

INVESTIGAÇÕES SÔBRE O CONTEÚDO DE ANTITOXINA DO SÔRO ANTIGANGRENOSO

ARIOSTO BÜLLER SOUTO

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

R. SCHWINDT FURLANETTO

Assistente do Instituto Butantã.

Em estreita correlação com o Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e o Serviço de Fiscalização do Exercício Profissional de São Paulo, foram realizadas pelo Instituto Butantã e pelo Instituto Adolfo Lutz, investigações sôbre o conteúdo de antitoxinas dos vários soros antigangrenosos, encontrados à venda no mercado brasileiro.

Em outros países tem sido realizados inquéritos semelhantes ao que acabamos de realizar.

Assim Henry verificou o poder antitóxico dos soros antigangrenosos empregados na guerra de 1914 a 1918. Os soros alemães foram pela primeira vez dosados pelos Aliados em outubro de 1917. Havia grande expectativa pois haviam sido preparados com um bacilo novo ainda não conhecido dos Aliados. Porém os resultados foram desapontadores. Henry⁷ escreveu "It is now certain that Conradi and Bieling, Aschoff were dealing with mixed cultures in the belief that they were pure, and that these mixed clearly defined in the literature published by Allied investigators." A quantidade de Welchii era apenas 1/5 a 1/10 da quantidade necessária para obter a completa neutralização de uma dose letal de cultura pura. Os soros de Hoechst e de Gauss eram muito fracos, e o sôro do Instituto Bhering eram um pouco mais forte, continha quantidade moderada de antitoxina V. septique, sendo pobre de antitoxina Welchii e destituído de antitoxina oedematiens. Os soros ingleses eram bem mais fortes do que os soros alemães, porém o que melhor dosou foi o sôro preparado por Weimberg, no Instituto Pasteur de Paris.

Prigge¹³ por ordem do Ministerio da Guerra do Reich, realizou extensas investigações sôbre o efeito do sôro antigangrenoso e o seu conteúdo em antitoxinas. Examinou também outros soros

expostos á venda no comércio e aplicados na terapêutica e na profilaxia da gangrena humana e da peritonite.

Prigge verificou que vários dos soros examinados não continham antitoxina alguma, nem contra a toxina no principal agente causador da gangrena gasosa, o *Cl. welchii*. Tais verificações vieram demonstrar porque não havia sido possível formar uma opinião realmente positiva sôbre o valor terapêutico do sôro anti-gangrenoso.

As falhas no preparo e na dosificação dos soros antigangrenosos não decorrem da ausência de padrões para a sua aferição, pois, conforme se pode lêr no trabalho que um de nós publicou com Rivarola¹⁶ desde 1930, a Comissão Permanente de Padronização Biológica da Organização de Higiene da Liga das Nações, tendo em conta as recomendações da Conferência sôbre Padronização de Francfort (1928), resolvera estabelecer e recomendar um padrão e uma unidade internacional para o sôro antiwelchii.

Posteriormente foram estabelecidos os padrões e as unidades para o sôro antivibrião séptico (1935), para o sôro antinovyi (1935) e para o sôro antihistolítico (1936).

Os processos estabelecidos pela Liga das Nações foram adotados oficialmente por quase todos os países, porém as dificuldades técnicas que essas dosagens acarretam constituem até o presente um obstáculo a sua introdução na prática rotineira dos laboratórios produtores.

As consultas que recebemos sôbre os processos de dosagem e a interpretação dos resultados obtidos na avaliação do poder anti-tóxico dos soros antigangrenosos, teem evidenciado o desconhecimento das técnicas oficialmente recomendadas, o que já levou um de nós a publicar com Rodrigues¹⁵, uma nota a êsse respeito.

Constituem motivo de falhas no preparo e na dosagem das toxinas: o emprêgo de meios de cultivo inadequados, como por exemplo, os meios ricos de glicose para a obtenção das toxinas do *Cl. welchii* e do *Cl. novyi*; o uso de amostras não toxígenas; o tempo de crescimento demasiado curto ou muito prolongado, a filtração inadequada das toxinas; a conservação em temperatura não favoravel; a estocagem em vidros claros; a falta de proteção contra a oxidação; o emprêgo de líquidos de diluição com pH não acertado; o borbulhamento de ar no momento da diluição, p. ex., da toxina tetânica. A demora em inocular as misturas diluidas e não conservadas ao abrigo da luz; o uso de animais híbridos ou sem ter o peso padrão p. ex. no caso do tétano; o mau ambiente

de conservação dos animais de prova, não aquecidos a 35°C, p. ex., para os camundongos, são outras tantas causas de êrro nas dosagens das toxinas. O emprêgo de soluto fisiológico feito com cloreto de sódio impuro ou não fundido prèviamente; a falta de pipetas certificadas; o uso de padrões mal conservados; o fenômeno de Danicz pela falha na perfeita mistura toxina-antitoxina; a deficiência no tempo de contato para neutralização toxina-antitoxina; a desinfecção da pele pela tintura de iôdo, antes das inoculações dos solutos em prova p. ex., no tétano; o refluxo do líquido, ou a penetração de mínimas quantidades da mistura no interior da aponevrose retardando a absorção e modificando inteiramente os resultados p. ex., no sôro antinovyi, o uso de séries pequenas de animais, ou de animais muito híbridos, são também falhas que, em geral, não sendo evitadas, ocasionam erros nas dosagens dos soros antianaeróbios.

O emprêgo de toxinas não equivalentes acarretam resultados duvidosos nas dosagens, não dando títulos reais e sim títulos aparentes. Na dosagem do sôro antiwelchii, o teor muito elevado de toxina "alfa" em relação ao teor da toxina "beta", causa dificuldade nas dosagens dos soros antigangrenosos. Em seus trabalhos Stewart e Clampit (ref. Bengtson³) Weimberg e Guillaumie²⁰ Ypsen, Llewellyn-Smith e Sordelli²¹ passaram em revista varias das causas que podem influir na dosagem dos soros antiperfringes.

