

J. B. ARANTES, G. KARmann & OTTO G. BIER  
**EMPRÉGO DA REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO ESPECÍFICA NA DOSAGEM DO ANTIVENENO CROTÁLICO**

POR

J. B. ARANTES, G. KARmann &amp; OTTO G. BIER

*(Do Laboratório de Imunologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

Poucos e contraditórios são os trabalhos que se referem à possibilidade de medir o valor antitóxico dos antivenenos ofídicos tomando como índice a precipitação que eles produzem quando misturados ao veneno homólogo.

LAMB, em 1904, foi o primeiro a se ocupar do assunto e, trabalhando com o sistema veneno-antiveneno *cobra*, chegou à conclusão de que se obtém precipitação com os soros preparados em coelho, mas não com os anti-soros de cavalo.

Em 1909, CALMETTE & MASSOL (1) verificam, todavia, também com o antiveneno *cobra*, uma correlação bastante aproximada entre a formação de precipitado e o valor neutralizante (em camundongos) de soros preparados em cavalo, chegando à conclusão de que, ao contrário do que afirmava LAMB, podia o antiveneno *cobra* ser dosado *in vitro* com razoável aproximação.

VITAL BRAZIL (2) manifesta-se discretamente sobre o assunto e, embora assinala que a turvação observada nas misturas de antiveneno (crotálico e botrópico) e veneno homólogo só se desenvolve numa zona estreita vizinha do ponto de neutralização (comprovado mediante injeção venosa no pombo), conclui que a concordância não é perfeita e que, por isso, a verificação de precipitininas não pode ser utilizada para a dosagem exata dos soros antiofídicos. Do mesmo modo, HOUSSAY & NEGRETE (3), afirmam não haver relação entre o poder precipitante e o poder neutralizante trabalhando com sôro antiofídico polivalente (*anti-C. terrificus - B. alternata - B. neuwiedii*) e veneno de *B. alternata*.

Mais recentemente (1935), MALLICK (4), com o sistema sôro anti-*cobra-V.-russellii* mais veneno de *cobra*, chega também à conclusão de que a floculação, segundo RAMON, não pode ser usada para a aferição do antiveneno, embora não seja aparente, dos protocolos de suas experiências, porque se manifesta tão pessimisticamente acerca daquela possibilidade.

A mesma conclusão chegam GHOSH & KUNDA, em 1940 (5), havendo, porém, estes autores, encontrado valores bastante próximos nas titulações feitas *in vivo* (no pombo) e *in vitro* (floculação) do antiveneno *Vipera russellii*.

Nos últimos quatro anos, no Instituto Butantan, um de nós (J.B.A.), vem acumulando dados comparativos das dosagens *in vivo* (por injeção venosa no pombo, segundo VITAL BRAZIL) e *in vitro* (misturas de 1 cm<sup>3</sup> de sôro com quantidades variáveis de veneno) de numerosos antivenenos ofídicos preparados em cavalo, tendo chegado à definida impressão de que a precipitação específica pode servir de guia seguro na aferição do sôro contra o veneno da cascavel neotrópica (*Crotalus terrificus terrificus*), embora não o seja no caso do antiveneno botrópico.

No presente trabalho tais resultados são consubstanciados, estabelecendo-se com maior precisão as condições técnicas favoráveis à evidenciação do ótimo de precipitação, quer usando-se o método dito α (DEAN & WEBB), no qual diferentes quantidades de antígeno são adicionadas a uma dose fixa de anticorpo, quer o método inverso (β), segundo RAMON, tal como se usa para a dosagem *in vitro* da antitoxina diftérica e outras.

#### MATERIAL E MÉTODOS

*Antivenenos* — Foram usados soros crotálicos monovalentes ou soros antiofídicos mistos (crotálico-botrópico), quer de sangria direta, quer purificados e concentrados.

*Solução de veneno* — As soluções de veneno foram preparadas a partir do veneno-padrão do Instituto (dessecado 5 dias a 37°C) e geralmente na concentração de 1 mg por ml. Como solvente (e também como diluente no preparo de soluções menos concentradas) usou-se soluto de cloreto de sódio a 0.85% tampônado com fosfatos a pH 7.4 e adicionado de mertiolato na proporção de 1:10 000.

Conservadas na geladeira a 4°C, tais soluções de veneno mantêm o seu título inalterável durante 15 dias, após o que começam a enfraquecer progressivamente.

*Técnica das reações de precipitação* — A precipitação das misturas veneno-antiveneno foi estudada quer variando o antígeno, segundo DEAN & WEBB (método α), quer variando o anticorpo (método β), de acordo com o método de RAMON.

