

SOBRE A DURAÇÃO DA ACTIVIDADE DAS ANTITOXINAS E ANTIVENENOS

POR

AFRANIO DO AMARAL, J. BERNARDINO ARANTES
E FLAVIO DA FONSECA

INTRODUÇÃO

Um dos aspectos mais interessantes e de maior relevancia scientifica e economica na pratica sorotherapica é, sem duvida, o que concerne á duracão da actividade especifica dos soros, especialmente daquelles cuja afericão pode ser feita com bastante rigor, isto é, os antitoxicos (antitoxinas) e os antipeçonhentos (antivenenos). O interesse dessa questão reside na attitude diametralmente opposta, assumida aprioristicamente, de um lado, pelos clinicos e, do outro, pelos immunologos, acreditando em geral os primeiros que, para ter effeito curativo, um soro deve ser recente, enquanto os segundos eram levados, pelas noções geraes sobre o comportamento das proteínas, a acreditar na possibilidade de conservacão da actividade therapeutica de tal producto por periodos relativamente dilatados. Todavia, guiados pela prudencia que sempre tem orientado o preparo e applicacão de todas as substancias biologicas, os sorologistas acharam, desde o começo, preferivel restringir a um prazo relativamente curto as indicacões referentes á conservacão da especificidade das antitoxinas e antivenenos entregues ao consumo.

Infelizmente, essa attitude de prudencia dos technicos, justificada pela necessidade de uma observacão mais demorada desse importante aspecto da sorotherapia, foi sempre mal comprehendida pelos clinicos e pelos pharmaceuticos, os quaes ainda agora costumam exaggerar a sua repulsa ao emprego de soros menos recentes sob a vaga allegacão de inactividade. Conforme veremos adiante, essa repulsa que aos laboratorios productores causa transtornos formidaveis e avultadas perdas, não se justifica nem mesmo do ponto de vista immunologico, dahi promanando o proprio interesse scientifico e economico do problema. Si é bem verdade que a era sorotherapica foi iniciada ha pouco mais de 40 annos, não é

menos certo que, si houvessem desde cedo comprehendido o enorme alcance da exacta determinação da duração da actividade dos soros therapeuticos, os especialistas teriam provavelmente procurado ha mais tempo coordenar esforços no intuito de elucidar as classes medica e pharmaceutica, sobre a conveniencia de, em certos casos, preferirem até productos antigos a outros de recente preparação.

Effectivamente, é curioso que, apesar de se haver publicado mais de uma dezena de memorias technicas sobre o assumpto, todas concordes na demonstração da perduradoura especificidade dos soros, ainda hoje os proprios medicos se recusem a lançar mão de productos menos recentes. Que os collegas não têm razão nesse modo de ver é facil demonstrar por uma analyse da literatura scientifica, que poude ser agora vantajosamente completada pelo redoseamento, por nós effectuado, de antitoxinas e antivenenos de preparação bastante antiga e conservados, em condições sem duvida desvantajosas, em mão dos consumidores.

RESENHA BIBLIOGRAPHICA

A — ANTITOXINAS

1. A primeira referencia, existente na literatura sobre a conservação da actividade das antitoxinas, parece ser a nota publicada em janeiro de 1902 pelo Ministerio do Interior da França, com a informação de que “o soro antidiphtherico não perde suas propriedades curativas pela conservação *mesmo durante um anno*”.

2. Em editorial publicado em maio de 1904, o Journal of the Royal Army Medical Corps vehiculou a informação de que “o soro antidiphtherico conservado, tanto na Inglaterra, como na India, *por mais de um anno*, revela alguma perda mas insufficiente para contraindicar sua utilização”.

3. Em 1905, Miller (1) examinou 82 partidas de soro antidiphtherico e redoseou-as pelo methodo de Ehrlich, repetindo, assim, a technica que havia sido empregada na determinação original. Verificou que apenas em 25 partidas, portanto em cerca de 30 %, tinha havido alguma perda do poder antitoxico. Levando em consideração que, no preparo das partidas, o laboratorio concedera uma margem de 6 a 25 % a mais da actividade marcada, verificou este pesquisador que, *ao cabo de 2 a 3 annos*, a potencia era mais ou menos igual á indicada no rotulo das empolas, tirando de seu estudo as seguintes conclusões:

a) o soro antidiphtherico perde sua actividade aos poucos, os mais fortes um pouco mais rapidamente, mas nunca tão depressa quanto se suppõe;

b) a indicação da actividade nas empolas, desde que incluia a margem dada pelo laboratorio, garante a conservação do poder exacto por muitos annos;

c) a procura do soro fresco não se justifica, porquanto um soro velho pode apresentar ainda uma potencia exacta, sendo portanto utilizavel até que se obtenha outro.

4. Em 1907, Kinyoun e Hitchens (2) examinaram 100 partidas differentes de soro antidiphtherico, devolvidas ao laboratorio depois de terem estado no commercio de 13 a 27 meses, tendo observado uma perda de 0 a 48,6 % na actividade das mesmas. Verificaram ainda que a perda maior da actividade occorria nos soros que haviam sido *concentrados por simples evaporação*, devendo-se a proposito notar que naquelle tempo ainda não se empregava commumente, nem mesmo nos Estados Unidos, o methodo de concentração por precipitação fraccionada das globulinas. De seu estudo, esses auctores concluíram naquella occasião o seguinte: a depreciação (inactivação) é um factor variavel, independente do tempo durante o qual um soro esteve exposto á venda; a perda media de 25 %, correspondente a um periodo de 12 a 15 meses, deve ser coberta por uma margem de 24 % para cada anno.

5. Em 1910, Anderson (3), trabalhando no Laboratorio de Hygiene de Washington com 18 amostras de antitoxina diphtherica que haviam sido conservadas em differentes temperaturas e por periodos variaveis de 1 a 3 annos, verificou que:

a) a antitoxina, conservada em geladeira a cerca de 5°C, perde em media 6 % de seu poder por anno;

b) conservada a 15°C, sua perda é de cerca de 10 % por anno e de 36 % ao cabo de 3 annos;

c) mantida em temperatura ambiente, variavel entre cerca de 21°C no inverno e 37°C no verão, a antitoxina soffre uma inactivação media de 20 % ao anno e de 59 % em 3 annos, o que mostra a conveniencia de se manterem os soros em temperatura relativamente baixa.

