

TECNICA DO PREPARO DA TOXINA E ANTITOXINA DIFTERICA NO INSTITUTO BUTANTAN

POR

JANDYRA PLANET DO AMARAL

As grandes dificuldades que encontramos ao iniciar a preparação da antitoxina difterica, dificuldades estas que deverão surgir a cada tecnico que principia o preparo da toxina homologa em grande escala, nos levam à publicação deste trabalho onde procuramos coordenar algumas observações de nossa experiencia.

Todos os pesquisadores que procuraram aperfeiçoar a fabricação do soro anti-difeterico concordam que o elemento primordial para a fabricação deste, é um antígeno de alto valor. Assim Glenny, Ramon, Schmidt e muitos outros afirmam em experiencias comprovadas que um bom soro depende de um bom antígeno, Schmidt demonstrou, em 1931, que uma toxina com menos de 8 u. f. não deve ser usada para imunização. É bem verdade que o conceito estabelecido por Ramon, que certas substancias inespecificas adicionadas ao antígeno melhoram de algum modo a produção de anticorpos, tem grande valor na fabricação de soros; mas ficará sempre num plano secundario, pois não suprirá nunca o valor de um bom antígeno.

Baseados nestes conhecimentos é que o problema da fabricação de uma toxina difterica potente apresenta-se logo ao tecnico que tem necessidade de preparar um soro terapeutico.

Meio de cultura — Si examinarmos a literatura sobre a toxina difterica podemos notar que a quantidade de trabalhos com receitas e detalhes sobre o seu preparo é bem grande, em relação á apparencia simples do assunto. Do simples caldo Martin até os meios mais complicados, ha um numero enorme de formulas sendo interessante notar que em geral a receita dada por um experimentador, outro a reproduz com um pequeno detalhe de alteração que em suas mãos dá melhor resultado. Desta maneira nos parece que, diferenças de condições locais e da materia prima fizeram do preparo da toxina difterica um problema a ser resolvido de maneira propria em cada país, em cada região, em cada laboratorio. Sor-delli, em 1935, chama com insistencia a atenção sobre esse ponto que tambem jul-

gamos de suma importancia, pois varias formulas foram por nós experimentadas com resultados sempre pouco satisfatórios. Hoje que conseguimos regular uma serie de detalhes circunstancias, obtemos resultados em um meio muito simples e de facil preparo.

A um quilo de carne de vitela, desembaraçada de gorduras e nervos e passada por maquina, são adicionados 2 litros d'agua distilada. Deixa-se a 37° durante mais ou menos 15 horas. Dá-se uma fervura de 5 minutos, passa-se num pano e filtra-se em papel de filtro. Adiciona-se 3% de peptona Witt farmaceutica e 0.5 de cloreto de sodio; dissolvem-se estes ingredientes, alcaliniza-se a 7,7 — 7,8 com soda normal, leva-se ao autoclave a 120 por 20 minutos. Filtra-se a quente em papel fino e distribui-se em balões de maneira que a camada liquida tenha mais ou menos 1,5 cc. de altura. (300 ccs. em balões de Fernbach com capacidade de 2 litros). Esteriliza-se a 110° por 30 minutos. A este caldo é adicionado na ocasião do repique acetato de sodio na proporção de 5 gs. por 1.000 e glicose na razão de 2 gs. por 1.000. O acetato e a glicose funcionando com substancias economizadoras do consumo proteico têm papel preponderante na elevação da D.M.L. da toxina.

Reação do meio de cultura. — Devemos lembrar que o pH usado por nós está entre 7,5 e 7,8; num caldo mais acido ou mais alcalino não logramos obter toxinas razoaveis.

