Santos (1961). O doseamento do plasma exemplificado na Tabela XXI após a purificação e concentração descrita, encontra-se na Tabela XXII.

De acordo com os requisitos mínimos da Organização Mundial de Saúde, o soro antibotulínico tipo A por nós preparado foi diluído para conter 500 U.A./ml. O protocolo final da titulação desse soro após a conveniente diluição, encontra-se na Tabela XXIII.

RESULTADOS

Neste capítulo estão insertas as tabelas referentes aos resultados obtidos em nossas experimentações, comentadas a seguir.

Limitamo-nos, pois, à apresentação das tabelas com explicações sucintas das mesmas.

TABELA I

Resultados das titulações da toxina obtida das diversas amostras de C. botulinum tipo A. Primeira passagem em meio de cultura.

Cepas nº	Títulos testados	Tempo de observação em horas			
		24	48	72	96
381-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	1/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
387-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
388-I.B.	20.000	2/4	2/4	3/4	4/4
	120.000	0/4	0/4	1/4	2/4
389-I.B.	20.000	0/4	0/4	2/4	3/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
391-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
392-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
394-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
395-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
62-I.P.	20.000	0/4	2/4	3/4	4/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
193-I.P.	20.000	0/4	0/4	2/4	3/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4

I.B. — Instituto Butantan

Procedência:

I.P. — Instituto Pasteur

TABELA II

*Resultados das titulações obtidas pelo cultivo de diversas amostras
 de C. botulinum tipo A. Segunda passagem em meio de cultura*

Cepas nº	Títulos testados	Tempo de observação em horas			
		24	48	72	96
381-I.B.	20.000	0/4	2/4	2/4	4/4
	120.000	0/4	0/4	1/4	2/4
387-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
388-I.B.	20.000	4/4	4/4	4/4	4/4
	120.000	4/4	4/4	4/4	4/4
389-I.B.	20.000	4/4	4/4	4/4	4/4
	120.000	4/4	4/4	4/4	4/4
391-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
392-I.B.	20.000	4/4	4/4	4/4	4/4
	120.000	4/4	4/4	4/4	4/4
394-I.B.	20.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	120.000	0/4	0/4	0/4	0/4
395-I.B.	20.000	0/4	2/4	2/4	4/4
	120.000	0/4	0/4	3/4	3/4
62-I.P.	20.000	4/4	4/4	4/4	4/4
	120.000	4/4	4/4	4/4	4/4
193-I.P.	20.000	2/4	3/4	4/4	4/4
	120.000	1/4	2/4	2/4	4/4

I.B. — Instituto Butantan

Procedência:

I.P. — Instituto Pasteur

TABELA III

Determinação do tipo das toxinas oriundas das cepas nº 388-I.B e 389-I.B.

Toxina da cepa nº 388-I.B.	Toxina da cepa nº 389-I.B.	Sôro padrão** Volume	Solução de gelatina fosfatada Volume	Volume inoculado ***	Observação			
					Animais nº	24	48	72
Incubação de uma hora em temperatura ambiente								
1 ml*	—	1 ml	0,5 ml	0,5 ml	1	SS	SS	SS
—	1 ml *	1 ml	0,5 ml	0,5 ml	2	SS	SS	SS
—	—	—	—	—	3	SS	SS	SS
1 ml	—	—	—	—	4	SS	SS	SS
—	1 ml	—	—	—	5	SS	SS	SS
—	—	—	—	0,5 ml	6	SS	SS	SS
—	—	—	—	—	7	SS	SS	SS
—	—	—	—	—	8	SS	SS	SS
—	—	—	—	—	9	†	†	†
—	—	—	—	0,5 ml	10	†	†	†
—	—	—	—	—	11	†	†	†
—	—	—	—	0,5 ml	12	†	†	†
Controles								

* 1 ml = 50 DMM

** soro padrão tipo A diluído contendo 1 ml = 0,5 U.A. (Serum of the Medical Research Council-London)

*** dose individual por via intraperitoneal em camundongos de 18 a 22 g

**** † = morte do animal

TABELA IV

Determinação do período de toxigênese máxima para a produção de toxina botulínica tipo A. (Cepa nº 388-I.B., amostras dos balões 1, 2 e 3, retiradas após 3 dias de semeadura)*

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	4/4			
	150.000	300.000	2/4	3/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	1/4	3/4	4/4
	250.000	500.000	0/4	1/4	1/4	1/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	100.000	200.000	3/4	4/4		
	150.000	300.000	3/4	4/4		
	200.000	400.000	0/4	2/4	3/4	3/4
	250.000	500.000	0/4	0/4	1/4	1/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	0/4	1/4
3	100.000	200.000	4/4			
	150.000	300.000	3/4	4/4		
	200.000	400.000	2/4	2/4	3/4	4/4
	250.000	500.000	0/4	0/4	1/4	1/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA V

Determinação do período de toxigênese máxima para a produção de toxina botulínica tipo A. (Cepa nº 388-I.B., amostras dos balões 1, 2 e 3 retiradas após seis dias da semeadura)*

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	300.000	600.000	3/4	4/4		
	350.000	700.000	2/4	3/4	4/4	
	400.000	800.000	0/4	0/4	2/4	3/4
	450.000	900.000	0/4	0/4	1/4	1/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	300.000	600.000	0/4	3/4	4/4	
	350.000	700.000	0/4	2/4	4/4	
	400.000	800.000	0/4	0/4	3/4	4/4
	450.000	900.000	0/4	0/4	1/4	1/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	300.000	600.000	1/4	4/4		
	350.000	700.000	0/4	3/4	4/4	
	400.000	800.000	0/4	2/4	2/4	2/4
	450.000	900.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA VI

*Determinação do período de toxigênese máxima para a produção de toxina botulínica tipo A. (Cepa nº 388-I.B., amostras dos balões 1, 2 e 3 retiradas após nove dias de semeadura)**

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	3/4	4/4		
	150.000	300.000	2/4	4/4		
	200.000	400.000	3/4	3/4	4/4	
	400.000	800.000	0/4	0/4	2/4	2/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	100.000	200.000	4/4			
	150.000	300.000	3/4	4/4		
	200.000	400.000	2/4	4/4		
	400.000	800.000	0/4	2/4	3/4	3/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	100.000	200.000	4/4			
	150.000	300.000	2/4	4/4		
	200.000	400.000	2/4	3/4	4/4	
	400.000	800.000	1/4	3/4	3/4	3/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA VII

*Determinação do período de toxigênese máxima para a produção de toxina botulínica tipo A. (Cepa nº 388-I.B., amostras dos balões 1, 2 e 3 retiradas após doze dias de semeadura)**

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	200.000	400.000	3/4	4/4		
	300.000	600.000	3/4	4/4		
	400.000	800.000	1/4	1/4	3/4	3/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	1/4	1/4
2	200.000	400.000	4/4			
	300.000	600.000	2/4	3/4	4/4	
	400.000	800.000	0/4	1/4	2/4	2/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	200.000	400.000	2/4	4/4		
	300.000	600.000	2/4	3/4	4/4	
	400.000	800.000	1/4	2/4	3/4	4/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	1/4	1/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA VIII