6. Em 1912, MacConkey (4), desejando verificar o effeito exercido, sobre a actividade do soro antidiphtherico, por temperatura proxima da do corpo humano, tratou de estudar comparativamente a influencia de differentes modos de distribuição e conserva sobre o poder antitoxico de 3 partidas, tendo concluido que:

a) distribuido em empolas e mantido a 36°C, o soro perde cerca de 36 % de sua actividade em 6 meses e de 49 % em um anno;

b) conservado em recipientes maiores (frascos de 250 cc.) na temperatura de 36°C, sua inactivação attinge 60 % ao cabo de 6 meses;

c) sua conservação sob uma camada de parafina não reduz a perda;

d) conservado em empolas, o soro perde actividade a 36°C cerca de 6 vezes mais depressa do que na temperatura da geladeira.

7. Em fim de 1916, este mesmo auctor (5) completou um trabalho de redeseamento de varias qualidades de soros e especialmente do antidiphtherico, cuja inactivação estudou em 31 amostras que haviam sido conservadas sem maiores cuidados. Sua conclusão final foi que “os soros mantêm sua especificidade por um periodo muito mais longo do que se acredita” e que a antitoxina diphtherica perde em media 23 % de seu poder no periodo maximo de verificação, correspondente a 4 annos e meio.

8. Em 1916, Brazil (6), baseado em observação que fizera em 1896 na Hospedaria de Immigrantes em S. Paulo, por occasião de um surto de diphtheria então registado e que cedera facilmente ao emprego de soro especifico comprado no mercado e de preparação muito antiga, publicou uma monographia, em cuja primeira parte referiu os resultados da redeterminação de actividade feita em amostras de 10 partidas de antitoxina diphtherica.

As conclusões dessa parte do trabalho são as seguintes:

“Esta verificação de dosagem feita em ampoulas de differentes partidas de sôro devolvidas ao Instituto, depois de um periodo de 4 a 7 annos, de enfrascamento, nos prova á saciedade quão exagerada é a ideia predominante sobre a alterabilidade do poder anti-toxico dos sôros therapeuticos. Vemos, com effeito, que o sôro anti-diphtherico conservou de modo perfeito o seu valor anti-toxico dentro do praso de 5 annos de entregue ao consumo. Os sôros de seis a 7 annos perderam no maximo 13 %, perda essa insignificante que não autorisa a rejeição do producto. Devemos ainda salientar que em relação aos sôros examinados, é razoavel suppor que nem todos tivessem sido conservados em excellentes condições”.

“Por todas as razões expostas verificamos que não ha motivo algum justificavel para a rejeição dos sôros antigos. Ao contrario, em igualdade de circumstancias, dando-se uma margem á pequena perda possivel do valor antitoxico, é preferivel o emprego do sôro velho. Guiado por orientação contraria, poderá o clinico ser levado a preferir um sôro baixo de 200 unidades, por exemplo, de recente preparo, a um outro de 800 ou 1.000 unidades, de preparo antigo. O erro entretanto é palpavel, como passamos a demonstrar. Emquanto que do primeiro serão precisos pelo menos de 30 a 40 centimetros cubicos para ter-se de 6.000 a 8.000 unidades exigidas para o tratamento de um caso de diphtheria de media intensidade, do segundo, admittindo-se uma perda de 20 % serão necessarios, no maximo, apenas 15 centimetros para obter-se o mesmo numero de unidades. O criterio que deve orientar o clinico no emprego dos sôros anti-toxicos é a indicação da dosagem e a applicação de um certo numero de unidades de accôrdo com a gravidade do caso e a idade do paciente.”

B — ANTIVENENOS

1. Em 1907, Calmette (7) mostrou que a redeterminação de actividade de empolas de soro antivenenoso, devolvidas, ao cabo de 1 ½ e 2 annos, da India e

da Indochina, no decurso de seus trabalhos fundamentaes sobre a sorotherapia anti-ophidica, revelara o seguinte: "seu titulo não havia baixado sensivelmente. O aspecto do liquido que ellas continham havia-se modificado apenas um pouco: este estava descorado e em seu seio fluctuavam pequenos flocos brancos. Estes flocos não indicam alteração: são constituídos por deposito de albumina precipitada".

2. Em 1917, Brazil (6), na segunda parte de sua citada monographia, publicou os protocollos de redeterminação do poder neutralizante de 4 partidas de soro anti-crotalico e 7 partidas de soro anti-ophidico (anti-crotalico e anti-bothropico), depois de um prazo variavel entre 26 e 47 meses de seu empolamento.

Eis suas conclusões no particular:

"Os sôros anti-peçonhentos perdem muito mais do seu valor anti-toxico, do que o sôro anti-diphtherico, sendo de notar que sua perda foi extremamente variavel, ficando subordinada ao limite maximo de 33 %, o que se verificou uma unica vez. Uma das causas dessa variação é o modo tão vario pelo qual é conservado o sôro. Este é enviado, com effeito, para as fazendas, onde algumas vezes é tratado com o necessario carinho, sendo guardado em lugar fresco e ao abrigo da luz. Na generalidade dos casos, porém, é atirado para cima de um movel qualquer, exposto á acção da luz e do calor, e, nestas condições resiste muito menos do que quando é mantido com os necessarios cuidados. De um modo geral, pôde-se admittir uma perda de 30 % em tres annos, o que não representa grande cousa, tratando-se de sôros muito anti-toxicos. E' aconselhavel, quando se tenha de empregar um sôro antigo, injectar-se uma dose de 30 % mais forte do que a do sôro de recente fabricação. Esta pratica é muito mais razoavel do que substituição constante de provisão.

E' um facto geralmente admittido que os sôros depois de um certo tempo de enfrascamento, são menos toxicos do que os sôros muito recentes, o que levou alguns laboratorios a deixarem envelhecer os sôros antes de entregal-os ao consumo.

