

## OBTENÇÃO DE ANTITOXINA PERFRINGENS DO TIPO A EM ESCALA INDUSTRIAL \*

Maria Antonieta da SILVA \*\*  
Hideyo IIZUKA \*\*  
Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA \*\*  
Hisako Gondo HIGASHI \*\*  
Raymundo ROLIM-ROSA \*\*

RIALA6/515

SILVA, M.A.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E.P.T.; HIGASHI, H.G. & ROLIM-ROSA, R.  
— Obtenção de antitoxina perfringens do tipo A em escala industrial. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(1):1-8, 1981.

**RESUMO:** Descreve-se o método utilizado na preparação da antitoxina perfringica do tipo A, em escala industrial, pela hiperimunização de cavalos, através de antígeno misto, adsorvido pelo alúmen de potássio. Empregando-se esquema de imunização próprio, conseguiu-se obter soro antigangrenoso perfringico tipo A, dosando ao redor de 200 UI/ml, título este que, após a concentração pelo método de Pope, elevou-se ao nível antitóxico de 850 a 1.000 UI/ml. O soro purificado e concentrado foi diluído convenientemente para compor o soro antigangrenoso polivalente.

**DESCRITORES:** gangrena gasosa; *Clostridium perfringens*, antitoxina tipo A; antígenos bacterianos; cavalos, imunização; soro antigangrenoso perfringico.

### 1 — INTRODUÇÃO

*Clostridium perfringens* é o agente etiológico preponderante da gangrena gasosa humana, seguido por *Cl. septicum* e *Cl. oedematiens* <sup>2, 3, 21, 22, 26, 33, 35, 36</sup>. Este microrganismo secreta inúmeras toxinas e enzimas dotadas de atividade letal, necrosante, hemolítica, neurotóxica, enzimática e leucoaglutinante. Assim, podem ser identificados pelo menos 13 agentes ou fatores tóxicos, representados pelas letras do alfabeto grego. Sob o ponto de vista da atividade letal e de distintas doenças que causam no homem e em outros animais, são classificados em seis subespécies ou tipos toxigênicos, designados pelas letras maiúsculas do alfabeto latino: A, B, C, D, E e F. Eles apresentam respectiva especificidade imunológica <sup>26, 33, 34, 40</sup>. O componente principal deste complexo tóxico e responsável

pela atividade letal é a toxina alfa <sup>26</sup>, única que é comum aos seis tipos, estudada por MacFarlane e Knight como sendo um enzima que tem atividade lecitínásica, e identificada quimicamente como fosfolipase C <sup>24</sup>.

O *Cl. perfringens* do tipo A e do tipo F são responsáveis pela doença humana, sendo este último, causador da toxinfecção alimentar, na forma benigna <sup>2</sup>.

O *Cl. perfringens* tipo A tem capacidade de produzir alfa toxina em abundância, e constitui normalmente cerca de 50% de *Clostridia* isolada de material clínico <sup>20</sup>.

Segundo McLENNAN <sup>26</sup>, o índice de mortalidade pela gangrena gasosa era da ordem de 50%, no início da grande guerra, no período de 1940-1942, e, cerca de 30% durante a guerra de 1943, no norte da África, e finalmente, no noroeste europeu, o índice reduziu-se

\* Realizado no Setor de Anaeróbios do Instituto Butantan, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Butantan.

para 22%. A análise desses casos revelou que o índice de mortalidade era significativamente menor entre os pacientes que tinham recebido o tratamento soroterápico, além de outros tratamentos indispensáveis, confirmando assim o valor terapêutico do soro antigangrenoso.

Além dos dados compilados durante as guerras mundiais, inúmeros pesquisadores também têm observado e comprovado a eficiência do soro antigangrenoso<sup>5, 9, 10, 18, 25, 28, 42</sup>.

Apesar dos avanços da quimioterapia, da antibióticoterapia e mais recentemente da oxigenoterapia hiperbárica<sup>2, 34, 42</sup> terem conseguido notável conquista no tratamento da gangrena gasosa, o único tratamento antitóxico eficaz é a soroterapia específica<sup>5, 9, 10, 18, 25, 31</sup>.

A técnica de produção de soro antigangrenoso, pelo Instituto Butantan, foi introduzida em 1938<sup>35</sup>; nela procedemos inúmeras modificações e aperfeiçoamentos tecnológicos, os quais apresentamos neste trabalho, com o propósito de oferecer subsídios à produção, em escala industrial, do referido antissoro.

## 2 — MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Estirpe bacteriana* — *Clostridium perfringens* SR-12, selecionada dentre as 47 amostras da espécie *perfringens*, existentes na germoteca do Instituto Butantan, por ser dotada de elevado poder antigênico.