Determinação do período de toxigênese máxima para a produção de toxina botulínica tipo A. (Cepa nº 388-I.B., amostras dos balões 1, 2 e 3 retiradas após quinze dias de semeadura)*

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	200.000	400.000	4/4			
	300.000	600.000	2/4	4/4		
	400.000	800.000	1/4	2/4	2/4	3/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	200.000	400.000	3/4	4/4		
	300.000	600.000	3/4	4/4		
	400.000	800.000	2/4	3/4	3/4	3/4
	500.000	1.000.000	1/4	1/4	1/4	1/4
3	200.000	400.000	1/4	4/4		
	300.000	600.000	3/4	4/4		
	400.000	800.000	0/4	0/4	2/4	2/4
	500.000	1.000.000	0/4	0/4	1/4	1/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA IX

Determinação do período de toxigênese máxima para a produção de toxina botulínica tipo A. (Cepa nº 388-I.B., amostras dos balões 1, 2 e 3 retiradas após dezoito dias de semeadura)*

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	2/4	4/4		
	200.000	400.000	1/4	3/4	4/4	
	300.000	600.000	0/4	2/4	2/4	3/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	1/4
2	100.000	200.000	4/4			
	200.000	400.000	2/4	4/4		
	300.000	600.000	0/4	3/4	3/4	3/4
	400.000	800.000	0/4	1/4	1/4	1/4
3	100.000	200.000	3/4	4/4		
	200.000	400.000	1/4	3/4	3/4	3/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	2/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA X

Determinação do período de toxigênese máxima para a produção de toxina botulínica tipo A. (Cepa nº 388-I.B., amostras dos balões 1, 2 e 3 retiradas após vinte e um dias de semeadura) *

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	2/4	4/4		
	200.000	400.000	0/4	1/4	4/4	
	300.000	600.000	0/4	0/4	2/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	100.000	200.000	3/4	4/4		
	200.000	400.000	1/4	1/4	3/4	3/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	1/4	1/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	100.000	200.000	2/4	4/4		
	200.000	400.000	0/4	2/4	2/4	3/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA XI

Dosagem da toxina botulínica tipo A. do primeiro ensaio onde houve variação da concentração dos componentes do meio de cultura após seis dias de incubação.
(Cepa nº 388-I.B.) *

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	100.000	200.000	0/4	1/4	2/4	4/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	100.000	200.000	1/4	3/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	0/4	2/4	3/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	1/4	1/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3A	100.000	200.000	2/4	4/4		
	200.000	400.000	2/4	2/4	3/4	4/4
	400.000	800.000	0/4	1/4	1/4	3/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	1/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

Balão nº 1 — Volume 2.500 ml. Meio de cultura isotonizado mas com 50% dos valores de seus componentes. Dosada após 6 dias de incubação.

Balão nº 2 — Volume 2.500 ml. Meio de cultura conforme a fórmula original. Dosada após 6 dias de incubação.

Balão nº 3 — Volume original 1.250 ml. Meio de cultura isotonizado mas com 200% dos valores de seus componentes. Dosada após 6 dias de incubação.

Balão nº 3 A — O mesmo que o balão nº 3, acrescentado, 6 dias após, da quantidade restante do mesmo meio, titulado após outros 6 dias de incubação.

TABELA XII

*Dosagem da toxina botulínica tipo A, do segundo ensaio onde houve variação da concentração dos componentes do meio de cultura após seis dias de incubação.
(Cepa nº 388-I.B.)**

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	100.000	200.000	0/4	0/4	2/4	4/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	100.000	200.000	0/4	2/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	0/4	3/4	4/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3A	100.000	200.000	2/4	3/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	1/4	2/4	4/4
	400.000	800.000	1/4	2/4	2/4	4/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	1/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

Balão nº 1 — Volume 2500 ml. Meio de cultura isotonizado mas com 50% dos valores de seus componentes.

Balão nº 2 — Volume 2.500 ml. Meio de cultura conforme a fórmula original.

Balão nº 3 — Volume original 1.250 ml. Meio de cultura isotonizado mas com 200% dos valores de seus componentes.

Balão nº 3A — O mesmo que o balão nº 3, acrescentado, 6 dias após, da quantidade restante do mesmo meio e titulado após outros 6 dias de incubação.

TABELA XIII

*Dosagem da toxina botulinica tipo A, do terceiro ensaio onde houve variação da concentração dos componentes do meio de cultura apó seis dias de incubação. (Cepa nº 388-I.B.)**

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	100.000	200.000	0/4	1/4	2/4	4/4
	200.000	400.000	0/4	1/4	1/4	3/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	100.000	200.000	1/4	2/4	3/4	4/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	1/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3A	100.000	200.000	1/4	3/4	4/4	
	200.000	400.000	1/4	2/4	3/4	4/4
	400.000	800.000	0/4	1/4	2/4	3/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	1/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

Balão nº 1 — Volume 2.500 ml. Meio de cultura isotonizado mas com 50% dos valores de seus componentes.

Balão nº 2 — Volume 2.500 ml. Meio de cultura conforme a fórmula original.

Balão nº 3 — Volume original 1.250 ml. Meio de cultura isotonizado mas com 200% dos valores de seus componentes.

Balão nº 3A — O mesmo que o balão nº 3, acrescentando, 6 dias após, da quantidade restante do mesmo meio e titulado após outros 6 dias de titulação.

TABELA XIV

*Dosagem da toxina botulinica tipo A, preparada no meio de Wadsworth com o dôbro dos componentes do meio de cultura após doze dias de incubação. (Cepa nº 388-I.B.)**

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	150.000	300.000	1/4	2/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	1/4	2/4	4/4
	250.000	500.000	0/4	1/4	2/4	3/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	0/4	1/4
2	150.000	300.000	0/4	0/4	1/4	3/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	250.000	500.000	1/4	1/4	2/4	2/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	150.000	300.000	0/4	3/4	3/4	4/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	2/4	3/4
	250.000	500.000	0/4	1/4	1/4	2/4
	300.000	600.000	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

** Cada balão contendo o volume de 2.500 ml de meio

TABELA XV

*Dosagem da toxina botulinica tipo A, preparada no meio de Prévot & Brygoo. Volume 3000 ml em cada balão. Incubação de nove dias a 37°C. (Cepa nº 388-I.B.) **

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	3/4	4/4		
	200.000	400.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	100.000	200.000	0/4	4/4		
	200.000	400.000	0/4	2/4	2/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	100.000	200.000	2/4	4/4		
	200.000	400.000	0/4	1/4	1/4	1/4
	400.000	800.000	0/4	1/4	2/4	2/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
4	100.000	200.000	0/4	3/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA XVI

*Dosagem da toxina botulinica tipo A, preparada no meio de Prévot & Bryggo. Volume 3.000 ml em cada balão. Incubação de nove dias a 37°C. (Cepa nº 388-I.B.)**

Balão nº	Diluição da Toxina 1:	Título DMM	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
1	100.000	200.000	2/4	3/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	0/4	2/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
2	100.000	200.000	0/4	2/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	1/4	2/4	3/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
3	100.000	200.000	0/4	2/4	2/4	3/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	1/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
4	100.000	200.000	0/4	0/4	2/4	3/4
	200.000	400.000	0/4	0/4	0/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	0/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
5	100.000	200.000	1/4	2/4	4/4	
	200.000	400.000	1/4	1/4	2/4	2/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	0/4	1/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
6	100.000	200.000	2/4	2/4	3/4	4/4
	200.000	400.000	2/4	2/4	3/4	3/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	1/4	2/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4
7	100.000	200.000	0/4	3/4	4/4	
	200.000	400.000	0/4	1/4	2/4	3/4
	400.000	800.000	0/4	0/4	1/4	1/4
	800.000	1.600.000	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

TABELA XVII

Perda da toxidez da toxina botulinica tipo A após a clarificação e filtração em filtros diferentes. Títulos em DMM camundongos.

