

# SOROS ANTIANAERÓBIOS

ARIOSTO BÜLLER SOUTO

do Instituto Adolfo Lutz

CELSO RODRIGUES

do Instituto Biológico de São Paulo

*“Para consagrar o acerto e a realização daqueles dispositivos preciosos do nosso Regulamento, não há senão apelar para um esforço de conjunto, afim de que todos os nossos laboratórios, pelo menos aqueles que têm sobre os ombros o peso dos encargos oficiais, se inscrevam na tarefa de proteger, amanhã, os interesses da coletividade, empenhando-se num entendimento mútuo sobre o que poderá constituir, tão solidamente quanto o ficar provado, as bases de uma uniformização de técnicas”.* ARLINDO DE ASSIS.

Esclarecimentos necessários relativos à uniformização de técnicas oficiais para o controle e à interpretação da dosagem dos soros antigangrenosos e antitetânicos, nos Institutos Estaduais de Controle, constituem o motivo do presente trabalho.

## I — SORO ANTIGANGRENOSO

Diante de um caso de gangrena gasosa, existe sempre a incerteza quanto ao agente etiológico responsável e, portanto, quanto à antitoxina específica a ser empregada.

Devido à complexidade da flora da gangrena gasosa, o soro antigangrenoso dificilmente poderá conter tôdas as substâncias protetoras específicas contra os agentes infectantes encontrados nas infecções gangrenosas. E' porém necessário que contenha os anticorpos específicos contra os germes mais frequentes, tais como: o *Clostridium Welchii*, o *Clostridium septicum*, o *Clostridium Novyi*, o *Clostridium Sordellii*, o *Clostridium sporogenes* e outros. O efeito flora das gangrenas gasosas, agentes secundários, tais como o *Clostridium sordellii*, o *Clostridium sporogenes* e outros. O efeito

coadjuvante que resulta da coexistência dessas espécies microbianas em simbiose, explica, pelo sinergismo microbiano, a gravidade insólita que apresentam certas infecções gangrenosas. Essa sinergia de efeitos tóxicos tem grande importância, na evolução de certos tipos de gangrena gasosa.

Daí a importante consequência terapêutica resultante da concorrência dos antisoros específicos monovalentes antigangrenosos no soro polivalente. A ação reforçadora desses antisoros é do mais alto interesse, tanto na profilaxia, como no tratamento das feridas fortemente contaminadas.

Os antisoros antigangrenosos monovalentes agem sinèrgicamente, reforçando-se reciprocamente no soro polivalente. A *cataxia*, a *paraespecificidade dos soros* e a *sinergia* dos anticorpos, permitem explicar essa ação coadjuvante dos soros gangrenosos monovalentes nos soros polivalentes.

Denomina-se *cataxia* à ruptura de atividade da associação microbiana, isto é, do sinergismo microbiano, quando se neutraliza a toxina do germe dominante da infecção pelo antisoro específico, permitindo ao organismo dominar eficazmente os germes secundários de menor atividade no processo mórbido.

Na explicação do mecanismo da ação *paraespecífica do soro* é admitida a hipótese seguinte: os soros polivalentes exercem uma dupla ação — 1.º pelos anticorpos específicos de que são dotados; 2.º pelos anticorpos “normais” ou “inespecíficos” presentes no soro de grande número de espécies animais. Esses anticorpos “normais” ou “inespecíficos” são, em muitos casos, eficientes para ajudar o organismo a combater os germes secundários de associação. Além disto, os anticorpos “normais” ou “inespecíficos” existentes nos soros, reforçam de maneira considerável, o efeito dos anticorpos específicos que entram na composição do soro polivalente. Torna-se assim, o soro polivalente, muito mais ativo, pela ação *sinérgica* desses anticorpos “normais” ou “inespecíficos”.

\* \* \*

Tendo em conta a maior frequência do *Clostridium Welchii* na flóra das gangrenas, êle é considerado como o agente principal dessa infecção. Esta espécie é muito espalhada na natureza: foi encontrada em 100% das amostras de terra examinadas em 1917, em tôdas as frentes de batalha; foi encontrada em cerca de 99% das fezes humanas e em 90% dos casos de apendicite.

A rigor não existe um *Clostridium Welchii*, porém um grupo dessas bactérias. No grupo *Welchii*, o tipo humano é designado como tipo A, o tipo B é o *Clostridium agni*, o tipo C é o *Clostridium paludis* e o tipo D é o *Clostridium ovitoxicus*. Somente o tipo A, por suas propriedades toxicológicas e sorológicas oferece interesse na patologia humana.

O *Clostridium Welchii* tipo A produz uma exotoxina verdadeira, termolábil, neutralizada pela antitoxina específica; produz também, nos meios glicosados, um veneno de ação aguda, não específico, capaz de matar instantaneamente os camundongos inoculados por via venosa. A toxina verdadeira possui diferentes fatores tóxicos:

a) hemotóxicos: hemolisinas, hemoaglutininas, leucoaglutininas;

b) não hemotóxicos: neurotóxicos, miotóxicos, hepatóxicos,

A imunização de animais com a exotoxina *Welchii* tipo A, rica de diferentes componentes tóxicos, produz um soro antitóxico específico capaz de neutralizar esses componentes tóxicos nos seus efeitos hemolítico, necrosante e na toxicidade geral.

Baseia-se o processo de dosagem do soro antitóxico na neutralização de alguns desses efeitos tóxicos. Foi verificada a possibilidade de certos desses fatores tóxicos não estarem presentes na toxina que serviu para a produção da antitoxina específica. É lógico que, estando ausentes, esses fatores tóxicos, não produzirão os fatores antitóxicos correspondentes. Assim, os soros que contenham somente alguns fatores antitóxicos, jamais poderão neutralizar a totalidade dos fatores tóxicos, tanto "in vitro" como "in vivo". E isto é possível verificar experimentalmente. Com efeito, as dosagens feitas em animais, pelos mesmos métodos e com os mesmos soros, mas não com as mesmas toxinas, podem fornecer resultados discordantes, ultrapassando grandemente os limites do erro. Porém, se forem sempre empregados nessas dosagens os mesmos métodos e "toxinas equivalentes", serão obtidos resultados estatisticamente aceitáveis, tendo em conta o número de animais empregados.

É possível afastar, em grande parte, as diferenças de resultados observadas, quando se realizam as medições de antitoxinas por meio de toxinas cujo conteúdo de fatores tóxicos é equivalente.

O efeito tóxico da toxina do *Clostridium Welchii* foi primeiramente atribuído à toxina hemolítica "alfa" sendo, posteriormente, ligado à toxina "beta". A toxina "beta" é presentemente aceita

como sendo o fator principal da intoxicação perfríngica, representando a toxina “alfa” um fator de importância secundária. Esses diversos fatores são produzidos desigualmente pelas diferentes amostras de *Clostridium Welchii*, variando grandemente a sua proporção nas diferentes toxinas, o que permite explicar as diferenças dos resultados das dosagens de antitoxinas quando se empregam toxinas não equivalentes produzidas por amostras de *Clostridium Welchii*.

