

APERFEIÇOAMENTO DO PROCESSO DE HIPERIMUNIZAÇÃO ANTITETÂNICA VISANDO A OBTENÇÃO DE ANTITOXINA DE ALTA DOSAGEM

(Anotações de Relatórios de Serviço)

Sebastião de Camargo CALAZANS
Reynaldo S. FURLANETTO *

Serviço de Imunoterapia do Instituto Butantan (*)

Foi sempre grande o interesse dos pesquisadores que se dedicam ao preparo dos soros terapêuticos, a obtenção de produtos cada vez mais potentes.

Para esse fim, em numerosas publicações recentes, vem sendo feita a adição, aos antígenos, de substâncias não específicas e que se revelaram estimulantes ao aumento da produção dos anticorpos desejados.

A idéia já é antiga, porém com interpretação diferente, pois em 1889, Roux e Yersin (1), pouco tempo depois de terem descoberto a toxina diftérica observaram, em suas experiências, que o veneno elaborado pelo bacilo de Klebs-Löffler, que matava cobaias no período de 30 a 60 horas, tinha sua ação retardada quando tratado pelo cloreto de cálcio, o que levou os referidos autores a dizerem que "se a substância tóxica aderisse bastante ao corpo insolúvel, ela não se difundiria senão lentamente determinando, talvez a vacinação gradual do animal".

(*) EXPLICAÇÃO NECESSARIA

Este trabalho representa a análise das pesquisas realizadas durante os anos de 1942-1943 e 1944, no Serviço de preparo da antitoxina tetânica, e que fazem parte dos relatórios anuais, encaminhados à Diretoria do Instituto Butantan.

Não estando ainda completas nossas pesquisas, sua publicação deveria ser feita em 1945.

Acontece que, sendo um de nós, transferido para o Instituto "Adolfo Lutz", inesperadamente, e sem ao menos um simples aviso pessoal, a

* "In memoriam".

organização por nós planejada, de comum acordo com a Diretoria, então em exercício e as pesquisas em andamento, foram interrompidas.

Comemorando-se porém, no corrente ano, o octogésimo aniversário da criação do Instituto Butantan, resolvemos publicar estas anotações para que ficasse documentado nas Memórias do Instituto, o que foi conseguido naqueles três anos a respeito da produção da antitoxina tetânica.

Em 1916, Le Moignic e Pinoy (2) empregaram uma vacina antitífica constituída por germes mortos pelo calor, tendo como veículo a lanolina e o óleo de oliva. Visavam realizar a vacinação antitífica com uma dose única, reunindo em uma só, a totalidade dos germes empregados nas quatro injeções em uso.

O emprego, porém, de substâncias não específicas na rotina do preparo de soros terapêuticos só foi estabelecido depois das pesquisas memoráveis e fundamentais de G. Ramon e que revolucionaram por completo os antigos processos de hiperimunização dos equinos e a profilaxia da difteria e do tétano.

Este grande e persistente pesquisador, a quem tanto devem a ciência e a humanidade, assinalou, depois de uma série de observações, "o aumento, por vezes considerável, do teor de antitoxina no soro dos cavalos que apresentavam, acidentalmente, um abscesso no ponto de injeção da toxina diftérica, durante o processo de imunização".

Atribuindo à referida reação inflamatória, a melhora do título dos soros, que vinha preparando, resolveu adicionar aos antígenos, substâncias não específicas, mas capazes de produzirem, in loco, acentuada reação semelhante a obtida acidentalmente.

Fixou-se Ramon (3), no início, no emprego da tapioca pulverizada, cuja aplicação passou a ser adotada largamente, sendo logo seguida pelo uso de cloreto de cálcio e das vacinas associadas. Por outro lado, Glenny, Pope, Waddington e Wallace (4), adicionando alúmen de potássio às toxinas, notaram o aparecimento de um precipitado insolúvel que aumentava, também, grandemente o poder antigênico das mesmas.