2.2 *Inoculum* — A amostra selecionada sofreu o processo de exaltação da virulência<sup>23, 35</sup>, pela passagem sucessiva em animais sensíveis como o pombo e cobaio, de cerca de 350g de peso. Quando utilizamos o cobaio, inocula-se pela via intramuscular, inicialmente, cerca de 0,5 ml da suspensão da cultura jovem, desenvolvida no meio de TAROZZI<sup>37</sup>, no músculo da coxa, com devidas precauções e rigorosa assepsia. A passagem é repetida tantas vezes, até que o volume de 0,1 ml da suspensão bacteriana, resultante da cultura de aproximadamente 5 horas de desenvolvimento, determine a morte do animal inoculado dentro de 24 horas. A amostra de virulência exaltada, colhida da última passagem e semeada em 20 ml do meio de Tarozzi, previamente regenerado, e incubada a 37° C, durante 5 horas, correspondente à fase logarítmica de crescimento, é que constitui o inóculo para o preparo da toxina perfringica.

2.3 *Toxina perfringica tipo A* — A toxina foi preparada no meio de cultura preconizado por WADSWORTH<sup>43</sup> modificado.

Para cada partida de toxina, eram preparados 10.000 ml de meio de cultura, apresentando a sua fórmula, a seguinte constituição básica:

Carne de vitela .....	5.000 g
Peptona (Oxóide) .....	200 g
Cloreto de sódio .....	50 g
Acetato de sódio .....	225 g
Glicerofosfato de sódio .....	225 g
Glicose a 20% .....	200 ml
Água .....	10.000 ml

O meio de cultura é preparado de acordo com a técnica descrita no trabalho anterior<sup>36</sup>. Ajustado o pH para 7,8 com auxílio de solução de hidróxido de sódio concentrado, a 40%, o meio era dispensado em volumes de 3.000 ml, em frascos Erlenmeyer de 5.000 ml de capacidade, juntamente com cerca de 600 g de carne moída e cozida. Reajustar o pH novamente a 7,8. Após a esterilização, o meio era resfriado bruscamente com água corrente, até a temperatura de aproximadamente 45°C, a fim de garantir a anaerobiose pela eliminação do oxigênio residual<sup>35</sup>. No momento da semeadura, adicionava-se com esterilidade, a solução de glicose e de acetato glicerofosfato de sódio, previamente preparado separadamente. Após a semeadura de 20 ml do inóculo em cada frasco, eram incubados durante 18 horas, a 37°C, no final da qual, transferiam-se para a geladeira. As amostras eram colhidas de cada frasco, a fim de proceder as provas biológicas e o exame bacterioscópico, para controle de microorganismos não específicos. Os frascos contaminados eram desprezados.

2.3.1 *Titulação da toxina* — As alíquotas de alfa toxina perfringica, colhidas separadamente de cada frasco, e submetidas a ação da força centrífuga equivalente a cerca de 3.000 xg (aceleração gravitacional), a 4°C, durante aproximadamente 30 minutos, até a obtenção de sobrenadante totalmente límpido, eram tituladas em camundongos albinos a fim de determinar a sua atividade em DMM e DL 50, de acordo com a mortalidade verificada em 24 e 48 horas de observação.

2.4 *Anatoxina perfringica* — A toxina perfringica destinada ao preparo da anatoxina perfringica, deve ser altamente imunogênica<sup>38</sup>, isto é, convém apresentar títulos ao redor de 10<sup>2</sup> DL 50 em camundongos. A destoxificação da cultura tóxica era realizada mediante a formolização, na concentração final de 0,4%, no produto previamente centrifugado. O processo de destoxificação era completado na estufa, a 37°C, requerendo normalmente incubação por um período de duas a três semanas, acompanhada de agitação constante. Este processo permite a desativação do fator letal da alfa toxina, sem afetar a capacidade imunogênica. A prova de inocuidade de anatoxina era executada pela inoculação de 0,5 ml do produto pela via subcutânea, em camundongos, ou 5 ml de maneira similar em cobaios de 350 gramas de peso. Os animais de prova não devem apresentar sintomas reveladores da ação da toxina perfringica, durante o período de observação de 10 dias.

