

INFLUENCIA

DO pH SOBRE A ACTIVIDADE DO VIRUS VACCINICO

POR

R. GODINHO E D. VON KLOBUSITZKY

A necessidade do descobrimento de methodos de controle da actividade do virus vaccinico surgiu desde quando a immunização contra a variola passou a ser feita por meio da lymphá preservada no laboratorio, depois de destacada da pustulação dos animaes sensiveis.

Abandonado o velho systema da vaccinação directa de "pis-à-bras" e industrializado o preparo da polpa nos institutos vaccinogenicos, começaram, desde logo, a apparecer os methodos de investigações da actividade da vaccina antes do seu emprego na pratica.

O primeiro dentre os processos divulgados foi o de Calmette e Guérin que aproveitou a receptividade do coelho, descoberta por Gailleton, em 1889. Este methodo, dado a conhecer em 1901, é ainda hoje adoptado, com certas modificações, por varios laboratorios e recommendado, entre outros, pelo comité permanente de variola e vaccina da Commissão de Hygiene da Sociedade das Nações.

Valendo-se dessa lapino-receptividade, Guérin, Kelsch, Belin e outros introduziram, posteriormente, modificações no primitivo processo de Calmette e Guérin, e Chaumier, 1910, tentou instituir um methodo de controle humano. Henseval e Convent, quasi na mesma epoca, preconizaram um methodo baseado no poder de neutralização do soro do coelho vaccinado. Em 1921, Groth experimentou um novo methodo visando, ainda no coelho, a via intradermica. Gordon e Sobernheim, respectivamente em 1923 e 1925, do mesmo modo que o Hygienic Laboratory de Washington em 1927 (1), suggeriram alterações interessantes no methodo de Calmette e Guérin.

Todos esses processos de doseamento do virus podem ser enfeixados em um só grupo com a denominação de *dermo-reacções*, que se separariam de outro, por sua vez constituido pelas *corneo-reacções*, baseadas, seja nas verificações originaes de Gorini, feitas em 1903, por meio de inoculação do virus na cornea do coelho, seja, mais tarde, em 1925, nas de Gins, que usou para esse fim a cornea da cobaia. O processo de Gins proporcionou ao experimentador fami-

liarizado com o seu uso, um meio pratico e economico de determinar facilmente no laboratorio o limite de actividade do virus vaccinico em qualquer estado em que este se encontre. A interpretação dos resultados no controle da actividade antigenica da vaccina exige, por sua vez, cuidados especiaes em virtude das extremas variações individuaes dos animaes sensiveis, principalmente o coelho, cuja grande facilidade de infecção accidental já foi experimentalmente confirmada. Por outro lado, para a garantia da actividade da vaccina, como condição principal que lhe deve ser sempre assegurada, não bastam as precauções tomadas desde a selecção da semente para inoculação no animal vaccinifero até a sua colheita cercada de especiaes cuidados. Além de grande numero de agentes de natureza physica, chimica ou biologica, todo o material de conserva que a seguir entra em contacto com a polpa pode exercer decisiva influencia na determinação ou perda de actividade do virus.

Neste particular, as Secções de Virus e de Physico-Chimica do Instituto Butantan vêm emprehendendo, desde 1932, uma serie de verificações para bem esclarecer o problema da reacção das polpas e ter sempre garantido o grau de virulencia da vaccina aqui preparada contra a variola.

A primeira experimentação realizada foi no sentido de determinar a reacção exacta das nossas polpas existentes em 1932, com diferentes prazos de permanencia em baixa temperatura e, em seguida, o grau de actividade do virus vaccinico.

QUADRO No. 1

Verificação do pH das polpas vaccinicas quando emulsionadas em gliceras acidas, ("neutras" segundo os respectivos rotulos), de procedencias diversas, e doseamento da actividade do virus.

No. das polpas	Reacção	Actividade do virus vaccinico pelo methodo de Gins	
		Dil. 1/10.000	Dil. 1/50.000
4689	5,34	++++	++
4690	5,76	++++	++++
4691	5,52	++++	—
4692	5,60	++++	++++
4694	5,63	++++	+++
4696	4,92	++++	—
4697	5,16	++++	++++
4699	4,91	++++	—
4700	5,66	++++	—
4701	5,23	++++	—
4702	5,26	++++	++++
4703	5,02	++++	++++
4704	6,08	++++	—
4712	5,27	++++	+++
4713	5,91	++++	++
4739	5,61	++++	—
4740	5,20	++++	+++
4758	5,62	++++	+++
4792	5,65	++++	—
4798	5,97	++++	—

Todas as determinações foram feitas electrometricamente, em condições naturalmente muito demoradas, dada a viscosidade das polpas, em cujo caso o equilibrio entre o gas H e os ions de H só é alcançado muito lentamente.