Mais recentemente, Ramon, em estudos realizados com seus colaboradores Lemétayer e Richou (5), mostrou ser a lanolina de grande utilidade na imunização e, em novas pesquisas ainda com Lemétayer (6), expos os resultados da imunização de carneiros e cavalos com anatoxina tetânica misturada com a referida substância. Com o emprego da lanolina, os animais não só se imunizaram rapidamente, como forneceram soro de alta dosagem.

Para Weinberg e Guillaumie (7), que compartilham da opinião de Ramon, o aumento do poder imunizante dos antígenos é devido "à reabsorção lenta e contínua do antígeno em consequência do seu envolvimento pela lanolina, e à forte reação local e geral do organismo, fator comum a todos os processos de imunização, mas que se manifesta, em geral, de uma maneira mais violenta, quando se emprega o processo da lanolina".

Thibaut (8), em interessantes pesquisas, estudou as modificações histológicas determinadas pela inoculação subcutânea, em cobaias, de 4 misturas diferentes, a saber:

- 1.º) Caldo Simples
Solução Fisiológica
- 2.º) Anatoxina Tetânica
Solução Fisiológica
- 3.º) Solução Fisiológica
Lanolina
Óleo de Oliva
- 4.º) Anatoxina Tetânica
Lanolina
Óleo de Oliva

Suas conclusões baseadas no estudo histológico de cortes da zona inoculada foram as seguintes: a anatoxina injetada subcutaneamente em cobaias não determina reação histológica característica, pois a reação se assemelha à produzida pelo caldo simples que é banal, leve e efêmera, ao passo que as modificações produzidas pelas misturas oleosas são profundas, com grande proliferação do tecido conjuntivo, criando uma lesão durável.

Norman (9), em 1934, empreendeu uma série de experiências nas quais estudou a influência das emulsões finamente divididas de óleos e gorduras sobre as toxinas bacterianas. Empregou para isso substâncias de origem vegetal, animal e mineral, como o óleo de oliva, o creme de leite e a parafina, emulsionadas com goma acácia, estudando sua influência sobre a ação das toxinas produzidas pelos bacilos tetânico, diftérico, perfringente e *V. Séptico*.

Conclui o autor que as toxinas são adsorvidas pelas partículas oleosas e depois lentamente cedidas ao organismo e que quanto mais finas as emulsões, maior a proteção contra as doses letais das toxinas empregadas. A adição de substâncias que tornem as emulsões estáveis garante a proteção contra as toxinas, assinalando, por outro lado, que o creme de leite não tinha nenhuma ação protetora. Referiu-se ainda às experimentações que vinha fazendo a respeito da possibilidade de imunização de animais por esse processo.

Walsh e Frazer (10), independentemente do autor anterior, investigaram problemas semelhantes, inoculando em coelhos grandes doses de toxinas misturadas a emulsão de óleo de fígado de bacalhau e óleo de oliva, chegando às mesmas conclusões.

De tudo o que acima ficou exposto, devemos concluir com Ramon que é na intensa reação inflamatória local, na qual se observa o aparecimento de forte leucocitose, que deve residir a exaltação do poder imunizante dos antígenos, pelas substâncias não específicas.

Uma outra aquisição de grande valor, na produção de antitoxina tetânica, com títulos elevados foi, sem dúvida, a recomendação de Glenny, Pope, Waddington e Wallace (11) de se deixar um intervalo de 30 dias entre a primeira injeção do antígeno tetânico e do início da imunização.

Algum tempo mais tarde, Ramon e Lemétayer (12) observaram que os cavalos vacinados com duas doses de vacina antitetânica, dois anos antes, produziam antitoxina tetânica de títulos muito mais elevados.

No Instituto Butantan, tanto no preparo de soros antipeçonhentos, como no serviço de preparo do soro antidiftérico, e dos soros antianaeróbios, todas estas substâncias têm sido empregadas e com grande sucesso, tendo tais métodos sido iniciados em São Paulo, pelos saudosos amigos e colegas Lemos Monteiro e Flávio Fonseca (13).

Em 1932, Flávio Fonseca (14), então responsável pelo preparo da antitoxina tetânica, adotou a vacinação antitetânica, sistematicamente, nos animais do Instituto.