O processo rotineiro, comumente usado na aferição dos titulos dos soros, é determinar qual a quantidade de sôro suficiente para proteger animais de prova contra intoxicação letal por uma dose de prova da toxina padrão (seja a *test-dose* no sôro antigangrenoso seja o *limite de morte* no sôro antitetânico).

Comparando-se a ação antitóxica exercida pelo sôro em prova com a ação antitóxica exercida por um sôro padrão relativamente a uma dose fixa de toxina prèviamente padronizada, obtêm-se o título do sôro em prova.

Devido ao poder de reação dos vários animais de prova, empregados nas dosagens, ser individualmente muito diverso, necessário se tornaria empregar séries grandes de animais para poder afastar os resultados que não pudessem ser estatisticamente aceitáveis. A regularidade nos resultados seria estabelecida pelo aumento proporcional da porcentagem de animais mortos com diluição proporcionalmente maior do sôro desde que nas dosagens dos soros antigangrenosos se observa a lei das proporções múltiplas.

A sensibilidade do animal empregado como reativo, conforme um de nós já demonstrou com Von Ubish¹⁷ guarda íntima dependência com os característicos raciais, com as condições climáticas, com as condições alimentares, com a idade e com o peso.

Esta interdependência torna fácil compreender porque só com o emprêgo de séries grandes de animais será possível afastar os erros nos resultados. É difícil porém, dentro das finalidades práticas, nos exames habituais de rotina, empregar séries muito grandes de animais. O essencial é verificar si o efeito protetor do sôro em prova, é ou não é comparável ao efeito protetor do sôro padrão mesmo com séries menores de animais, obedecendo o que se estabeleceu como princípio geral da padronização biológica. A análise dos resultados obtidos permite comparar si o sôro em prova protegeu um número maior ou menor de animais em relação ao número de animais protegidos pelo soro padrão. Tal comparação é impossível quando todos os animais usados como testemunhas e que receberam doses de prova da toxina padrão e do sôro padrão morrem ou sobrevivem. Para que isto não ocorra necessário se torna usar várias séries de testemunhas, essas séries de testemunhas são sempre inoculadas com quantidades de toxina superiores e inferiores a dose test ou ao limite de morte empregado nas dosagens. Assim é possível obter resultados comparáveis e estatisticamente aceitáveis e que se aproximando tanto quanto possível da realidade, podem fornecer informações sôbre o valor terapêutico do sôro antigangrenoso.

As técnicas empregadas em nossas investigações foram as recomendadas pela "*Comissão Permanente de Padronização Biológica da Liga das Nações*".

Durante o período da guerra de 1939/1945, a Organização de Higiene da Liga das Nações solicitou ao "*Medical Research Council*" que se encarregasse do fornecimento dos padrões internacionais enquanto o "*Staten Serum Institut*" de Copenhague, não pudesse vir a fazê-lo novamente.

As verificações de Hartley e Evans⁷ demonstraram que as antitoxinas padrões inglesas poderiam ser enviadas aos Institutos produtores de soros por Hampstead, e que essas antitoxinas padrões de Hampstead poderiam ser usadas exatamente como as recebidas anteriormente de Copenhague e o valor em unidades internacionais poderia ser mantido. Colocando à disposição dos interessados, durante a guerra, os soros padrões antigangrenosos, Hartley

e Evans, escreviam que os padrões britânicos não deveriam substituir os padrões internacionais correspondentes de Copenhague. Ficariam na posição dos padrões ingleses antidiftéricos e antitetânicos de antes da guerra, cujas unidades sempre haviam sido tituladas em relação aos padrões internacionais de Copenhague.

Como as antitoxinas podem apresentar propriedades anormais Hartley e Evans envidaram esforços afim de que os padrões ingleses não fossem diferentes dos padrões de Copenhague. Com a terminação da guerra os padrões internacionais de Copenhague foram retomados sem maiores complicações.

A determinação do novo padrão inglês em relação ao padrão internacional correspondente não opresentou dificuldade. Êsses padrões apresentam tôdas as características e tôdas as propriedades dos padrões internacionais de Copenhague. Foi assim mantida a unidade internacional tal como é aceita e definida. Os novos padrões ingleses, rigorosamente preparados em relação ao padrão internacional correspondente, permitiram obter uma exatidão que não ultrapassa os limites dos erros de titulação.

Segundo Hartley e Evans: "Nous pouvons donc en conclure que la valeur de l'unité internationale a dans chaque cas été maintenue".

Durante a guerra os padrões gangrenosos puderam ser fornecidos também pelo "National Institute of Health" de Washington. Terminada a guerra esses padrões estão sendo novamente fornecidos por Copenhague.

Foi graças aos padrões gangrenosos ingleses e americanos que durante todo o período de guerra puderam ser mantidas as unidades internacionais e respeitado o principio internacional da padronização biológica, sendo mantidas as definições sôbre as varias unidades:

a) para o *Clostridium Welchii*, unidade antitóxica, é a atividade antitóxica exercida por 0.322 mg da antitoxina sêca e estável, conservada no "National Institute of Health" de Washington;

b) para o *Clostridium septicum*, unidade antitóxica, é a atividade antitóxica exercida por 0.2377 mg da antitoxina sêca e estável conservada no "Institute Pasteur" de Paris;

c- para o *Clostridium Novyi*, unidade antitóxica, é a atividade exercida por 0.2681 mg da antitoxina sêca e estável conservada no "Statens Serum Institute" de Copenhague;

d) para o *Clostridium histolyticum*, unidade antitóxica é a atividade antitóxica exercida por 0.3575 mg da antitoxina sêca e estável conservada no "Statens Serum Institute" de Copenhague.

As quantidades especificadas nas definições acima representam também a *unidade de antitoxina*.

As preparações sêcas e estáveis ou padrões (standards) a que nos referimos são conservadas nos Institutos Oficiais de Contrôlo; êsses Institutos enviam periôdicamente quantidades rigorosamente pesadas, dissolvidas em mistura de duas partes de glicerina, duplamente destilada, e uma parte de salina a 0.85% sob a forma de "*solutos padrões*".