Nós consideramos como “toxinas equivalentes” as toxinas ricas de “toxina beta” e, para as dosagens do soro anti *Welchii* aconselhamos empregar só toxinas cujo conteúdo de “alfa toxina” — proporcionalmente ao conteúdo de “beta toxina” — seja diminuto. Somente com essas toxinas é permitido esperar determinações uniformes do poder neutralizante dos soros em relação à toxina “beta”. Toxinas ricas de fator “alfa” produzem resultados duvidosos nas dosagens não dando títulos reais e sim títulos aparentes.

O teor de toxina “alfa” poderá ser dosado pela verificação do conteúdo de hemolisinas “in vitro”.

Assim, só deverão ser empregadas, quer no preparo quer na dosagem dos soros anti *Welchii*, toxinas sem ou com ação hemolítica muito reduzida.

Não se pôde confirmar a hipótese de que com o uso de toxinas oriundas de culturas de amostras “unicelulares” os resultados seriam mais exatos.

Contudo, os resultados mais exatos ainda são obtidos quando se emprega a mesma amostra de germe toxigênico e se utilizam técnicas uniformes no preparo do meio de cultura e da toxina.

O emprêgo de meios de cultura de composição uniforme, permite obter toxinas de composição mais constante em relação aos seus diferentes fatores tóxicos.

Ao lado do soro anti *Welchii*, entram na composição do soro antigangrenoso polivalente vários outros soros monovalentes; assim, o soro anti *Clostridium septicum* é ativo contra a toxina e produtos tóxicos desse germe.

O *Clostridium septicum* produz uma exotoxina genuína que atua quase sem período de incubação. Doses tóxicas sublimiares nada produzem no animal de experiência, ao passo que, doses ligeiramente superlimiares produzem 100% de mortes. Esses efeitos tóxicos da toxina *Clostridium septicum* que seguem a lei do tudo ou nada, foram bem verificados por Lautenschläger e por nós.

O *Clostridium Novyi* é outro agente primário da gangrena gasosa. Nos meios de cultura esse germe produz exotoxina após 5 a 6 dias de incubação. A toxina do *Clostridium Novyi*, quando inoculada on animal de laboratório, necessita certo período de latência antes de fazer aparecer os sintomas de intoxicação.

O *Clostridium histolyticum* é considerado, por certos autôres, como agente secundário da gangrena gasosa. A toxina do *Clostridium histolyticum* produz no corpo humano e nos animais de laboratório as lesões mais terríveis observadas na gangrena gasosa. Para a toxina histolítica não existem barreiras. Transforma tudo em um líquido sanguinolento.

No preparo do sôro antigangrenoso, reúnem-se as diferentes antitoxinas monovalentes para os diferentes germes da gangrena, obtidas separadamente. Para essa reunião de antisoros monovalentes, toma-se por base a frequência relativa dos germes anaeróbios nas gangrenas gasosas. Assim, a antitoxina do *Clostridium Welchii* que é observado em 60 a 80% dos casos, entra em maior proporção e, as antitoxinas do *Clostridium Novyi*, presente em 5 a 35%, do *Clostridium septicum*, em 15 a 30% e do *Clostridium histolyticum*, em 2%, entram em quantidades proporcionalmente decrescentes.

Este método de mistura das antitoxinas monovalentes, para o preparo do sôro polivalente, é um método simplista sujeito a críticas. Notadamente se considerarmos que nenhum trabalho foi feito entre nós, para comprovar, nos casos de gangrena gasosa, da exatidão das frequências relativas dos diferentes agentes etiológicos.

\* \* \*

Passemos agora à questão relacionada com a interpretação dos títulos de dosagens do sôro antigangrenoso.

Um dos grandes problemas relativos à soroterapia antigangrenosa é o título de dosagem dos soros do comércio, isto é, do seu conteúdo real em antitoxina.

Na "Conferência Cirúrgica Inter-Aliada sôbre a Gangrena Gasosa", Wright já se admirava e, com justa razão, que os cirurgiões empregassem soros antigangrenosos sôbre os quais não possuíam qualquer indicação quanto ao conteúdo antitóxico.

Os trabalhos sôbre os soros antigangrenosos empregados na guerra, vieram demonstrar que os mesmos eram absolutamente fracos e que alguns soros alemães não possuíam qualquer valor anti-

tóxico específico. Prigge (1937) antes de ser iniciada a presente guerra, por ordem do Ministério da Guerra da Alemanha, tendo em conta as necessidades daquela nação, controlou os estoques dos soros antigangrenosos existentes no mercado alemão e verificou que vários desses soros examinados não continham antitoxina alguma.

Daf a conclusão de Prigge (1937) porquê, até agora, não foi possível julgar do justo valor profilático e terapêutico do soro antigangrenoso.

Com raras exceções, no Brasil os soros antigangrenosos em geral estão sofrendo contrôlo deficiente de dosagem pelos laboratórios comerciais, devido às dificuldades técnicas e à falta de técnicos especializados.

Vários laboratórios nacionais nos enviam consultas frequentes sobre a interpretação do resultado das dosagens dos soros antigangrenosos. A êste respeito as publicações sobre o preparo do soro antigangrenoso são omissas. Nada consta nas "Vorschriften für die Staatliche Priifung des Gasbrand (perfringens) Sera" — do Ministério da Guerra da Alemanha, de 1937.

Prigge (1937), em sua publicação "Uber Wirksamkeit und Antitoxingehalt des Gasbrandseruns" nada esclarece a êste respeito. Na monografia que um de nós publicou com Rivarola "Preparacion del suero antigangrenoso" (Souto e Rivarola, 1938) não abordámos o assunto.

Bengtson (1931, 1934, 1936), nos vários padrões oficiais dos Estados Unidos, relativos aos soros antigangrenosos, não se deteve sobre a questão.

No estudo comparativo dos padrões antigangrenosos soviéticos e internacionais, Glotova (1937) é omissa a êsse respeito.

Jensen (1936), Hartley e White (1935), Walburn e Reymann (1935, 1936), Weinberg, Davesne e Prevot (1932), Weinberg e Guillaumie (1936, 1937) e os numerosos "Rapport de la Comission Permanente de Standartisation Biologique" (1931, 1935) não trataram da interpretação do resultado das dosagens dos soros antigangrenosos.

Estabelecendo as técnicas padrões para dosagem do soro antigangrenoso, a "Comissão Permanente de Padronização Biológica da Organização de Higiene da Liga das Nações" recomendou sua adoção oficial.

Glotova (1937) criticou nessas técnicas as unidades e a via de introdução adotadas para certos soros e Weinberg (1936) verificou

que os títulos antitóxicos obtidos em certos soros eram aparentes e não reais.

A interpretação dos títulos de dosagem dos soros antigangrenosos é, pois, uma das razões da presente nota. Vamos definir primeiramente as unidades, as test-dose e, depois, a interpretação dos resultados, não passaremos em revista a questão da preparação e da dosagem do soro, porquê, em trabalho anterior, um de nós (Souto e Rivarola, 1938), já tratou longamente desse assunto.