O Instituto Pasteur de Paris, adoptou de ha muito tempo, essa pratica, no laboratorio, antes de serem expedidos."

"Depois de algum tempo de enfrascamento dos sôros, forma-se um precipitado, que pelo repouso se deposita no fundo do frasco ou ampoula. Agitado turva-se, tomando uma apparencia desagradavel. Este precipitado não indica uma alteração do producto, nem accarreta a substancia anti-toxica, que permanece no liquido. Este pelo repouso ficará limpido e poderá ser aspirado cautelosamente, afim de ser injectado sem a substancia precipitada."

3. Em 1921, Houssay e Negrette (8), pesquisando o poder neutralizante em amostras de 7 partidas de soro anti-ophidico devolvidas do interior e que haviam sido conservadas durante 13 a 23 meses provavelmente sem precauções especiaes, verificaram tambem que a inactivação dos antivenenos se processa lentamente.

Observaram, porém, que sua perda havia sido proporcionalmente maior do que a registada por Brazil no trabalho citado no paragrapho anterior. Essa differença aquelles auctores a attribuiram á circumstancia de haverem trabalhado com anti-venenos de valor antitoxico inicial mais elevado. Todavia, uma analyse dos protocollos publicados revela que, em relação ao poder anti-bothropico, a comparação feita pelos dois auctores argentinos entre os seus resultados e os de Brazil não é cabivel, pelo facto de Brazil haver usado o veneno de *Bothrops jararaca* para determinação do valor anti-bothropico, ao passo que Houssay e Negrette usaram para esse fim o veneno de *Bothrops alternata*.

Suas conclusões são as seguintes:

“Apezar de reputarmos as perdas reaes mais elevadas do que as calculadas por Brazil, que notou ser o soro antiophidico um dos que mais se alteram, todavia estamos de accordo com elle em que os soros ainda são activos depois de muito tempo. Praticamente e na falta de soro fresco não se deve vacillar em empregar um soro velho, o qual quasi seguramente produzirá effeito.

Como corollario do que verificámos resulta que, si os soros fortes têm muita acção e pequeno volume, o que é de grande vantagem, no entanto se inactivam mais rapidamente do que os fracos, não sendo, pois, os mais economicos”.

4. Em 1922, Phisalix (9), em seu conhecido trabalho sobre animaes venenosos, dedicou apenas poucas palavras ao soro anti-venenoso, limitando-se visivelmente a reproduzir a informação já antiquada de Calmette. Disse ella textualmente: “Este soro conserva durante cerca de 2 annos seu valor anti-toxico em todos os climas; depois esse valor decresce pouco a pouco.”

5. Em 1925, Anderson e Caius (10) examinaram soros antivenenosos (anti-cobraico e anti-viperico) preparados no Instituto Central de Pesquisas de Kasauli, distribuidos em empolas de 40 cc. devolvidas ao laboratorio em prazos de 3, 6, 9 e 12 meses depois de terem sido conservados nas seguintes condições:

- a) mantidas em um armario e protegidas pelo seu involucro natural, sem qualquer precaução contra a luz;
- b) mantidas do lado de fora sem involucro e expostas á luz directa;
- c) mantidas em uma caixa fechada, dentro de geladeira e de todo protegidas contra a luz;
- d) mantidas na geladeira sem qualquer involucro e sem protecção contra a luz;
- e) mantidas em mesa do escriptorio sem qualquer involucro e expostas á luz e á temperatura ambientes.

As conclusões de seu importante trabalho são as seguintes, em relação ao poder neutralizante para com o veneno de cobra de capello (*Naja naja*):

a) o antiveneno, á semelhança de todos os outros soros, perde gradualmente actividade durante os primeiros 6 a 9 meses de sua conservação;

b) em seguida a essa perda inicial, surge de subito um reforço de actividade que chega a ultrapassar o limite apresentado originalmente pelo producto; isto ocorre dentro dum periodo de 12 a 14 meses após o empolamento;

c) esse ganho da actividade não é devido ás particulas que geralmente se depositam por meio da centrifugação;

d) a luz e o calor existentes ordinariamente nos tropicos (dentro de casa) não exercem influencia apreciavel sobre a potencia do antiveneno.

6. Em 1927, Pawlowsky (11), em sua compilação sobre o mesmo assumpto, seguiu os passos de Phisalix e Calmette, dizendo que o soro antivenenoso "não perde sua actividade especifica no decurso de cerca de 2 annos".

7. Em 1931, Maitra e Ahuja (12), tendo encontrado, no Instituto de Kasauli, 19 amostras de antiveneno indiano de 2 ½ a 9 annos de preparo, trataram de verificar si as mesmas ainda possuiam poder neutralizante em relação ao veneno da cobra de capello. Eis textualmente a conclusão a que chegaram: "cerca de 50% das amostras retiveram sua actividade original muito tempo depois do limite admittido para sua applicação therapeutica que é de 2 annos a contar da data do preparo. Cerca de 50% das amostras se haviam enfraquecido mas ainda mantinham perto de metade do poder antitoxico inicial, o que demonstra ser apenas quantitativa a deterioração produzida por uma conserva prolongada; o soro antivenenoso, como o anti-diphtherico, mantém sua especificidade, ou, por outra, é ainda capaz de neutralizar *in vitro* o veneno da cobra durante um prazo muito mais longo do que o admittido actualmente."

C — CONCLUSÃO GERAL BIBLIOGRAPHICA

Do estudo da literatura existente sobre o assumpto se podem, portanto, tirar, parcialmente, varias conclusões, a saber:

a) Embora haja no pormenor alguma discordancia entre os trabalhos dos varios auctores, se tem verificado em geral que o soro antidiphtherico pode ser conservado sem precauções especiaes durante um periodo relativamente dilatado, porquanto a maior perda verificada, no periodo maximo de 7 annos até agora observado, não é sufficiente para contraindicar o emprego do producto;

b) em igualdade de condições, os antivenenos, mesmo depois do periodo maximo de observação, até agora assignalado, de 9 annos após o preparo, ainda conservam bastante actividade para se justificar sua utilização para fins curativos;

c) a inactivação encontrada nas antitoxinas e antivenenos estudados está sujeita a certas variações, observáveis de partida a partida; ella independe do maior ou menor prazo de exposição, mas se processa sempre mais lentamente na geladeira do que na temperatura ambiente.