Amostra usada — sua conservação. — A amostra usada é a Park 8. Esta, além de cultivada em meio de Loeffler para a conservação da cultura, é transplantada cada 2 ou 3 dias em tubos contendo o proprio caldo preparado para o fabrico da toxina. Desta maneira procura-se conservar a toxigenicidade da amostra pela sua maior adaptação ao meio. Destes tubos será a cultura transplantada para um balão intermediario que apresenta formação intensa de pele já em 48 horas; deste balão é feito o transplante ultimo, sendo suficiente para mais ou menos 25 outros. Estes ao fim de 48 horas apresentam uma pele espessa, sendo a massa do caldo transparente.

Si por um lado é razoavel que a adaptação da amostra ao meio de cultivo aumenta sua toxigenicidade, por outro sabemos que uma cultura em transplantes sucessivos e frequentes dissocia, quasi sempre com perda de suas propriedades de virulencia e toxigenicidade. Foi o que verificámos no decorrer do nosso serviço de rotina; com um numero excessivo de passagens perde-se a toxigenicidade da amostra, o que se exterioriza no caldo por uma formação de peles finas e quebradiças.

Felippe M. quando propõe a conservação das culturas do Park 8 sob oleo de vaselina lembra tambem êsse detalhe. Vejamos estes 4 exemplos com passagens diferentes do Park 8 experimentadas em condições perfeitamente identicas:

| | |
|--|--|
| Park 8 — 7 passagens . D.M.L. = 1/700 | Park 8 — 10 passagens . D.M.L. = 1/700 |
| Park 8 — 8 m e s e s em passagens D.M.L. = 1/300 | Park 8 — 7 m e s e s em passagens D.M.L. = 1/500 |
| Park 8 — 20 passagens . D.M.L. = 1/500 | Park 8 — 30 passagens . D.M.L. = 1/1000 |
| | Park 8 — 70 " . D.M.L. = 1/200 |
| | Park 8 — 90 " . D.M.L. = 1/200 |
| Park 8 — 8 m e s e s em passagens D.M.L. = 1/400 | Park 8 — 1 ano em passagens D.M.L. = 1/100 |

Vemos que a D.M.L. da cultura muito antiga em passagens, é sempre maior que a das culturas mais recentes.

Os olhos de um tecnico acostumado, raramente se enganam com o aspecto de uma cultura que irá dar uma toxina forte; o crescimento luxuriante das peles que se formam à superficie do caldo e caem depois para se depositarem em camadas no fundo do balão, dando aparecimento a novas peles, a tonalidade escura que toma o caldo, são indicios quasi seguros de caldos muito toxicos.

Um serviço de soroterapia desde que se tenha em mãos toxinas de titulos altos torna-se grandemente facilitado, conhecimento teorico que podemos comprovar si relacionarmos o serviço de imunização destes 3 ultimos anos com a produção de toxinas neste mesmo espaço de tempo.

QUADRO 1

Quantidade de toxina difterica produzida em relação à D. M. L. nestes tres ultimos anos

| 1936 | | 1937 | | 1938 | |
|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|--------------|
| D.M.L. | Quantidade | D.M.L. | Quantidade | D.M.L. | Quantidade |
| 1/100 | 23.000 ccs. | 1/100 | — | 1/100 | — |
| 1/200 | 54.000 ccs. | 1/200 | — | 1/200 | — |
| 1/300 | 22.000 ccs. | 1/300 | — | 1/300 | — |
| 1/400 | 5.000 ccs. | 1/400 | 6.000 ccs. | 1/400 | — |
| 1/500 | 1.500 ccs. | 1/500 | 11.000 ccs. | 1/500 | 24.000 ccs. |
| 1/600 | — | 1/600 | 36.000 ccs. | 1/600 | 33.000 ccs. |
| 1/700 | — | 1/700 | 82.000 ccs. | 1/700 | 97.000 ccs. |
| 1/800 | — | 1/800 | 34.000 ccs. | 1/800 | 22.000 ccs. |
| 1/900 | — | 1/900 | — | 1/900 | 6.000 ccs. |
| 1/1.000 | — | 1/1.000 | 51.000 ccs. | 1/1.000 | 141.000 ccs. |
| 1/1.200 | — | 1/1.200 | — | 1/1.200 | 9.500 ccs. |
| Titulo medio — 1/200 | | Titulo medio — 1/750 | | Titulo medio — 1/820 | |