De acôrdo ainda com as especificações da Comissão de Padronização Biológica consideramos como *test dose*:

I — do *Clostridium welchii* (*perfringens*) — a quantidade de toxina *Welchii* que, misturada a 1/5 de unidade antitóxica internacional de antitóxina padrão antiwelchii, provoca a morte de alguns, porém não de todos os camondongos, de 17 a 20 g inoculados por *via venosa*.

A *test dose* francesa segundo Weinberg e Guillaumie (1936), de toxina *Welchii* é a quantidade de toxina *Welchii* que, misturada a uma unidade antitóxica de antitoxina padrão antiwelchii (de fabricação francesa), provoca a morte da metade dos camondongos inoculados.

Essas duas definições diferem do que se entende por unidade de toxina que é a quantidade correspondente a 20 D. M. L. de uma dada toxina *Welchii*. Se o título antitóxico de um sôro antiwelchii for determinado com o auxílio da unidade de antitoxina, êste título é geralmente, inferior ao que se obtém quando se utiliza a *test dose* (Lt) de toxina, pois a *test dose* (Lt) de toxina tem, em geral, um valor inferior a 20 D. M. L.

Não é pois aconselhável adotar a unidade de toxina como base para determinação porque a mesma também está baseada na definição da D. M. L. e, a definição da D. M. L. é motivo de controvérsia. Com efeito a maioria dos autôres admite como D. M. L. a quantidade de toxina que mata cêrca de 50% dos camondongos inoculados com o pêsso variante entre 17 e 20 g, outros, porém, como Benzoni (1938), consideram a D. M. L. como a menor quantidade de toxina que mata 100% dos camondongos de 17 g de pêsso: assim estas divergências são suscetíveis de ocasionar diferenças muito acentuadas nos resultados finais.

II — do *Clostridium septicum* (*oedematis-maligni*) — a quantidade de toxina septicum que, misturada a uma unidade antitóxica internacional de antitóxina padrão anti-*Clostridium septicum*, provoca a morte de alguns, porém, de nem todos os camundongos, de 17 a 20 g, inoculados por via venosa.

III — do *Clostridium novyi* (*oedematiens*) — quantidade de de toxina Novyi que, misturada a dois contésimos de unidade antitóxica internacional de antitóxina padrão anti-*Clostridium novyi*, provoca a morte de alguns mas não de todos os camundongos de 17 a 20 g, inoculados por via muscular.

IV — do *Clostridium histolyticum* — a quantidade de toxina *histolyticum* que, misturada a uma unidade antitóxica internacional de antitóxina padrão, anti-*Clostridium histolyticum*, provoca a morte de alguns mas não de todos os camundongos de 17 a 20 g, inoculados por via venosa.

Pela própria natureza dessas definições, verifica-se a necessidade de serem empregadas séries grandes de animais reativos. A sensibilidade de animais à toxina gangrenosa varia, da mesma maneira que a sensibilidade dos animais reativos varia em relação à toxina tetânica, conforme um de nós teve ocasião de demonstrar em colaboração com Von Ubish (1939).

Estas variações devem ser tomadas em consideração ao organizar os coeficientes morte-sobrevida sendo necessário usar várias séries de testemunhas: séries inoculadas com quantidades de toxinas exatamente correspondentes à test-dose e ao soro padrão e séries com quantidades mínimas de toxina, superiores, e inferiores à test-dose empregada.

Baseados nas definições descritas acima os resultados por nós obtidos foram interpretados como se segue:

Antitoxina Welchii

(1 cm³ da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.)

Diluindo 1cm³ da antitóxina padrão em 19 cm³ de salina, obtemos uma solução em que 1cm³ continha uma unidade, donde 0.2cm³ continha 1/5 de unidade. Assim, 0.2 cm³ da diluição do soro a ser examinado, que protegeu aproximadamente 50% dos camundongos inoculados era equivalente a 0.2 de unidade do soro padrão, e 1cm³ era equivalente a 1 unidade. A diluição usada exprimia diretamente o resultado da dosagem.

Antitoxina septicum

(1 cm³ da antitoxina padrão internacional contém 50 U. I.)

Diluindo 1cm³ da antitoxina padrão em 9 cm³ de salina, obtivemos uma diluição em que 1cm³ continha 5 unidades, donde 0.2 cm³ continha uma unidade. Assim, 0.2 cm³ da diluição do sôro a ser examinado, que protegeu aproximadamente 50% dos camondongos inoculados, era equivalente a 5 unidades. Portanto, a diluição usada foi multiplicada por 5, afim de obtermos o resultado da dosagem.

Antitoxina histoliticum

(1 cm³ da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.)

Diluindo 1cm³ da antitoxina padrão em 3 cm³ de salina, obtivemos uma solução em que 1cm³ continha 5 unidades, donde 0,2 cm³ continha uma unidade. Assim, 0,2 cm³ da diluição do sôro a ser examinado que protegeu aproximadamente 50% dos camondongos inoculados, era equivalente a 5 unidades. Portanto, a diluição usada foi multiplicada por 5, afim de obtermos o resultado da dosagem.

Antitoxina Novyi

(1 cm³ da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.)

Diluindo 1cm³ da antitoxina padrão em 99 cm³ de salina, obtivemos uma solução em que 1cm³ continha 0.2 unidades. Assim 0.1cm³ da diluição do sôro a ser examinado, que protegeu aproximadamente 50% dos camondongos inoculados era equivalente a 0.02 unidade do sôro padrão; 1cm³ do sôro em prova equivalia a 0.2 unidade do sôro padrão e 5 cm³ equivaliam a uma unidade. Portanto, a diluição usada foi dividida por 5, afim de obtermos o resultado da dosagem.

TÉCNICA

Achamos útil redescrever as técnicas para o exame oficial dos soros antigangrenosos, já descritas em nosso trabalho com Rodrigues¹⁵.

PROCESSOS DE DOSAGEM

A — Sôro antiwelchii.