Esta prática, além de proteger os eqüinos contra o tétano, faz com que eles reajam, com muito maior intensidade, ao estímulo imunizante dos antígenos tetânicos ao serem submetidos ao processo de hiperimunização.

PREPARO DA TOXINA E DA ANATOXINA TETÂNICAS

O meio empregado para a obtenção da toxina tetânica é o que já, há muito tempo, vem sendo empregado neste Serviço, isto é, o meio de Tarozzi, constituído por caldo de coração de boi, glicosado a 1%.

Após uma série de experiências, resolvemos reduzir o pH inicial deste meio de 7,8 para 5,5, de conformidade com as pesquisas de A. Berthelot, G. Ramon e Mlle. Amoureux, julgado melhor para a produção uniforme, de uma boa toxina tetânica.

As experiências deste Serviço, neste particular, vêm sendo realizadas desde 1940, sendo tal prática empregada rotineiramente.

Outra modificação, não menos importante, foi a referente ao tempo de incubação, que era de 15 dias. Esse período hoje está reduzido, praticamente à metade, pois as filtrações são feitas no fim de 8 a 9 dias de estufa. Findo o prazo de produção da toxina, é a mesma clarificada, por meio de filtração, através de polpa de papel de filtro, colocada em funis de Büchner e em seguida filtrada em placas Zeitz E. K., e, finalmente, determinada a D.M.M., em cobaias de 350 g. Provas de pureza das culturas antes da clarificação, e da esterilidade da toxina filtrada, são feitas em todas as partidas.

Quebrando-se com certa freqüência os funis de Büchner, feitos de porcelana, esta Seção tratou de substituí-los por outros semelhantes, mas de metal, com resultados perfeitamente iguais.

Quanto ao título da toxina utilizada a D.M.M. foi de 0,0002 para cobaias de 350 g pela via subcutânea.

A anatoxina é preparada de acordo com a técnica já conhecida. Uma vez terminado o processo de desintoxicação, é feita a prova de inocuidade e verificado o poder antigênico da mesma.

As provas de inocuidade e do poder antigênico da anatoxina são feitas em duas cobaias.

As cobaias recebem, uma 5 c.c. e outra 10 c.c., pela via subcutânea. Um mês após a injeção da anatoxina, essas cobaias são inoculadas com 50 e 100 D.M.L. da toxina tetânica, respectivamente, e devem sobreviver, sem sintomas, em ambas as provas.

O título da antitoxina tetânica é determinado pelo processo de Rosenau e Anderson e expresso em unidades americanas — U.A. Uma U.A. corresponde a duas unidades internacionais — U.I.

O processo de imunização empregado para a obtenção da antitoxina tetânica consta de 3 fases, a saber:

- 1.^a Vacinação — (sensibilização dos animais)
- 2.^a Imunização de base
- 3.^a Hiperimunização

VACINAÇÃO

Todo animal que entra para o Instituto recebe duas doses de 25 e 50 c.c. da anatoxina tetânica, adicionada de 0,5% de alúmen de potássio, com 15 dias de intervalo, após o que é distribuído aos vários Serviços de imunização.

Transcorrido, no mínimo, um mês de intervalo após a vacinação, os cavalos encaminhados ao Serviço de produção de antitoxina tetânica serão submetidos a uma das seguintes variantes:

1.^a MODALIDADE-IMUNIZAÇÃO DE BASE

Consta de 4 injeções de anatoxina adicionada de alúmen de potássio, na proporção de 0,5% até o total de 650 cm³, de 5 em 5 dias, sendo a primeira injeção de 50 cm³ e a última de 300 cm³; dosando mais de 5 U.A. por cm³, 8 dias após a última injeção, descanso de 20 dias, quando, então, se inicia a fase de hiperimunização.

HIPERIMUNIZAÇÃO

Nesta fase os animais recebem um total de 750 cm³ de toxina, com 0,5% de alúmen de potássio (menos na última), em injeções feitas cada 5 dias; dosando mais de 300 U.A. por cm³, serão submetidos às sangrias definitivas.

