

## MODERNAS TECHNICAS DE PREPARO DA ANTITOXINA TETANICA

---

### c) Influencia da vaccinação previa de cavallos sobre o ulterior augmento do titulo antitoxico do soro

POR

FLAVIO DA FONSECA

---

Interessado o serviço sob nossa direcção no fornecimento de antitoxinas de alto poder neutralizante, vimos acompanhando de perto o progresso realizado ultimamente neste capitulo da sorotherapia e temos instituido uma serie de experiencias tendentes a verificar, não só os resultados assignalados em trabalhos recentes, como a possibilidade do emprego dos nossos methodos no serviço de producção de antitoxina tetanica deste Instituto.

As technicas de hyperimmunização de cavallos destinados á producção de antitoxina tetanica têm sido, de facto, consideravelmente aperfeiçoadas nestes ultimos annos, verificando-se continua e notavel elevação no poder antitoxico dos soros obtidos em varios laboratorios. Uma rapida revista da literatura recente permittirá concluir que a obtenção de soros de altos titulos antitoxicos está estreitamente ligada á adopção das novas technicas, indicadas umas pela observação casual e deduzidas outras de phenomenos occorridos no decurso da hyperimmunização.

Não menor foi o progresso relativamente ao lapso de tempo necessario para attingir-se o maximo de producção de anticorpos, pois esse prazo está hoje muito reduzido graças ao emprego da anatoxina tetanica. Realmente, o uso deste antigeno nas primeiras phases da immunização dos productores do soro anti-tetanico, determina, em um mês, immunidade sufficiente para permittir o emprego de doses iguaes a 50 e mesmo 100 c. c. de uma toxina de alto poder toxico.

Embora apresentando a grande vantagem de abreviar consideravelmente o periodo de immunização, diminuindo alem disso os seus riscos, não consegue, todavia, a anatoxina, mesmo quando inoculada em altas doses, elevar o titulo anti-

toxico além do limite attingido com a toxina, salvo em casos excepcionaes. O emprego associado da anatoxina e toxina não modifica tão pouco esses resultados, como se deprehe de da literatura; ainda recentemente Savino (1), baseado em resultados obtidos com 131 cavallos immunizados, no inicio, com anatoxina e, em seguida, com toxina, em doses de 20 até 700 c. c., refere ter obtido media geral de 257 u. (americanas), com menos de 100 u. em 36 animaes e maximo de 700-800 u. em apenas 4 animaes.

Conquista de valor para a sorologia tetanica constituiu a verificação de Ramon e Descombey (2) sobre a vantagem da addição do pó de tapioca esterilizado ao antigeno tetanico, o que determinava uma producção maior de antitoxina por parte dos cavallos assim immunizados. Esta technica foi applicada ao tetano por analogia com o que se passa na producção dos soros anti-diphthericos, em que Ramon (3) já havia observado o mesmo phenomeno. Serviu de ponto de partida ás suas experiencias a occorrenca de um titulo antitoxico, mais elevado do que o habitualmente attingido, nos cavallos que, accidentalmente, apresentavam um abcesso no ponto da inoculação do antigeno. Reproduzindo experimentalmente essa condição, concluiu Ramon que o pó de tapioca esterilizado e addicionado ao antigeno diphtherico, produz resultados identicos, attribuidos por elle e outros auctores ao edema (affluxo leucocytario), seguido da lenta absorpção do antigeno, phenomenos estes semelhantes ás observadas nos abcessos naturaes.

A applicação deste methodo permittiu, não só a Ramon e Descombey, como a Condrea (4), Glenny (5) e Feierabend (6), a obtenção de optimos resultados successivos. Outras substancias, além do pó de tapioca, foram ainda experimentadas com exito na formação de um precipitado ao qual ficasse adsorvido o antigeno; entre ellas estão o alume de potassio, que Glenny, Pope, Waddington e Wallace (7) observaram ter o mesmo effeito adsorvente, o sulfato de aluminio e o chloreto de calcio, este ultimo com a vantagem de ser menos toxico.

Uma outra etapa de valor para o aperfeiçoamento da producção da antitoxina tetanica, é representada pela recente technica proposta pelas auctoridades neste assumpto, Ramon e Lemétayer (8, 9, 10 e 11), que, em 1931, verificaram que cavallos submettidos um anno antes á vaccinação contra o tetano pela technica de Descombey (12), i. é, que haviam recebido, com um mês de intervallo, 2 injecções de 10 c. c. de anatoxina tetanica addicionada de tapioca, se revelavam muito melhores productores de antitoxina tetanica do que animaes não vaccinados, ao serem submettidos á hyperimmunização com antigenos addicionados de substancias não especificas. Esta technica fora, aliás, precedida por uma semelhante, devida a Glenny, Pope, Waddington e Wallace, que já em 1925 (13) tinham dado a conhecer que um repouso de um mês, instituido logo após as primeiras inoculações de toxina tetanica, permittia a elevação do titulo da antitoxina ao dobro, o que a experiencia do nosso laboratorio veiu confirmar, como se verá em trabalho anterior, escripto em collaboração com Lemos Monteiro (14).