2.5 *Antígeno para imunização de cavalos* — Para o preparo de antígeno destinado à imunização de cavalos, a toxina era centrifugada a baixa temperatura, e em seguida, precipitada pela solução estéril de 10% de sulfato duplo de alumínio e potássio, sob agitação constante, resultando uma concentração final de 1,25% do adsorvente. A queda do pH do antígeno era corrigido a 5,5 pela adição de

solução concentrada de hidróxido de sódio a 40%. O antígeno, constituído de anatoxina adsorvida, era destinado à imunização de base, isto é, a lote de cavalos novos, enquanto que a toxina adsorvida pelo alumínio era utilizada para hiperimunização de cavalos velhos, isto é, aqueles que já haviam recebido o estímulo primário.

**2.6 Preparo do soro antiperfringico** — O soro antiperfringico misto, de ação antitóxica e antibacteriana era preparado pela imunização de cavalos selecionados, previamente examinados e identificados pelo Serviço de Veterinária, vacinados contra tétano e garrotilho. A imunização era realizada em duas fases, visando melhor rendimento de soro e ausência de reações indesejáveis no animal soroprodutor.

**2.6.1 Imunização de base** — Na primeira fase de imunização, os cavalos novos<sup>3, 44</sup> recebiam o estímulo primário provocado pela inoculação de anatoxina alfa perfringica. Principiava-se com a administração de antígeno, em pequenas doses diárias, progressivamente crescentes, de acordo com o esquema de imunização estabelecido em trabalhos anteriores<sup>19, 30</sup>. A sangria exploradora de cada cavalo era realizada sete dias após a inoculação da última dose de antígeno. Os animais com resposta antigénica satisfatória, isto é, aqueles que apresentavam teor de antitoxina ao redor de 100 UI/ml, eram sangrados na proporção de 5% do seu peso corporal, divididos em três vezes, com intervalo de 48 horas entre uma sangria e outra. A seguir, os animais entravam em fase de recuperação, durante o espaço de tempo de 30 a 45 dias<sup>1</sup>.

**2.6.2 Hiperimunização** — Nesta fase, cada cavalo recebia antígeno misto, constituído de toxina contendo suspensão bacteriana, cuja concentração estava controlada pelo processo de centrifugação, a baixa temperatura. A administração deste antígeno também era feita em doses fracionadas e progressivamente crescente de duas injeções semanais, durante o período de quatro semanas<sup>19, 30</sup>. Todos os equídeos que demonstrassem resposta antigénica satisfatória eram separados e sangrados. As reimmunizações eram sistematicamente repetidas após os períodos de sangria e de repouso do animal.

O sangue era recebido em solução anticoagulante de citrato de sódio, sendo imediatamente a seguir, submetido a centrifugação em uma desnatadeira para a separação do plasma, e adicionava-se fenol, na concentração final de 0,4%. O volume de plasma resultante, mantido em recipiente de vidro, estéril, era conservado em câmara fria a 4°C, até o momento de ser submetido a concentração e purificação, operação esta efetuada de acordo com o método de POPE<sup>14, 32</sup>.

O doseamento do teor de antitoxina perfringica tipo A, das amostras de mistura de plasma obtidas após a hiperimunização de equídeos, era realizado em camundongos, se-

gundo a técnica preconizada pelo "National Institute of Health, USA"<sup>39</sup>, e traduzida em UI (Unidade Internacional), usando como padrão de referência, o Soro Antigangrenoso Perfringico tipo A, padrão internacional, da Organização Mundial de Saúde.

Finalmente, o soro antigangrenoso perfringico purificado era novamente titulado e acertado frente a antitoxina padrão internacional, a fim de conter 300 UI/ml do tipo A, quando, evidentemente se tratasse de soro monovalente. O soro antigangrenoso polivalente purificado, deve apresentar como potência mínima, as seguintes capacidades antitóxicas por mililitro do produto: antitoxina perfringens, 100 UI, antitoxina septicum, 100 UI, e antitoxina oedematiens, 150 UI, respectivamente<sup>11</sup>.

## 2.7 Soro e toxina padrões

**2.7.1 Soro padrão** — O soro antiperfringico tipo A, padrão internacional, era proveniente do Statens Serum Institute, da Organização Mundial de Saúde, Copenhagen, sendo recebido, sob forma liofilizada, em ampolas contendo 90,35 mg de antitoxina perfringica, equivalente a 270 UI<sup>45</sup>. Portanto, uma unidade internacional do atual padrão é a atividade específica que está encerrada em 0,3346 mg de antitoxina equina hiperimmune liofilizada. O solvente do soro padrão é constituído de mistura de duas partes de glicerina bidestilada neutra e de uma parte de solução fisiológica estéril, a 0,85% de NaCl, PA.