Quantidade de antígenos empregada:

— Anatoxina	650 c.c.
— Toxina	750 c.c.
Total	1.400 c.c.

Dias decorridos até a primeira sangria definitiva: 70

2.^a MODALIDADE

É igual à primeira, com um intervalo de oito dias entre a imunização de base e a hiperimunização.

Dias decorridos até a primeira sangria definitiva: 48

Títulos antitóxicos alcançados em alguns cavalos, nos anos de 1942, 1943 e 1944

NÚMERO DOS CAVALOS	ANOS	DOSAGEM
509	1942	2.500 U.A.
523	"	2.500 U.A.
592	"	2.500 U.A.
594	"	2.500 U.A.
500	"	3.000 U.A.
513	"	3.000 U.A.
521	"	3.000 U.A.
	1943	
521	16/4	4.000 U.A.
521	24/4	3.500 U.A.
507	24/4	4.000 U.A.
531	4/6	4.000 U.A.
554	4/6	4.000 U.A.
E-545	19/7	5.000 U.A.
E-545	13/7	6.500 U.A.
E-545	31/7	7.000 U.A.
E-545	10/8	5.250 U.A.

Em 1943, os títulos antitóxicos, obtidos no Serviço de hiperimunização antitetânica, ultrapassaram nossa expectativa, deixando mesmo em segundo plano os excelentes resultados obtidos em 1942; supomos haver conseguido o maior título antitóxico até hoje registrado na imunização contra o tétano, pois, em toda a literatura consultada não foi encontrado título de dosagem da antitoxina igual ao produzido pela égua n.º 545, de procedência nacional, que revelou conter de 3.000 a 7.000 U.A. por cm³, como se vê abaixo:

E. 545 do Serviço de Soro Antitetânico (duas imunizações em 1943)

1. ^a imunização	1. ^a sangria = 4.000 U.A.
	2. ^a sangria = 4.500 U.A.
	3. ^a sangria = 3.500 U.A.
	4. ^a sangria = 6.000 U.A.
2. ^a imunização	1. ^a sangria = 6.500 U.A.
	2. ^a sangria = 5.000 U.A.
	3. ^a sangria = 7.000 U.A.
	4. ^a sangria = 5.500 U.A.

A obtenção pela primeira vez de antitoxina com o título de 7.000 U.A. por c.c., constitui fato marcante na história da produção da antitoxina tetânica no Instituto Butantan.

Em 1944, foram também alcançados títulos altos como se vê na relação abaixo:

NÚMERO DOS CAVALOS	ANOS	DOSAGEM
	1944	
500	25/4	7.000 U.A.
544	25/4	7.000 U.A.
541	27/4	4.500 U.A.
510	27/4	4.500 U.A.
530	27/4	5.000 U.A.
563	27/4	5.000 U.A.
594	8/5	4.000 U.A.
563	8/5	4.000 U.A.
500	8/5	5.000 U.A.

Pelo que pudemos apurar, o maior título antitóxico referido na literatura é o citado por G. Ramon e Lemétayer (15) que relatam ter obtido em um grupo de 15 cavalos, previamente vacinados contra o tétano, o título máximo de 10.000 U.I. que correspondem a 5.000 U.A., em dois animais, conforme se vê a seguir:

"N.º des Chevaux	Titres des sérums	N.º des Chevaux	Titres des sérums
1	6.000 unités (0)	9	1.800 unités
2	1.200	10	2.800
3	3.000	11	6.000
4	1.500	12	3.000
5	10.000	13	6.000
6	2.600	14	10.000
7	6.000	15	6.000"
8	6.500		

(0) Unités internationales.