CONTRIBUIÇÃO ACTUAL

Pelo exposto no capitulo anterior se deduz que o estudo da conservação do poder neutralizante das antitoxinas e antivenenos tem sido feito até agora em partidas não concentradas e cujo preparo datava no maximo, respectivamente, de 7 a 9 annos. Seria, pois, interessante verificarmos si a exposição de taes productos, durante periodos mais dilatados, á temperatura ambiente, ou o facto de terem sido concentrados por precipitação fraccionada, poderia contribuir para seu maior ou mais rapido enfraquecimento. Essa pesquisa afigurava-se tanto mais importante, quanto o Instituto Butantan estava, no particular, em situação especial para favorecer essa verificação e isto pelas seguintes razões:

1.^a) ha mais de 20 annos este Instituto se dedica ao preparo simultaneo de antivenenos e antitoxinas alem de outros productos biologicos;

2.^a) ha perto de 15 annos vem produzindo antitoxinas e antivenenos concentrados, tendo portanto acompanhado os laboratorios norte-americanos e precedido os institutos europeus e outros na pratica da refinação dos plasmas por precipitação fraccionada das globulinas;

3.^a) ha quasi 20 annos vem recebendo empolas de soros antitoxicos e anti-peçonhentos, devolvidas das fazendas do interior, onde são conservadas sem maiores precauções e depois de haver decorrido muitos annos de sua distribuição.

Para esse fim, tratámos, preliminarmente, de aproveitar amostras de soros muito antigos, alguns com cerca de 25 annos de preparo, procurando verificar até que ponto havia chegado sua inactivação. As partidas examinadas correspondiam, de um lado, aos seguintes productos:

- a. Antitoxina diphterica
- b. " tetanica
- c. Antiveneno crotalico
- d. " bothropico
- e. " ophidico.

Doutro lado, ellas eram representadas, em parte, por soro obtido por sangria directa de cavallos immunizados e, em parte, por pseudo-globulina oriunda da precipitação fraccionada do plasma correspondente.

a) *Verificações sobre a antitoxina diphtherica*

Já havendo, conforme indicámos acima, outros auctores estudado a actividade de soros antidiphthericos de até 7 annos de preparo, procurámos fazer as nossas determinações em partidas mais antigas. Para esse fim, aproveitámos empolas de partidas cuja distribuição datava de perto de 7 a 20 annos (entre 1925 e 1912), havendo, pois, ultrapassado de até 4 vezes o prazo maximo concedido antigamente pelo Instituto para sua utilização therapeutica.

Outrosim, limitámo-nos em nossas pesquisas a verificar si as varias partidas de soros antidiphthericos antigos de que dispunhamos ainda retinham 50% de seu poder antitoxico inicial e isto porque nos pareceu, *a priori* e á luz da bibliographia, que a inactivação raramente chegaria a ultrapassar metade da potencia primitiva.

Technica — Na aferição do poder neutralizante empregámos o methodo classico de Ehrlich, usando antitoxina padrão fornecida pelo Laboratorio de Hygiene de Washington e fazendo a inoculação das misturas em cobaias de 250 grs. de peso medio. E' bem verdade que, ha cerca de 20 annos, o Instituto, baseado aliás em observação de Ehrlich, vem empregando, na determinação do poder neutralizante da antitoxina diphtherica, pombos adultos com peso medio de 300 grs., inoculando-os com as misturas por via intra-muscular na região peitoral, em vez de cobaias, por via subcutanea e aferindo, de tempos a tempos, em cobaias de peso padrão, os resultados observados em pombos (13). O volume da mistura inoculada nos pombos é tambem de 4 cc. e, pois, igual ao que se emprega nas cobaias segundo o methodo de Ehrlich, consistindo a unica differença nestes dois processos em pequena alteração do limite de morte (L+) da toxina, o qual, em via de regra, é para os pombos cerca de 0,01 cc. maior do que para as cobaias.

Nas determinações feitas, resolvémos preliminarmente verificar si a actividade da antitoxina contida em varias empolas numa mesma partida não apresentava oscillação, tendo concluido, conforme se vê no protocollo abaixo, que essa oscillação não ocorre.

Em seguida, tratámos de tirar a limpo si o precipitado que, por decantação, se forma no interior das empolas e que é constituido por pseudo-globulina, poderia exercer qualquer influencia sobre o resultado do redoseamento. Para esse fim, o conteudo de cada empola foi separado em duas porções: uma, inteiramente limpa e obtida por centrifugação do liquido; outra, representada pelo liquido em estado natural, sem previa centrifugação.

Os resultados de nossas determinações acham-se indicados no quadro I.

REDOSEAMENTO DE ANTITOXINAS DIPHTERICAS ANTIGAS

Partida	Qualidade	Distribuição	Porção	Potencia		Perda	pH actual (*)	Notas
				primitiva	presente			
26	não concentrada	26. III. 1912	centrifugada	200 u. a.	> 100 u. a.	- 50 %	7.90	Empola I
"	—	—	"	—	" "	"		" II
"	—	—	"	—	" "	"		" III
"	—	—	com precipitado	—	" "	"		" I
"	—	—	" "	—	" "	"		" II
"	—	—	" "	—	" "	"		" III
27	"	22. VI. 1912	centrifugada	350 "	> 175 "	- 50 %	7.21	—
"	—	—	com precipitado	—	" "	"		—
41	"	18. XI. 1913	centrifugada	400 "	200 "	- 50 %	7.40	—
"	—	—	com precipitado	—	< 200 "	+ 50 %		A cobaia morreu antes do prazo
45	"	27. III. 1914	centrifugada	250 "	> 125 "	- 50 %	7.51	—
"	—	—	com precipitado	—	" "	"		—
61	"	8. VII. 1915	centrifugada	350 "	> 175 "	"	7.23	—
"	—	—	com precipitado	—	" "	"		—
69	"	25. XI. 1915	centrifugada	400 "	> 200 "	"	—	—
"	—	—	com precipitado	—	" "	"		—
74	"	14. III. 1916	centrifugada	650 "	325 "	50 %	8.06	—
"	—	—	com precipitado	—	< 325 "	+ 50 %		A cobaia morreu antes do prazo
88	"	3. X. 1916	centrifugada	350 "	< 175 "	+ 50 %	7.34	—
"	—	—	com precipitado	—	" "	"		—