**2.7.2 Toxina perfringica padrão tipo A** — A toxina padrão foi preparada no laboratório, e padronizada ao nível de 1 L+ (Limite morte), frente ao soro padrão internacional antiperfringico tipo A. O Limite morte da toxina perfringica tipo A é a menor quantidade desta toxina que, misturada a 1/5 de unidade antitóxica do soro padrão internacional, provoca a morte de, pelo menos, 50% do lote de camundongos de 17-20 g de peso, inoculados pela via intravenosa, em 48 horas de observação<sup>11, 39</sup>.

A toxina padrão deve ser conservada em estado seco e pulverizado, a vácuo, em dessecador, em atmosfera contínua de pentóxido de fósforo ou de cloreto de cálcio, a temperatura de 4°C. Ela deve apresentar título estável e elevado, e conter quantidade mínima de teta toxina perfringica<sup>39</sup>.

O solvente da toxina padrão é a solução de proteose peptona a 1%<sup>43</sup>, e o diluente para todos os ensaios biológicos é a solução fisiológica, a 0,85% de NaCl, PA, esterilizada em autoclave.

**2.8 Animais de laboratório** — Os camundongos albinos de 17-20 g, e os cobaias de 350 g de peso, utilizados, sem distinção de plasma obtidas após a hiperimunização de Instituto Butantan.

### 3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *Clostridium perfringens* é um bacilo cosmopolita e largamente distribuído na natureza, estando presente em quase todos os tipos de ambiente. Além de ser habitante normal do intestino do homem e da maioria dos animais, é encontrado no solo, nas poeiras, nas vestimentas, na pele etc., motivo pelo qual pode contaminar facilmente qualquer fermento. Os fermentos profundos, principalmente aqueles causadores de lesões dilacerantes dos músculos, favorecem o desenvolvimento da gangrena gasosa<sup>3, 26</sup>.

O soro antigangrenoso é utilizado em tratamentos tanto preventivo quanto curativo, de fermentos daquela natureza. A soroterapia antigangrenosa é o único agente capaz de neutralizar a letal exotoxina secretada pelos germens da gangrena gasosa.

O processo atual de obtenção de soro antigangrenoso, em escala industrial, é o resultado de inúmeros ensaios tecnológicos realizados em nosso laboratório, permitindo o estabelecimento de condições ideais para a obtenção de toxina perfringica tipo A, e de antígenos para a imunização de cavalos.

Uma das causas primordiais, que mais afeta o preparo de antígeno eficaz, dotado de alta imunogenicidade, destinado à obtenção de soros com bons títulos, é a baixa taxa de produção de alfa toxina pelo *Cl. perfringens*<sup>23, 35</sup>.

MÖLBY e col.<sup>27</sup> fazendo estudo comparativo entre as diversas amostras de *Cl. perfringens* procedentes do ATCC e do NCTC (American Type Culture Collection, USA, e National Collection of Type Culture, London, respectivamente), verificaram que a taxa de produção de exotoxinas letais depende das características de crescimento dos germens, inerentes as propriedades associadas intrinsecamente a determinadas estirpes bacterianas. Em condições ótimas de pH, obtiveram toxina perfringica tipo A, cuja toxicidade oscilava entre os valores de 2 a 50 DL/50 por mililitro, para camundongos. Percebe-se logo, que nem todas as amostras de *Cl. perfringens* são capazes de sintetizar proteínas extracelulares de elevado teor tóxico. A escolha da estirpe certa, além de condições culturais adequadas, representa fator de grande importância no rendimento final das exotoxinas.

No presente trabalho também foram observadas grandes variações toxigênicas entre as diversas amostras estudadas. Preliminarmente, foram selecionadas quatro cepas, indenticadas pelos n.º IB-12, SR-12, IB-23 e IB-39, respectivamente, as quais revelaram ser amostras toxigênicas em camundongos, dosando ao redor de 40 DL50/ml, após algumas passagens prévias de exaltação de virulência em cobaias. Em ensaios posteriores, as cepas SR-12 e IB-23 apresentaram maior toxigenicidade, pois determinaram a morte de cobaias num período inferior a 24 horas, quando inoculadas pela via intramuscular, no volume de 0,1 ml de suspensão da cultura de

seis horas de desenvolvimento em meio de Tarozzi. A toxina obtida dessas culturas dosou ao redor de 100 DL50/ml para camundongos. Por este motivo a estirpe SR-12 foi escolhida para a produção de toxina perfringica tipo A, ficando a IB-23 reservada para eventuais necessidades.

Inicialmente, nas primeiras passagens, exigia-se tempo de incubação mais longo e maior volume de suspensão de cultura — cerca de 1,0 ml — e a ocorrência da morte do animal, mesmo nessas condições, poderia ultrapassar o período de 24 horas.