A Comissão de Padronização Biológica assim especificou as diferentes 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 e específica exercida por 0,2377 mg. da antitoxina sêca e estável conservada no "Institute Pasteur" de Paris;
- c) para o *Clostridium Novyi*, a unidade antitóxica é a atividade antitóxica exercida por 0,2681 mg. da antitoxina sêca e estável, conservada no "Statens Serum Institute" de Copenhagen;
- 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 Copenhagen.

Essas preparações sêcas e estáveis ou padrões (standards) são conservadas também em outros Institutos Oficiais de Contrôlo.

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

Quantidades rigorosamente pesadas dessas preparações sêcas e estáveis, dissolvidas em mistura de duas partes de glicerina, duplamente destilada, e uma parte de salina a 0,85%, constituem os solutos padrões. Esses solutos padrões são enviados periodicamente pelos Institutos Oficiais de Contrôlo aos laboratórios interessados no preparo dos soros antigangrenosos. Os solutos padrões, conservados na obscuridade e à temperatura de 0 a 5°C., segundo verificamos, mantêm-se estáveis até 10 meses, não devendo ser usados, porém, além do prazo prescrito pelo Instituto remetente.

Os soros antigangrenosos são titulados em unidades internacionais, com a mesma exatidão que os demais soros padronizados. Baseia-se o processo de dosagem em animal, na comparação do efeito de um *soluto padrão*, e do sôro a ser examinado, em relação a test-dose da toxina. As definições das test-doses de toxinas variam de acôrdo com as toxinas em consideração.

Vamos definir rapidamente as várias "test-doses":

I — *Clostridium Welchii* (*perfringens*) — A test dose internacional (Lt) de toxina *Welchii* é a quantidade de toxina *Welchii* que, misturada a 1/5 de unidade antitóxica internacional de antitoxina padrão anti-*Welchii*, provoca a morte de alguns, porém não de todos os camondongos, de 17 a 20 grs., inoculados por via venosa.

A test dose francesa — (Weinberg e Guillaumie (1936)), de toxina *Welchii* é a quantidade de toxina *Welchii* que, misturada a uma unidade antitóxica de antitoxina padrão anti *Welchii* (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 anti *Welchii* fôr determinado com 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 aconselhável adotar a unidade de toxina como base para determinações porquê a mesma está baseada na definição da D.M.L. A definição da D.M.L. pode ser motivo de controvérsia. Se a maioria dos autores admitem como D.M.L. a quantidade de toxina que mata cêrca de 50% dos camondongos inoculados com o pêso variante entre 17 e 20 grs., outros, como Benzoni (1938) consideram a D.M.L. como a menor quantidade de toxina que mata 100% dos camondongos de 17 grs. de pêso; assim estas divergências são susceptíveis de ocasionar diferenças muito acentuadas nos resultados finais.

II — *Clostridium septicum* (*oedematis* — *maligni*) — A test dose (Lt) de toxina *Clostridium septicum* é a quantidade de toxina que, misturada a uma unidade antitóxica internacional

de antitoxina padrão anti-*Clostridium septicum*, provoca a morte de alguns, porém, de nem todos os camondongos de 17 a 20 grs., inoculados por via venosa.

III — *Clostridium Novyi (oedematiens)* — Test-dose (Lt) de toxina *Novyi* é a quantidade de toxina *Novyi* que, misturada a dois centésimos de unidade antitóxica internacional de antitoxina padrão anti-*Clostridium Novyi*, provoca a morte de alguns mas não de todos os camondongos de 17 a 20 grs., inoculados por via muscular.

IV — *Clostridium histolyticum* — Test dose (Lt) de toxina *histolyticum* é a quantidade de toxina *histolyticum* que, misturada a uma unidade antitóxica internacional de antitoxina padrão, anti-*Clostridium histolyticum*, provoca a morte de alguns, mas não de todos os camondongos de 17 a 20 grs., inoculados por via venosa.

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

O fator individual só poderá ser menos presado, se forem empregadas séries grandes de animais, capazes de assegurar resultados estatisticamente aceitáveis. Infelizmente isto é extremamente difícil, dentro das possibilidades práticas. Assim, o uso de pequenas séries de animais, o único aplicável dentro das finalidades de rotina, está sujeito a erros.

Nem sempre é possível esperar que sobrevivam 50% dos animais inoculados e que morram 50% nas séries animais; o número de sobreviventes poderá ser bastante variável: assim, por exemplo, si empregamos séries de 6 animais poderemos ter: 2/6, 4/6, e até 1/6. Estas variações devem ser tomadas em consideração quando se organizam os coeficientes morte-sobrevida.

São considerados dosando bem os soros que, comparados com o sôro padrão, protegem um número maior de animais ou número aproximado àqueles protegidos pelo sôro padrão. Essa comparação é impossível quando todos os animais testemunhas morrem ou

quando todos os animais sobrevivem. É, pois, necessário usar várias séries de testemunhas: séries inoculadas com quantidades de toxinas exatamente correspondentes à test-dose e ao sôro padrão e séries com quantidades mínimas de toxina, superiores e inferiores à test-dose empregada.

Passemos agora a interpretar os resultados das dosagens baseados nas definições descritas acima.

#### *Antitoxina Welchii*

1 cm<sup>3</sup> da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.

Diluindo 1 cm<sup>3</sup> da antitoxina padrão em 19 cm<sup>3</sup> de salina, obtém-se uma solução em que 1 cm<sup>3</sup> contém uma unidade, donde 0,2 cm<sup>3</sup> contém 1/5 de unidade. Assim, 0,2 cm<sup>3</sup> da diluição do sôro a ser examinado, que protege aproximadamente 50% dos camundongos inoculados, é equivalente a 1/5 de unidade do sôro padrão.

#### *Antitoxina septicum*

1 cm<sup>3</sup> de antitoxina padrão internacional contém 50 U. I.

Diluindo 1 cm<sup>3</sup> da antitoxina padrão em 9 cm<sup>3</sup> de salina, obtém-se uma diluição em que 1 cm<sup>3</sup> contém 5 unidades, donde 0,2 cm<sup>3</sup> contém uma unidade. Assim, 0,2 cm<sup>3</sup> da diluição do sôro a ser examinado, que protege aproximadamente 50% dos camundongos inoculados, sendo equivalente a 1 unidade padrão, 1 cm<sup>3</sup> do sôro em prova equivale a 5 unidades.

#### *Antitoxina histolyticum*

1 cm<sup>3</sup> da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.

Diluindo 1 cm<sup>3</sup> da antitoxina padrão em 3 cm<sup>3</sup> de salina, obtém-se uma solução em que 1 cm<sup>3</sup> contém 5 unidades, donde 0,2 cm<sup>3</sup> contém uma unidade. Assim, 0,2 cm<sup>3</sup> da diluição do sôro a ser examinado, que protege aproximadamente 50% dos camundongos inoculados, sendo equivalente a 1 unidade padrão, 1 cm<sup>3</sup> do sôro em prova equivale a 5 unidades.

