PREPARAÇÃO E TESTE DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO "E" E DO SEU ANTI-SORO ESPECÍFICO

Hisako Gondo HIGASHI*
Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA*
Raymundo ROLIM ROSA
Maria Antonieta da SILVA*
Fernando FRATELLI*
Naomi ENOKI*
Hideyo IIZUKA*

RESUMO: Os autores descrevem o método utilizado na preparação do soro antibotulínico tipo E, que não apresenta reação cruzada com a toxina heteróloga, pela hiperimunização de equideos, através do antígeno adsorvido pelo alúmen de potássio (sulfato duplo de alumínio e potássio). Empregando o esquema de imunização anteriormente proposto, conseguiram obter mistura de plasma hiperimunes o qual, após purificado pelo método de Pope, modificado, concentrou até níveis na ordem de 750 a 1.000 UI/ml. Este produto foi diluído convenientemente para que contivesse 500 UI/ml de antitoxina.

UNITERMOS: Botulismo; Clostridium botulinum tipo E, intoxicação alimentar, toxina e anatoxina, antitoxina.

INTRODUÇÃO

O botulismo é uma intoxicação fatal que pode acometer os homens e os animais, causada pela ingestão de alimentos contaminados por diferentes cepas de *Clostridium botulinum*^{3,4,6,7,8,9,11} onde liberam toxinas potentes que, eletivamente, agridem os tecidos do sistema nervoso central (SNC). Após a penetração das toxinas nas células do SNC, dificilmente elas são neutralizadas pelos anticorpos. Convém ainda ressaltar que não se estabelece imunidade cruzada entre as diferentes toxinas. Como a cura do botulismo, até o momento, somente pode ser obtida pela aplicação de soros hiperimunes específicos e, face ao exposto acima, o êxito da soroterapia reside na utilização do sorotipo — específico e na precocidade de sua aplicação ou, em outras palavras, o soro deve ser aplicado antes da penetração das toxinas nas células nervosas.

A partir de 1972 o Instituto Butantan começou a produzir o soro antibotulínico tipo A¹⁹ e, posteriormente, o tipo B¹⁵. Devido à especificidade das antitoxinas¹⁸ e a eficácia do seu emprego depender de diagnóstico labora-

Instituto Butantan — Av. Vital Brasil, 1500 CEP 05504 — São Paulo — Brasil.
 Recebido para a publicação em 15-6-1988 e aceito em 4-10-88.

torial que demanda tempo, incompatível com a evolução clínica do paciente em nosso meio, foi introduzida a preparação do soro bivalente A e B.

Em face do isolamento de um novo tipo de toxina ^{14,17}, denominada como tipo E e do surgimento de diversos casos de intoxicação humana em diferentes países ^{11,12} pelo consumo de pescados contaminados com este tipo de toxina e, ainda, pela crescente utilização do peixe e seus derivados enlatados, no Brasil, propusemo-nos a preparar o soro antibotulínico tipo E que é o objetivo do presente trabalho.

É importante ressaltar também a possibilidade de produção do soro tipo

ABE.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Cepas utilizadas

1.1 — Exame e caracterização

Para a obtenção da toxina tipo E adequada à produção de soros foi necessária a seleção de cepas mais toxigênicas. Este trabalho foi desenvolvido entre dez amostras a saber:

- amostra nº 63 IP, existente na Germoteca do Instituto Butantan, recebida do Instituto Pasteur, Paris, enviada pelo Prof. A. R. Prevot em 1962.
- amostras 1E, 2E, 38E, 42E, 44E e 48E cedidas pelo Instituto Tecnológico de Alimentos de Campinas (ITAL); São Paulo — Brasil*.

 cepa liofilizada de Nanaimo, recebida do Microbiological Research Establishment, Porton Down Salisbury, Weltshire England**.

cepa liofilizada EK e EKX, recebida da World Health Organization –
 Department of Biological Standardization – Copenhagen-Denmark.

Todas as amostras foram examinadas e encontradas satisfatórias quanto à pureza, por repicagem em meio de TPGY¹⁰ e incubadas durante 48h a 30°C em anaerobiose.