Os resultados de uma serie de verificações (Quadro No. 1) demonstraram que havia, incontestavelmente, um elemento a desviar o grau de reacção das polpas para um ponto de acidez e, por conseguinte, capaz de favorecer a destruição do virus, cuja integridade não é mais conservada desde que o pH chegue a attingir o indice de 4,0 ou se eleve a 10,0, de accordo com os estudos de Cunningham e Maskar (2).

No doseamento da actividade do virus vaccinico nem todas as polpas attingiram o limite "fortemente positivo" na diluição de 1/50.000 pelo methodo de Gins.

Procurando, em seguida verificar a reacção das polpas recém-colhidas desde aquella epoca, foi encontrado um resultado dentro do limite do ponto optimo e com a actividade do virus nas mesmas condições segundo demonstra o Quadro No. 2.

QUADRO No. 2

Reacção das polpas *in natura*, recém-colhidas, e doseamento da actividade do virus vaccinico.

No. das polpas	Reacção	Doseamento do virus vaccinico pelo methodo de Gins. Dil. 1/50.000			
4751	6,67	+	+	+	+
4752	6,58	+	+	+	+
4753	6,74	+	+	+	+
4754	6,88	+	+	+	+
4755	6,74	+	+	+	+
4756	6,76	+	+	+	+
4757	7,12	+	+	+	+
4793	6,20	+	+	+	+
4794	6,76	+	+	+	+
4795	6,25	+	+	+	+
4797	6,76	+	+	+	+
4798	6,57	+	+	+	+
4799	6,60	+	+	+	+
4800	6,92	+	+	+	+
4802	6,70	+	+	+	+
4803	8,00	+	+	+	+
4804	6,95	+	+	+	+
4806	6,67	+	+	+	+
4807	6,59	+	+	+	+
4824	7,70	+	+	+	+

Tratámos, immediatamente, de verificar a reacção das glicerinas até então empregadas e fornecidas ao Instituto, de varias procedencias, com a indicação de "neutras". Em quatro typos analysados os resultados revelaram que taes glicerinas, tanto as de procedencia nacional, como as estrangeiras, eram *fortemente acidas*, o que explicava a tendencia a franca acidez das polpas então existentes no nosso laboratorio.

QUADRO No. 3

Analyses procedidas em glicerinas de varios typos correntemente fornecidas ao Instituto Butantan.

Marca da glicerina	Reacção potenciometrica
SCHERING	5,12
ELLEQUEIROZ	4,30
GLOBO	4,30
EVANS	4,85

Sendo a glicerina um producto largamente empregado nos laboratorios e centros de experimentação de natureza biologica, queremos chamar a attenção dos interessados para este ponto importante da questão, pois não é possível encontrar tal substancia em estado de neutralidade. Com effeito, normalmente as gliceras são sempre acidas, e isto porque, ao serem purificadas por destillação no vacuo, não se separam completamente dos acidos oriundos do processo geralmente usado na sua preparação, que é o da hydrolyse de substancias gordurosas por meio do acido sulfurico. Nestas condições, a propria glicerina bidestillada ainda pode conter traços desses acidos.

Na neutralização da glicerina temos usado, com resultado satisfactorio, o hydroxido de Na ou un soluto tampão de phosphatos com pH 7,4. Do soluto tampão é geralmente sufficiente 1 cc. para 1.000 cc. de glicerina. Na neutralização com NaOH precisamos sempre determinar com exactidão a quantidade a ser usada. Nestas condições, depois que passámos a fazer no Instituto a neutralização systematica da glicerina empregada para emulsionar as polpas, estas, em exames posteriores, feitos após quinze mezes de permanencia no frigo a -10°C ., têm demonstrado perfeita approximação do ponto optimo (pH 7,8) á integridade do virus; este, de seu lado, ao ser doseado, tambem tem revelado actividade sempre positiva ainda na diluição de 1/50.000 pelo methodo de Gins, sendo que bastaria para ser considerado em optimo estado de conservação desde o limite de diluição a 1/10.000, segundo esclarece o Quadro No. 4.