Ramon, Lemétayer e Hamedy (15), referindo-se ao facto, aparentemente paradoxal, de a vacinação anti-tetanica, ao contrario da diphterica, conferir essa propriedade, attribuem-no a que os cavallos, não apresentando immuniidade natural ao tetano, adquirem pela vacinação um estado de immuniidade inicial que pode ser aperfeiçoada pela hyperimmunização, ao passo que, no caso da diphteria, a immuniidade natural nelles existente os colloca, em relação á immuniidade diphterica, no ponto que só vêm a attingir, em relação a immuniidade tetanica, depois de vacinados.

Em trabalho anterior, collaborando com Lemos Monteiro (14), tivemos oportunidade de expor os resultados conseguidos com o uso de antigenos precipitados pelo alume de potassio. Relataremos nesta nota os resultados obtidos com as primeiras hyperimmunizações de cavallos vacinados contra o tetano pela administração de 2 injeções de anatoxina adicionada de alume de potassio, vacinações estas que resolvemos fazer systematicamente nos animaes do Instituto desde que nos foi entregue o serviço de tetano.

No trabalho citado (14), apresentámos um quadro demonstrativo do maior titulo obtido antes e depois de serem os animaes submettidos á immunização por toxina adicionada de 0,5 gr. de alume de potassio, verificando-se que a media geral dos valores triplicou. E' de notar, todavia, que os animaes utilizados nessa verificação eram representados pelos melhores productores, que vinham sendo aos poucos seleccionados, devendo ser attribuidos a este facto os titulos altos por nós obtidos naquella verificação, os quaes estão em contradicção apparente com os titulos relativamente baixos alcançados em cavallos não vacinados do quadro II, que abaixo apresentamos, constituido por cavallos novos, ainda não experimentados em immunização tetanica.

A presente nota compara os resultados obtidos após a hyperimmunização de 2 grupos de cavallos com anatoxina — toxina + alume de potassio. Os animaes componentes do grupo I tinham soffrido vacinação anti-tetanica havia 6 meses ou 1 anno, ao passo que os do grupo II não tinham sido vacinados, tendo-lhes sido, porém, concedido o repouso de 1 mês, preconisado por Glenney, Pope, Waddington e Wallace.

*Grupo I.* 6 cavallos vacinados contra o tetano com 2 inoculações de anatoxina + 0,5 gr. % de alume de potassio (1.<sup>a</sup> = 10 c. c., 2.<sup>a</sup> = 10 c. c., 20 c. c. ou 50 c. c.) e por meio de anatoxina-toxina, ambas adicionadas de alume, segundo o esquema abaixo:

QUADRO I  
CAVALLOS VACCINADOS

N.º	Vacinação		Hyperimmunização								Título da anti-toxina obtida na 1.ª sangria	
	1.ª inj.	2.ª inj.	Anatoxina + 0,5 gr. % de alume				Toxina + 0,5 gr. % de alume					
			28.VII.32	5.VIII.32	16.VIII.32	24.VIII.32	2.IX.32	9.IX.32	16.IX.32	23.IX.32	30.IX.32	14.X.32
505	11.XII.31 10 c.c.	19.I.32 20 c.c.	100 c.c.	100 c.c.	200 c.c.	300 c.c.	50 c.c.	100 c.c.	200 c.c.	300 c.c.	400 c.c.	1200 U. A.
509	1.X.31 10 c.c.	3.XI.31 10 c.c.	"	"	"	"	"	"	"	"	"	1600 U. A.
511	5.XI.31 10 c.c.	7.I.32 10 c.c.	"	"	"	"	"	"	"	"	"	1500 U. A.
532	17.VI.31 10 c.c.	23.VII.31 50 c.c.	—	50 c.c.	150 c.c.	"	"	"	"	"	"	500 U. A.
533	17.VI.31 10 c.c.	23.VII.31 50 c.c.	—	"	"	"	"	"	"	"	"	600 U. A.
535	17.VI.31 10 c.c.	23.VII.31 50 c.c.	—	"	"	"	"	"	"	"	"	800 U. A.

O quadro acima mostra os optimos resultados obtidos com este processo, principalmente no caso dos cavallos Nos. 505, 509 e 511, cujo titulo foi bastante superior ao dos 3 ultimos, o que pode ter sido devido, tanto a mera coincidência, pois o numero de observações é muito reduzido para eliminar esta hypothese, como ao facto de terem aquelles recebido a mais uma injeção de anatoxina, bem como quantidade total maior deste antigeno, que foi de 700c.c., ao passo que os 3 ultimos receberam apenas 500 c.c.. Tambem não é impossivel que a differença do titulo obtido como o soro dos 3 primeiros cavallos do grupo seja devida ao menor lapso de tempo decorrido entre a vacinação e o inicio da hyperimmunização.