*Antitoxina Novyi*

1 cm<sup>3</sup> da antitoxina padrão internacional contém 20 U. I.

Diluindo 1 cm<sup>3</sup> da antitoxina padrão em 99 cm<sup>3</sup> de salina, obtém-se uma solução em que 1 cm<sup>3</sup> contém 0,2 unidades. Assim 0.1 cm<sup>3</sup> da diluição do sôro a ser examinado, que protege aproximadamente 50% dos camondongos inoculados sendo equivalente a 0,02 unidade padrão, 1 cm<sup>3</sup> do sôro em prova equivale a 0,2 unidade padrão, 1 cm<sup>3</sup> do sôro em prova equivale a 0,2 unidade e 5 cm<sup>3</sup> equivalem a uma unidade.

\* \* \*

Achamos útil adotar como base para uniformização das técnicas para o exame oficial dos soros antigangrenosos, nos Institutos oficiais, as instruções que o Ministério da Guerra da Alemanha fez expedir para o exame oficial do sôro antigangrenoso anti *Welchii*. Essas instruções poderão servir também como norma diretriz para o exame oficial dos demais soros antigangrenosos nos Institutos Estaduais de Contrôlo e de base para uniformização da técnicas.

## ANEXO

*Instruções para o exame oficial dos soros gangrenosos  
(Welchii)*

- § 1. (1) Os soros contra a toxina do principal causador da gangrena (*Cl. welchii*) ou que contêm um componente contra a toxina deste germe, deverão ser entregues, antes de postos no mercado, ao exame oficial.
- (2) Os soros gangrenosos (*Welchii*) que contêm um componente antitóxico já oficialmente examinado, serão provados segundo as instruções a este respeito. O exame será completado pela medição do valor indicada sob § 13.
- § 2. (1) Os soros não devem conter mais de 0,5% de fenol ou 0,4% de tricresol. Tôdas as adições devem ser feitas antes da entrega do produto aos fiscais oficiais.
- (2) O sôro deve conter no mínimo 100 unidades de antitoxina gangrenosa (*Welchii*) em 1 cm<sup>3</sup>.

*Entrega para o exame oficial*

- § 3. (1) A pedido do fabricante o fiscal oficial deve proceder ao exame oficial dos soros.
- (2) O fiscal recebe o soro a ser examinado em um recipiente com número de controle, dando um recibo e registrando a entrada em seu livro oficial.
- § 4. (1) Se o soro é preparado de tal maneira, que as mesmas misturas são feitas em diversos recipientes, o fiscal deve controlar o preparo das misturas, convencendo-se de sua igualdade completa, afim de dar aos recipientes o mesmo número de controle. Neste caso ele deve registrar no seu livro oficial os números das operações de cada porção e anotar a composição das misturas feitas em sua presença.
- (2) Se uma quantidade maior de soro é distribuída em vários recipientes, a distribuição também deve ser feita na presença do fiscal, afim de se dar o mesmo número de controle às diversas porções. Sobre esta distribuição feita em sua presença, o fiscal deve fazer registros exatos em seu livro.
- § 5. (1) Para o exame oficial deve retirar-se de cada soro na presença do fiscal:
- a) 6 amostras de sempre 5 cm<sup>3</sup>;
  - b) 4 amostras de sempre 10 cm<sup>3</sup>;
  - c) 4 amostras de sempre 5 cm<sup>3</sup>;
- colocando-as em recipientes estereis.
- (2) Quando o soro for entregue em vários recipientes originais ao fiscal, deve retirar-se as amostras mencionadas sob a) e b) de cada recipiente, marcando-as correspondentemente. As amostras mencionadas sob c) devem conter uma mistura composta de partes iguais do conteúdo dos vários recipientes.
- § 6. Os frascos com as amostras devem ser lacrados, antes da entrega ao Instituto Estadual de Controle, em presença do fiscal e providos de uma etiqueta, indicando o nome exato do soro, número de controle e, na conservação do estoque em diferentes recipientes originais, a indicação exata do recipiente de conservação e o dia de retirada das amostras.

§ 7. O laboratório onde foi feito o sôro deve mandar acompanhar a remessa por um cartão do modelo A, que deve conter indicações exatas quanto ao teor de fenol e tricresol, esterilidade, o comportamento na experiência animal e o teor de antitoxina do sôro. Além disso, devem ser anotados os números e as espécies dos animais, dos quais foi tirado o sôro, a quantidade, o conteúdo e as marcas dos recipientes de conservação; o fiscal deve conferir o cartão, passando o visto. Se se tratar de soros entregues ao fiscal em vários recipientes originais, o Instituto Estadual de Controle exigirá indicações complementares quanto ao preparo e composição das misturas.

§ 8. Depois de retiradas as amostras os recipientes devem ser lacrados em presença do fiscal e conservados em uma sala sob a responsabilidade dêste.

#### *Exame oficial*

§ 9. O sôro deve ser claro, mostrando muito pouco sedimento; sôro com turvação nítida, permanente, ou com sedimento grande não pode ser admitido.

§ 10. Cada sôro deve ser examinado quanto ao seu teor de albumina; êste não pode exceder 12%. A determinação do teor de albumina é feita segundo os métodos químicos comuns.

§ 11. (1) Para o exame da esterilidade deve colocar-se sempre 4-5 gotas de sôro em:

- a) um tubo de ágar-peptona de carne;
- b) um tubo de ágar-glicosado (camada alta);
- c) um tubo de caldo de cultura;
- d) um tubo de caldo glicosado
- e) um tubo de caldo de fígado,

misturando-se bem com o meio de cultura. O conteúdo do primeiro tubo é colocado em placa.

- (2) As culturas a), b), c), e d), devem ser observadas durante 6 dias na estufa a 37°C. A cultura e) deve ser incubada durante 10 dias sob isenção de oxigênio a 37°C. Se durante êste tempo se desenvolverem germes no sôro, êste deve ser recusado.
- (3) Se no exame bacteriológico o conteúdo de um dos recipientes se mostrar contaminado, enquanto que

as amostras retiradas dos outros recipientes se mostram estéreis, só não se deve admitir o recipiente do qual fôra retirada a amostra contaminada.

- § 12. (1) Para a verificação do teor de substâncias impedi-dentes (antisépticas) inoculam-se subcutanea-mente 0,5 cm<sup>3</sup> do sôro em um camondongo. Se o animal apresentar sintomas, dos quais se deduz uma porcentagem elevada de fenol ou tricresol no sôro, ou conteudo elevado de substâncias tóxicas, não se deve admitir êste sôro.
- (2) Para o exame da inocuidade inoculam-se, além dis-so, por via subcutânea, 10 cm<sup>3</sup> de sôro em cobaia. O animal não deve apresentar sintomas de infec-ção durante os 6 dias consecutivos.
- (3) Se o conteudo de um recipiente se mostrar nocivo, deve recusar-se todo o sôro.