A maioria dos autores admite que a adição de glicose ao meio de cultura, como fonte de carboidrato, é indispensável, a fim de se obter boa toxigênese de *Cl. perfringens* tipo A. Todavia, a taxa desse açúcar tem sido experimentada em diferentes concentrações: de 0,1%<sup>15, 16</sup>, 0,5%<sup>4, 29</sup> e de 0,2 a 2%<sup>41</sup>. Nas condições do nosso experimento, a taxa ideal foi de 0,4%. Por outro lado, meios de cultura muito rico em glicose constitui uma das causas que determina a inibição da toxigênese<sup>36, 41</sup>.

A temperatura de incubação é outra condição relevante na produção de toxina, e que tem sido provado em várias experiências anteriores de 31 a 45°C<sup>4, 6, 23, 27, 29, 35</sup>. Obtivemos resultados satisfatórios a 37°C, incubando durante um período de 18 horas, quando ocorria a máxima produção de exotoxina.

A suplementação de fatores de crescimento e de principais vitaminas ao meio de cultura, sempre estimula a síntese de exotoxina perfringica, e esta condição se torna indispensável quando se trata de meio de cultura sintético, além da adição de 13 aminoácidos essenciais, em sua forma levógira<sup>4, 23, 31</sup>.

Para o preparo de antígeno, utilizamos toxinas que dosavam ao redor de 100DL50/ml. Mas por outro lado, vários pesquisadores têm obtido bons resultados, empregando toxina perfringica menos potente, cujos títulos oscilavam entre os valores de 10 a a 60 DMM<sup>15, 16, 35, 38</sup>.

O sulfato duplo de alumínio e potássio foi utilizado como adjuvante, por ser o mais empregado na adsorção de antígeno destinado a hiperimunização de cavalos<sup>1, 3, 19, 30, 35, 38</sup>, embora outros tenham também encontrado resultados com lanolina<sup>3, 15, 44</sup>.

A infecção gangrenosa pelo *Clostridium perfringens* caracteriza-se pela exuberante reprodução bacteriana e pelo seu alto poder invasor razões pelas quais o soro antigangrenoso perfringico deve ter ação mista, isto é, antibacteriana e antitóxica<sup>12, 13, 35</sup>. Porém, muitos autores enfrentaram sérios obstáculos quando empregaram antígeno misto, constituído de toxina e suspensão bacteriana, para a imunização de cavalos. Os problemas mais difíceis são aqueles provocados pelas reações indesejáveis do antígeno, impossibilitando o uso deste tipo de imunógeno, inclusive devido a alta taxa de mortalidade de cavalos<sup>12, 13, 33, 35, 36</sup>, superior a 30%<sup>3</sup>.

SOUTO & RIVAROLA<sup>35</sup> contornaram este problema pelo emprego de anatoxina filtrada, neutralizada pela adição de soro antigangrenoso polivalente, no início da imunização.

No presente trabalho, estes inconvenientes foram contornados pela utilização do antígeno inócuo, isto é, destoxificado e adsorvido pelo alúmen de potássio, PA, na fase inicial de imunização. Em seguida, na fase de hiperimunização propriamente dita, era empregado antígeno constituído de toxina mais suspensão bacteriana virulenta, precipitadas pelo alúmen. Os cavalos submetidos ao processo, suportavam normalmente esta forma de antígeno, pois já tinham adquirido imunidade suficiente na fase inicial. Devido à coexistência de dois imunógenos, o microbiano e o tóxico, a síntese de antissoro de atividades antimicrobiana e antitóxica perfringica tipo A, processava-se satisfatoriamente.

O emprego de cavalos jovens é outro fator muito importante para obtenção constante de antitoxina de elevado título<sup>3, 44</sup>.

YAMAMOTO e col.<sup>46</sup>, ao estudarem vários tipos de antígenos gangrenosos para produção de soro antigangrenoso perfringico tipo A, verificaram que em condições naturais, somente uma proporção de cerca de 10% dos animais revelam ser bons produtores de antitoxina. Este fenômeno é explicado pela existência prévia de imunidade potencial<sup>1</sup>, isto é de anticorpos naturais circulantes antigangrenoso naturalmente adquiridos. Esta condição imunitária ideal pode ser artificialmente induzida em cavalos novos, aplicando-se doses de antígeno, em lotes de animais destinados à produção de soros, antes de iniciar a hiperimunização propriamente dita.