Citando ainda outros pesquisadores, dizem os mesmos autores por nós referidos:

"La valeur antitoxique moyenna des sérums antitoxiques préparés par S. Schmidt atteint, em 1927-1928 près de 1.000 unités (internationales) et la valeur la plus élevés que ai été obtenue: 4.400 unités chez un Cheval. Condrea, en utilisant diverses techniques, préparé des sérums dont le titre antitoxique moyen est de 600 unités et cela après un temps d'hyperimmunsation beaucoup plus long et des quantités d'antigène plus considerables. Glenny, dans un article tout récent, dit avoir atteint

la moyenne de 1.600 unités (800 unités U.S.). La mise em parallèle de tous ces chiffres et resultats avec ceux fournis plus haut à propos de l'hyperimmunisation de nos quinze Chevaux donne la mesure des progrès réalisés à tous points de vue, grâce aux méthodes que l'un de nous a établies ou perfectionnées durant ces six dernières années et que nous avons associées dans l'essai rapporté. Aux avantages qui s'attachant à la mise en oeuvre de ces méthodes et aux résultats acquis: économie de temps et d'antigène, production d'antitoxine considérablement accrue, s'en ajoutent d'autres, nom moins importants qui ont trait à l'utilisation des sérums antitetaniques ainsi obtenus en thérapeutique. Par exemple, ces sérums dont la haute teneur en antitoxine spécifique peut être encore augmentée par la concentrations et la purification donnent de grandes facilités pour le traitement du tétanos déclaré, ils permettent, em effect, de réduire considérablement le volume du liquide spécifique à injectar".

Do exposto conclui-se que Ramon e Lemétayer obtiveram em 15 cavalos uma média de 2.423 U.A., sendo a dosagem máxima de 5.000 U.A., em dois cavalos. S. Schmidt obteve 2.200 U.A., em um único cavalo; Condréa, depois de um longo período de imunização, consegue uma média de 300 U.A.; Glenny, por sua vez, obteve uma dosagem média de 800 U.A.

Em nosso Serviço de rotina este ano, computando-se indistintamente todos os animais, bons e maus produtores submetidos à imunização, tivemos as seguintes dosagens:

1. ^a imunização — 40 cavalos —	dosagem máxima — 6.000 U.A.
	dosagem média — 1.544 U.A.
2. ^a imunização — 15 cavalos —	dosagem máxima — 7.000 U.A.
	dosagem média — 1.886 U.A.

Quadro demonstrativo das dosagens obtidas pelos autores citados e no serviço de antitoxina tetânica no Instituto Butantan

	ANOS	DOSAGEM MÁXIMA	DOSAGEM MÉDIA
SCHMIDT	1928	2.200 U.A.	500 U.A.
CONDRÉA			300 U.A.
GLENNY			800 U.A.
RAMON e LEMÉTAYER	1931	5.000 U.A.	2.423 U.A.
LEMONS MONTEIRO e FLÁVIO FONSECA	1931	1.600 U.A.	
FLÁVIO FONSECA	1932	1.600 U.A.	
CALAZANS e FURLANETTO	1942	3.000 U.A.	
CALAZANS e FURLANETTO	1943	7.000 U.A.	1.715 U.A.
CALAZANS e FURLANETTO	1944	7.000 U.A.	1.888 U.A.

Vê-se que este serviço não só conseguiu bater o recorde mundial no que diz respeito à dosagem máxima, mas ainda obteve uma média geral de dosagem, num serviço de rotina, que se pode classificar de excelente.

Acreditamos que estes títulos excepcionais corram por conta do tipo de imunização, por nós adotado, além de outros fatores mencionados, como a seleção de animais bons produtores e ao alto poder imunizante dos antígenos empregado.

Do relatório anual de 1943 do Diretor do Instituto Butantan, Flávio Fonseca (16), destacamos os seguintes tópicos:

“Resultados de grande significação prática no preparo de antitoxina tetânica foram obtidos pelos Drs. Calazans e Furlanetto, os quais registraram em diferentes cavalos, títulos antitóxicos excepcionais de 3.500, 4.000, 4.500 e 5.000 unidades americanas por cm³, havendo mesmo um equino (a égua n.º 545, de procedência nacional), no qual se encontrou um título de 4.000-6.000 U.A., em diferentes sangrias da 1.^a imunização e de 5.000-7.000 U.A., em várias sangrias de 2.^a imunização.

Tais títulos de 6.000-7.000 U.A., como foram obtidos no animal acima referido, parecem constituir um recorde, pois RAMON e LEMÉTAYR, de grande experiência no assunto, se referem ao título máximo de 5.000 U.A., obtido em dois, de um lote de quinze equinos”.