QUADRO No. 4

No. das polpas	Reacção	Doseamento do virus vaccinico pelo methodo de Gins. Dil. 1/50.000
4796	7,55	+ + + +
4797	7,26	+ + + +
4799	7,67	+ + + +
4800	7,11	+ + + +
4802	7,68	+ + + +
4803	8,17	+ + + +
4804	7,46	+ + + +
4825	7,26	+ + + +
4826	7,13	+ + + +
4828	7,45	+ + + +
4829	7,91	+ + + +
4831	7,84	+ + + +
4832	8,01	+ + + +
4833	8,11	+ + + +
4834	8,10	+ + + +
4835	7,81	+ + + +

RESUMO

A interpretação dos resultados no controle da actividade antigenica da vacina que deve ser feita systematicamente antes do emprego humano, exige cuidados especiais em virtude não só das variações individuais dos animaes sensiveis, bastante conhecidas do experimentador familiarizado com o seu uso, como ainda do grande numero de influencias, de ordem physico-quimica ou biologica, que determinam a diminuição ou perda da actividade do virus vaccinico. Entre estas figura a da reacção das polpas porque a integridade do virus não é mais conservada, desde que o pH destas chegue a atingir o indice de 4,0 ou se eleve a 10,0.

Na determinação electrometrica de uma serie de partidas de polpas vaccinicas do Instituto Butantan, emulsionadas em glicerina, foi verificada a existencia de um elemento que desviava o primitivo grau de reacção quando recém-colhidas, entre pH 6,20 e 8,17, para um ponto de accentuada acidez, com prejuizo para a actividade do virus. Analysadas as glicerinas empregadas na suspensão das mesmas polpas com a indicação de *neutras*, os resultados demonstraram que, tanto as de procedencia nacional como as estrangeiras, eram fortemente *acidas*. Sendo a glicerina um producto largamente empregado nos laboratorios e centros de experimentação de natureza biologica, é necessario chamar-se a attenção dos interessados para este ponto importante da questão, pois não é possivel encontrar-se tal substancia em estado de neutralidade. Com effeito, normalmente as glicerinas são sempre acidas, e isto porque, ao serem purificadas por destillação no vacuo, não se separam completamente dos acidos oriundos do processo geralmente usado na sua preparação, que é o da hydrolyse de substancias gordurosas por meio do acido sulfurico. Nestas condições, a propria glicerina bi-destillada ainda pode conter traços desses acidos.

Na neutralização da glicerina usada no Laboratorio Vaccinico, emprega-se, com resultado satisfactorio, o hydroxido de sodio ou um soluto tampão de phosphato com pH 7,4. Do soluto tampão é geralmente sufficiente 1cc. para 1000 cc. de glicerina. Na neutralização com NaOH sempre se determina com exactidão a quantidade a ser usada. Nestas condições, depois que se passou a fazer no Instituto a neutralização systematica da glicerina empregada para emulsionar as polpas, estas, em exames posteriores, feitos após quinze meses de permanencia no frigo a -10°C , têm demonstrado perfeita approximação do ponto optimo (pH 7,8) á integridade do virus; este, de seu lado, ao ser doseado, tambem tem revelado actividade sempre positiva ainda na diluição de 1/50.000 pelo methodo de Gins, sendo que bastaria, para ser considerado em optimo estado de conservação, o limite de diluição a 1/10.000.

ABSTRACT

The pH of the lymph occupies a prominent place among the elements that must be carefully controlled in the preparation of small-pox vaccine in order for its activity not to be rapidly modified. By using the best brands of so-called "neutral" glycerin it was found at the Instituto Butantan Vaccine Department that the pH of the vaccine pulp originally near the neutral point or slightly alkaline rapidly changed towards acidity with consequent decrease of the virus activity. An analysis made of these "neutral" brands of glycerin disclosed that they were all decidedly acid so as to require a previous neutralization by sodium hydroxide or by a buffer sulphate solution to become acceptable for the vaccine preparation.

BIBLIOGRAPHIA

1. ——— A method for estimating the potency of smallpox vaccine — Hygienic Laboratory Bull. (149):1-27. — U. S. P. H. Service, Washington, D. C., 1929.
2. *Cunningham, J. & Maskar, K. S.* — The hydrogen ion content of vaccine etc. — Ind. J. Med. Res. XV(3):819.1928.

(Trabalho das Secções de Virus e de Physico-Chimica do Instituto Butantan, janeiro de 1934. Dado á publicidade em agosto de 1934).