- § 13. (1) Como padrão para a medição do valor serve um sôro Standard de conteudo antitóxico exatamente conhecido, conservando em porções sêcas e em tu-bos de vácuo no Instituto Estadual de Controle. Quantidades bem dosadas dêsse sôro standard são dissolvidas em uma mistura de duas partes de gli-cerina duplamente destilada e uma partê de solu-ção fisiológica a 0,85% de maneira a se formar uma solução mãe, contendo 50 unidades antitóxicas por 1 cm<sup>3</sup>.
- (2) Como toxina test serve uma toxina sêca retirada de culturas micromanipuladas de bacilo gangrenoso (*Cl. welchii*) de atividade sempre igual, se-cada em porções, dividida e colocada em tubos de vácuo. Como toxinas test empregam-se toxinas sêcas que, na experiêcia do tubo de ensaio, não possuem nenhum ou muito pequeno efeito hemolí-tico contra as hemátias de carneiro.
- (3) Como dose de exame emprega-se a dose L + 50 (0,2 de unidade antitóxica) da toxina padrão, isto é, uma dose de toxina que, após mistura com 0,2 de unidade antitóxica, produz morte dentro de 48

horas em mais ou menos metade dos animais de experiência. Para sua determinação misturam-se quantidades gradativas da toxina padrão com 0,2 unidades antitóxicas no volume de 0,5 cm<sup>3</sup>, injetando-se após conservação durante 1 hora em temperatura ambiente, em camundongos brancos de 16-18 grs. de pêso, por via intravenosa. O valor médio determinado por experiências realizadas em épocas diferentes do ano deve ser empregado como test dose de exame.

- (4) Para realização do exame dissolvem-se porções dosadas da toxina test em uma quantidade de solução tampão isotônica de cloreto-fosfato de sódio (blutisotonische Kochsalz-Phosphat Pufferlösung), medidas com pipetas padrão (pH = cêrca de 7,3), de maneira tal, que em 1 cm<sup>3</sup> esteja contido o quádruplo da dose necessária para o exame.
- (5) Do soluto mãe do sôro standard faz-se uma diluição com soluto tampão, usando pipetas padrão de maneira que em 1 cm<sup>3</sup> esteja contida uma unidade antitóxica.
- (6) Da mesma forma faz-se uma diluição do sôro a ser examinado, que corresponde aproximadamente à indicação do valor expresso pelo fabricante, devendo conter cada 1 cm<sup>3</sup>, 1 unidade antitóxica.
- (7) Para a determinação do valor misturam-se quantidades de 0,25 — 0,22 — 0,20 — 0,18 e 0,16 cm<sup>3</sup> da diluição feita dos solutos mãe do sôro standard, correspondendo a 0,25 — 0,22 — 0,20 — 0,18 e 0,16 unidades antitóxicas e quantidades iguais da diluição feita do sôro a ser examinado, sempre contido no mesmo volume de líquido (0,25 cm<sup>3</sup>), com 0,25 cm<sup>3</sup> do soluto da toxina test. As diversas misturas são injetadas, após conservação durante uma hora em temperatura ambiente, em camundongos brancos do pêso de 16-18 grs. por via intravenosa. Para o exame de cada mistura devem ser usados seis camundongos.

(8) Por conseguinte recebem:

Camondon- gos Série	Diluição de sôro (VO 1:0,25 cm <sup>3</sup> )		Soluto de toxina
1	2		3
1	Sôro Standard	0,25 cm <sup>3</sup> = 0,25 UA <sup>(1)</sup>	0,25 cm <sup>3</sup> (Test - dose)
2	" "	0,22 cm <sup>3</sup> = 0,22 UA	0,25 cm <sup>3</sup> " "
3	" "	0,20 cm <sup>3</sup> = 0,20 UA	0,25 cm <sup>3</sup> " "
4	" "	0,18 cm <sup>3</sup> = 0,18 UA	0,25 cm <sup>3</sup> " "
5	" "	0,16 cm <sup>3</sup> = 0,16 UA	0,25 cm <sup>3</sup> " "
6	Sôro examinado	0,25 cm <sup>3</sup>	0,25 cm <sup>3</sup> " "
7	" "	0,22 cm <sup>3</sup>	0,25 cm <sup>3</sup> " "
8	" "	0,20 cm <sup>3</sup>	0,25 cm <sup>3</sup> " "
9	" "	0,18 cm <sup>3</sup>	0,25 cm <sup>3</sup> " "
10	" "	0,16 cm <sup>3</sup>	0,25 cm <sup>3</sup> " "

(9) O tempo de observação dos animais é de dois dias. Se durante êste período o sôro examinado proteger um número maior, ou, mais ou menos o mesmo número de animais com vida que o sôro standard, é aprovado com a indicação do valor dada pelo fabricante. O sôro examinado que conservar menor número de animais com vida que o sôro standard, deverá ser recusado.

§ 14. (1) Quando o sôro é conservado em vários recipientes originais, deve proceder-se ao exame indicado sob § 11 e 12 com amostras de cada recipiente.

(2) O exame descrito sob § 13 de um sôro conservado em diversos recipientes, é feito uma só vez com as amostras indicadas sob § 5 c).

#### *Distribuição do sôro*

§15. O Instituto Estadual de Controle comunica o resultado do exame oficial ao fabricante, enviando-lhe o boletim do modelo B.

(1) UA = unidade antitóxica.

§ 16. (1) O fiscal oficial é responsável para que os soros gangrenosos (*Welchii*) oficialmente examinados sejam postos no comércio com rótulo “aprovado oficialmente”, desde que o exame tenha sido satisfatório.

(2) A retirada do sêlo de chumbo dos recipientes originais, o enchimento das empolas e o lacramento destas só podem ser feitos na presença do fiscal e segundo as determinações de suas indicações oficiais.

§ 17. Na etiqueta das empolas devem constar as seguintes indicações:

- a) local da fabricação (fabricante);
- b) nome exato do sôro;
- c) número de contrôle;
- d) indicação do valor;
- e) o rótulo “aprovado oficialmente”, como também a indicação do local e data do exame;
- f) até que data o sôro pode ser empregado (§ 20).

§ 18. O sôro que à base do exame oficial foi verificado não corresponder às exigências, é devolvido pelo fiscal ao fabricante, registrando-se o fato no livro oficial.

§ 19. O Instituto Estadual de Controle deve ordenar a retirada imediata de um sôro, cujo reexame mostrou uma diminuição do teor antitóxico de mais de 10% abaixo do valor indicado originalmente ou, então, se uma outra verificação qualquer coíbe a aplicação do sôro.

§ 20. Os soros examinados oficialmente são retirados em série do mercado, por ordem do Instituto, depois de três anos a contar da data do exame, devido ao vencimento do tempo de garantia certificada oficialmente.

§ 21. Nas farmácias não pode ser conservado ou vendido sôro, cuja retirada do mercado já tenha sido publicada.