Em ambos os casos foi o volume final completado a 3 ml com água fisiológica e os tubos imersos em banho-maria a 50°, até 1/3 da coluna líquida neles contida, de maneira a provocar a formação de correntes de convenção, que aceleram a formação de partículas e facilitam-lhes a visibilidade. O tempo total de observação foi de 4-5 horas. Reproduzimos abaixo o protocolo seguido na pesquisa do ótimo de floculação, segundo RAMON e que permite a titulação de soros capazes de neutralizar por ml desde 0.1 até 2.5 mg de veneno (tab. 1).

TABELA 1

*Protocolo de dosagem pelo método  $\beta$  (Ramon)*

	Sol. veneno 1 mg/ml	Sóro	NaCl 0.85%	Quantidade de veneno neutralizada por 1 ml de sóro
1	ml	ml	ml	mg
2	0.25	2.5	0.25	0.10
3	0.25	2.1	0.65	0.12
4	0.25	1.8	0.95	0.14
5	0.25	1.6	1.15	0.16
6	0.25	1.4	1.35	0.18
7	0.25	1.2	1.55	0.21
8	0.25	1.0	1.75	0.25
		0.9	1.85	0.27
1	0.25	0.8	1.95	0.31
2	0.25	0.7	2.05	0.35
4	0.25	0.6	2.15	0.41
3	0.25	0.5	2.25	0.50
5	0.25	0.45	2.30	0.55
6	0.25	0.40	2.35	0.62
7	0.25	0.35	2.40	0.71
8	0.25	0.30	2.45	0.83
1	0.25	0.26	2.49	0.92
2	0.25	0.23	2.52	1.09
3	0.25	0.20	2.55	1.25
4	0.25	0.17	2.58	1.47
5	0.25	0.15	2.60	1.66
6	0.25	0.13	2.62	1.92
7	0.25	0.11	2.64	2.27
8	0.25	0.10	2.65	2.50

*Técnica das dosagens in vivo* — Para as dosagens *in vivo* foi usado o método da injeção venosa em pombos de 300 g, segundo VITAL BRAZIL (2).

## RESULTADOS E COMENTÁRIOS

A fim de estabelecer a melhor técnica a seguir na determinação do ótimo de precipitação fizemos uma série de ensaios de tipo "checkerboard", usando um único sôro para determinar os ótimos  $\alpha$  e  $\beta$ .

Na tabela 2 (a,b) vêm expressos os resultados obtidos.

TABELA 2

a) Determinação do ótimo de precipitação pelo método de Dean &amp; Webb

Quantidade de veneno, mg.

Quantidades de sôro, ml	2.30	1.90	1.60	1.30	1.10	0.90	0.75	0.60	0.50	0.40	0.35	Ratio $\frac{G}{A}$
0.32							105	27	45	145	220	1.87
0.39						104	15	28	98	130		1.92
0.47				113	40	10	25	75	95	108	125	1.91
0.57			180	30	10	15	40					1.92
0.70		57	37	10	12	42	180					1.86
0.85	65	50	10	34	42	45	60					1.88
1.00		10	13	15	40	50	270					1.90

b) Determinação do ótimo de precipitação pelo método de Ramon

Quantidade de sôro, ml

Quantidades de veneno mg	2.30	1.90	1.00	0.85	0.70	0.57	0.47	0.39	0.32	0.27	0.22	0.19	0.16	Ratio $\frac{G}{A}$
0.35									280	120	65	50	70	1.84
0.40									200	68	50	100		1.81
0.50								130	45	40	140			1.85
0.60						232	115	42	28	50				1.87
0.75					137	55	25	20	246					1.92
0.90	260	240	140	102	38	16	14	42	120					1.91
1.10	90	45	15	10	8	30	135							1.92
1.30				135	10	95								1.86
1.60		250	180	10	60									1.88
1.90			22	38	135									1.90

Vê-se na tabela 2 que o antiveneno estudado se comporta como um sôro do tipo H no sentido de BOYD (6) e que os seus ótimos  $\alpha$  e  $\beta$  praticamente coincidem, as ratios G/A em ambos os casos variando apenas de 1.86 a 1.92 para o ótimo  $\alpha$  e de 1.81 a 1.92, no caso do ótimo  $\beta$ . Este resultado, aliás baseado em floulações feitas com um único antiveneno, está em oposição ao ponto de vista expandido recentemente (1944) por BOYD & TURNELL (7) de que os ótimos  $\alpha$  e  $\beta$  jamais podem coincidir.