Partida nº	Título da Toxina antes da Filtração	Título da toxina após a filtração			Perda em %
		Filtros Seitz	Vela Mandler	Vela Berkefeld N	
1	200.000	40.000			80%
2	100.000	20.000			80%
3	300.000	100.000			66%
					Média: 75,3%
4	200.000		100.000		50%
5	200.000		90.000		55%
6	400.000		300.000		25%
					Média: 43,3%
7	400.000		200.000		50%
8	300.000		225.000		25%
9	200.000		150.000		25%
					Média: 33%

TABELA XVIII

Determinação da porcentagem de formol necessária para a destoxificação em função do tempo de incubação e título antigênico após a inoculação de 5 ml em cobaias para cada % de formol

Número da partida de Toxina	Título da Toxina em DMM	Porcentagem de formol*	Tempo para destoxificação em dias	Título da antitoxina em U.A.**
17	120.000	0,3	30	0,5
		0,4	30	0,5
		0,5	25	1,0
		0,8	15	0,5
		1,0	15	0,2
23	100.000	0,3	35	3
		0,4	30	3
		0,5	25	5
		0,8	20	1
		1,0	15	1
26	200.000	0,3	35	1
		0,4	35	1
		0,5	30	2
		0,8	20	0,1
		1,0	20	0,1
31	100.000	0,3	30	5
		0,4	30	5
		0,5	20	10
		0,8	15	2
		1,0	15	2
35	180.000	0,3	30	1
		0,4	30	1
		0,5	25	5
		0,8	15	0,5
		1,0	15	0,5

* comercial B. Herzog

** Título da mistura do sôro de 5 cobaias imunizadas com toxóide obtido com porcentagens diferentes de formol.

TABELA XIX

*Determinação da DL50 da toxina botulinica tipo A utilizada como padrão**

Título correspondente	Diluição da Toxina 1:	Tempo de observação em horas			
		24	48	72	96
60.000	30.000	3/10	6/10	9/10	10/10
72.000	36.000	5/10	6/10	9/10	9/10
86.400	43.200	2/10	6/10	8/10	8/10
103.680	51.840	1/10	3/10	3/10	5/10
124.416	62.208	0/10	2/10	2/10	2/10
149.299	74.649	0/10	0/10	0/10	0/10

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos

Resultado. DL50 calculada pelo método de Reed & Muench (1938) = 87.958/ml

TABELA XX

*Determinação do Limite-morte (L+) ou teste dose da toxina botulinica tipo A utilizada como padrão**

Toxina diluída a 1:8 **	Soro padrão diluído a 1:50 (0,1 ml = 0,1 U.A.)	Solução de gelatina fosfatada	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
0,10 ml	0,5 ml	1,9 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,20 ml	0,5 ml	1,8 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,30 ml	0,5 ml	1,7 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,40 ml	0,5 ml	1,6 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,50 ml	0,5 ml	1,5 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,60 ml	0,5 ml	1,4 ml	0/4	0/4	1/4	1/4
0,70 ml	0,5 ml	1,3 ml	0/4	1/4	2/4	3/4
0,80 ml	0,5 ml	1,2 ml	1/4	2/4	4/4	
0,90 ml	0,5 ml	1,1 ml	3/4	4/4		

* Inoculação de 0,5 ml da mistura por via intraperitoneal em camundongos

** Volumes para 5 camundongos

Observações: A quantidade de toxina que praticamente determinou cerca de 50% de morte em 96 horas foi a de 0,14 ml. Tomamos, pois, esse valor como teste dose de nossa toxina.

TABELA XXI

*Resultados dos doseamentos da mistura de plasmas antibotulinicos tipo A**
(Cavalo nº 420)

Tituto correspondente em U.A.	Plasma		Toxina para 5 dose-teste (L_+) = 0,14 ml	Solução de gelatina fosfatada	Tempo de observação em horas			
	Diluição 1:	Volume			24	48	72	96
140		0,64 ml	0,70 ml	1,16 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
160		0,56 ml	0,70 ml	1,24 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
180	180	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	0/4	4/4		
200		0,45 ml	0,70 ml	1,35 ml	4/4			
Soro padrão								
1,2		0,40 ml	0,70 ml	1,40 ml	1/4	4/4		
1,0	50	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	0/4	0/4	1/4	2/4
0,8		0,60 ml	0,70 ml	1,20 ml	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos.

A menor quantidade de plasma que preservou da morte pelo menos cinquenta por cento das camundongos inoculados foi a correspondente à diluição de 1:160, por onde se conclui que o tituto do plasma é de 160 U.A./ml.

TABELA XXII

*Resultado da dosagem do soro antibotulínico tipo A purificado**

Tituto correspondente em U.A.	Soro		Toxina para 5 dose teste (L_+) = 0,14 ml	Solução de gelatina fosfatana	Tempo de observação em horas			
	Diluição 1:	Volume			24	48	72	96
600		1,00 ml	0,70 ml	0,80 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
800		0,75 ml	0,70 ml	1,05 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
1.000		0,60 ml	0,70 ml	1,20 ml	0/4	1/4	1/4	1/4
1.200	1.200	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	0/4	1/4	1/4	1/4
1.400		0,43 ml	0,70 ml	1,37 ml	0/4	0/4	2/4	2/4
1.600		0,37 ml	0,70 ml	1,43 ml	2/4	3/4	4/4	
Soro Padrão								
50	50	0,40 ml	0,70 ml	1,40 ml	4/4			
		0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	0/4	1/4	2/4	2/4
		0,60 ml	0,70 ml	1,20 ml	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos.

Pelos resultados acima pode-se atribuir o valor de 1.400 U.A./ml.

TABELA XXIII

*Dosagem do sôro antibotulinico tipo A após sua purificação e conveniente diluição**

Tituto ponden- to em U.A.	Soro		Toxina para 5 dose teste (L+) = 0,14 ml	Solução de gelatina fosfatada	Tempo de observação em horas			
	Diluição 1:	Volume			24	48	72	96
425	425	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	0,4	0/4	0/4	0/4
450	450	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	0,4	0/4	0/4	0/4
475	475	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
500	500	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	1/4	1/4	2/4	2/4
525	525	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	0/4	2/4	4/4	
550	550	0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	2/4	4/4		
Soro Padrão								
50	50	0,40 ml	0,70 ml	1,40 ml	4/4			
		0,50 ml	0,70 ml	1,30 ml	1/4	3/4	3/4	3/4
		0,60 ml	0,70 ml	1,20 ml	0/4	0/4	0/4	0/4

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal em camundongos.