106	"	24. VIII. 1917	centrifugada	1800 "	> 900 "	- 50 %	}	6.07	—
"	—	—	com precipitado	—	" "	"			
257	concentrada	28. IV. 1921	centrifugada	300 "	< 150 "	+ 50 %	}	5.10	Preparado de euglobulina
"	—	—	com precipitado	—	" "	"			
262	"	5. VII. 1921	centrifugada	300 "	> 150 "	- 50 %	}	5.66	" "
"	—	—	com precipitado	—	" "	"			
302	"	25. VIII. 1922	centrifugada	400 "	< 200 "	+ 50 %	}	5.47	A cobaia morreu antes do prazo
"	—	—	com precipitado	—	" "	"			
303	"	28. VIII. 1922	centrifugada	300 "	> 150 "	- 50 %	}	6.41	" "
"	—	—	com precipitado	—	" "	"			
362	"	19. XII. 1925	centrifugada	2000 "	> 1000 "	- 50 %	}	6.40	A cobaia morreu antes do prazo
"	—	—	com precipitado	—	< 1000 "	+ 50 %			

(*) Tendo verificado que o pH das partidas, concentradas no periodo anterior ao seu, era muito baixo (acidez nítida), a actual directoria, ao reorganizar os serviços de concentração de plasmas, estabeleceu que nenhuma partida deveria ser exposta ao consumo sinão com o pH 7.30, determinado pelo potenciometro.

Conclusões — O redoseamento de antitoxinas diphtericas antigas, entregues ao consumo entre cerca de 9 e 20 annos passados e devolvidas por suspeita de inactividade, revelou que:

1.º — em diversas empolas de uma mesma partida não havia variação da porcentagem da perda do poder antitoxico;

2.º — em cerca de 62% das partidas, essa perda não tinha sequer chegado a 50%, havendo attingido ou ultrapassado esse limite em apenas 38% dos casos;

3.º — parece não haver perda progressiva do poder antitoxico em resultado do envelhecimento; a inactivação ocorre aparentemente nos primeiros tempos, ficando depois o producto mais ou menos estabilizado;

4.º — o precipitado que se forma no seio do soro não exerce influencia alguma, ou pelo menos apreciavel, sobre o poder antitoxico do mesmo;

5.º — a concentração parece não exercer influencia sobre a duração da actividade.

b) *Verificações sobre a antitoxina tetanica*

No decurso de nossas pesquisas sobre a inactivação da antitoxina diphterica pelo envelhecimento, verificámos que o precipitado que se forma nas empolas é inteiramente inerte, não exercendo, pois, qualquer influencia sobre a actividade do producto. Por essa razão, resolvémos, de referencia á antitoxina tetanica, fazer apenas o redoseamento do liquido tal qual se encontra nas empolas.

Guiados igualmente pelas indicações do comportamento da antitoxina diphterica, fizemos com a tetanica apenas o redoseamento do poder antitoxico em relação a 40%, 50% e 80%, respectivamente, da actividade primitiva das partidas.

Nossos estudos no particular versaram sobre 7 amostras de antitoxina tetanica entregues ao consumo entre 1915 e 1926, tendo, portanto, envelhecido cerca de 5 a 16 annos.

Technica — Na aferição do poder neutralizante empregámos o methodo norte-americano, estabelecido por Anderson e Rosenau, utilizando-nos de toxina e antitoxina padrões fornecidas pelo Laboratorio de Hygiene de Washington. Cumpre-nos assignalar, a proposito, que esse processo tem sido o unico adoptado em Butantan desde que foi aqui iniciado o preparo do soro antitetanico e que não seguimos o novo padrão, ultimamente estabelecido pelo Comité de Hygiene das Nações e chamado de europeu ou mesmo internacional, cuja unidade é realmente metade mais fraca do que a americana.

Os resultados de nossas verificações sobre a perda da actividade da toxina tetanica estão condensados no quadro II.

QUADRO II

REDOSEAMENTO DE ANTITOXINAS TETANICAS ANTIGAS

Partida	Qualidade	Distribuição	Potencia		Perda	pH actual
			primitiva	presente		
9	não concentrada	20-IX-1915	1000 u. a.	400 u. a.	60 %	—
25	" "	16-IV-1917	500 "	300 "	40 %	5.60
34	concentrada	11-II-1918	2000 "	800 "	60 %	—
35	"	27-II-1918	2000 "	1000 "	50 %	—
76	"	20-IX-1923	300 "	200 "	33 %	—
79	"	19-X-1923	400 "	200 "	50 %	5.45
123	"	24-IV-1926	300 "	150 "	50 %	4.80

Conclusões

O redoseamento de antitoxinas tetanicas, entregues ao consumo ha cerca de 6 a 15 annos e devolvidas por suspeita de inactividade, revelou que:

1.º — a perda do poder antitoxico attingiu apenas 33 a 40% em 2 das 7 partidas examinadas, 50% em 3 outras, não ultrapassando 60% nas 2 restantes;

2.º — a inactivação não depende do tempo de envelhecimento, pois ella ocorre nos primeiros annos, ficando depois a antitoxina mais ou menos estabilizada;

3.º — a concentração não exerce influencia apreciavel sobre a duração da actividade.

c-e) *Verificações sobre os antivenenos: crotalico, bothropico e ophidico*

Para o exame da inactivação dos antivenenos (soros antipeçonhentos) lançamos mão de empolas correspondentes a 51 partidas distribuidas entre 1907 e 1925, cujo envelhecimento havia attingido entre 6 e 25 annos, ficando, dess'arte, grandemente ampliadas as observações feitas a esse proposito por outros investigadores.