Para determinar a dose "test" foram preparadas as seguintes soluções:

1) 1cm³ da antitoxina padrão foi diluída em solução fisiológica de modo que 1 cm³ continha 1 unidade antitóxica.

2) Uma certa quantidade da toxina sêca foi rigorosamente pesada em um vidro de relógio sêco e tarado, e em seguida dissolvida em solução fisiológica.

3) As misturas de antitoxinas padrão e toxina diluída foram feitas de modo que 0.5 cm³ (quantidade a ser injetada em cada camondongo) continha: 0.2 cm³ de antitoxina diluída (1/5 da unidade), quantidade variável da diluição da toxina (variámos de 0.02 de cm³) e mais a quantidade de sôro fisiológico necessária para perfazer o volume constante de 0.5 cm³. As misturas conservadas à temperatura ambiente, durante 45 a 60 minutos foram injetadas na quantidade de 0.5 cm³ por via venosa em camondongos de 17 a 20 g.

Os animais foram observados durante 48 horas: a maioria morreu antes das primeiras 24 horas, e poucos, depois das 48 horas.

O protocolo abaixo dá exemplo de determinação da dose "test" de uma toxina Welchii sêca:

QUADRO I

<i>Toxina diluída</i>	<i>Antitoxina</i>	<i>N.º de camondongos usados</i>	<i>N.º de camondongos mortos</i>	<i>N.º de camondongos sobrev.</i>	<i>Proporção de camondongos sobreviventes</i>
0.16 cm ³	1/5 Unid.	12	0	12	12/12
0.18 cm ³	1/5 Unid.	12	0	12	12/12
0.20 cm ³	1/5 Unid.	12	6	6	6/12
0.22 cm ³	1/5 Unid.	12	12	0	0/12
0.24 cm ³	1/5 Unid.	12	12	0	0/12

Por simples regra de 3, verificamos qual a quantidade de toxina, em miligramas, contida nos 0.2 cm³ da solução de toxina. A "test" dose é representada por êsses miligramas contidos nos 0.2cm³ da diluição. O protocolo acima nos mostra que quando aumentamos a dose de 0.02 cm³ todos os camundongos morreram, e que quando diminuimos a dose de 0.02 cm³ todos os camundongos se restabeleceram apesar de terem mostrado sintomas mais ou menos graves. Determinada a "test" dose (p. ex. 0.00325 g) era feita a dosagem do sôro de valor desconhecido.

II — *Dosagem de sôro antiwelchii tipo A de valor desconhecido.*

Procedemos em duas fases: na primeira fase foi feita uma dosagem, de aproximação injetando-se uma série de misturas contendo cada uma em 0.5 cm³, a dose "test" de toxina mais quantidades variáveis e distantes entre si de antitoxina. Foram assim determinados os limites grosseiros da quantidade de antitoxina capaz de proteger o animal.

Na segunda fase as diluições foram de maneira a se aproximarem muito dos limites indicados pela experiência preliminar, sendo as misturas feitas de modo a conter nos 0.5 cm³, a dose "test" da toxina conhecida, mais as quantidades variáveis da antitoxina de valor ignorado.

Paralelamente foram observadas 3 (três) séries de testemunhas, misturando quantidades superiores iguais e inferiores a uma dose "test" e mais 1/5 de Unidade da antitoxina padrão.

Os animais inoculados foram conservados sob observação durante 48 horas. Os animais testemunhas fornecem a exata noção sôbre o comportamento da test dose da toxina durante a dosagem. A proporção de animais sobreviventes, portanto de animais protegidos, indica o valor da antitoxina desconhecida.

O exemplo abaixo permitê seguir a marcha da dosagem.

P. ex.: se a dosagem preliminar nos indicou que a antitoxina continha aproximadamente 400 unidades por cm³, na prova final inoculamos grupos de 12 camundongos com misturas contendo nos 0.5 cm³, quantidades de antitoxina muito aproximadas das 400 unidades, mais a dose "test" da toxina (por exemplo: 0.00325g).

Nas provas de contrôle usamos grupos de 12 camundongos testemunhas. Exemplo de resultado:

<i>Dose test de toxina</i>	<i>Antitoxina de valor desconhecido</i>	<i>Camundongos</i>
		<i>Proporção de sobreviventes</i>
0.00325 em 0.2cm ³	0.2 cm ³ de 1/360	12/12
	0.2 cm ³ de 1/380	4/12
	0.2 cm ³ de 1/400	0/12
	0.2 cm ³ de 1/420	0/12
	0.2 cm ³ de 1/440	0/12

TESTEMUNHA

<i>Dose test de toxina</i>	<i>Ant. padrão</i>	<i>Proporção com sobreviventes</i>
0.18 cm ³	1/5 Unid. em 0.2 cm ³	1/12
0.20 cm ³	1/5 Unid. em 0.2 cm ³	4/12
0.22 cm ³	1/5 Unid. em 0.2 cm ³	0/12

A antitoxina de valor desconhecido dosa portanto 380 Unidades por cm³; pois nessa diluição ela protegeu alguns camundongos, porém nem todos, contra uma dose test de toxina. A dose "test" de toxina unida a 1/5 de Unidade do sôro padrão, matou 60% dos camundongos inoculados, isto demonstra que o padrão funcionou perfeitamente.

B — Sôro anti-vibrião séptico (œdematis-maligni)

I — Determinação da "test dose".

Para determinar a dose "test" foram preparadas as seguintes soluções:

(1) 1cm³ da antitoxina padrão foi diluída em solução fisiológica de modo que 1cm³ continha 5 unidades antitóxicas.

(2) Uma certa quantidade da toxina sêca foi cuidadosamente pesada em um vidro sêco e tarado e em seguida dissolvida em solução fisiológica.

(3) As misturas de antitoxina e toxina diluídas foram feitas de modo que, 0.5cm^3 (quantidade a ser injetada em cada camundongo) continha 0.2cm^3 de antitoxina diluída (1 Unidade) mais uma quantidade variável da diluição da toxina (variámos em volume de 0.02cm^3) e mais a quantidade de soro fisiológico necessário para perfazer o volume constante de 0.5cm^3 . As misturas conservadas em temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos foram injetados, na quantidade de 0.5cm^3 , por via venosa em camundongos de 17 a 20 g.