QUADRO 2

Relação entre os mais altos titulos antitoxicos alcançados pelos animais nos ultimos 3 anos

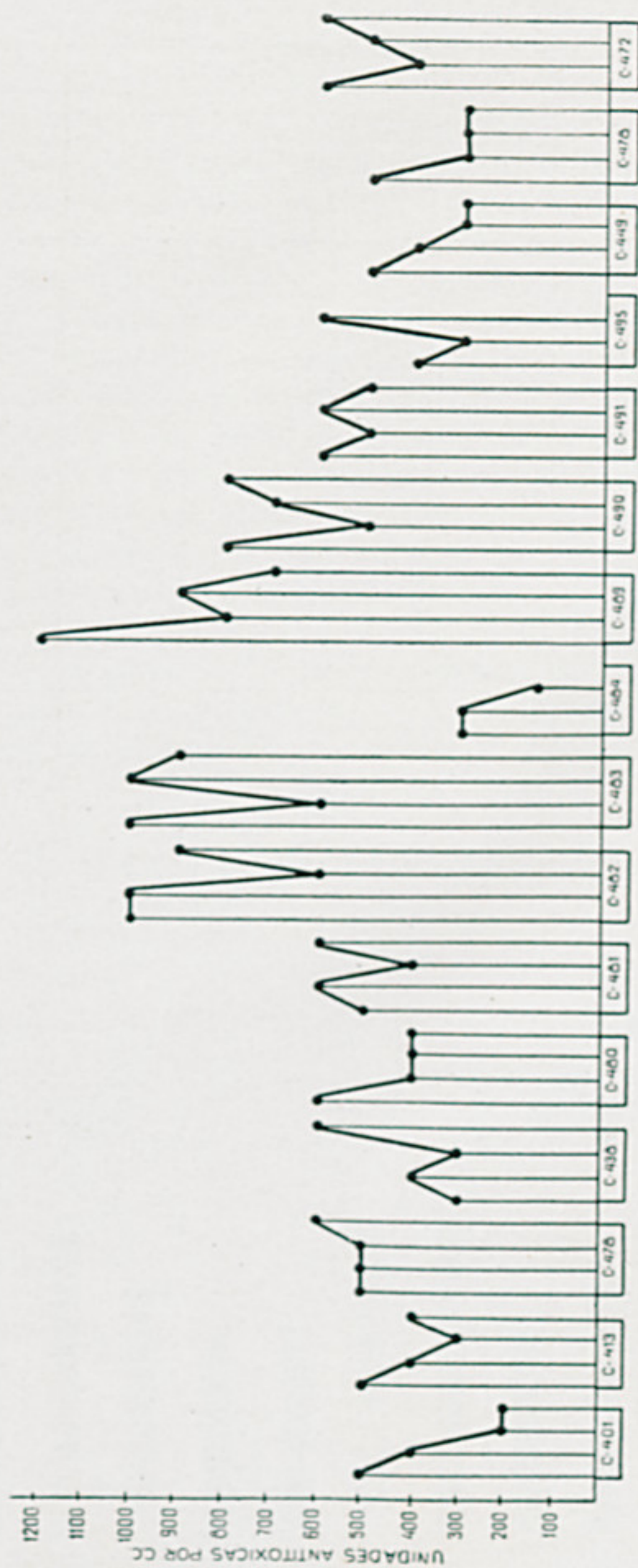
| 1936 | | | 1937 | | | 1938 | | |
|------------------------------|-----------------------|-------------|------------------------------|-----------------------|-------------|------------------------------|-----------------------|-------------|
| Unidades antitoxicas por cc. | Quantidade de cavalos | Porcentagem | Unidades antitoxicas por cc. | Quantidade de cavalos | Porcentagem | Unidades antitoxicas por cc. | Quantidade de cavalos | Porcentagem |
| 200 | 12 | 30 | >300 | 24 | 25 | >300 | 5 | 12,8 |
| <200 | 28 | 70 | 300 | 29 | 30,8 | 300 | 5 | 12,8 |
| <500 | | | 400 | 17 | 18 | 400 | 5 | 12,8 |
| — | — | — | 500 | 9 | 9,5 | 500 | 4 | 10,2 |
| — | — | — | 600 | 5 | 5,3 | 600 | 5 | 12,8 |
| — | — | — | 700 | 5 | 5,3 | 700 | 2 | 5,1 |
| — | — | — | 800 | — | — | 800 | 2 | 5,1 |
| — | — | — | 900 | 4 | 4,2 | 900 | 2 | 5,1 |
| — | — | — | 1.000 | 1 | 1 | 1.000 | 6 | 15,3 |
| — | — | — | 1.200 | — | — | 1.200 | 1 | 2,5 |
| — | — | — | 1.500 | — | — | 1.500 | 1 | 2,5 |
| — | — | — | 2.000 | — | — | 2.000 | — | — |
| — | — | — | 2.500 | — | — | 2.500 | 1 | 2,5 |
| TOTAL — 40 animais | | | TOTAL — 94 animais | | | TOTAL — 39 animais | | |