A menor diluição de soro que preservou da morte cinquenta por cento dos camundongos foi a de 1:500, conforme mostra a Tabela acima. Esse soro contém, portanto, 500 U.A./ml. O soro convenientemente diluído é acondicionado em ampolas de 20 ml cada qual contendo 10.000 U.A.

COMENTÁRIOS E DISCUSSÃO

A ocorrência do surto de botulismo na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (1958) veio mostrar a necessidade de se produzir no Brasil os soros antibotulínicos contra os tipos de intoxicação humana mais frequentes, os tipos A e B, até então importados de países estrangeiros. Neste trabalho, pioneiro no país, nos preocupamos inicialmente com o preparo do soro contra o tipo A, visto o acidente acima descrito ter sido produzido por esse tipo. Muito embora não se tenham ainda descrito intoxicações no Brasil causadas pelo *Clostridium botulinum* tipo B, sendo esta intoxicação frequente em outros países, resolvemos também preparar este último soro a fim de estarmos melhor equipados contra eventuais acidentes. No entanto, neste trabalho somente descrevemos o preparo do primeiro soro, isto é, o anti tipo A, visto que o preparo do segundo soro constituiria uma repetição da metodologia empregada.

Os acidentes botulínicos revestem-se geralmente de aspecto grave e o êxito da terapêutica sorológica (ainda a única medicação indicada) está na aplicação precoce do soro.

No processo de obtenção do soro antibotulínico em escala industrial realizamos numerosos ensaios para atingirmos o nosso objetivo, pois não havia técnica pré-determinada que nos pudesse servir de orientação.

Preliminarmente procuramos selecionar as cepas mais toxigênicas das existentes na germotéca do Instituto Butantan como podemos observar nas Tabelas I e II.

Através dos títulos das toxinas obtidas na segunda passagem, houve incremento da toxigênese em algumas amostras. Tivemos, portanto, de optar, um tanto arbitrariamente, por uma ou duas cepas mais toxigênicas. Assim sendo, na primeira passagem (Tabela 1), para a raça n.º 388-I.B., a toxina apresentou um título de 20.000 DMM/camundongo já em 24 horas. Situação quase igual notou-se com as raças n.ºs 389-I.B., 62-I.P. e 193-I.P. Optamos, pois, trabalhar inicialmente com a primeira daquelas raças e caso fosse necessário, mais tarde, poderíamos utilizar as demais citadas.

Em seguida, passamos à confirmação do tipo, submetendo duas raças à prova de toxinotipia, através da qual certificamo-nos de que as referidas raças pertencem de fato ao tipo A (Seção 3.1.5).

Quanto ao tempo necessário para a obtenção da toxigênese máxima na primeira titulação, que foi realizada em amostra colhida após três dias de semeadura, a toxina apresentou o título de 400.000 DMM/camundongo; colhida, porém, após seis dias, o título apresentado foi de 800.000 DMM/camundongo (Tabelas IV e V). Verificamos, em seguida, que o título se mantinha estável do sexto ao décimo quinto dia, quando a cultura era mantida a 37°C; após este período, ocorria um decréscimo do título tóxico, conforme demonstram as Tabelas V a X.

Essas observações foram repetidas por três vezes com os mesmos resultados em experiências posteriores, que deixamos de apresentar aqui, a fim de evitar repetições desnecessárias. Nossos resultados estão de acordo com as observações de Stevenson *et alii* (1947), isto é, de que o aumento do título da toxina é gradativo nos seis primeiros dias, havendo, em seguida, estabilização, para depois ocorrer um decréscimo lento de seu título.

Prévot et Brygoo (1953) consideram a autólise como uma das causas da liberação de toxina. A lise espontânea das bactérias aumentaria a quantidade de toxina livre numa proporção logarítmica, segundo Stevenson *et alii* (1947). Com esse objetivo, os referidos autores preconizavam a destruição dos corpos bacterianos, através de congelação e descongelamento. Supondo-se que a autólise bacteriana fosse a responsável pela toxigênese não nos parece muito razoável que o título da toxina não aumentasse além do sexto dia de incubação, quando deve haver provavelmente uma autólise maior.

Propusemo-nos, em seguida, a verificar os títulos das toxinas quando obtidas em meio de cultura para o qual variamos a concentração dos componentes do mesmo.

Partindo do meio básico, alteramos a concentração de seus componentes, para mais ou para menos, sempre mantendo o mesmo volume. Com esse procedimento, obtivemos os resultados expostos nas Tabelas XI, XII e XIII. Por aí, pode-se verificar que, com o meio contendo a metade dos componentes (Balão n.º 1) do meio básico, a toxina não chegou a dosar 200.000 DMM/camundongo, ao passo que, com o meio básico normal (Balão n.º 2), o título pode seguramente ser estimado em 400.000 DMM/camundongo; por outro lado, no meio de cultura contendo o dobro dos componentes do meio básico (Balão n.º 3), a toxina obtida no sexto dia dosou também 400.000 DMM/camundongo. No entanto, quando se adiciona sobre o balão n.º 3 o restante do meio de cultura (Balão n.º 3A), a toxina, titulada após outros 6 dias de incubação, chegou seguramente a dosar 800.000 DMM/camundongo. Tal experimentação parece indicar que a toxigênese máxima obtida no sexto dia não deve ocorrer por esgotamento dos componentes do meio, pois o Balão n.º 3, contendo o dobro dos ingredientes, não ultrapassou o título obtido com o Balão n.º 2. Talvez o acúmulo de metabólitos iniba o crescimento e consequentemente cause diminuição da toxigênese, essa sugestão decorre dos resultados obtidos com o Balão n.º 3A, onde foi adicionada, após 6 dias de crescimento, na porção do mesmo meio, tendo ocorrido, como consequência, nítido aumento da quantidade de toxina, chegando a obter-se 800.000 DMM/camundongo. Tais resultados parecem ainda contradizer o fato de que a lise bacteriana seja a única responsável pela toxigênese. No nosso caso, parece lícito raciocinar-se que a adição de novo meio de cultura torna a promover novo crescimento além de diluir excessiva concentração de metabólitos impedientes do crescimento. Nessas condições, parece que é durante a nova fase de multiplicação bacteriana que surge nova toxigênese. Supõe-se que os resultados obtidos na Tabela XIV, relativos a 3 balões que continham o dobro dos ingredientes, confirmam nosso ponto de vista, pois, aí, os títulos praticamente não ultrapassaram 500.000 DMM/camundongo.

Procuramos também comparar os títulos das toxinas obtidas com o meio de cultura de Wadsworth e o meio de Prévot & Brygoo, parecendo não haver

diferença relevante entre os títulos das toxinas obtidas, conforme podemos comprovar pela comparação entre as Tabelas V e XV.

Ficou em seguida demonstrado que o processo de filtração da toxina acarreta grande perda de toxicidade. Quando se usam filtros Seitz, com placas esterilizantes (EKS), essa perda é de cerca de 70 a 80%; quando se usam velas esterilizantes Mandler, a perda de toxicidade é da ordem de 43,3%; quando se usam velas Berkefeld N, essa perda reduz-se a cerca de 33% (Tabela XVII).