Conhecido o fato que os ótimos  $\alpha$  e  $\beta$  frequentemente cãem na zona de equivalência, fizemos algumas verificações dos sobrenadantes correspondentes a tais precipitados e pudemos realmente comprovar, mediante injeção venosa em camundongos, a inexistência de veneno livre. Esta verificação é consubstanciada pela concordância entre as dosagens *in vivo* e *in vitro* de diferentes antivenenos crotálicos, tal como se pode ver na tabela 3.

TABELA 3

*Concordância entre as dosagens in vivo (pombo) e in vitro (floculação) de diferentes antivenenos crotálicos*

Antiveneno	Dosagem <i>in vivo</i> : quantidade de veneno neutralizada por 1 ml de antiveneno	Dosagem <i>in vitro</i> : quantidade de veneno que flocula ótimamente com 1 ml de antiveneno	Ratio $\frac{\text{in vivo}}{\text{in vitro}}$
C 30	mg 0.10	mg 0.92(*) 0.92 0.92 0.96 1.09	0.98 0.94 0.82
C 29	2.10	1.78(*) 1.64	1.2 1.3
C 178	0.50	0.50	1.0
C 193	0.30	0.27(*) 0.27	1.1
C 011	0.40	0.35	1.1
C 016	0.45	0.41	1.1
C 006	0.30	0.20	1.5
C 014	0.25	0.27	0.93
C 015	0.45	0.41	1.1
324	0.50	0.41	1.2
424 (**)	0.60	0.62	0.97

(\*) Dosagens repetidas com diferentes soluções de veneno.

(\*\*) Sóro antiofídico misto capaz de neutralizar por ml. 0.6 de veneno crotálico e 1.2 de veneno bovípico.

A relação  $\frac{\text{in vivo}}{\text{in vitro}}$  foi, na maioria das vezes, muito próximo de 1, só tendo havido um afastamento apreciável no caso dos soros C 29 e C 006. Tais desvios, que aliás são muito pequenos quando comparados, p. ex<sup>o</sup>, com os observados na dosagem do sôro antidiftérico, não invadem o valor da floculação na dosagem dos soros anti-ofídicos, uma vez que esta indica a dose justamente neutralizada

por um certo volume de sôro ( $L_0$ ), ao passo que a dosagem *in vivo* indica um valor frequentemente intermediário entre  $L_0$  e  $L+$  (daí ser a ratio  $\frac{\text{in vivo}}{\text{in vitro}}$  quase sempre superior a 1.0).

## CONCLUSÕES

1. A reação de floculação específica observada entre o veneno e o anti-veneno crotálico mostra ótimos  $\alpha$  e  $\beta$  praticamente coincidentes e que correspondem à zona de neutralização.

2. Comparando-se os resultados das dosagens *in vivo* (método de VITAL BRAZIL) e *in vitro* (floculação) de uma série de antivenenos crotálicos, obteve-se uma ratio  $\frac{\text{in vivo}}{\text{in vitro}}$  muito próxima de 1. Daí a conclusão de que a floculação específica poderá servir como um guia seguro na aferição do antiveneno crotálico.

## ABSTRACT

1. The optimal proportions ratios are very close for the system *Crotalus terrificus* venom-antivenin, when determined either by the alpha (DEAN & WEBB) or the beta methods (RAMON).

2. The comparative titration of a series of *Crotalus* antivenins, by using the flocculation and pigeon methods, showed a  $\frac{\text{in vivo}}{\text{in vitro}}$  ratio very near to 1.0.

3. The conclusion is drawn that the flocculation reaction is a reliable index for the titration of the neutralizing potency of *Crotalus* antivenins.

## BIBLIOGRAFIA

1. Calmette, A. & Massol, L. (1909). Les précipitines du sérum antivenimeux vis-à-vis du venin de cobra. *Ann. Inst. Pasteur*, 23, 115.
2. Vital Brazil (1914). La défense contre l'ophidisme. Pocai-Weiss & Cia., São Paulo, Cf. pág. 246.
3. Houssay, B. A. & Negrete, J. (1917). Propriedades precipitantes específicas de los sueros antiofídicos. *Rev. del Inst. Bacteriológico del Dep. Nac. de Higiene*, 1, 15-31.
4. Mallick, S. M. K. (1935). The applicability of flocculation tests for standardization of antivenene. *Indian J. Med. Res.*, 23, 525-529.
5. Ghosh, B. N. & Kundu, N. L. (1940). The reaction between *Vipera russellii* venom and its antivenene. *Ind. and J. Med. Res.*, 27, 1121-1127.
6. Boyd, W. C. (1943). Fundamentals of Immunology. Interscience Publ., Inc., New York, Cf. pág. 215-219.
7. Boyd, W. C. & Turnell, M. A. (1944). The essential difference between the two optimum proportions flocculation ratios. *J. exper. med.*, 80, 289-298.

(Recebido para publicação em maio de 1945).