MODELO A

CARTÃO N.º .....

PARA O INSTITUTO ESTADUAL DE CONTRÔLE

do sôro gangrenoso enviado por .....  
em..... de..... de.....  
N.º de contrôle (livro oficial).....  
Denominações (número dos animais doadores de sôro) .....  
.....  
Dia da sangria .....  
Quantidade de sangue .....  
Quantidade total de sôro .....  
Denominação e conteudo dos recipientes diversos .....  
Quantidade de sôro enviada para exame .....  
Espécie e quantidade de substâncias impiedientes adicionadas .....  
.....  
Resultado do exame no local de preparo: .....  
Animais de experiência N.º .....  
Indicação do valor ..... vêzes  
(1 cc. = ..... UA)  
Comportamento .....  
Conteudo em germes .....  
Dia da retirada oficial das amostras destinadas ao Instituto Estadual de  
Contrôle .....  
Dia da remessa para o Instituto Estadual de Contrôle .....  
Observações: .....  
.....

Assinaturas

Do fiscal oficial

e

do representante do fabricante

.....

.....

MODELO B

BOLETIM

sobre o resultado do exame oficial do soro antigangrenoso enviado por .....

.....

com cartão n.º .....

em .....

recebido em ..... de manhã  
à tarde

N.º de controle (livro oficial) .....

Quantidade enviada para o exame .....

I. O soro corresponde às exigências legais e possui valor indicado  
de ..... unidades antitóxicas em 1 cc.

II. O soro foi recusado, porque .....

O Instituto Estadual de Controle exige a taxa de exame de ..... Cr\$

Observações .....

.....

....., de ..... de .....

(Carimbo de officio)

O Diretor do Instituto de Controle

.....

(Assinatura e indicação do cargo).

.....

## II — SORO ANTITETÂNICO

São descritas aqui modificações da técnica de dosagem da toxina e do soro que, em nossas mãos, produziram resultados satisfatórios.

O soro antitetânico é exclusivamente antitóxico. Por isso, é dosado com a toxina do *Clostridium tetani*, medindo-se a capacidade neutralizante de proporções variáveis do soro contra doses fixas de toxina.

Para isso, deixa-se em contacto quantidade constante de toxina com quantidades diferentes de uma diluição apropriada de soro a dosar, inoculando-se a mistura subcutaneamente, em camundongo ou em cobaia, após determinado período de contacto.

Na execução de uma dosagem de soro antitetânico, requer-se:

- a) *toxina padrão*. Esta pode ser fornecida pelo "National Institute of Health", ou ser preparada no próprio laboratório;
- b) *soro padrão*. Fornecido pelo "National Institute of Health", e também por outras instituições. Em tese, também pode ser preparado no laboratório.

As toxinas líquidas, obtidas por filtração de cultura de "*Clostridium tetani*", não são apropriadas para servir como toxina padrão. Para serem utilizáveis, devem ser previamente precipitadas, e depois padronizadas. Um bom método de precipitação é o descrito por Istrati e atribuído a Kirksch. Consiste na saturação do caldo tóxico por sulfato de sódio e subsequente junção de sulfato de amônio, até que o precipitado antes de formado, sobrenade francamente. A vantagem do método é obter um precipitado menos ácido que sobrenada mais facilmente e que, sendo mais compacto, escorre melhor. O seguinte protocolo ilustra o processo:

Cultura em caldo de coração peptonado, sob vaselina:

Volume do filtrado .....	5.000 cm <sup>3</sup>
Sulfato de sódio, juntado lentamente, até saturar .....	appte. 1.800
Sulfato de amônio, até sobrenadar o precipitado .....	appte. 1.000

O precipitado colhido com escumadeira de tela estanhada é escorrido e colocado em placa de Petri de 15 cm<sup>2</sup>. Esta é disposta

num dissecador hermêticamente fechado contendo cloreto de cálcio, onde é feito vácuo de 600 mm.Hg., indo em seguida para à estufa a 37°C., aí permanecendo 48 horas.

Estando o preparado perfeitamente sêco, é passado para um gral e moído, sendo, em seguida, peneirado em tamiz de seda, tudo feito dentro de um aparelho protetor, envidraçado. O pó obtido em pesafiltros sêco, é conservado no escuro, na geladeira, no vácuo de um dissecador fechado, contendo cloreto de cálcio.

A toxina padrão, fornecida pelo "National Institute of Health", é recebida sêca. As toxinas usadas em laboratório devem ter os seus índices perfeitamente estabelecidos: importa fazer as seguintes medições:

- a) *DLM (Dose letal mínima)* — Convencionada como a menor dose de toxina capaz de matar a cobaia de 350g. em 96 horas, ou o camondongo de 20 g. em 6 dias.
- b) *L+ (Limes mortis)* — A quantidade de toxina que, misturada a 1 test-dose (TD) de sôro antitetânico, provoca a morte do animal de prova. Sendo a medição praticada em cobaia, o prazo de observação é de 96 horas; sendo praticada em camondongo, o prazo é de 6 dias.

Para determinar o DLM, procede-se da seguinte maneira:

- a) Medidas preliminares:

Material necessário: Tubos neutros;  
 Pipetas certificadas;  
 Balões certificados;  
 Dedais ou mamadeiras;  
 Seringas de precisão;  
 Pesa-filtros;  
 Microespátula.

Tôda a vidraria deve ser rigorosamente desengordurada pela permanência em solução sulfocrômica, e convenientemente lavada com água destilada. Em seguida será sêca em estufa ou fôrno, com exceção do aparelhamento certificado, que secará naturalmente. Também as seringas devem estar perfeitamente sêcas.

- b) Técnica da dosagem:

Tratando-se de uma toxina de teor desconhecido é conveniente fazer primeiro uma dosagem de largos limites, para, numa segunda série, aproximar melhor os intervalos medidos. Pode-se prever

para uma toxina sêca um teor variando entre 500.000 e 5.000.000 DLM por centímetro cúbico, de acôrdo com a pureza do precipitado obtido. Um primeiro "test" deverá abranger estas duas dosagens extremas. Para isso, devemos diluir inicialmente a toxina a 1/500.000, da seguinte maneira:

Verificada a balança, toma-se com uma pinça apropriada, um pesa filtros sêco e coloca-se em um dos pratos. Tara-se em seguida. Retira-se depois da geladeira o dissecador com a toxina e com a microespátula colhe-se uma quantidade mínima desta, colocando-se no pesa filtros. Se a balança for de tipo periódico, deve-se usar de preferência, para a pesada, o pesa-filtros fechado. E' aconselhável urna balança de pesada rápida.

De qualquer forma, nunca se deve pesar uma quantidade inferior ao décuplo da sensibilidade da balança, para manter a pesada em nível suficientemente baixo.

Sendo a toxina sêca extremamente higroscópica, a pesada deve ser a mais rápida possível, sem prejuizo da exatidão. Daí a grande vantagem da balança periódica, de leitura imediata.