Technica. — Na determinação da actividade dos antivenenos, os laboratorios têm usado varios processos, baseados em principios os mais dispares, o que é talvez devido á enorme differença observada, entre as especies de serpentes, nos com-

plexos principios toxicos e antigenicos dos respectivos venenos. Encarados em conjuncto, os principaes processos podem ser discriminados em: *in vitro*, *in vivo* e mixtos.

O mais importante dos processos de determinação *in vitro* é o de Calmette e Massol (14), baseado no poder precipitante do soro anti-cobraico em relação á peçonha. Este processo é sujeito a resultados desencontrados, pelo que pouco tem sido utilizado.

O principal methodo *in vivo*, aliás baseado em idea de Lamb (15), é o de Calmette (16), que consiste na determinação do poder preventivo exercido, sobre coelhos de 2 kilos, pelo antiveneno especifico, em relação a 1 mgr. do veneno da cobra de capello, injectado por via subcutanea 2 horas mais tarde. Esse processo não tem sido adoptado geralmente em relação a outros antivenenos, porque apresenta grandes variações, alem de o poder preventivo nem sempre ser um bom indice da actividade curativa.

O typo da technica mixta é a de Brazil (17), empregada ha mais de 25 annos em Butantan e seguida neste trabalho. Consiste em: diluir com agua physiologica, em tubos separados, quantidades variaveis de veneno, até completar 1 cc.; juntar em cada tubo 1 cc. do soro a determinar e incubar a mistura a 37°C durante 30 minutos a 60 minutos; injectar então cada dose na veia axillar de um pombo (300 grs. de peso medio), sendo o resultado indicado pela sobrevivencia do animal. Desconhecendo provavelmente esses trabalhos feitos e publicados no Brasil, Anderson (18), em data recente, acaba de descrever e Maitra e Mallick, de adoptar (19), como sendo original, esse mesmo methodo no estalonamento de antiveneno anti-viperico da India.

E' bem verdade que Acton e Knowles (20), baseados em que a neutralização do veneno por meio de mistura *in vitro* com o antiveneno correspondente, seguida de sua inoculação intra-venosa em pequenos animaes de laboratorio (coelhos no caso em apreço), está longe de indicar a potencia real de tal soro sob as condições verificadas nas picadas, lembraram a conveniencia de fazerem-se taes determinações em especies mais affins do homem, pelo que resolveram mais tarde (21) fazer a verificação do poder curativo do antiveneno em macacos, primeiro inoculados, por via hypodermica, com a peçonha em estudo.

Outrosim, não é menos certo que, continuando o trabalho por um de nós (A. do A.) iniciado no Antivenin Institute of America, Githens e Butz (22) verificaram que certos venenos contêm, alem de seus principios toxicos siderantes, outras substancias dotadas do poder de fixar os anticorpos, embora incapazes de matar os pombos rapidamente. Dessa verificação decorreria, no opinar destes investigadores, a necessidade de se usar, na aferição dos antivenenos, de preferencia um methodo de leitura indirecta, baseado no estabelecimento previo do limite de morte (L+) dos venenos correspondentes.

De outro lado, tendo em vista a desigualdade de comportamento dos varios venenos quando introduzidos por via hematica, um de nós (A. do A.) já

procurou aferir a actividade de antivenenos pelo poder curativo por elles exercido por via subcutanea sobre camundongos previamente inoculados pela mesma via com a peçonha correspondente. Todavia, esse processo, por ser bastante delicado, ainda não está convenientemente estalonado, de sorte que resolvemos, neste trabalho, recorrer á antiga technica de determinação do poder neutralizante em pombo, tanto mais quanto havia sido esta a usada em todas as determinações feitas primitivamente sobre os que iamos redosear. Para esse fim, empregámos o veneno de cascavel (*C. terrificus*) na determinação do poder do soro anti-crotalico e da fracção anti-crotalica do soro anti-ophidico e o de jararaca (*B. jararaca*) no caso do soro anti-bothropico e da fracção bothropica no soro anti-ophidico, preferindo sempre, em virtude das conhecidas variações da actividade toxica das peçonhas, amostras de veneno que no particular se approximassem dos chamados padrões: DML = 0 mgr. 001 no da cascavel e 0 mgr. 02 no da jararaca, para o pombo, por via venosa.

Os resultados de nossas verificações estão resumidos nos quadros III, IV e V.

QUADRO III

Partida	Qualidade	Distribuição	Potencia em mgr. por cc.		Perda	pH actual
			primitiva	presente		
23	não concentrado	17-VII-1909	1,0	0,5	50 %	—
32	" "	15-VII-1911	0,5	0,2	60 %	7.96
34	" "	29-IX-1911	1,8	0,95	47,3 %	7.78
44	" "	31-VII-1913	1,8	1,0	44,5 %	—
47	" "	3-V-1914	1,4	0,7	50 %	8.02
53	" "	20-III-1915	1,6	0,9	43,9 %	7.28
59	" "	13-VII-1916	1,2	0,5	58,4 %	8.08
61	" "	22-IX-1916	0,9	0,4	56 %	7.72
63	concentrado	26-XII-1916	1,8	1,1	38,9 %	—
67	não concentrado	2-IV-1917	1,0	0,6	40 %	7.86
68	" "	22-VI-1917	0,9	0,4	56 %	7.98
88	concentrado	7-I-1922	0,8	0,6	25 %	—
92	" "	18-I-1923	0,8	0,4	50 %	5.77
104	" "	24-X-1924	1,0	0,8	20 %	5.15
107	" "	27-III-1925	0,9	0,7	23 %	—
111	" "	11-I-1926	1,2	0,9	25 %	—

QUADRO IV

REDOSEAMENTO DE ANTIVENENOS BOTHROPICOS ANTIGOS

a. Antivenenos bothropicos monovalentes: contra *Bothrops jararaca*.