SOUTO & FURLANETTO<sup>36</sup> verificaram que os soros antigangrenosos encontrados no mercado nacional, resultante da pesquisa realizada

durante um período de três anos, apesar da progressiva melhoria dos títulos antitóxicos relativos à capacidade terapêutica e profilática, o teor de antitoxina perfringica oscilava entre os valores de menos de cinco até cerca de 50 UI/ml. Somente duas amostras exibiram títulos iguais a 100 UI/ml.

SOUTO & RIVAROLA<sup>35</sup> enfatizam que a resposta antagênica de cada animal é muito variável. Os animais imunizados produziram soro hiperimune cujos títulos oscilavam ao redor de 100 UI/ml. GUILLAUMIE e col.<sup>17</sup> obtiveram títulos antitóxicos que variavam entre os valores de 35 a 400 UI/ml, "in vivo"; e quando dosaram as mesmas amostras pelo método "in vitro", encontraram resultados que iam de 20 a 4000 UI, em título antihemolítico, e concluíram dessa maneira da inexistência de correlação entre estes dois métodos de dosagens. BITTNER e col.<sup>3</sup>, utilizando cavalos jovens de dois a três anos de idade, com esquema de imunização próprio, e antígeno precipitado pelo alúmen de potássio, conseguiram obter teor de antitoxina perfringica circulante ao redor de 200 a 300 UI/ml, porém o método de dosagem utilizado foi "in vitro".

Utilizando o esquema de imunização elaborado em nosso laboratório<sup>19, 30</sup>, foi obtida antitoxina perfringica tipo A, dosando ao redor de 200 UI/ml (tabela), que após a purificação e concentração pela digestão enzimática associado ao processo de termocoagulação proteica, seguida de precipitação fracionada pelo sulfato de amônio e diálise<sup>14</sup>, atingia níveis de 850 a 1000 UI/ml. Este soro, purificado e concentrado era finalmente diluído para apresentar 100 UI/ml de antitoxina perfringica tipo A, para compor o Soro antigangrenoso polivalente, e 300 UI/ml, quando se tratar de Soro antigangrenoso específico monovalente<sup>11</sup>.

TABELA

Níveis de antitoxina perfringica, observados em quatro cavalos, no decurso de cinco hiperimunizações

Cavalos n.º	Títulos em UI/ml					Média aritmética UI/ml
	Hiperimunização					
	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	
190	150	200	250	250	200	210
325	140	250	200	250	150	198
400	220	150	140	150	180	168
438	150	180	250	300	300	236

#### 4 — CONCLUSÕES

4.1 Utilizando-se *Clostridium perfringens* tipo A, estirpe SR-12, foi preparada toxina perfringica dosando cerca de 100 DL50/ml em camundongos.

4.2 O antígeno perfringico empregado na hiperimunização de cavalos era constituído de toxina e de suspensão bacteriana, portanto induzia a síntese de antitoxina dotada de atividade antibacteriana e de antitóxica.

4.3 O soro antigangrenoso perfringico apresentou título antitóxico da ordem de 200 UI de antitoxina perfringica tipo A por mililitro nas sangrias de prova.

4.4 A mistura de plasma resultante de várias hiperimunizações permitiu a obtenção de uma antitoxina purificada e concentrada, cujo título atingiu níveis da ordem de 850 a 1000 UI/ml, a qual foi convenientemente diluída para obtenção de soro antigangrenoso polivalente para fins terapêuticos.

RIALA6/515

SILVA, M.A.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E.P.T.; HIGASHI, H.G. & ROLIM ROSA, R.  
— Production of *Clostridium perfringens* type A antitoxin, on industrial scale.  
*Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(1):1-8, 1981.

ABSTRACT: A method is described for the preparation of *Clostridium perfringens* type A antitoxin, on industrial scale, by the hyperimmunization of horses with mixed alum-adsorbed antigen. With the use of the immunization method idealized in laboratory of Instituto Butantan, São Paulo, an antigangrenous *Cl. perfringens* type A antitoxin was obtained with a dosage of about 200 IU/ml, a titre that after concentration by Pope's method, increased to antitoxic levels of 850 to 1.000 IU/ml. The purified and concentrated antitoxin was conveniently diluted to constitute a polyvalent gas gangrene antitoxin.