Os animais foram observados durante 48 horas; a maioria morreu rapidamente antes das primeiras 24 horas.

NOTA: Quando descrevemos a técnica de dosagem para a antitoxina Welchii, paginas atrás, demos também o exemplo da determinação da dose "test" para a toxina Welchii secca; seguimos a mesma orientação para a determinação da dose "test" da toxina secca v. séptico.

II — *Dosagem de amostras de antitoxinas v. séptico de título desconhecido.*

Em presença de um soro antivibrião séptico de valor desconhecido procedemos em duas fases: na primeira, com o objetivo de orientar a dosagem, injetamos uma série de misturas contendo em 0.5cm^3 , a dose "test" de toxina padrão, mais quantidades variáveis e distantes entre si de antitoxina, sendo inoculados 4 camundongos com a mistura. Os limites extremos de antitoxina que protegeram completamente os camundongos contra a morte e a quantidade que não protegeu ficaram, assim, estabelecidos.

Na segunda fase, preparamos uma série de diluições, com os limites indicados pela experiência preliminar, sendo as misturas feitas de modo a serem contidas em 0.5cm^3 : a dose "test" da toxina mais quantidades variáveis de antitoxina em prova.

Para efeito de contróle da "test" dose da toxina, misturamos quantidades ligeiramente superiores e ligeiramente inferiores a uma "test" dose com uma unidade antitóxica do soro padrão e inoculamos as misturas em séries de 12 camundongos. (Estando certa a dose "test" morrem cerca de 50% dos camundongos inoculados com uma test dose, os inoculados com quantidade ligeiramente inferior sobrevivem e os inoculados com quantidade ligeiramente superior morrem).

Um exemplo de dosagem: a prova preliminar nos indicou que a maior diluição do sôro que protegeu contra uma "test" dose foi de 1/100; sendo que na diluição de 1/200 houve 100% de mortes.

Procedemos então à diluição com aproximação mais rigorosa entre 1/100 e 1/200.

<i>Toxina</i>	<i>Antitoxina</i>	<i>Camundongos</i>
		<i>proporção de sobreviventes</i>
Uma "test" dose em 0.2 cm ³	0.2 cm ³ de 1/100	12/12
	0.2 cm ³ de 1/120	12/12
	0.2 cm ³ de 1/140	12/12
	0.2 cm ³ de 1/160	6/12
	0.2 cm ³ de 1/180	0/12
	0.2 cm ³ de 1/200	0/12

TESTEMUNHAS DA "TEST" DOSE

<i>Toxina</i>	<i>Antitoxina padrão</i>	<i>Camundongos</i>
		<i>proporção de sobreviventes</i>
Uma dose "test" = 0.2 cm ³	Uma unidade em 0.2 cm ³	5/12
Menos de uma dose "test" = 0.18 cm ³	Uma unidade em 0.2 cm ³	12/12
Mais de uma dose "test" = 0.22 cm ³	Uma unidade em 0.2 cm ³	0/12

A antitoxina desconhecida na diluição 1/160, protegeu cerca de 50% dos camundongos inoculados. Multiplicando-se a diluição por 5 temos 800 unidades internacionais como título da antitoxina em prova. Sabemos desde logo que a dose "test" de toxina estava exata, pois unida com uma unidade do sôro padrão matou alguns, mas nem todos os animais inoculados.

C — *Sôro anti-histoliticum* — Os processos foram os mesmos que os do sôro anti-vibrião séptico (*oedematis-maligni*).

D — Sôro antinovyi (Oedematiens).

I — Determinação da test dose.

Para a determinação da dose "test" foram preparadas as seguintes soluções:

(1) 1cm^3 da solução padrão foi diluída de tal maneira que 1cm^3 continha 0.2 de unidade.

(2) Uma certa quantidade da toxina sêca foi cuidadosamente pesada em um vidro sêco e tarado, e em seguida dissolvida em solução fisiológica.

(3) As misturas de antitoxina e toxina diluída foram feitas de modo que 0.2cm^3 (quantidade a ser injetada em cada camundongo) continha 0.1cm^3 de antitoxina diluída (0.02 de Unidade), mais quantidades variáveis da solução de toxina (variáveis de 0.02cm^3). As misturas conservadas à temperatura ambiente durante uma hora, foram injetadas, por via intramuscular (0.2cm^3), em grupos de 12 camundongos.

Os animais foram observados durante 3 dias. A maioria morreu nas primeiras 72 horas.

O protocolo abaixo ilustra a determinação da "test" dose de toxina edematosa sêca:

<i>Dose de toxina</i>	<i>Antitoxina padrão diluída</i>	<i>Proporção de camundongos sobreviventes</i>
0.06 cm^3	0.02 de Unid.	12/12
0.08 cm^3	0.02 de Unid.	12/12
0.1 cm^3	0.02 de Unid.	12/12
0.12 cm^3	0.02 de Unid.	6/12
0.14 cm^3	0.02 de Unid.	0/12

A dose "test" era portanto representada pelos miligramas contidos em 0.12cm^3 . O protocolo acima mostra que quando a dose foi aumentada de 0.02cm^3 todos os camundongos morreram, e que quando a dose foi decrescida de 0.02cm^3 os camundongos mostraram graves sintomas porém se restabeleceram.

II — *Dosagem de antitoxina edemática de título desconhecido pelo método da injeção intramuscular.*

Procedemos em duas fases: na primeira, com o intuito de orientar a dosagem, injetamos uma série de misturas contendo para cada uma, em 0.2 cm³, a dose "test" de toxina, mais quantidades variáveis e distantes entre si de antitoxina, sendo inoculados 4 camundongos com a mistura. Os limites grosseiros da quantidade de antitoxina que protegeram completamente os camundongos contra a morte ficaram assim determinados.