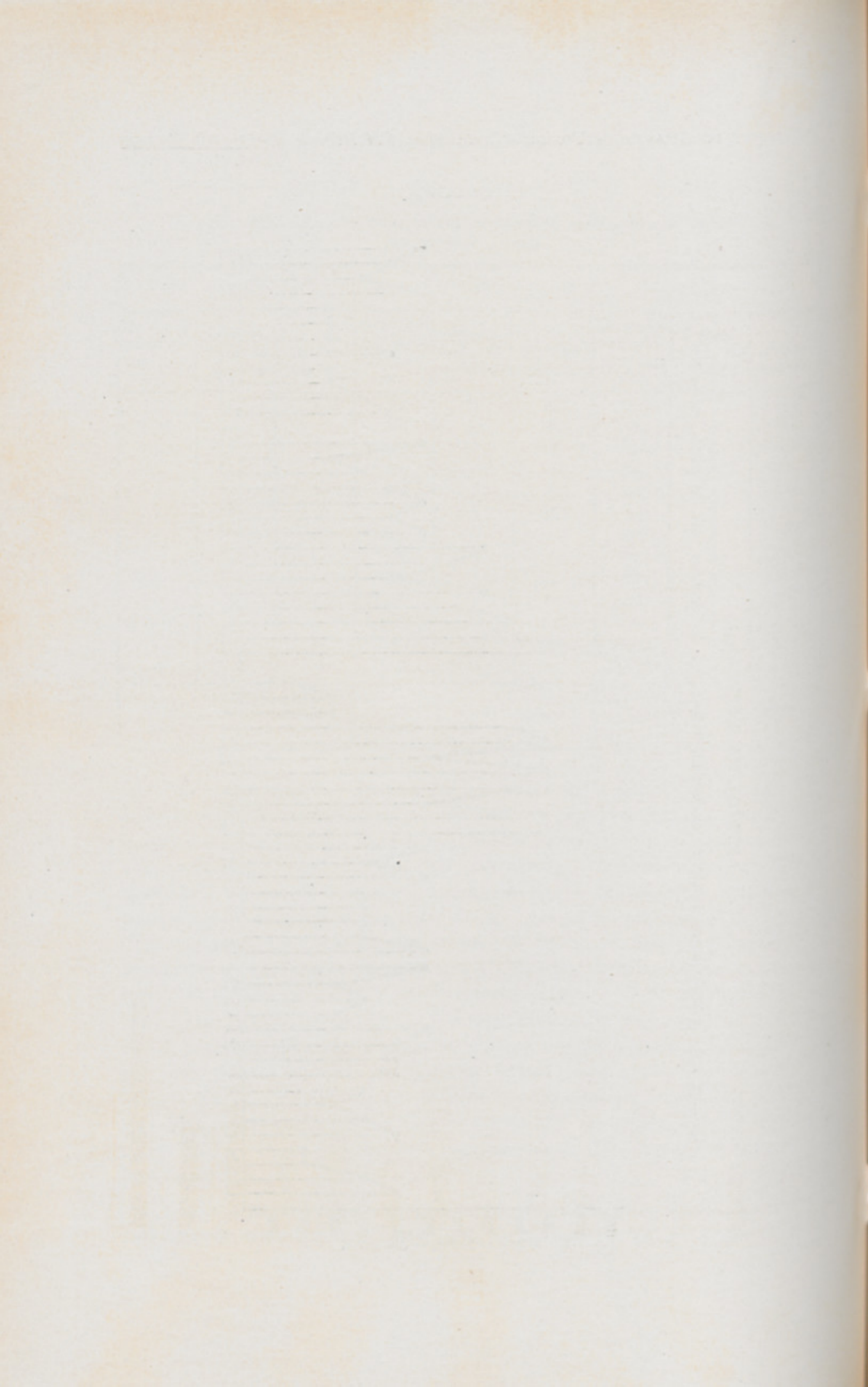
Pela comparação dos Quadros 1 e 2 notamos que a uma D. M. L. mais alta estão relacionadas as melhores porcentagens de titulos antitoxicos dos animais imunizados. Em 1936 quando a D.M.L. média foi 1/200 não conseguimos titulos antitoxicos de 500u. por cc. Em 1937, com toxina já melhorada, mas em menor quantidade que em 1938, temos porcentagens intermediarias, mais altas que no primeiro ano e mais baixas que neste ultimo. Em 1938, com uma D.M.L. media de 820 u. temos um titulo antitoxico medio de 720 u., e ainda porcentagem bem regular para titulos mais altos como seja 15,3% para 1.000 unidades. A porcentagem de animais com titulos inaproveitaveis (menos que 300 unidades) baixa bastante em 1938, sendo de 12,8%. É sabido que o animal para apresentar um teor alto de antitoxina difterica, deve possuir uma certa imunidade natural; deste modo por mais potente que seja um antígeno haverá sempre uma porcentagem de animais que não produzem titulos antitoxicos aproveitaveis. Savino em bem organizadas estatisticas, estabelece uma media de 31% de animais maus produtores de antitoxina. Desta maneira nossa porcentagem de 2,8%, em 1938, nos parece bem razoavel.