Quando semeadas em meio de agar-sangue, apresentam colônias translúcidas, com um diâmetro em torno de 0,5 milímetro após 48h de incubação a 37°C, podendo evidenciar uma discreta reação de hemólise¹. Em meio de cultura contendo gema de ovo, as colônias são irregulares exibindo uma superfície iridiscente quando examinada sob luz oblíqua. Esta zona lustrosa é também denominada camada aperolada (pearly layer), apresentam uma zona de precipitação maior do que aquelas das colônias do tipo A e cepas proteolíticas do tipo B e F, medindo de 2,0 a 4,0 milímetros circundando-as²⁴. A gelatina é hidrolisada, são capazes de provocar, uma suave coagulação do leite, o qual no entanto não é digerido²². Finalmente, a produção de gás sulfídrico não é evidenciada, o que é característico ao grupo a qual o C. botulinum tipo E pertence¹6,22,23.

2 - Obtenção de toxina

2.1 - Meios de cultura utilizados

Os seguintes meios foram utilizados em nossas experiências:

- meio de Müller modificado por Lathan
- meio de TPGY¹⁰

Por gentileza da Dra. Ivone Delazari — Pesquisadora do ITAL.

Por gentileza do Dr. J. Bawmer — Canadá.

meio de Duff modificado¹²

pulsos por agitação.

2.2 — Preparação do "inoculum" As cepas liofilizadas eram ressuspensas com 2ml do meio a ser utilizado e semeadas em 20ml do mesmo meio. Os tubos, após 48 horas de incubação a 30°C em jarras anaeróbicas (sistema Gas-pack — BBL em atmosfera de CO₂ e H₂),

bos, apos 48 horas de incubação a 30°C em jarras anaeróbicas (sistema Gas-pack — BBL em atmosfera de CO₂ e H₂), eram repicados cinco vezes sucessivamente, nas mesmas condições mencionadas. O material total da 5ª passagem, após 24 horas de incubação, era utilizado como inóculo para produção de dois litros de toxina após 6 dias de incubação a 30°C. O pH dos meios era = 7,0, e o volume contido no balão era de 3/4 do volume total do Erlemmeyer. Durante o período de incubação havia formação de gases que eram ex-

3 - Provas efetuadas

- 3.1 Prova de pureza: exame microscópico de cultura em lâminas coradas pelo método de Gram apresentavam forma de bastonetes gram positivos, com bordas arredondadas isoladas ou aos pares e com algumas formas esporuladas subterminais.
- 3.2 Titulação da Toxina:

3.2.1 — Tripsinização do material

Após a inoculação nas condições anteriormente mencionadas, removia-se assepticamente 5ml do sobrenadante da cultura com evidência de crescimento, que eram centrifugados a 15.000rpm a 4°C durante 20 minutos. Após a centrifugação 2ml do sobrenadante eram colocados em tubos de ensaio, e o pH acertado para 6,0 com HC1 1N¹0 . A seguir adicionava-se 1% de Tripsina (Difco 1:250) e a mistura era incubada a 37°C por 45 minutos, com agitação nos primeiros 15 minutos e depois mantida em repouso por trinta minutos.

3.2.2 — Testes para detecção de Toxina Camundongos de 14 a 16g eram inoculados intraperitonealmente com 0,5ml do produto obtido conforme descrito no item 3.2.1., com diluições em série em solução-tampão de gelatina fosfatada. A observação da morte dos camundongos era feita e anotada a partir de 24 horas até um período máximo de 96 horas.

4 - Preparação da Anatoxina

Foram selecionadas toxinas com título de 100.000 DMM/camundongos ou mais. A destoxificação da cultura foi obtida pela adição de formaldeído (conc. de 37%) na concentração final de 0,5%. O processo de destoxificação era completado na estufa a 37°C requerendo normalmente um período de incubação de 30 dias, com agitação a cada dois dias.

5 — Prova de destoxificação

Pela inoculação de 1,0ml do material por via intraperitoneal em 5 camundongos de 18 a 20g. O resultado era considerado satisfatório quando os animais sobreviviam sem sintomas, durante um período de vinte dias de observação. Caso os animais em testes morressem ou apresentassem sintomas, retornávamos o produto à estufa por mais 15 dias e repetíamos a prova. Se os sintomas persistissem era adicionado mais 0,5% de formaldeído e levado à estufa a 37°C por mais 10 dias e repetia-se a prova "in vivo".