Partida	Qualidade	Distribuição	Potencia em mgr. por cc.		Perda	pH actual	Notas
			primitiva	presente			
1	não concentrado	29-XI-1920	1,6	1,4	12 %		
2	" "	11-XII-1920	1,6	1,3	19 %		
3	" "	12-VII-1921	2,4	1,2	50 %		Em 1926 havia já perdido 33%.
4	" "	12-VII-1921	2,4	1,5	38 %		" " "
5	" "	13-VII-1921	2,4	1,4	42 %		" " "
6	" "	19-IX-1921	2,2	1,4	36 %		Em 1916 havia já perdido 36%.

b. Antivenenos bothropicos polyvalentes: contra *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. jararacussu*,
B. alternata, *B. neuwiedii*, *B. cotiara* e *B. itapetiningae*.

23	não concentrado	13-V-1911	3,0	1,5	50 %	7.37	
26	" "	15-III-1912	2,7	2,1	22 %	—	
30	" "	4-XI-1912	1,4	1,2	14 %	—	
32	" "	29-IV-1913	2,0	1,5	25 %	7.59	
33	" "	8-VIII-1913	2,2	1,0	54 %	—	
42	" "	3-II-1915	2,0	1,4	30 %	6.89	
44	" "	8-IX-1915	2,0	1,2	40 %	6.86	
46	" "	18-XI-1915	1,8	1,2	33 %	—	
47	" "	22-III-1916	1,8	1,1	39 %	7.67	
50	mixto	30-IX-1916	1,8	0,8	56 %	—	Mistura soro pseudo- globulina.
58	não concentrado	23-X-1917	1,5	1,0	33 %	—	
96	concentrado	4-XII-1922	1,6	1,2	25 %	—	
100	" "	24-IV-1923	2,0	1,2	40 %	—	
113	" "	9-XI-1925	2,2	1,8	18 %	5.56	

QUADRO V

REDOSEAMENTO DE ANTIVENENOS OPHIDICOS ANTIGOS

Antiveneno polyvalente contra *Crotalus terrificus* — *Bothrops jararaca*, *B. atrox*, *B. jararacussu*, *B. alternata*, *B. neuwiedii*, *B. cotiara* e *B. itapetiningae* e cuja actividade antitoxica é expressa em relação aos venenos de *C. terrificus* *B. jararaca*.

Partida	Qualidade	Distribuição	Potencia em mgr. por cc.		Perda	pH actual
			primitiva	presente		
23	não concentrado	26-VIII-1907	0,3 × 0,6	0,15 × 0,9	50 × 33 %	7.72
41	" "	30-VI-1908	0,3 × 1,3	0,125 × 0,8	58 × 38%	—
75	" "	5-X-1910	0,3 × 1,2	5,15 × 1,1	50 × 8%	—
91	" "	7-X-1911	0,35 × 2,7	0,15 × 1,8	51 × 33%	8.02
108	" "	11-XII-1912	0,3 × 2,4	0,2 × 1,6	33 × 33%	8.10
117	" "	16-VIII-1913	0,5 × 2,0	0,25 × 1,3	50 × 35%	—
136	" "	18-IV-1914	0,4 × 1,8	0,22 × 0,9	45 × 50%	—
145	" "	13-III-1915	0,4 × 2,0	0,24 × 1,3	40 × 35%	—
165	" "	30-III-1916	0,3 × 1,4	0,09 × 0,5	70 × 64%	7.42
166	" "	31-III-1916	0,3 × 1,0	0,11 × 0,6	63 × 40%	8.13
169	" "	5-VI-1916	0,2 × 1,4	0,11 × 0,5	45 × 64%	—
187	" "	19-VII-1917	1,2 × 2,4	0,9 × 1,6	25 × 33%	—
197	" "	25-V-1918	0,4 × 1,4	> 0,2 × 0,8	< 50 × 43%	7.44
233	concentrado	6-VI-1922	0,4 × 1,1	> 0,2 × 0,8	< 50 × 27%	—

Conclusões — O redoseamento de antivenenos entregues ao consumo ha cerca de 6 a 25 anos, isto é, entre 1907 e 1925, revelou que:

a) em relação ao antiveneno crotalico,

- 1.º a perda do poder antivenenoso attingiu ou foi inferior a 50 % em 12 das 16 partidas examinadas (75 %), tendo oscillado entre 56 a 60 % nas 4 restantes;
- 2.º a inactivação parece não estar ligada directamente ao tempo de envelhecimento, pois ocorre desde os primeiros annos, parecendo estacionar logo depois;
- 3.º a concentração não exerce influencia apreciavel sobre a duração da actividade.

b) em relação ao antiveneno bothropico,

- 1.º a perda do poder antivenenoso attingiu ou foi inferior a 33 % em 10 das 20 partidas examinadas (50 %), oscillando entre 36 e 50 % em 8 (40 %);
- 2.º a inactivação parece não estar ligada directamente ao tempo de envelhecimento, pois ocorre desde os primeiros annos, parecendo estacionar logo depois;
- 3.º a concentração não exerce influencia apreciavel sobre a duração da actividade.

c) em relação ao antiveneno ophidico,

- 1.º a perda do poder anticrotalico attingiu ou foi inferior a 50 % em 10 das partidas examinadas (72 %), tendo variado entre 51 e 70 % nas 4 restantes (28 %); a perda do poder antibothropico nas mesmas empolas oscillou entre 8 e 50 % em 12 partidas (85,6 %), havendo sido de 64 % nas 2 restantes (14,4 %);
- 2.º o poder anticrotalico (anti-neurotoxico) soffre relativamente com maior frequencia a inactivação do que o antibothropico (anti-cytolytico);
- 3.º a inactivação parece não estar ligada directamente ao tempo de envelhecimento, pois ocorre desde os primeiros annos, parecendo estacionar logo depois.

CONCLUSÕES FINAES

1. O precipitado que se forma no seio das antitoxinas e antivenenos e constituido por pseudo-globulina, parece não exercer influencia alguma, ou pelo menos apreciavel, sobre a actividade dos mesmos.