DESCRIPTORS: gas gangrene; *Clostridium perfringens* type A antitoxin; antigens, bacterial; horses, immunization; antitoxins, gas gangrene *C. perfringens*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARR, M. & GLENNY, A.T. — Some practical applications of immunological principles. *J. Hyg., Camb.*, 44:135-42, 1945.
2. BIER, O.G. — *Bacteriologia e imunologia e suas aplicações à medicina e higiene*. 18.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Melhoramentos, 1977.
3. BITTNER, J.; OLARU, A.; POP, A.; POTORAC, E.; VOINESCO, V.; FICIU, E. & OPRISAN, R. — Hyperimmunisation tétravalente des chevaux producteurs de sérum antigangréneux. I. Hyperimmunisation successive. *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 23:253-60, 1964.
4. BITTNER, J.; STAVRI, D. & FICIU, S. — Méthode simple pour l'obtention constante d'une alpha-toxine perfringens a titre élevé. II. Rôle de la combinaison de glucides et de la température d'incubation. *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 23: 1037-44, 1964.
5. BITTNER, J.; ANDERLEANU, J. & CHERCIU, I. — Traitement complexe de la gangrène gazeuse. V. Effic du sérum antigangréneux polyvalent sur l'infection tétravalente du cobaye, réalisée d'après un modèle expérimental propre. *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 30:45-57, 1971.
6. BOYD, M.J.; LOGAN, M.A. & TYTELL, A.A. — The growth requirements of *Clostridium perfringens* (Welchii) BP6K. *J. biol. Chem.*, 174:1013-25, 1948.
7. BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. — *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
8. BURROWS, W.; MOULDER, J. W. & LEWERT, R.M. — *Tratado de Microbiologia*. 18 ed. Mexico, Edit. Interamericana, 1965. p.
9. EVANS, D.G. — The protective properties of the alpha antitoxin and antihyaluronidase occurring in *Cl. welchii* type A antiserum. *J. Path. Bact.*, 55:427-34, 1943.
10. EVANS, D.G. — The treatment with antitoxin of experimental gas gangrene produced in guinea-pigs by (a) *Cl. welchii*, (b) *Cl. oedematiens* and (c) *Cl. septicum*. *Brit. J. exp. Path.*, 26:104-11, 1945.
11. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil; oficializada pelo Governo Federal pelo Decreto n.º 45.502 de 27 de fevereiro de 1959. 2.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Siqueira, 1959.