Terminada a pesada, e enquanto um auxiliar se encarrega de fazer o vácuo no dissecador, e novamente resguardá-lo na geladeira, entorna-se no pesa-filtros a quantidade de solução fisiológica necessária para estabelecer uma solução de título exato, por exemplo a 1/10.000. Desta forma, se a pesada foi de 2 mg., juntámos 20 cm<sup>3</sup> de salina.

Para completar a dissolução a 1/500 adiciona-se 1 cm<sup>3</sup> desta solução primária em um balão tarado de 50 cm<sup>3</sup>, e completa-se o volume com solução fisiológica.

Partindo-se desta solução mãe a 1/500.000, as rediluições seguintes se fazem da maneira seguinte:

Solução mãe	Sol. fisiológica	Diluição obtida	N.º de DML por cm <sup>3</sup> .
1 cc.	—	1/500.000	500.000
0,5 cc.	0,5 cc.	1/1.000.000	1.000.000
0,2 cc.	0,8 cc.	1/2.500.000	2.500.000
0,1 cc.	0,9 cc.	1/5.000.000	5.000.000

Os cuidados essenciais a serem tomados na execução das diluições são: rapidez e precisão nas medidas e menor exposição possível à luz e ao oxigênio. A mistura deve ser feita por agitação delicada, com movimentos circulares largos, cadenciados, ou enrolamento entre as mãos, nunca por choques bruscos e antagônicos,

evitando o mais possível a formação de espuma. Uma boa técnica, que evita completamente a necessidade de agitação, é fazer as diluições finais em dedais ou mamadeiras e no volume requerido para a inoculação.

Prontas as diluições, cada uma delas é recolhida numa seringa e inoculada imediatamente nos animais de prova. Para cada diluição deve-se usar uma seringa marcada, para evitar confusões.

Para a prova podem ser usadas cobaias ou camondongos.

a) *Cobaias*: Devem ser usados animais de 350 g. de peso, indicando uma idade aproximada de 5 meses.

Os resultados constantes e rigorosamente interpretáveis só podem ser obtidos com animais de uma mesma família, ou animais geneticamente "puros", a não ser que se possa lançar mão de séries extensas (Souto e Ubisch, 1939). De qualquer forma é boa praxe tomar dois animais para cada diluição.

À inoculação se faz de ordinário, no volume de 1 cm<sup>3</sup> subcutaneamente. A região preferida é a abdominal, mas há vantagens evidentes na escolha da face interna da coxa (Sordelli, com. verbal). Os animais inoculados ficarão isolados devendo ser o menos perturbados possível. Observações diárias precisam entretanto ser feitas, anotando-se o progresso dos sintomas. Estes podem, por exemplo, ser assim simbolizados, quando se trata de inoculação na coxa:

- c — contratura completa do membro inoculado;
- l c — contratura incompleta do membro inoculado;
- cc — contratura completa dos membros posteriores;
- ccc — envolvimento de todos os membros. Sinais gerais;
- q. m. — agonia;
- + — morte.

A cobaia é observada até o 5.<sup>o</sup> dia, só tendo valor a morte dentro dos 4 primeiros dias; a morte no 5.<sup>o</sup> dia poderá dar indicação remota para as dosagens mais aproximadas.

b) *Camondongos*: Camondongos também podem ser utilizados e empregam-se animais de 20 g., cuja idade estará entre 45-50 dias. Tomam-se 3 ou 4 camondongos para cada diluição. É conveniente que se usem animais de uma mesma família.

A sensibilidade do camundongo é admitida como sendo apenas a metade da cobaia, o que indicaria uma dose aproximadamente 9 vezes menor, considerada a diferença em peso. Na verdade temos observado que, para matar o camundongo em 6 dias, requer-se uma quantidade de toxina apenas 4 vezes menor que a necessária para

matar a cobaia em 4 dias, de forma que, para obter resultados comparáveis, esta é a dose a empregar.

Injetam-se portanto, 0,25 cm<sup>3</sup> sob a pele da raiz da cauda e, tomando as mesmas precauções que no caso das cobaias, prolonga-se a observação por mais dois dias. A dosagem final poderá, dessa forma, ser sempre referida a cobaias.

Os resultados desta primeira dosagem de tateamento, vão indicar o esquema a seguir na determinação mais aproximada, tornando-se tão exata quanto possível.

Na suposição das cobaias inoculadas com a diluição de 1/100.000 terem morrido em 60 horas e de terem sobrevivido as que receberam a diluição de 1/2.500.000, procederemos a nova dosagem, tendo como limite estas duas doses.

Partindo de uma solução mãe de 1/1.000.000 obtida seguindo os mesmos passos já citados, é estabelecida a seguinte tabela de rediluição:

Solução mãe	Sol. fisiológica	Diluição obtida	N.º de DLM contidos em 1 cm <sup>3</sup>
1 cm <sup>3</sup>	—	1/1.000.000	1.000.000
1 cm <sup>3</sup>	0,2 cm <sup>3</sup>	1/1.200.000	1.200.000
1 cm <sup>3</sup>	0,5 cm <sup>3</sup>	1/1.500.000	1.500.000
1 cm <sup>3</sup>	0,8 cm <sup>3</sup>	1/1.800.000	1.800.000
1 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	1/2.000.000	2.000.000
1 cm <sup>3</sup>	1,5 cm <sup>3</sup>	1/2.500.000	2.500.000

Diluições mais aproximadas são desnecessárias, sendo perfeitamente satisfatória uma precisão de 20%. Os demais passos técnicos são idênticos. É claro que as quantidades inoculadas permanecem constantes, 1 cm<sup>3</sup> para cobaia e 0,25 cm<sup>3</sup> para camundongo.

Determinada a DLM, resta estabelecer o L+ da toxina.

O L+ de uma toxina é a quantidade de toxina que, depois de estar em contacto com 1 T.D. de sêro padrão durante um período certo, é capaz de provocar a morte da cobaia inoculada em 96 horas.

Segundo a medição internacional, ainda relativamente pouco usada no Brasil, a test-dose de sêro padrão internacional é a quinta parte de uma unidade antitóxica padrão, o que faz da unidade internacional exatamente a metade da unidade americana.

Os soros utilizados para determinar 1 L+ das toxinas são soros estandardizados obtidos no "National Institute of Health de Washington", ou no "Statens Serun Institute de Copenhagen", e em alguns outros Institutos Oficiais europeus.

E' possível preparar sôro padrão no laboratório, desde que se tenha um outro sôro padrão para comparar, ou a toxina padronizada; mas é de bom aviso manter sempre um padrão estranho, seja êle toxina ou sôro, pois esta precaução impede erros sistemáticos acumulados.

O sôro padrão americano é enviado sob a forma de solução glicerizada de antitoxina, contendo 50 TD por centímetro cúbico, ou 5 unidades americanas (10 internacionais).

O material necessário para a determinação do limite de morte, L+, é o mesmo exigido para o da DLM. Os cuidados também são os mesmos.