Na segunda fase, preparamos uma série de diluições rigorosas com os limites indicados pela experiência preliminar, sendo as misturas feitas de modo que em cada 0.2 cm³ estivessem contidas a dose "test" da toxina, mais quantidades variáveis e próximas entre si da antitoxina em prova.

Para efeito de contrôlo da dose "test" da toxina injetamos quantidades ligeiramente superiores e inferiores a essa dose "test" mais 0.02 de unidade de antitoxina padrão. Grupos de 12 camundongos foram inoculados com 0.2 cm³ das diferentes misturas e observados durante 72 horas. A proporção dos animais sobreviventes foi anotada, calculando-se então o valor da antitoxina de valor desconhecido.

RESULTADOS

QUADRO I

<i>Sôro antigangrenoso</i>	<i>Laboratório</i>	<i>Partida</i>	<i>Data da dosagem</i>	<i>Resultado em unidades internacionais por cm³</i>
antiwelchii tipo A	1	263	1943	menos de 20
	1	243	1944	menos de 5
	1	263	1944	igual a 10
	1	275	1945	menos de 50
	2	33 859	1943	menos de 20
	2	42 968	1944	menos de 10 e mais de 5
	2	38 381	1944	menos de 10 e mais de 5
	2	44 560	1944	igual a 10
	2	62 073	1945	igual a 75
	2	62 077	1945	igual a 100

<i>Sôro antigangrenoso</i>	<i>Laboratório</i>	<i>Partida</i>	<i>Data da dosagem</i>	<i>Resultado em unidades internacionais por cm³</i>
	3	69 584	1943	mais de 20 e menos de 50
	3	110	1944	mais de 20 e menos de 40
	3	5	1945	menos de 100
	5	28	1945	igual a 100
<i>Sôro antivibrião septico</i>	1	263	1943	menos de 50
	1	243	1944	menos de 5
	1	263	1944	menos de 5
	1	275	1945	menos de 62.5
	2	33 859	1943	menos de 50
	2	42 968	1944	menos de 5
	2	38 381	1944	menos de 5
	2	44 560	1944	igual a 5
	2	62 073	1945	igual a 125
	2	62 077	1945	igual a 125
	3	69 584	1943	menos de 50
	3	110	1944	mais de 20 menos de 50
	3	5	1945	igual a 100
<i>Sôro antinovyi</i>	1	263	1943	menos de 10
	1	243	1944	menos de 2
	1	263	1944	menos de 2
	1	275	1945	menos de 50
	2	33 859	1943	menos de 10
	2	42 968	1944	menos de 2
	2	38 381	1944	menos de 2
	2	62 073	1945	igual a 50
	2	62 077	1945	igual a 50
	3	69 584	1943	igual a 50
	3	110	1944	igual a 100
	5	28	1945	igual a 100
	1	263	1943	não tem antitoxina histolítica
	1	243	1944	não tem antitoxina histolítica
	1	263	1944	não tem antitoxina histolítica
	1	275	1945	não tem antitoxina histolítica

Soro antigangrenoso	Laboratório	Partida	data da dosagem	Resultado em unidades internacionais por cm ³
Soro antihistolítico	2	33 859	1943	menos de 50
	2	42 968	1944	menos de 5
	2	38 381	1944	menos de 5
	2	44 560	1944	menos de 5
	2	62 073	1945	menos de 125
	2	62 077	1945	menos de 125
	3	69 584	1943	não dosa 50
	3	110	1944	mais de 20 menos de 50
	5	28	1945	igual a 250

DISCUSSÃO

Segundo o relatório de Mac Lennan¹⁰ com a progressão do 8.º Exército do Deserto para as áreas mais cultivadas da Tripolitânia e da Tunísia, a incidência da gangrena gasosa aumentou passando de 3.4 por 1.000 feridos a aproximadamente 7 por 1.000 feridos, confirmando o que havíamos previsto com Rodrigues (1943). Dos casos relatados, 70% se restabeleceram, em grande parte devido ao diagnóstico rigoroso, à boa cirurgia e à intensa soroterapia anti-gangrenosa intramuscular e endovenosa aplicada em todos os casos: no mínimo 3 empôlas e de 90.000 a 110.000 unidades em média, continuanda enquanto persistia a toxemia.

A mortalidade por gangrena gasosa oscilou ao redor de 30% no Norte da Africa, conforme relatam Mac Lennan & Rogers¹¹ em contraste com a mortalidade na guerra passada que oscilou ao redor de 50%. A presença da hialuronidase nos fluidos de edema permitiu o diagnóstico mais precoce da infecção produzida pelo *Cl. welchii*, pelo *Cl. septicum* e pelo *novyi* (*oedematiens*).

Considerando a gangrena gasosa como uma combinação de invasão bacteriana local e de toxemia, compreende-se a vantagem de associar ao tratamento soroterápico o tratamento quimioterápico local na prevenção e no tratamento da proliferação bacteriana.

O tratamento quimioterápico local por meio de um pó contendo 99 partes de sulfatiazol e 1 parte de proflavina produziu ótimos resultados na prevenção da gangrena gasosa, conforme re-

ferem Mac Intosh & Selbie⁹, principalmente devido à atividade de tal pó contra o *Cl. welchii*, o *Cl. novyi* e o *Cl. septicum*; a proflavina exerce ação terapêutica importante contra o estafilococo e contra os Gram negativos tais como a *P. pyocyanea*, o *B. proteus* e certos coliformes.

Conforme escreve Feggetter⁶: "It appears that S.P. powder is a valuable therapeutic agent in the treatment of var wounds; it is certainly the best that I have used". Ascroft² obteve excelentes resultados terapêuticos com o PS tanto em feridas limpas como contaminadas.

O tratamento só pela penicilina não tem produzido os resultados esperados na terapêutica da gangrena gasosa. Em todos os casos é aconselhável associar sistematicamente o sôro. Conforme escreve Herrel⁸: "As experience accumulated, however, it was evident that penicillin alone was not the final answer to successful treatment of this disease. The role of penicillin is primarily to rid the disease tissue of microorganism and the experience of the British investigators demonstrated that to combine antitoxin with penicillin was essential in treatment of gas gangrene. In other words, penicillin is an important part, but not the sole factor, in treatment of this infection". O sôro antigangrenoso e o tratamento cirúrgico são os fatores importantes na terapêutica da gangrena.