Pela ação do formol as toxinas sofrem processo de destoxificação; segundo Henrique & Sorensen (1909), isso ocorre em consequência de um bloqueio, por ação do formol, dos radicais amínicos responsáveis pela toxicidade.

A quantidade de formol a ser empregada, de acordo com vários pesquisadores, varia dentro de um certo limite. Levando em consideração esses fatos, determinamos a quantidade de formol necessária para completa destoxificação, sem prejuízo do poder antigênico. Esse valor, encontrado por nós para a toxina botulínica tipo A, obtida nos meios já citados, foi de 0,5%; nesse caso destoxificação ocorre ao redor de vinte e cinco dias em estufa 37°C (Tabela XVIII).

O emprego de bons adjuvantes nas vacinas para se obter um alto poder imunizante constitui uma das preocupações primordiais dos pesquisadores. Dentre os adjuvantes usados, o alúmen tem sido o mais empregado para a precipitação da fração antigênica das anatoxinas. Nigg *et alii* (1947) estudaram comparativamente várias amostras de anatoxinas botulínicas tipo A, precipitadas por concentrações diferentes de alúmen em função da resposta antigênica obtida em cobaias.

Apesar de terem verificado que os melhores resultados foram obtidos com 2% de alúmen, empregaram-no a 1%, justificando que, para a imunização humana, apresenta a vantagem de ser menos irritante, observação essa confirmada por Reames *et alii* (1947).

Welikanow (1931) já havia observado, em cobaias, o alto grau de proteção conferido pela anatoxina contra altas doses de toxina homóloga.

Rice *et alii* (1947) obtiveram melhores resultados com cobaias empregando anatoxinas precipitadas pelo alúmen a 1,25%. Verificaram, ainda, que as cobaias que apresentavam em seu soro títulos antitóxicos acima de 0,01 U.A./ml sobreviviam a uma dose de toxinas entre 160.000 a 480.000 DMM.

Os resultados obtidos por nós, também em cobaias, empregando anatoxinas botulínicas tipo A, precipitadas pelo alúmen a 1,25%, equiparam-se aos dos autores acima citados. Tivemos a oportunidade de confirmar também que as cobaias que apresentavam títulos acima de 2 U.A. eram capazes de resistir à inoculação de 100.000 DMM/cobaia.

O primeiro soro antibotulínico foi conseguido por Van Ermengen (loc. cit.) imunizando cavalos mediante inoculações periódicas de quantidades infinitesimais de toxina botulínica.

A imunização com toxina botulínica apresenta alguns inconvenientes, citados por Prévot (1955): "pode provocar reações tóxicas graves nos animais, durante a hiperimunização, determinando um atraso no esquema imunitário, bem como é demorada a indução da formação de anticorpos". Por motivo optamos pela anatoxina, a qual pode ser manipulada sem maiores precauções.

As amostras de anatoxinas precipitadas pelo alúmen que se mostraram mais antigênicas foram utilizadas para a hiperimunização de equinos.

Para a obtenção de uma antitoxina botulínica tipo A, com títulos razoáveis, foi necessário testar vários esquemas de hiperimunização, dentre eles o preconizado por Weinberg & Goy (1925). Nesse esquema os títulos encontrados giravam ao redor de 10 a 40 U.A. Como os resultados obtidos não eram satisfatórios, não determinamos a sangria definitiva.

Tivemos melhor êxito com a elaboração de um esquema de hiperimunização idealizado por nós e apresentado na Secção 3.7. Com esse esquema, obtivemos títulos ao redor de 160 U.A./ml (Tabela XXI) Esse soro, após a purificação e concentração, apresentou um título de cerca de 1.400 U.A./ml (Tabela XXII).

O soro purificado e concentrado foi diluído para que contivesse 500 U.A./ml, de acordo com o que foi estabelecido na XV Seção do "Expert Committee on Biological Standardization", em dezembro de 1962.

CONCLUSÕES

6.1 — Das dez amostras de *Clostridium botulinum* tipo A, existentes na germoteca do Instituto Butantan, quatro cepas mostraram-se mais toxígenas nos meios de cultura por nós utilizados.

6.2 — O período de toxigênese máxima para uma das cepas por nós trabalhadas (Cepa n.º 388-I.B.) ocorre ao redor do 6.º dia de cultivo em meio apropriado e o título decresce após o 15.º dia, quando a cultura é mantida a 37°C.

6.3 — Variando-se a concentração dos componentes do meio de cultura, há também variações na toxigênese, do que se depreende que a produção de exotoxina está, até certo ponto, diretamente ligada à concentração dos componentes do meio de cultura.

6.4 — Parece que é durante a fase de multiplicação bacteriana que se dá a toxigênese.

6.5 — As toxinas obtidas em ambos os meios de cultura utilizados, Wadsworth e Prévot & Bryggo, não apresentaram diferença relevante, no que diz respeito a títulos tóxicos.

6.6 — A quantidade de formol necessária à destoxificação das toxinas botulínicas tipo A por nós obtidas foi de 0,5%, ocorrendo a transformação em anatoxina ao redor de vinte e cinco dias a 37°C. Nessas condições é melhor preservada a antigenicidade.

6.7 — O esquema de hiperimunização para equinos, preconizado neste trabalho, fornece a resposta rápida e com razoáveis títulos de anticorpos.

6.8 — A mistura de plasma das diversas hiperimunizações reunidas permite obter-se um soro purificado com alto título de anticorpos.

6.9 — É certamente a primeira vez que se prepara no Brasil o soro antibotulínico tipo A para fins terapêuticos, o que coloca nosso país entre os cinco países do mundo a produzir o referido sôro em escala industrial.

SUMMARY — Since no antitoxins for *Clostridium botulinum* have been so far produced in Brazil, the author decided to study the possibility to obtain these preparations at the Department of Immunology in the Instituto Butantan.

Various means of toxin obtention for *C.b.* type A have been assayed, resulting in toxins at a mouse test level of about 800,000 MLD, which, converted into antoxins, were used in the hyperimmunization of horses.

The author found out that the scheme of hyperimmunization is fundamental

to obtain good neutralizing titers, and finally achieved a hyperimmune plasma containing 160 antitoxin units/ml. After purification and concentration this serum had a titer of about 1,400 antitoxin units/ml. Diluted to contain 500 antitoxin units/ml, it is now available for eventual human accidents.

UNITERMS — Botulism;
Intoxication by the ingestion of contaminated preserved food.

AGRADECIMENTOS

Para a realização do presente trabalho foram vários os amigos e colegas que contribuiram de um modo ou de outro, direta ou indiretamente. A todos, os meus profundos agradecimentos. A alguns nomes de colegas e amigos queremos fazer especial referência.

Ao Professor Doutor REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO, Professor Titular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, a quem devo minha iniciação científica e ainda a sugestão do presente trabalho, orientação e crítica do original, a minha eterna gratidão.

Igualmente e especialmente, ficamos gratos ao Professor Livre-Docente, Dr. ANDREJUS KOROLKOVAS, da Disciplina de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela orientação em redigir e dispor a matéria da presente tese e correção do vernáculo em várias fases da redação.

É justo ainda destacar nosso reconhecimento ao Dr. RAYMUNDO ROLIM ROSA, Diretor da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantan, pelo auxílio na fase de redação deste trabalho.