6 - Filtração da Anatoxina

Era obtida por passagem seriada em filtros e membranas Millipore de 0,45 e de 0,22 micra, respectivamente, pois o filtro 90S da AMF reduzia o título do produto.

7 — Provas efetuadas após a filtração

7.1 — Toxicidade em cobaios: cinco cobaios de 250g recebiam cinco (5,0) ml da anatoxina por via subcutânea. A prova era considerada satisfatória desde que não ocorressem mortes ou sintomas durante 30 dias de observação.

7.2 – Esterilidade: Em meio de Tioglicolato Brewer e Sabouraud, onde eram semeados dois (2,0)ml do produto em 20ml do

meio.

8 — Preparação do antígeno para hiperimunização de cavalos

8.1 – As anatoxinas com o pH corrigido para 6,0 com HC1 1N eram adicionadas de solução a 10% de sulfato duplo de alumínio e potássio (alúmen) em água destilada. A solução era previamente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 micra. O volume adicionado com agitação constante era suficiente para obter-se concentração final de alúmen de 1,25%. Verificava-se no final da adição uma variação de pH que era corrigido a 5,8 com solução de hidróxido de sódio a 40% v/v. O precipitado resultante, após 24 horas de sedimentação, era recolhido e ressuspenso em solução salina, suficiente para recompor o volume inicial de anatoxina. Este procedimento era repetido quatro vezes ou até a obtenção de sobrenadante límpido.

8.2 — Avaliação do poder imunogênico do antígeno Dez cobaios de 450g — 550g eram inoculados por via subcutânea com 1ml de antígeno. Após 40 dias os animais eram sangrados por punção cardíaca e os soros misturados em volumes iguais e titulados frente à toxina padrão. Foram selecionadas as anatoxinas que induziram títulos iguais ou superiores a duas Unidades Internacionais por ml no soro das

cobaias.

Antes da utilização do antígeno em cavalos, as amostras eram selecionadas por hiperimunização de coelhos, com inoculações subcutâneas a cada 3 dias, iniciando-se com 0,1ml na primeira dose e 0,2ml, 0,3ml, 0,4ml, 0,5ml, 1ml, 1,5ml até 2,0ml nas doses subseqüentes.

9 - Hiperimunização de equídeos

A antitoxina botulínica tipo E foi obtida pela hiperimunização de quatro cavalos sadios pesando cerca de 400kg, com idade média de dois anos (304, 825, 837 e 997).

Esquemas de Hiperimunização

Foi adotada a técnica de produção de antitoxina botulínica tipos A e B que havia dado bons resultados ^{20,15}.

Básico:

A sangria explorada, realizada sete dias após a última dose, indicava quais os animais que deveriam ser sangrados. O sangue era recebido sobre uma solução a 17% de citrato de sódio na proporção de 10% dessa solução em relação ao volume de sangue a ser colhido. Foram aproveitados os animais que apresentaram níveis de anticorpos ao redor de 100 UI/ml de soro. Após a sangria os animais eram colocados em recuperação por 45 dias.

Hiperimunização:

Foram aproveitados para a produção de antitoxina os plasmas de animais com níveis de anticorpos igual ou superior a 100 UI/ml. As reimunizações eram feitas sistematicamente após 45 dias de recuperação, segundo o mesmo esquema de hiperimunização.

9.1 – Obtenção do plasma hiperimune Após a sedimentação das hemácias por 24 horas a 4°C, o plasma era separado e adicionado de solução de fenol, para concentração final de 0,4g%. Os plasmas eram mantidos a 4°C até o momento do processamento.

9.2 – Purificação e concentração do plasma Obtidas por digestão enzimática segundo o método de Pope²¹.