O êxito do tratamento da gangrena gasosa pela sôroterapia guarda íntimo paralelismo com o tratamento cirúrgico adequado, conforme ficou bem esclarecido por Trueta¹⁸.

A excisão cirúrgica do tecido morto e desvitalizado é, em todos os casos, o cuidado profilático mais importante na prevenção da gangrena gasosa.

* * *

O sôro antigangrenoso é antitóxico e antimicrobiano. A etiologia polimorfa da doença obriga que o sôro seja também polivalente. A fisionomia particular da guerra, através de sua possível correlação com a flora predominante na região onde se travam os combates, não apresenta um valor absoluto, tem antes um valor de probabilidade na etiologia da gangrena.

Assim na guerra de movimento prepondera o *Cl. welchii* como agente patogênico, ao passo que na guerra de estabilização a flora se complica.

A guerra de 1933-1945 veio evidenciar que *Cl. novyi* nas gangrenas gasosas não era tão raro como parecia e que a composição

do sôro antigangrenoso, no que se referia ao seu conteúdo em sôro antinovyi, deveria ser revista. O baixo teor de sôro antinovyi em certos soros antigangrenosos polivalentes (15.000.U.I.) foi a causa de 3 mortes, devido ter preponderado nesses casos a infecção pelo *Cl. novyi* conforme relata Mac Lennan (obra citada).

Trabalhos com relação à flora da gangrena gasosa no Norte da África e na zona de guerra do Pacífico demonstram ser o *Cl. novyi* muito mais comum do que se havia suspeitado. Daí escrever Mc Lennan (obrs. cit.): "From this will be obvious that, in my opinion the relative dosage of the various gas gangrene antitoxin, and especially of *Cl. oedematiens*, urgently requires reconsideration".

O "War Wounds Committee of the Medical Research Council" diante do fracasso da sulfanilamidoterapia nas infecções pelo *Cl. novyi* (*oedematiens*) resolveu insistir no uso da antitoxina específica. Conforme se poderá ler em um editorial⁵ do Lancet (1943): "In this Committee may have been influenced by recent experience in the Middle East where *oedematiens* gas gangrene, which like tetanus is principally a toxæmia and unaffected by sulphonamide therapy was the most common type of infection".

Com o desenvolvimento dos métodos rápidos de diagnóstico bacteriológico dos germes anaeróbios, a flora da gangrena está sendo melhor conhecida. Aschoff¹ chamou a atenção para a falsa concepção sobre a flora da gangrena gasosa nos feridos recentes. Tal engano foi atribuído por Aschoff, ao fato dos bacteriologistas terem realizado os seus estudos em cidades ou em zonas da retaguarda e não no proprio front de combate. "Je mehr der Bakteriologe Gelegenheit hatte, auch die gestürmisch verlaufenden Fälle an der Front zeil untersuchen, um so mehr lissen sich such andere Erreger der Gasödeme nachweisen".

Aschoff¹ lembrou que Weinberg e Seguin encontraram em 126 casos de amputações e dissecações: o bacilo de Welch-Fränckel em 96 amputações e o bacilo de Novyi em 32 amputações, isto é, na proporção de 3:1 ao passo que nas dissecações (39) aqueles germes foram encontrados na proporção de 20 para 16, isto é, 5:4. Acredita Aschoff que os pesquisadores franceses certamente teriam chegado a resultados diferentes sobre a flóra da gangrena gasosa si tivessem examinado os casos rápidos de gangrena, nas formações sanitárias de primeiro socorros. Esses casos rápidos morreram antes de chegar aos hospitais da retaguarda. Aschoff pode chegar a esta conclusão após ter examinado grande número de casos imediatamente depois do ferimento, tendo assim chegado à conclu-

são de ser muito maior a porcentagem do vibrião séptico ou bacilo de Ghon-Sachs (Pararanschbrandbacillus.) “So kamen wir zu der Uberzeugung dass im Kriege der Ghon-Sachssche Bacillus (Pararanschbrandbacillus) eine Grössere Rolle spielte als der Welch-Fränkelsche Bacillus”.

Não foi possível estabelecer se a virulência aumentava com a perda de sangue, o transporte dificultado, ou se as condições de umidade e de resfriamento condicionavam maior agressividade do germe. Sobretudo porque nas amostras de terra examinadas o bacilo de Welch-Fränkél estava presente em 2 terços dos casos ao passo que o vibrião séptico era o mais raro de todos os 3 causadores dos edemas gasosos.

Essa noção sobre a flóra da gangrena gasosa é de interesse para a composição do sôro antigangrenoso pois a ausencia ou o baixo teor de determinada antitoxina poderá ser a causa da morte por gangrena, como o foi efetivamente nos 3 feridos referidos por Mac Lennan.

Weinberg ¹⁹ já havia verificado também esta diferença entre a flora da gangrena na guerra de movimento e a flóra na guerra de estabilização. “Tant que la guerre a conservè son caractère de guerre de mouvement, on ne trouvait dans la flore microbienne des grangrènes gazeuses que le *B. perforans*. Mais dès que les armées se stabilisèrent dans les tranchées la flore devint de plus em plus compliquée. Ainsi on na pas tardé a trouver des cas de gangrène gazeuse a Vibrion septique ou a *B. oematiens*.”

Se o sôro polivalente não contiver quantidades adequadas das antitoxina específicas êsse sôro falhará e não impedirá a morte do ferido.

Todos êsses fatos foram por nós referidos, afim de que se possa compreender porque só os soros polivalentes e no mínimo quadri-valentes, com um mínimo de dosagem oferecem a garantia suficiente na profilaxia e no tratamento das gangrenas humanas.

Certos soros examinados não eram tetravalentes e não apresentavam, muitos deles, um mínimo compatível para se lhe atribuir qualquer valor terapêutico.