Com relação ao processo de imunização empregámos um metodo ha muitos anos adotado neste Instituto (Metodo de Dean) que nos parece excelente, pois

ANTITOXINA DIFTERICA

Quadro 3 — Relação entre os titulos antitoxicos alcançados no decurso das diferentes sangrias





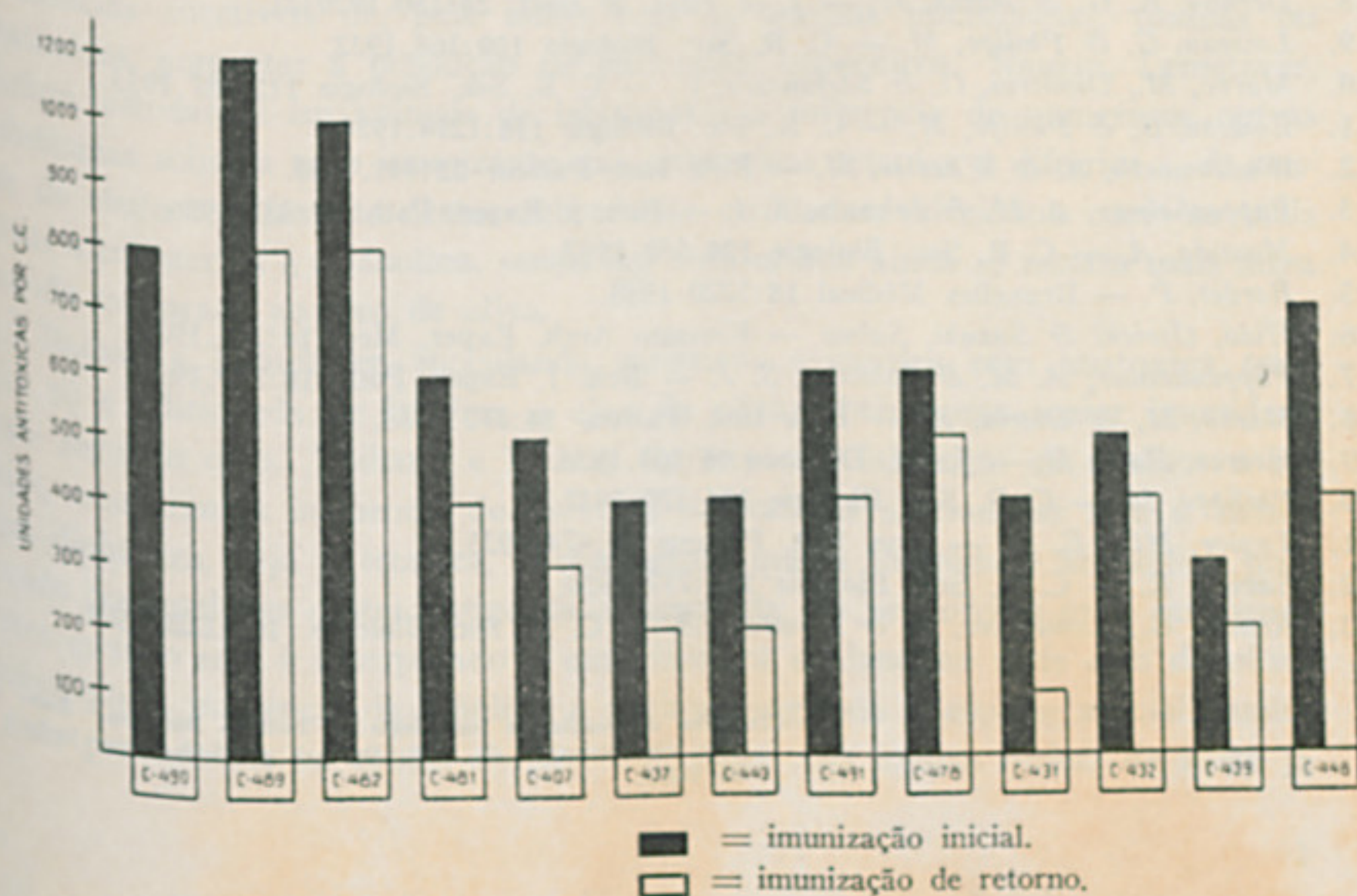
raramente temos deparado com animais, que tendo ingressado em serviço com idade suficiente e em boas condições de saúde, apresentem reações tão intensas que o impossibilitem de suportar o ritmo da imunização. Começando com quantidade infima de toxina (0,01cc.) o animal em doses crescentes deverá apresentar o titulo antitoxico maximo quando receber de 250 a 300 ccs.. Neste ponto será sangrado 3 a 4 vezes com intervalo de 15 dias entre duas sangrias. Frequentemente nas ultimas sangrias o titulo baixa, se bem que existam exceções para as quais não encontramos ainda nenhuma explicação. Pela esquematização abaixo dos diferentes titulos alcançados nas varias sangrias de 16 cavalos podemos verificar que para cada animal ha uma particular alternativa de titulos.