10 — Provas efetuadas

10.1 — Titulação de antitoxinas do plasma e soro purificado Os plasmas e os soros purificados e concentrados eram titulados em camundongos, de acordo com o método padronizado pelo National Institute of Health⁵, utilizando um soro padrão proveniente do "International Laboratory of Biological Standards by Statens Serum Institute", de Copenhagem. A toxina de referência era preparada em nosso próprio laboratório e padronizada frente ao soro padrão acima mencionado, ao nível de L+/100. Esta toxina era conservada pela adição em partes iguais soro/glicerina neutra e mantida a -20°C.

O soro antibotulínico tipo E produzido foi diluído de modo a conter 500 UI/ml⁵ e submetido aos controles químicos e biológicos exigidos pela Farmacopéia Brasileira¹³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como o título antitóxico obtido pela hiperimunização de cavalos está diretamente relacionado à toxigênese do antígeno, procuramos selecionar as cepas de diferentes procedências.

As cepas de Nanaimo 1E, 42E e 48E não se apresentaram tóxicas para

o meio utilizado, enquanto que as 38E, 44E e 2E eram pouco tóxicas, titulando ao redor de 1000 DMM em camundongo. Mesmo após tripsinização, as toxinas derivadas destas cepas apresentaram títulos ao redor de 5000 DMM, essas toxinas mesmo assim foram destoxificadas e após as provas de inocuidade satisfatórias foram precipitadas pelo sulfato duplo de alumínio e potássio, porém inoculadas em coelhos e cobaios para verificação da imunogenicidade não foram satisfatórias como se esperava.

As cepas EK e EKX, que se apresentaram altamente tóxicas, ao serem semeadas em diferentes meios de cultura a saber: Müller modificado por Lathan, meio de Duff modificado e meio de TPGY, apresentaram comportamento muito variável, sendo que o meio de TPGY foi o que demonstrou melhor resultado. Foi verificado também que o tempo ótimo de toxigênese era de seis dias a 30°C, ocorrendo declínio a partir do 7° dia. Após o período de incubação a cultura era tratada com tripsina 1/250 (DIFCO) na concentração final de 1%. A elevação da toxicidade deve-se, provavelmente, à conversão da protoxina, pela tripsina, em toxina ativa.

Ficou ainda demonstrado que o processo de filtração da toxina acarreta perda de 90% da toxicidade, quando utilizamos a placa esterilizante 90S, a utilização de membrana 0,45 micra e 0,22 micra (tabela 1) não altera a toxi-

cidade do produto.

A quantidade de formaldeido a ser empregada na destoxificação varia de acordo com o título da toxina. Levando em conta esse fato, determinamos a quantidade de formaldeido necessária para completa destoxificação sem prejuízo do poder imunogênico. (Tabela 2)

O alúmen de potássio na proporção de 1,25% como adjuvante, confirmou para esta cepa os ótimos resultados verificados na obtenção de outros soros antibotulínicos. O poder imunogênico da toxina derivada da cepa EK foi testado em cobaios e coelhos, apresentando títulos ao redor de 16

UI/ml e 50 UI/ml respectivamente.

Estabelecidos os parâmetros passamos a produzir a toxina botulínica em maior escala, e os lotes preparados e respectivos títulos constam na tabela 2. Foi utilizada a cepa EK que possuía todas as características necessárias para a produção do soro antibotulínico tipo E. A anatoxina proveniente do filtrado tóxico e tratado pelo formaldeído e pelo sulfato duplo de alumínio e potássio é a que foi utilizada na imunização de eqüídeos para a produção do plasma antibotulínico, o qual concentrado e purificado pelo método de Pope apresentou resultado satisfatório.

A tabela 3 mostra o resultado do doseamento do soro antibotulínico específico, onde os níveis antitóxicos atingiram os valores de cerca de 1000

UI/ml.