À Dra. JANDYRA PLANET DO AMARAL, Diretora do Instituto Butantan, pelo irrestrito apoio.

Aos Drs. HISAKO GONDO HIGASHI e MEDARDO SILES VILLARROEL, pela inestimável colaboração na parte técnica.

À Da. FERNANDA I. PIOCHI, Bibliotecária-chefe do Conjunto das Químicas e à sua colaboradora, Da. OLGA MENDONÇA FRANÇA CARVALHO, pelo indispensável auxílio prestado na parte referente à bibliografia.

Ao Prof. Dr. OMAR JAQUES MARZAGÃO BARBUTO, Diretor do Instituto do Zootecnica e Indústrias Pecuárias "Fernando Costa", de Pirassununga, pela colaboração na impressão deste trabalho.

Dedicatória Aos meus pais, pela orientação e educação.

À minha esposa e filhos, pelo estímulo.

OLIVEIRA, E. P. T. — Estudos sobre a preparação do soro antibotulínico tipo A.
Mem. Inst. Butantan, 36: 1-40, 1972.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, M. — Therapie des botulismus. *Deut. Med. Wschr.*, Leipzig, 45: 2177, 1968.
2. BENGSTON, J. A. — Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia coesar*. *Publ. Hlth. Rep.*, Washington, 37: 164-771, 1922.
3. BENGTSON, I.A. — Standardization of botulism antitoxins. *Amer. J. Publ. Hlth.*, New York, 11: 352-357, 1921.
4. BERGEY, D. H. & ETRIS, S. — Active imunization against tetanus infection with refined tetanus toxoid. *J. Immun.*, Baltimore, 31: 363-371 1936.
5. BRITISH PHARMACOPEIA 1963. London, Pharmaceutical Press, 1963, p. 109, 1908-1106.
6. BIER, O. — *Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e higiene*. 10.^a ed. Rio de Janeiro, Melhoramentos, 1961.
7. BIGELOW, W. D. & ESTY, J. R. — The thermal death point relation to time of typical thermophilic organisms. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 27: 602-617, 1920.
8. BOUROFF, A. & NASLEDICHEFF, S. — *Bull. Inst. Metz.*, 1: 35, 1936. Apud PREVOT, A. R. *Biologie des maladies dues aux anaérobies*. Paris Flammarion, 1955, p. 160.
9. 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, Gèneve*, 29: 70, 1963.
10. BUNNEY, W. E. — The action of formaldehyde on diphtheria toxin. *J. Immun.*, Baltimore, 20: 47-59, 1931.
11. BURROWS, W., MOULDER, J. W. & LEWERT, R. M. — Toxinas microbianas. In: — *Tratado de Microbiologia*, México, Interamericana, 1963, p. 265-267.
12. CARTWRIGHT, T. E. & LAUFFER, M. A. Temperature effects on Botulinum A toxin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 98: 327-330, 1968.
13. CLIFTON, C. E. — The utilization of amino acids of glucose by *Clostridium botulinum*. *J. Bact.*, Baltimore, 39: 485-497, 1940.
14. DICKSON, E. C. & BURKE, G. E. — A method of isolating bacillus botulinus from infected materials. *J. Amer. Med. Assoc.*, Chicago, 71: 518-521, 1918.
15. DICKSON, E. C. — *Botulism a clinical and experimental study*. Monograph of Rockefeller Institute for Medical Research, New York, nº 8, January 31, 1918.
16. DOLMAN, C. E. & CHANG, H. — *Canad. J. Publ. Hlth.*, Toronto, 43: 38, 1952. Apud PREVOT, A. R. — *Biologie des maladies dues aux anaérobies*. Paris, Flammarion, 1955, p. 200.
17. DOLMAN C. E. — Additional botulism episodes in Canada. *Can. med. Assi. J.*, Toronto, 71: 245-249, 1954.
18. DUMAS, J. *Bacteriologie medicale*. Paris, Flammarion, 1951, p. 692-706.

OLIVEIRA, E. P. T. — Estudos sobre a preparação do soro antibotulínico tipo A.
Mem. Inst. Butantan, 36: 1-40, 1972.

19. EHRLICH, P. — *Dtsch. Med. Wschn.*, Stuttger U., 24: 597, 1900. Apud BIER, O. — *Bacteriologia e imunologia em sua aplicação à medicina e higiene*. 10^a ed. Rio de Janeiro, Melhoramentos, 1961, p. 207.
20. ELBERG, S. S. & MEYER, K. F. The extracellular proteolytic system of *Clostridium parabotulinum*. *J. Bact.*, Baltimore, 37: 541-565, 1939.
21. ERMENGEN, E. VAN — Untersuchung über Falle von Fluschrvergiftung mit Symptomen von Botulismus. *Zentbl. Bakt. Parasitkde*, Jena, 19: 442-444, 1896.
22. ERMENGEN, E. VAN — Recherchés sur des accidents à caractères botuliniques. *Archs. Int. Pharm. Ter.*, Bruxelas, 3: 213-350, 499-601, 1897..
23. ERMENGEN, E. VAN — Recherchés sur des empoisonnements. *An. Soc. Med. Gand.*, 75: 28-30, 1899.
24. FASQUELLE, R. — Elements de bacteriologie medicale, 1957. Apud PEREIRA FILHO, M. J. — Diagnóstico biológico do surto de botulismo humano do Pronto Socorro de Pôrto Alegre. *Med. Cirurg.*, Pôrto Alegre, 19 (2): 58, 1958.
25. FERREIRA, E. B. — Botulismo: síntese clínica. *Med. Cirurg.*, Pôrto Alegre, 19 (2): 9-41, 1958.
26. FURLANETTO, R. S. — Purificação e concentração do soro antiloxoscélico. In — Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico. São Paulo, 1961, p. 64-65. [Tese]
27. GLENNY, A. T., POPE, C. G., WADDINGTON, H. & WALLACE, U. — Immunological notes. XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Path. bac.*, London, 29: 38-39, 1926.
28. GLOTOWA, E. W. & DANKEROWITZ, A. K. — Zur standardisierung des Antibotulinus serums. *Zentbl. Bakt. Parasitkde*, Jena, 133: 155-158, 1935.
29. GUNNISON, J. B. & MEYER, K. F. — The occurrence of nontoxic strains of *Cl. parabotulinum* XXXIV. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 45: 79-86, 1929.
30. GUNNISON, J. B., CUMMINGS, J. R. & MEYER, K. F. — *Clostridium botulinum* type E. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 35: 278-280, 1936.
31. GUNNISON, J. B. — Studies on the antigenic substances of *Clostridium parabotulinum*. *J. Immun.*, Baltimore, 26: 17-24, 1937.
32. HALL, I. C. — The occurrence of bacillus botulinus types A and B, in accidental wounds. *J. Bact.*, Baltimore, 50: 213-217, 1945.
33. HARRISON, W. T. — Some observations on the use of alum precipitate diphtheria toxoid. *Am. J. Publ. Hlth.*, Albany, 25: 289-300, 1935.
34. HENRIQUE & SORENSEN — *Z. physiol. chem.*, 64: 120, 1909. Apud HAWK, P. B., BERNARD, L. O. & WILLIAMS, H. S. — *Practical physiological chemistry*. 12 th ed. New York, Blakiston, 1949, p. 116, 117, 837.
35. HEWITT, L. F. — Note on the possible mechanism of diphtheria toxoid formation. *Biochem. J.*, Liverpool, 24: 983-992, 1930
36. HOTTEL, G. A. & MIGG, C. — Studies on botulinum, toxoid types A and B. II. Methods for determining antigenicity in animals. *J. Immun.*, Baltimore, 55: 255-262, 1947.
37. INUKAI, Y. — Effect of carbohydrate on toxin production by *Clostridium botulinum* type A. *Jap. J. Vet. Res.*, Sapporo, 10 (2): 64-71, 1962.
38. JERAMEC, C. — Toxine et antitoxine botulinique. *Revue Immunol. Thér. antimicrob.*, Paris, 2: 209-220, 1936.