Como ponto geral, podemos no entanto concluir que, com exceção de 3 animais nos quais o titulo mais alto não se apresenta na primeira sangria, os restantes têm um titulo antitoxico medio reduzido em relação ao volume total do sangue. Em nosso serviço o animal depois de sangrado numa media de 15 litros de sangue entra em descanso, retornando a este após tres meses. Nas possibilidades apresentadas pelo Instituto, o animal de retorno ao serviço já não oferece os titulos alcançados na primeira imunização.

Sempre que é praticada uma segunda imunização, o titulo maximo alcançado é inferior ao primeiro o que se poderá verificar no esquema 4 que mostra a relação entre duas imunizações sucessivas em 13 diferentes animais. Não é raro ainda a morte do animal durante o periodo de descanso. A possibilidade do aproveitamento dos cavalos de titulos antitoxicos muito baixos será objeto de um trabalho especial.

QUADRO 4

Relação entre os ma's altos titulos alcançados pelos animais na imunização inicial e na de retorno



Considerando o valor de uma unidade antitoxica relacionada com preço da manutenção de um animal em descanso, nos parece que, se as possibilidades de aquisição de animais não fossem restritas, a sangria a branco dos animais imunizados seria preferivel no ponto de vista economico.

RESUMO

O A. refere e discute as condições de processo e obtenção de toxina e antitoxina difterica no Instituto Butantan.

ABSTRACT

The author reports and dicusses the condition of the process and obtaining of diphtheric toxin and antitoxin at the Instituto Butantan.

BIBLIOGRAFIA

1. *Glenny, A. T.* — *The Lancet* 221:402.1931.
2. *Ramon, G.* — *C. R. Soc. Biologie* 104:842.1930.
3. *Schmidt, S.* — *C. R. Soc. Biologie* 106:308.1931.
4. *Sordelli, A.* — *Rev. Inst. Bact. Bs. Aires* 6:687.1935.
5. *Abt, G. & Loiseau, G.* — *Ann. Inst. Pasteur* 36:535.1922.
6. *Hartley, P. & Hartley, O. M.* — *J. of Path. & Bact.* 25:458.1921/22.
7. *Hartley, P.* — *J. of Path. & Bact.* 25:479.1921/22.
8. *Dernby, K. G. & David, H.* — *J. of Path. & Bact.* 24:150.1920/21.
9. *Loiseau, G. & Philipe, M.* — *C. R. Soc. Biologie* 109:168.1932.
10. *Marbe, M., Dimitriu, O. & Stefanescu, V.* — *C. R. Soc. Biologie* 113:487.1933.
11. *Loiseau, G. & Philipe, M.* — *C. R. Soc. Biologie* 116:1214.1934.
12. *Wadsworth, A. & Wheeler, M.* — *Bull. Inst. Pasteur* 23:441.1935.
13. *Pappenheimer, A. M. & Johnson, S. J.* — *Brit. J. Exper. Path.* 17:335.1936.
14. *Mustafa, A.* — *C. R. Soc. Biologie* 126:558.1937.
15. *Bordet, P.* — *Bruxelles Médical* 18:1220.1938.
16. *Hida, Otoichi & Suzuki, Sabuo* — *Kitasato Arch. Exper. Med.* 14:263.1937.
17. *Pappenheimer, A. M. & Johnson, S. J.* — *Brit. J. Exper. Path.* 18:239.1937.
18. *Marbé, M. & Olariu, A.* — *Bull. Inst. Pasteur* 34:273.1936.
19. *Heeren, Ralph H.* — *J. Inf. Diseases* 46:161.1936.
20. *Philippe, M.* — *C. R. Soc. Biologie* 126:170.1937.
21. *Taylor, Mlle. E. M.* — *Ann. Inst. Pasteur* 55:474.1935.
22. *Savino, E.* — *C. R. Soc. Biologie* 105:717.1930.
23. *Ramon, G.; Lemetayer, E. & Hamedy, A.* — *C. R. Soc. Biologie* 106:1228.1931.

(Trabalho da Secção de Imunologia do Instituto Butantan. Recebido em novembro de 1938. Dado à publicidade em Junho de 1939).