Finalmente este soro purificado e concentrado era diluído convenientemente para apresentar 500 UI/ml de antitoxina tipo E, de acordo com as recomendações estabelecidas na XV Seção de Expert. Committee on Biological Standartization da OMS.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos na produção de soro antibotulínico tipo E concluímos que:

a) das oito amostras de C1. botulinum testadas somente a EK e a EKX mostraram-se adequadas produzindo toxinas titulando cerca de 1 x 10⁵ a 4

x 10⁵ DMM para camundongo

- b) dos três meios de cultura testados, verificamos que o meio TPGY foi o melhor
- c) a tripsinização é importante na ativação da toxigênese do material produzido
- d) é recomendada a filtração da toxina em membrana inerte de 0,22 micra
- e) a quantidade de formaldeído necessária à destoxificação de toxina por nós obtida foi de 0,5% a 0,6% conforme o título, ocorrendo a transformação em anatoxina ao redor de 30 a 45 dias a 37°C
- f) a mistura de plasmas resultante de diversas imunizações permitiu obter soro purificado e concentrado cujo título atingiu níveis da ordem de 750 a 1.000 UI/ml
- g) esta primeira produção de soro antibotulínico tipo E para fins terapêuticos, no Brasil, abriu a possibilidade de obtenção do soro tipo ABE, que já consta da lista de soros hiperimunes produzidos no Instituto Butantan.

TABELA 1

Demonstração de perdas de toxina pela utilização de diferentes tipos de filtros: de profundidade e membrana inerte.

Lote	Título antes da filtração em DMM	Título após filtração em 90 S em DMM	Título após filtração em membrana inerte, em DMM
1	100.000	10.000	100.000
2	300.000	10.000	300.000
3	400.000	12.000	380.000
4	200.000	20.000	200.000

TABELA 2

Atividades destoxificante de diferentes concentrações de formaldeído, relacionadas ao título tóxico do produto.

Lote	Título da Toxina em DMM	Formaldeído %	Destoxificação a 37.º C após 30 ou 45 dias
1/82	200.000	5,0	30
2/82	100.000	5,0	30
3/82	100.000	5,0	30
4/82	300.000	6,0	45
5/82	150.000	5,0	30
6/82	300.000	6,0	45
1/83	500.000	6,0	45
2/83	600.000	6,0	45
3/83	400.000	6,0	45
4/83	600.000	6,0	45

TABELA 3

Níveis de antitoxina botulínica tipo E, obtidos em quatro cavalos, após a purificação*.

Lotes dos soros	T/2 1-	Tempo de observação em horas			
antibotulínicos tipo E	Título em UI/ml	24	48	72	96
Soro Dialisado	500	0/4	0/4	0/4	0/4
1-85-8	600	0/4	1/4	2/4	2/4
and the board of the	800	1/4	3/4	3/4	3/4
Soro Dialisado	300	0/4	0/4	0/4	0/4
1-84-54	600	0/4	0/4	0/4	0/4
	1000	0/4	0/4	0/4	0/4
Soro Dialisado	500	0/4	0/4	0/4	0/4
2-83-78	600	0/4	0/4	0/4	0/4
this to the little of the latest	800	0/4	0/4	4/4	0 6 5

Dose individual de 0,5ml das misturas de toxina e antitoxina, pela via intraperitonial, em camundongos de 18g a 22g, sendo a toxina ao nível de 0,01 L + , frente ao soro padrão internacional.

ABSTRACT: The present paper describes the method employed in the preparation of *Clostridium botulinum* type E antitoxin by horse hyperimunization with mixed alum potassium adsorbed antigen, that was the schema used in production of type A botulinum antitoxin. After Pope's method of purification and concentration the final titres reached values of 750 to 1.000 UI/ml.

KEYWORDS: Botulism; Clostridium botulinum Type E food poisoning, toxin, toxoid and antitoxin.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rosalvo Guidolin, pelas sugestões e pelo seu espírito de colaboração, que, sem medir esforços, revisou este trabalho, e ao Sr. Silvio de Jesus pela colaboração no preparo de meios de cultura e nas inoculações dos doseamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AJMAL, M.B.C. Nobbs. Incidence an significance of colonial variation in *Clostridium botulinum* tipo A. In: INGRAN, M. & ROBERTO, T.A., Ed. *Botulism*. INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FOOD MICROBIOLOGY, 5. *Proc.* Moscow, Chapman and Hall Limitil, London, p. 459-476, 1967.
- 2 AURELI, P.; FENICIA, L.; FERRINI, A.M. Intossicazione alimentare da Clostridium botulinum tipo E. Boll. Ist. sieroter. milan., 63 (6): 553-555, 1984.
- 3 BARRET, D.H.; EISENBERG, M.S.; BENDER, T.R.; BURKS, J.M.; HATHEWAY, C.L.; DOWELL JR., V.R. Type A and type B botulism in the North: First reported cases due to toxin other than type E in alaskan Imuit. Canad. med. Ass. J., 117(5): 483-489, 1977.
- 4 BOWMER, E.J.; WILKINSON, D.A. Botulism in Canada. Canad. med. Ass. J., 115 (11): 1084-1085, 1976.
- 5 BOWMER, E.J. Preparation and assay of the International Standards for Clostridium botulinum types A,B,C,D and E antitoxin. Bull. Org. mond. Santé, 29: 701-9, 1963.
- 6 Center for Disease Control. a. Annual Sumary, 1977. Reported Morbidity in United States. 1977. MMWR, 26: 2-6, 1978.