OLIVEIRA, E. P. T. — Estudos sobre a preparação do soro antibotulínico tipo A.
Mem. Inst. Butantan, 36: 1-40, 1972.

39. KATITCH, R. V. & KALEMBER, M. — *Higiena*, México, 13: 243-245, 1961.
Apud PREVOT, A. R., TURPIN, A. & KAISER, P. — *Les bactéries anaérobies*.
Paris, Dunod, 1967, p. 1084.
40. KEMPNER, W. & POLLACK, B. — Die Wirkung des botulismus toxins und
seines specifischen antitoxins auf die Nervenzellen. *Deut. Med. Wschr., Leipzig*,
23 (32): 505-507, 1897.
41. KEPPIE, J. — Comunicação pessoal. 1970.
42. KERNER — Neu Biobachtungen über die in würt so häufig Norfallender to-
dlichen vergiftungen, 1820. Apud WEINBERG, M., NATIVELLE, R. & PRÉ-
VOT, A. E. — *Les microbes anaérobies*. Paris, Masson 1937, v. 1, p. 296.
43. KNIGHT, B. C. J. G. — Privy Conunc. *Med. Res. Counc. Epec. Rept. Ser.*, London,
(210): 1-182, 1933. Apud *Biol. Abstr.*, Philadelphia, 11: 16707, 1937.
44. KOLLE, W. & HETSCH, H. — *La bactériologie expérimentale*. Trad. by H.
Carriere. 3 éme. ed. in French. Paris, Dunod 918, v. 2, p. 93-96.
45. LAMANNA, C. — Oral poisoning by bacterial exotoxins exemplified in botulism.
Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, 88: 1109-1114, 1960.
46. LAMANNA, C., MC ELROY, O. E. & EKLUND, H. W. — The purification and
crystallisation of *Clostridium botulinum* type A Toxin. *Science*, New York, 103:
613-614, 1946.
47. LANE, C. R. — Botulism. *Lancet*, London, 124: 1377, 1935.
48. LANNE, C. R. & JONES-DAVIES, T. E. — A case of botulism. *Lancet*, London,
229 (2): 717-718, 1935.
49. LEGROUX, R. & JERAMEC, C. Études sur la toxine et l'antitoxine botuliques.
C. r. Seanc. Soc. Biol., Paris, 120: 641-643, 1935.
50. LEGROUX, R. & JERAMEC, C. — L'infection botulique du porc. *Bull. Acad.
Med.*, Paris, 128: 404-405, 1944.
51. LEGROUX, R., LEVADITI, J. C. & JERAMEC, C. — Le botulisme en France
pendant l'occupation (1940-1944), *Presse med.*, Paris 10: 109, 1947.
52. LEUCHS, J. — Beitrag fur Kernntnis des Toxins und Antitoxins des B. botu-
linus. *Z. Hyg. Infektkrankh.*, Leipzig, 65: 55-84, 1910.
53. LINDSAY, R. B., NEWMAN, J. R. & HALL, I. C. — An outbreak of botulism in
Wyoming. *J. Amer. med. Ass.*, Chicago, 108 (23): 1961-1964, 1937.
54. LITTAUER, U. — Observations on the type A toxins of *Clostridium botulinum*.
Nature, London, 167: 994-995, 1951.
55. MEYER, K. F. & GUNNISON, J. B. — *Cl. botulinum* type D sp. N. *Proc. Soc.
exp. Biol. Med.*, New York, 26: 88-89, 1928/29.
56. MEYER, K. F. & GUNNISON, J. B. — European strains of *Cl. botulinum*
XXXVI. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 45 (2): 96-105. 1929.
57. MEYER, K. F. — The status of botulism as a world health problem. *Bull. Org.
Mond Santé. Gèneve*, 15: 281-298, 1956.
58. MOLLER, V. & SHEIBEL, I. — Preliminary report on the isolation of an appa-
rently new type of *Cl. botulinum*. *Acta path. microbiol. scand.*, Kobenhavn, 48,
p. 80, 1960.
59. NAUWERCK, V. — Med. Conspl. Bl. F. Wärt Lanchsver, 46, 1886. Munc. med.
Wochenschr. (30), 1886. Apud WEINBERG, M., NATIVELLE, R. & PRÉVOT,
A. R. — *Les microbes anaérobies*. Paris, Masson, 1937, p. 296.

OLIVEIRA, E. P. T. — Estudos sobre a preparação do soro antibotulínico tipo A.
Mem. Inst. Butantan, 36: 1-40, 1972.

60. NIGG, G., HOTTLER, G. A. COREILL, L.L., ROSENWALD, A. S. & BEVERIDGE, G. W. — Studies on botulism toxoid, type A and B. I. Production of alum precipitated toxoids. *J. Immun.*, Baltimore, 55: 245-254, 1947.
61. OHYE, D. F. & SCOTT, W. J. — The temperature relations of *Clostridium botulinum*, types A and B. *Austr. J. biol. Sci.*, Melbourne, 6: 178-189, 1953.
62. ORR, P. F. — A rapid method determining the presence and type of botulinus toxin in contaminated foods. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 29: 287-290, 1921.
63. OSHEROFF, B. J., SLOCUM, G. G. & DECKLER, W. M. — Status of botulism in the United States. *Publ. Hlth. Rep.*, Washington 79: 871-878, 1964.
64. PEREIRA FILHO, M. J. — Diagnóstico biológico do surto de botulismo humano do Pronto Socorro do Pôrto Alegre. *Med. Cirurg.*, Pôrto Alegre, 19 (2): 52-111, 1958.
65. POLSON, A. & STERNE, M. — *Sci. mat.*, Paris, 158: (400): 238, 1946. Apud PRÉVOT, A. R. — *Biologie des maladies dues aux anaérobies*. Paris, Flammarion, 1955, p. 212.
66. PRÉVOT, A. R. & BRYGOO, E. R. — Recherches sur les communautés antigeniques entre les cinq toxines botuliniques. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 84: 1037-39, 1953.
67. PRÉVOT, A. R., BRYGOO, E. R. & SILLIOC, R. — Action de la cortisone sur l'immunization du lapin par l'anatoxine botulinique B. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 85: 255-257, 1953.
68. PRÉVOT, A. R. — *Biologie des maladies dues aux anaérobies*. Paris, Flammarion, 1955, p. 159-221.
69. PRÉVOT, A. R. TURPIN, A. & KAISER, P. — *Les bactéries anaérobies*. Paris, Dunod, 1967, p. 1140-1274.
70. PRÉVOT, A. R. — *Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies*. St. Mandé, Editions de la Tourelle, 1966, p. 27-36
71. QUARATO, B. — Botulismo nella provincia de Foggia. *Policlinico*, Roma, 68: 389, 1961.
72. RAMBERT, P. & EMILE-ZOLA, F. — Les formes mortelles du botulisme. *Presse méd.*, Paris, 54: 486-497, 1946.
73. RAMON, G. — Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 38: 1-10, 1924.
74. RAMON, G. — La flocculation dans les mélanges de toxine et de serum antidiptérique. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 37: 1001-1011, 1923.
75. REAMES, H. R., KADULL, P. J., HOUSEWRIGHT, R. D. & WILSON, J. B. — Studies on botulinus toxoids, types A and B. III. Immunization of man. *J. Immun.*, Baltimore, 55: 309, 324, 1947.
76. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, 27: 493-497, 1938.
77. RICE, C. E. — A preliminary study of antigenic activity of mixtures of *Clostridium botulinum* toxoid. *Can. J. Res. ser. E. Med. Sci.*, Ottawa, 25: 181-187, 1947.
78. RICE, C. E., PALLISTER, E. F., SMITH, L. C. & REED, G. B. — *Clostridium botulinum* type A toxoids. *Can. J. Res. ser. E. Med. Sci.*, Ottawa, 25: 167-174, 1947.
79. RODOPOULO, A. K. — Metabolism of *Bacillus botulinus*. *Mikrobiologiya*, Moscow, 20: 26-32, 1951.