O nosso primeiro inquérito, realizado em 1939, não referido no presente trabalho, demonstrou resultados muito precários. Após o inquérito de 1943 verificamos que a situação permanecia estacionária neste particular. Não houve alteração em 1944, segundo concluímos do nosso 3.º inquerito, quando então foram advertidos os laboratórios produtores.

Ao mesmo tempo apressamos a elaboração do Regulamento sôbre produtos biológicos que vínhamos fazendo há cêrca de 3 anos, juntamente com o Dr. Genesio Pacheco, para a Comissão de Biofarmácia, do Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina.

Com o fito de não destruir o que quer que fosse que os laboratórios produtores haviam conseguido até então, baixamos provisoriamente os mínimos de dosagem tanto dos soros monovalentes como dos soros antigangrenosos polivalentes estabelecidos e obtidos por nós, desde 1938 no Instituto Butantã. Esperamos que para o futuro os baixos níveis que estabelecemos provisoriamente no "Regulamento de produtos biológicos" e no 2.º Suplemento de Revisão da Farmacopéia Brasileira possam ser elevados, mesmo porque ao envez de destruir desejamos sinceramente cooperar para que os nossos laboratórios produtores consigam produtos terapêuticos cada vez mais eficientes. E que isto está sendo possível basta analisar os resultados obtidos em o nosso 4.º inquérito de 1945.

CONCLUSÕES

I — Empregando as técnicas oficialmente recomendadas pela Comissão Permanente de Padronização Biológica da Liga das Nações são relatados os resultados dos inquéritos realizados durante 3 anos, sôbre o conteúdo dos soros antigangrenosos expostos à venda.

II — Os resultados construtivos dêsses inquéritos são evidenciados pela progressiva melhoria dos títulos antitóxicos dos soros antigangrenosos.

III — A comprovação da capacidade curativa e profilática dos soros antigangrenosos é o método de eleição para se concluir do seu valor terapêutico.

IV — A dosagem do seu conteúdo em antitoxinas monovalentes dá indicação sôbre o valor terapêutico do sôro antigangrenoso polivalente.

V — Existe estreito paralelismo entre o valor terapêutico do sôro e o seu teor qualitativo e quantitativo em antitoxinas.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ASCHOFF, L. — *Über die Gasödeme*. Gustav. Fischer Jena, 1938.
- 2 — ASCROFT, P. B. — Control of sepsis in a Hospital in North Africa. *The Lancet*, 1: 594, 1944.
- 3 — BENGTSON, I. A. — Étude sur la toxine du bacille perfringens *Bull de l' Organization d'Hygiene*, 7: 867, 1938.

- 4 — BENZONI, G. — Recerche biologiche sulla toxina del *B. perfringens*. *Bol. Inst. Sierot. Milan*, 17: 740, 1938.
- 5 — Editorial — New advance ou gas gangrene. *The Lancet*, 1: 745, 1943.
- 6 — FEGGETTER, G. Y. — Sulphathiazole-proflavine powder in war wounds. *The Lancet*, 1: 593, 1944.
- 7 — HARTLEY, P. e EVANS, D. G. — Preparations etalons pour la litrage de trois serums contre la gangrène gazeuse a *Cl. perfringens*, vibrión septique et *Cl. edematiens*. *Bull. de l'Organizat d'Hygiene*, 10: 129, 1934.
- 8 — HERREL, W. E. — Penicillin and other antibiotics agents. W. B. Saunders
- 9 — MAC INTOSH, Y. e SELBIE, F. R. — Sulphathiazole-proflavine powder in wounds. *The Lancet*, 1: 1591, 1944.
- 10 — MAC LENNAN, J. D. — Anaerobes infections in Tripolitania and Tunisia.
- 11 — MAC LENNAN, D., ROGERS, H. J. e WILLIAMS, B. W. — Early diagnosis
- 12 — MAC LENNAN, J. D. e MAC FARLANE, R. G. — Toxin and antitoxin studies of gas gangrene in man. *Lancet*, 2: 301, 1945.
- 13 — PRIGGE — R. Ueber Wirksamkeit und Antitoxingehalt des Gasbrandserums. *Deuts. Mediz. Wochens*, 63: 1906, 1937.
- 14 — RODRIGUES, C. e SOUTO, A. B. — Anaerobios em infecções de feridas — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3: 81, 1943.
- 15 — SOUTO, A. B. e RODRIGUES, C. — Sôros antianaeróbios — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3: 112, 1943.
- 16 — SOUTO, A. B. e RIVAROLA, J. B. — Preparación del suero antigangrenoso. *Revista de Sanidad Militar*, 10: 657, 1938.
- 17 — SOUTO, A. B. e VON UBISH, G. — Comportement du cobaye (*Cavia porcellus* L.) et du préa (*Cavia rufescens* Lund) visavis des antigènes tétaniques — *Revue D' Immunologie*, 1: 55, 1939.
- 18 — TRUETA, J. — War surgery of the extremities in the light of recent experience. *The Lancet*, 1: 651, 1944.
- 19 — WEINBERG, M. — La gangrene gazeuse. Enseignements de la guerre de 1914-1918. *Bull. Acad. Med*, 122 (30): 284, 1939.
- 20 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — De la nécessité d' apporter des modifications a la tecnica du titrage du sérum anti-perfringens. *Bull. de l' Organization d' Hygiene* 7: 867, 1938.
- 21 — YPSEN, J., LELLEWELY-SMITH, M. e SORDELLI, A. — Titrages comparatifs des serums antiperfringens. *Bull. de l'Organizat d' Hygiene*, 8: 1, 1939.

ERRATA

- 8 — HERREL, W. E. — Penicillin and other antibiotic agents — W. B. SAUNDERS
Philadelphia U. S. A. 1945.
- 10 — MAC LENNAN, J. D. — Anaerobes infections in Tripolitania and Tunisia
LANCET I:203,1944.
- 11 — MAC LENNAN, J. D., ROGERS, H. J. e WILLIAMS, B. W. — Early Diagnosis
of wound infection: with special reference to gas gangrene - LANCET I:355,1943.
-