2. A refinação dos plasmas por precipitação fraccionadas das globulinas e a concentração de iões hydrogenio representada pelo pH encontrado no conteúdo das empolas tambem não parecem influenciar a inactivação, mesmo depois de um longo periodo de envelhecimento dos productos.

3. O envelhecimento não é causa apparente da inactivação, a qual ocorre nos primeiros tempos, parecendo depois ficar estacionaria.

4. Essa inactivação apenas attinge, mesmo dentro de 25 annos, 50 % do valor primitivo, chegando raramente a 60 % (muito excepcionalmente, a 70 %), não havendo, portanto, razão absoluta para devolução das empolas por parte dos consumidores aos laboratorios productores que, em via de regra, ao indicarem a actividade de seus productos, deixam uma razoavel margem para garantia de seu emprego por longo tempo.

ABSTRACT

In the retitration of many samples of antitoxins and antivenins that had aged for a period sometimes as long as 25 years under ordinary conditions, without special preservation precautions, in the consumers' hands, many interesting facts have been disclosed. These may be briefly summarized as follows:

1. The precipitate formed with the aging of antitoxins and antivenins and represented by pseudoglobulin seems not to exert any marked influence upon their activity.

2. Neither the method of refination or concentration by fractionated precipitation of globulins as employed at the Instituto Butantan in its routine work since 1917, nor their final hydrogen ion concentration (pH) seems to contribute towards their inactivation even after a long aging as proved by the retesting of samples of batches concentrated as early as 1916 at the Instituto Butantan.

3. Aging itself probably is not the cause of their inactivation as this occurs during the years following their distribution, becoming more or less stabilized afterwards. Their inactivation at first may reach 50 % of their primitive titer of which the loss seldom represents 60 % (exceptionally 70 %) even after 25 years of aging.

5. Therefore, there is no definite reason for aged antitoxins and antivenins to be entirely discarded from consumption in as much as virtually all producing laboratories leave a margin of safety in the titer borne on the label of the ampules of each batch they prepare.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Miller, E. C. L.* — On the keeping qualities of antidiphtheritic serum — *Centralbl. f. Bakt. Orig.* XXXVIII:233.1905.
2. *Kinyoun, J. J. & Hitchens, A. P.* — On the deterioration of diphtheria antitoxin — *Centralbl. f. Bakt. Ref.* XL:1.1907.
3. *Anderson, J. F.* — The influence of age and temperature on the potency of diphtheria antitoxin — *Bull. Hyg. Lab. U. S. Public Health and Marine Hosp. Service* (66): 9-26.1910.
4. *MacConkey, A.* — On the loss in potency of diphtheria antitoxin when kept at 36°C — *J. of Hygiene* XII:511.1912.
5. *MacConkey, A.* — Note on the keeping qualities of therapeutic serum — *Brit. Med. Journal* I:10.1917.
6. *Brazil, Vital* — Duração da actividade antitoxica dos soros — *Ann. 1.º Congr. Med. Paulista* II:215-225.1917; *Collect. Trab. Inst. Butantan* I:229-309.(1901-1917).1917.

7. *Calmette, A.* — Les venins, les animaux venimeux et la serotherapie antivenimeuse: 260.1907 (ed. Masson et Cie.).
8. *Houssay, B. A. & Negrette, J.* — Duración de la actividad del suero anti-ofidico — *Rev. Assoc. Med. Argentina* XXXIV(204):7.1921; *C. R. Soc. Biol.* LXXXV: 1002.1921.
9. *Phisalix, M.* — Animaux venimeux et venins II:768.1922 (ed. Masson et Cie.).
10. *Anderson, L. A. P. & Caius, J. F.* — The effect of storage on the potency of antivenomous serum — *Indian J. Med. Res.* XIII.113-119.1925.
11. *Pawlowsky, E. N.* — Gifttiere und ihre Giftigkeit :314.1927 (ed. G. Fischer).
12. *Maitra, G. C. & Ahuja, M. L.* — Potency of time expired antivenomous serum stocked under ordinary conditions of storage at the Central Research Institute, Kasauli — *Indian J. Med. Res.* XIX:155.1931.
13. *Penteado, D. C.* — Contribuição á soroterapia anti-diphtherica. — *Ann. VIII° Congr. Brasil. Med.* I:474(1918).1925.
14. *Calmette, A. & Massol, L.* — Les precipitines du serum antivenimeux, vis-à-vis du venin de cobra — *Ann. Inst. Pasteur* XXIII:155.1909.
15. *Lamb, G.* — *Scient. Mem. Off. Med. & Sanit. Depts. Govmt. India (N. S.)*.16.1905.
16. *Calmette, A.* — op. cit. — *Ann. Inst. Pasteur* XXIII:258.1909.
17. *Brazil, V.* — Dosagem do valor antitoxico dos soros anti-peçonhentos — *Rev. Med. S. Paulo* X(22).1907; *Serumtherapia anti-ophidica*. loc. cit. XII(15).1909 (*Collectanea Inst. Butantan* I:121-123 et 197-229. 1901-1917); *A defesa contra o ophidismo* :103.1911 (ed. Poci & Weiss, S. Paulo); *La défense contre l'ophidisme* 245-246.1914 (ed. Poci & Weiss, S. Paulo).
18. *Anderson, L. A. P.* — On the standardization of Russell's viper antivenin — *Indian J. Med. Res.* XX(1):4.1932.
19. *Maitra G. C. & Mallick, S. M. K.* — Observations on detoxication of Daboia antivenin — *Indian J. Med. Res.* XX(1):332.1932.
- 20, 21. *Acton, H. W. & Knowles, R.* — *Indian J. Med. Res.* I(2):326-335.1913 et III(2): 275-361.1915.
22. *Githens, T. S. & Butz, L. W.* — Venoms of North American snakes and their relationship — *J. Immunology* XVI(1):71-80.1929; *Bull. Antivenin Inst. America* II(4):100-104.1929.

(Trabalho das Secções de Ophiologia e Immunologia do Instituto Butantan, apresentado como nota previa á Semana de Laboratorio. Soc. Med. e Cir. São Paulo, janeiro de 1932).