OLIVEIRA, E. P. T. — Estudos sobre a preparação do soro antibotulínico tipo A.
Mem. Inst. Butantan, 36: 1-40, 1972.

80. ROUX, E. & YERSIN, A. Contribution a l'étude de la diphtérie. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 2: 629-661, 1888.
81. ROUX, E. & YERSIN, A. — Contribution a l'étude de la diphtérie. *Ann. Inst. Pasteur*, 3: 273-288, 1889.
82. SCHOENHOLZ, P. & MEYER, K. F. — Studies on the serologic classification of *B. botulinus*. II. Agglutination. *J. Immun., Baltimore*, 10: 1-54, 1925.
83. SCHOENHOLZ, P. & MEYER, K. F. — Effect of direct sunlight, diffuse daylight and heat on potency of *botulinus* toxin in culture mediums and vegetable products: XXIV. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 35: 361-389, 1924.
84. SOMMER, E. M. & SOMMER, H. — Studies on *botulinus* toxin. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 43: 496-506, 1928.
85. STEVENSON, J. W., HELSON, V. & REED, G. B. — A Casein digest medium for toxin production by *Clostridium*. *Can. J. Res. ser. E. Med. Sci.*, Ottawa, 25: 9-13, 1947.
86. STEVENSON, J. W., HELSON, V. & REED, G. B. — Preparation of *Clostridium parabotulinum* toxins. *Can. J. Res. ser. E. Med. Sci.*, Ottawa, 25: 14-15, 1947.
87. STEWART, G., DEAL, S. J. & BROWN, W. R. — *Bact. Proc.*, Baltimore, 62: 49G6O, 1962. Apud PRÉVOT, A. R., TURPIN, A. & KAISER, P. — *Les bactéries anaérobies*. Paris, Dunod, 1967, . 1143.
88. STOVER, J. H., FINGERMAN, M. & FORESTER, R. H. — Botulinum toxin and the motor end-plate. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, New York, 84: 146-147, 1953.
89. STRASSBURGER, H. — Botulinusintoxikation nach genuss von Schnittlohnnekonserven. *Arch. Hyg. Bakt.*, Berlin, 131: 35-38, 1943. Apud PRÉVOT, A. R. — Biologie des maladies dues aux anaérobies. Paris, Flammarion, 1955, p. 196.
90. STUMBO, C. R. — Thermobacteriology as applied to food processing. *Adv. Fd. Res.*, New York, 2: 47-115, 1949.
91. TARDIEUX, P., HUET, M. & BJÖRKLUND, B. — Étude d'infections de catgut par *Clostridium botulinum* A. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 82: 763-765, 1952.
92. TAROZZI, G. — Observazioni sulla natura dei fenomeni che determinano la esigenza anaerobia nella cultura dei germe anaerobia. *Atti R. Accad. Fisiocr.*, Siena, 17: 19017, 1907.
93. THEILER, A. & ROBINSON, E. M. — Parabotulisme des équidés. *Révue gén. Méd. vét.* Toulouse, 36: 193-199, 1927.
94. THEILER, A. & ROBINSON, E. M. — Der botulismus der hanstiere. *Z. Hyg. Infektkrankh.*, Leipzig, 165: 220, 1927.
95. TYLER, H. R. — Pathology of the neuromuscular apparatus in botulism. *Arch. Path.*, Chicago, 76: 55-59, 1963.
96. UNDERWOOD, E. J., HARVEY, R. J. & PECK, A. B. — Biochemical data on the blood and urine sheep in the botulism areas of western Australia. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, Adelaide, 17: 193-203, 1939.
97. VAN HEYMINGER, W. E. — Bacterial toxins. Oxford, Black-well, 1950, 14 p.
98. VELIKNOV, I. — Immunisation experimentale de l'homme contre le botulisme. *Gior. Batt. Immun.*, Torino, 17: 451-456, 1936.
99. WADSWORTH, A. B. — *Standard methods*. 2nd. ed. Baltimore, Williams Wilkins, 1947, 190-205-636-638 p.

OLIVEIRA, E. P. T. — Estudos sobre a preparação do soro antibotulínico tipo A.
Mem. Inst. Butantan, 36: 1-40, 1972.

100. WAGMAN, J. — Isolation and sedimentation study of low molecular weight forms of type A Botulinus toxins. *Arch. Bioch. Biophys.*, New York, 50: 104-112, 1954.
101. WEINBERG, M. & GOY, P. — Empoli de l'anatoxine dans la préparation du sérum antibotulinique. *C. r. Soc. Biol.*, Paris, 92: 564-565, 1925.
102. WEINBERG, M. & GOY, P. — De anatoxine botulinique. *C. r. Soc. Biol.*, Paris, 91: 148-149, 1924.
103. WEINBERG, M. & GINSBOURG, B. *Données récents sur les microbes anaérobies et leur rôle en pathologie*. Paris, Masson, 1927, p. 88-113.
104. WEINBERG, M., NATIVELLE, R. & PRÉVOT, A. R. — *Les microbes anérobies*. Paris, Masson, 1937, v. 1, p. 294-341.
105. WELIKANOW, I. M. — Experimentelle Vakzination gegen den Botulismus. *Z. Immun. Forsch. exp. Ther.*, Jena, 70: 186-194, 1931.
106. WYNNE, S. E. — Physiological studies on spore formation in *Clostridium botulinum*. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 83: 243-249, 1948.
107. ZEISSLER, J. K. — Anaérobenzüchtung. In: — KOLLE, W. — *Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen*. Jena, Fischer, 1930, 10: p. 35-144.

Recebido para publicação em 10 de agosto de 1972.

Aceito em 11 de agosto de 1972.