*Grupo II.* Marcha da hyperimmunização de 5 cavallos novos, não vacinados, inoculados com toxinas da mesma preparação ou com toxinas de valor identico.

QUADRO II

CAVALLOS NÃO VACCINADOS

No.	Hyperimmunização							Titulo da antitoxina obtido na 1. <sup>a</sup> sangria	
	Anatoxina + 0,5 gr. % de alume			30 dias de repouso	Toxina + 0,5 gr. de alume				
	2.VIII.32	15.VIII.32	24.VIII.32		23.IX.32	30.IX.32	7.X.32	18.X.32	3.XI.32
516	50 c.c.	150 c.c.	300 c.c.	30 dias de repouso	100 c.c.	200 c.c.	300 c.c.	400 c.c.	400 U. A.
517	"	"	"		"	"	"	"	300 U. A.
519	"	"	"		"	"	"	"	300 U. A.
522	"	"	"		"	"	"	"	300 U. A.
526	"	"	"		"	"	"	"	400 U.A.

Os titulos obtidos com esta technica são, portanto, inferiores aos conseguidos após hyperimmunização de cavallos vacinados. Mesmo desprezando os resultados dos 3 primeiros cavallos do quadro I, que receberam uma dose mais elevada de anatoxina, ainda assim resulta a vantagem a favor dos cavallos vacinados, pois os não vacinados, que receberam tambem menos 50 c.c. de toxina do que os vacinados, apenas accusaram augmento de 50-100 u. (americanas) na 2.<sup>a</sup> sangria, quando já haviam soffrido nova inoculação de 400 c.c., estando portanto em condições de superioridade em relação á 1.<sup>a</sup> sangria dos cavallos vacinados.

Embora não tenhamos utilizado eschemas de immunização perfeitamente comparaveis, pois os cavallos receberam mais uma inoculação (50 c.c.) de toxina, pelo menos, do que os não vacinados, somos levados a crer, pelos resultados obtidos, que, realmente, a technica de Ramon e Lemétayer, que recommenda o emprego de cavallos vacinados contra o tetano para o preparo da antitoxina tetanica, constitue um elemento notavel de exito neste capitulo da sorologia.

## CONCLUSÃO

A comparação dos resultados obtidos pela hyperimmunização de 2 grupos de cavallos, respectivamente, vacinados contra tetano (por 2 injeções de anatoxina tetanica adicionada de alume de potassio) e não vacinados, sendo o 1.º representado por 6 animaes e o 2.º por 5, é favoravel á utilização de animaes previamente vacinados para a producção de antitoxina tetanica: apesar do pequeno numero de animaes empregados neste trabalho a differença parece bastante sensivel para permittir essa conclusão.

## ABSTRACT

In the production work of tetanus antitoxin, the immunization of 2 groups of horses of which one had been previously "vaccinated" by means of 2 injections of toxin plus potassium alum whilst the other had not thus been prepared, has shown a marked difference favouring the application of that preparatory "vaccination".

## BIBLIOGRAPHIA

1. *Savino, E.* — C. R. Soc. Biologie CVI(5):382.1931.
2. *Ramon, G. & Descombey, P.* — C. R. Soc. Biologie XCIII:508.1925.
3. *Ramon, G.* — C. R. Soc. Biologie XCIII:506.1925 *et* C. R. Acad. Sciences CLXXXI:157.1925.
4. *Conrea, P.* — C. R. Soc. Biologie CIII:1042.1930.
5. *Glenny, A. T.* — Brit. Med. Journal II(3632):244.1930.
6. *Feierabend, B.* — Trav. Inst. Hyg. Publ. Ét. Tchecosl. I(4):115.1930.
7. *Glenny, A. T.; Pope, C. G.; Waddington, H. & Wallace, U.* — J. Path. & Bact. XXIX:38.1926.
8. *Ramon, G. & Lemétayer, E.* — C. R. Soc. Biologie CIV(1):21.1931.
9. *Ramon, G. & Lemétayer, E.* — C. R. Soc. Biologie CVI(1):23.1931.
10. *Ramon, G. & Lemétayer, E.* — C. R. Soc. Biologie CVI(1):71.1931.
11. *Ramon, G.; Descombey, P. & Lemétayer, E.* — Ann. Inst. Pasteur XLVI(4):444.1931.
12. *Descombey, P.* — Ann. Inst. Pasteur XXXIX:485.1925.
13. *Glenny, A. T.; Pope, C. G.; Waddington, H. & Wallace, U.* — J. Path. & Bact. XXVIII:463.1925.
14. *Monteiro, J. L. & Fonseca, F. da* — Mem. Inst. Butantan VI:267.1931.
15. *Ramon, G.; Lemétayer, E. & Hamedy, A.* — C. R. Soc. Biologie CVI(13):1228.1931.

(Trabalho da Secção de Immunologia e Sorotherapia antitoxica do Instituto Butantan, terminado em dezembro de 1932).