12. FREDETTE, V. & FRAPPIER, A. — Recherches sur l'immunité dans la gangrène gazeuse. I. Valeur comparative des sérums antiperfringens de type antitoxique et de type mixte antitoxique-antibactérien. *Rev. canad. Biol.*, 5:436-41, 1946.
13. FREDETTE, V. & FRAPPIER, A. — Recherches sur l'immunité dans la gangrène gazeuse. II. Action déchaînant de filtrats non-toxiques de cultures de *Clostridium perfringens* dans la gangrène gazeuse expérimentale. *Rev. canad. Biol.*, 5:428-35, 1946.
14. FURLANETTO, R.S. — *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico*. São Paulo, 1961. p. 64-5. [Tese — Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo]
15. GUILLAUMIE, M. — Détermination du titre antitoxique des sérums anti-perfringens A, anti-vibrien septique, anti-histolytique et anti-oedematiens. Préparation, titrage et propriétés des toxines correspondantes. Contribution à l'étude de la toxine du Bac. perfringens A. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 66:204-47, 1941.
16. GUILLAUMIE, M. — Détermination du titre antitoxique des sérums anti-perfringens A, anti-vibriens septiques, anti-histolytiques et anti-oedematiens. Préparation, titrage et propriétés des toxines correspondantes. Contribution à l'étude de la toxine de Bac. perfringens A. Toxigenèse dans différents milieux. *Ann. Inst. Pasteur*, 66:329-78, 1941.
17. GUILLAUMIE, M.; KREGUER, A. & FABRE, M. — Propriétés et composition de la toxine de *Welchia perfringens*. I. Action hémolytique. *Ann. Inst. Pasteur*, 72:12-37, 1946.
18. HANSA, W.R. & BURNEY Jr., D.W. — Gas gangrene infection: combined treatment including 3.432.000 International Units of polyvalent gas gangrene antitoxin. *Nebraska med. J.*, 51:85-9, 1966.
19. HIGASHI, H.G.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E.P.T. & SILVA, M.A. — Preparação do soro antituberculínico tipo B, pela hiperimunização de cavalos, no Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43:77-85, 1978/79.
20. HOLDEMAN, L.V. & MOORE, W.E.C. — *Anaerobe Laboratory manual*. 3rd. ed. Blacksburg, Va., Virginia Polytechnic Institute/State University, 1975.
21. ITO, A. — Alpha toxoid of *Clostridium perfringens*. II. Immunogenicity of the toxoid. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 23:21-30, 1970.
22. LARCAN, A.; LAPREVOTE-HEULLY, M.C. & LAMBERT, H. — La gangrène gazeuse. Aspects étiologiques, cliniques et thérapeutiques d'actualité. *Nouv. Presse méd.*, 3:2493-6, 1974.
23. LOGAN, M.A.; TYTELL, A.A.; DANIELSON, I.S. & GRINER, A.M. — Production of *Clostridium perfringens* alpha toxin. *J. Immunol.*, 51:317-28, 1945.
24. MACFARLANE, M.G. & KNIGHT, B.C.J.G. — The biochemistry of bacterial toxins. I. The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem. J.*, 35:884-902, 1941.
25. MACFARLANE, M.G. — The therapeutic value of gas-gangrene antitoxin. *Brit. med. J.*, 2:636-40, 1943.
26. MACLENNAN, J.D. — The histotoxic clostridial infections of man. *Bacteriol. Rev.*, 26:177-276, 1962.
27. MÖLLBY, R.; HOLME, T.; NORD, C.E.; SMYTH, C.J. & WADSTRÖM, T. — Production of phospholipase C (alpha-toxin), haemolysis and lethal toxins by *Clostridium perfringens* types A to D. *J. gen. Microbiol.*, 96:137-44, 1976.
28. NAGLER, F.P.O. — Treatment of experimental gas gangrene due to *Clostridium welchii* with penicillin and antitoxin. *Brit. J. exp. Path.*, 26:57-63, 1945.
29. NORD, C.E.; MÖLLBY, R.; SMYTH, C. & WADSTRÖM, T. — Formation of phospholipase C and theta-haemolysin in pre-reduced media in batch and continuous culture of *Clostridium perfringens* type A. *J. gen. Microbiol.*, 84:117-27, 1974.
30. OLIVEIRA, E.P.T. — Estudos sobre a preparação do soro antituberculínico tipo A. *Mem. Inst. Butantan*, 36:1-40, 1972.
31. OWEN-SMITH, M.S. — Antibiotics and antitoxin therapy in the prophylaxis of experimental gas gangrene. *Brit. J. Surg.*, 55:43-5, 1968.
32. POPE, G. — Disaggregation of proteins by enzymes. *Brit. J. exp. Path.*, 19:245-51, 1938.
33. PREVOT, A.R. — *Biologie de maladies dues aux anaérobies*. Paris, Flammarion, 1955. p. 227-318.
34. REY CALERO, J. — *Microbiologia e immunobiologia de las enfermedades infecciosas*. Madrid, Marban, 1976. p. 359-72.
35. SOUTO, A.B. & RIVAROLA, J.B. — Preparación del suero antigangrenoso. I. Preparación del suero antiperfringens. *Mem. Inst. Butantan*, 12:393-433, 1938/39.
36. SOUTO, A.B. & FURLANETTO, R.S. — Investigação sobre o conteúdo de antitoxina do soro antigangrenoso. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 5:353-74, 1945.
37. TAROZZI, G. — Osservazioni sulla natura dei fenomeni che determinano la esigenza anaerobia nella culture dei germe anaerobia. *Atti Accad. Fisiocr.*, Siena, 17:1901-7, 1907.

38. TYTELL, A.A.; LOGAN, M.A.; TYTELL, A.G. & TEPPER, J. — Immunization of humans and animals with gas gangrene toxoids. *J. Immunol.*, 55:233-44, 1947.
39. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. National Institutes of Health. *Minimum requirements: Gas gangrene group of antitoxins*. Bethesda, Maryland, 1947.
40. VAN HEYNINGEN, W.E. — *Bacterial toxins*. Oxford, Blackwell, 1950. p. 23-42.
41. VINET, G.; FORGET, A. & FREDETTE, V. — Influence du glucose sur la formation du facteur déchainant et de la toxine par *Welchia perfringens* type A en bouillon VF. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 97:237-41, 1959.
42. VIRENQUE, Ch. — Traitement de la gangrène gazeuse. *Ann. Anesthesiol. franç.*, 16:1-4, 1975.
43. WADSWORTH, A.B. — *Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health*. 3rd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947.
44. WEINBERG, M. & GUILLAUMIE, M. — Obtention rapide, avec des antigènes englobés dans la lanoline, de sérums anti-gangréneux de titre antitoxique très élevé. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 124:518-21, 1937.
45. WORLD HEALTH ORGANIZATION — Expert Committee on Biological Standardization. Genève, 1971. Tech. rep. ser. 463.
46. YAMAMOTO, A.; ITO, A.; MURATA, R.; UEMATSU, N.; NAGAI, K. & MINOMO, K. — Hyperimmunization of horses with alpha toxoid of *Clostridium perfringens*. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 23:111-5, 1970.

Recebido para publicação em 15 de setembro de 1980.