CONCLUSÕES

1. Foram apresentados títulos de antitoxina tetânica produzida durante os anos de 1942, 1943 e 1944.

2. Em toda literatura consultada não foi encontrada antitoxina tetânica com título igual ao obtido nos equinos números 545, 500 e 544.

3. Por meio da refinação e concentração, essas antitoxinas poderão ter seu título ainda mais elevado, o que representará, sem dúvida, grande vantagem para o tratamento do tétano.

4. Foi ressaltada a importância da seleção de animais bons produtores na obtenção de antitoxina tetânica de altos títulos. Esses animais devem ser conservados no serviço, enquanto se acharem em boas condições.

5. Foram introduzidas modificações no processo de produção da toxina tetânica.

6. Os bons resultados obtidos podem ser atribuídos também ao alto poder imunizante dos antígenos empregados.

AGRADECIMENTOS

Não podemos terminar este trabalho sem prestar um sentido culto de saudade ao nosso amigo e companheiro de trabalho REYNALDO FURLANETTO, inteligência brilhante e dotado de notáveis qualidades de pesquisador, tão prematuramente desaparecido.

Aos queridos auxiliares JOÃO FERNANDES e ANTENOR MARCONDES, nosso preito de grande saudade.

A nossa prezada e inteligente colaboradora EMMA DE LIMA, inexcusável no cumprimento do dever, o nosso muito obrigado.

CONCLUSIONS

1. Titles of tetanic antitoxin produced during the years of 1942, 1943 and 1944 have been presented.
2. It has not been found, in all literature consulted, tetanic antitoxin with titles similar to the ones obtained in the horses number 545, 500 and 544.
3. By means of refinement and concentration these antitoxines may have titles yet higher than the ones here obtained what will be of great advantage in the treatment of tetanus.
4. The importance of a selection of good animal producers in the obtainance of tetanic antitoxin of high titles has been emphasized. Those animals should be left in condition of subsequent immunization while they are sound.
5. Modifications in the process of tetanic toxin have been introduced.
6. The good results that have been obtained may be due to the high immunization power of the antigenic employed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROUX, E. & YERSIN, A. I. Pasteur, 1889.
2. Le MOIGNIC & PINOY *C.R. Soc. Biol.*, 29:201 e 352, 1916.
3. RAMON, G. *C.R. Soc. Biol.*, 93:506, 1925.
4. GLENNY, A.T.; POPE, C.G.; WADDINGTON, H. & WALLACE, U. *J. Path. Bact.*, 29:38, 1926.
5. RAMON, G.; LEMÉTAYER, E. & RICHOU, R. *C.R. Soc. Biol.*, 115, 1934; *Rev. Immunol. (Paris)*, 1:199, 1935.
6. RAMON, G. & LEMÉTAYER, E. *C.R. Soc. Biol.*, 119:248, 1935.
7. WEINBERG, M. & GUILLAUMIE, M. *C.R. Soc. Biol.*, 119:719, 1935.
8. THIBAUT, P. *Rev. Immunol. (Paris)*, 2:508, 1936.
9. NORMAN MYERS, G. *J. Hyg.*, 34:250, 1934.
10. WALSH, V.G. & FRAZER, S.C. *Brit. Med. J.*, 1:557, 1934.
11. GLENNY, A.T.; POPE, C.G.; WADDINGTON, H. & WALLACE, U. *J. Path. Bact.*, 28:463, 1925.
12. RAMON, G. & LEMÉTAYER, E. *C.R. Soc. Biol.*, 106(1):21, 1931.
13. LEMOS MONTEIRO, J. & FONSECA, F. *Mem. Inst. Butantan*, 6:267, 1931.
14. FONSECA, F. *Mem. Inst. Butantan*, 7:303, 1932.
15. RAMON, G. & LEMÉTAYER, E. *C.R. Soc. Biol.*, 106(1):23, 1931.
16. FONSECA, F. Relatório Anual do Diretor do Instituto Butantan, 1943.