7 - Center for Disease Control. Botulism: California. MMWR, 27: 501-502, 1978.

8 - Center for Disease Control. Botulism - United States, 1978. MMWR, 28: 73-75, 1979.

- 9 Center for Disease Control. Botulism United States, 1979-1980. MMWR, 30 (10): 121-122, 1981.
- 10 GRAIG, J.M.; HAYNES, S.; PILCHER, K.S. Incidence of Clostridium botulinum tipo E in salmon and other marine fish in the Pacific Northwest. Appl. Microbiol., 16: 553-557, 1968.
- 11 CHERINGTON, M.; DENVER, M.D. Botulism Ten year experience. Arch. Neurol., 30 (6), 432-437, 1974.
- 12 DUFF, J.T., WRIGTH, G.G.; YARINSKY, A. Activation of Clostridium botulinum type F. Toxin by trypsin. J. Bact., 72: 455-460, 1956.
- 13 FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 2. ed. São Paulo, Indústria Gráfica Siqueira S.A. 1959. pp. 1027-35.
- 14 GUNNISON, J.B.; CUMMINGS, J.R.; MEYER, K.F. Clostridium botulinum type E. Proc. Soc. exp. Biol. med. 35: 278-280, 1937.
- 15 HIGASHI, H.G.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E.P.T.; SILVA, M.A. Preparação do soro antibotulínico tipo B pela hiperimunização de cavalos no Instituto Butantan, Mem. Inst. Butantan, 42/43: 77-85, 1978/79.
- 16 HOLDERMAN, L.V.; MOORE, W.E.C. Anaerobe laboratory manual Virginia Polytchnique Institute and State University Blancking, 1972. 130p.
- 17 HUSS, H.H.; PEDERSEN, A. Clostridium botulinum in Fish Nordisk. VETERINAER-MEDICIN, Copenhagen, 31: 214-221, 1979.
- 18 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.
- OLIVEIRA, E.P.T. Estudos sobre a preparação de soro antibotulínico tipo A. Mem. Inst. Butantan, 36: 1-40, 1972.
- 20 OLIVEIRA, E.P.T.; IIZUKA, H.; HIGASHI, H.G.; SILVA, M.A.; ROLIM ROSA, R. Emprego simultâneo de antígenos botulínicos tipos A e B em um mesmo animal, para obtenção de antitoxina bivalente. Mem. Inst. Butantan, 44/45: 307-315, 1980/81.
- 21 POPE, C.G. The action of proteolitic enzymus on the antitoxins and proteins in immune sera. II Heat denaturation after partial enzyme a action *Brit. J. exp. Path. 20*: 201-212, 1939.
- 22 SMITH, G.R.; MORYSON, C.J. The low prevalence of Clostridium botulinum in the lakes, marshes and waters ways of Camargue. J. Hyg., 78: 33-38, 1977.
- 23 SMITH, L.D.; HOBBS, G. Clostridium. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBON, N.E., Ed. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 ed. Baltimore, Williams & Wilkins Company, pp. 551-72.
- 24 UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. Bacteriological analytical manual for foods. Food and Drug Administration, U.S.D.H.E.W. 5 ed. 1-16, 1978.

12 TO DUFF, J. T., WEIGTH, C.G., YARINGRY A. Activation of Castilian borulinum