Ainda como naquele caso, é econômico fazer primeiro uma determinação larga e, em seguida, guiado por seus resultados, uma segunda prova, mais aproximada.

Deve-se esperar que o L+ de uma toxina sêca contenha entre 300 e 800 DLM, dependendo de seu teor em toxóide.

Na determinação do limite de morte, L+, a dosagem baixa fornece um bom exemplo; neste esquema de dosagem, foi empregada uma toxina com DLM de 0.000.001 (gama):

Toxina diluída a 1/1.000	Teor tóxico	N.º de DLM em 1 cm <sup>3</sup>	sôro diluído a 1/50	Solução fisiológica
0,21 cm <sup>3</sup>	219 g.	210	1 cm <sup>3</sup>	0,79 cm <sup>3</sup>
0,25 cm <sup>3</sup>	250 "	250	1 cm <sup>3</sup>	0,75 cm <sup>3</sup>
0,3 cm <sup>3</sup>	300 "	300	1 cm <sup>3</sup>	0,7 cm <sup>3</sup>
0,36 cm <sup>3</sup>	360 "	360	1 cm <sup>3</sup>	0,64 cm <sup>3</sup>
0,43 cm <sup>3</sup>	430 "	430	1 cm <sup>3</sup>	0,57 cm <sup>3</sup>
0,52 cm <sup>3</sup>	520 "	520	1 cm <sup>3</sup>	0,48 cm <sup>3</sup>
0,62 cm <sup>3</sup>	620 "	620	1 cm <sup>3</sup>	0,38 cm <sup>3</sup>
0,76 cm <sup>3</sup>	760 "	760	1 cm <sup>3</sup>	0,24 cm <sup>3</sup>

A seqüência do preparo destas misturas deve ser a seguinte:

a) Preparar as madeiras e seringas; é de bom aviso lutar as junções das agulhas com as seringas, afim de evitar qualquer perda de líquido na inoculação (a mistura cêra-breu, comumente usada nos laboratórios para a lutagem de lâminas, presta-se a êste mister). Coloca-se uma gota de mistura fundida entre a junção da agulha e seringa, bem sêcas; a mistura se insinua na fissura, podendo depois ser retirado o excesso.

b) Adicionar as diferentes quantidades de soluções nas madeiras.

c) Adicionar num tubo neutro, perfeitamente limpo e sêco, 4 cm<sup>3</sup>, 9 de solução fisiológica; com pipeta de 0,1 cm<sup>3</sup>, juntar a êste um décimo de centímetro cúbico de solução padrão. Agitar suavemente evitando a formação de espuma. Desta forma, obtém-se uma solução de antitoxinas contendo 1 TD por cm<sup>3</sup>. Com nova pipeta, distribuir a solução de antitoxina nas mamadeiras, 1 cm<sup>3</sup> em cada.

d) Pesar uma quantidade de toxina suficiente (no caso, aproximadamente 4mg) e dissolvê-la no volume de solução fisiológica necessário para obter imediatamente a diluição requerida (no caso, 1 cm<sup>3</sup> para cada mg. pesado). Distribuir as diferentes quantidades da solução tóxica e agitar brandamente).

e) Passar imediatamente cada mistura para uma seringa de 2 cm<sup>3</sup>. Deixar as seringas ao abrigo da luz, na temperatura ambiente, durante 30 minutos.

f) Inocular cada mistura, subcutâneamente, na face interna da coxa de uma cobaia.

Na técnica empregada pelos laboratórios americanos, usa-se fazer as diluições de modo a obter um volume final de 4 cm<sup>3</sup>.

E' de se esperar que algumas das cobaias inoculadas morram de tétano, em períodos mais ou menos aproximados das 96 horas; estas indicarão o centro da gravidade para a determinação mais aproximada.

Suponhamos que 360 gama representam a dose de toxina mais próxima da dose que produziu a morte em 96 horas; nestas condições, far-se-á então uma dosagem mais precisa, escalonando menos espaçadamente as quantidades de toxina tomando como limites as doses anterior (300 gama) e posterior (430 gama). O espaçamento pode ser de 20 a 30 DLM (representando por 20-30 gama), com o que já se obterá uma precisão suficiente. Desta forma, estabelecemos um novo protocolo de inoculações, semelhante ao primeiro, mas com as seguintes doses tóxicas: 300-330-360-390-420-450 gama.

Todos os demais passos são idênticos, não devendo ficar esquecido, porém, que aquí se torna taxativo usar duas cobaias para cada mistura, que portanto deve ser preparada em dôbro.

E' claro que, havendo interêsse em determinar o L<sup>o</sup>, uma segunda série se impõe, centralizada pela maior dose ainda ineficiente; admitindo-se no caso figurado 250 gama como tal, seria ne-

cessário prolongar a série, acrescentando as doses 270 e 240 gama, com o que, numa série única, ficariam determinados ao mesmo tempo o  $L^0$  e o  $L+$ .

A observação das cobaias deve durar 96 horas. Leituras posteriores são inúteis.

Camondongos também podem ser utilizados nesta determinação. As diferenças fundamentais introduzidas pelo uso dos camondongos são:

a) Compressão do volume da mistura em 1 cm<sup>3</sup>. Isto se consegue dobrando as concentrações de toxina e de antitoxina nas soluções respectivas (inclusive a antitoxina padrão) e tomando para mistura apenas a metade do volume.

b) Inoculação da quarta parte da mistura total, isto é, 0,25 cm<sup>3</sup>.

c) Observação por 6 dias, em lugar de 96 horas.

Da posse de uma boa toxina seca, rigorosamente estandarizada e frequentemente reverificada, e de um soro padrão, é possível dosar, com segurança, qualquer soro de valor desconhecido.

Cabe aqui, ainda, ficar em guarda contra o uso, como padrão, de toxinas de preparo muito recente. As características destas toxinas se modificam, a princípio, muito rapidamente, no sentido de uma diminuição da potência e uma elevação do  $L+$ . Só quando reverificações sucessivas indicarem, pela identidade de seus resultados, uma como que fixação dos caracteres da toxina, é que esta poderá ser utilizada nas dosagens.

#### DOSAGEM DO SORO ANTITETÂNICO

A potência do soro antitetânico é expressa em unidades por cm<sup>3</sup>.

Não existe ainda um acôrdo geral em se adotar um único conceito de unidade para os soros antitetânicos, qualquer que seja o país ou laboratório de origem.

A unidade escolhida pela Comissão Permanente de Padronização Biológica da Organização de Higiene da Sociedade das Nações, representa o quádruplo da "test-dose", ou da quantidade de antitoxina necessária para, quando misturada a test-dose de toxina ( $L+$ ), proteger da morte por 96 horas a cobaia inoculada.

A unidade mais geralmente adotada no Brasil é a americana, que representa precisamente o dôbro da unidade internacional.

Desta forma, a transformação da medida americana em internacional, ou vice-versa, é extremamente simples.

A técnica empregada nos EE. UU. e também aqui, já descrita por Rosenau e Anderson (1908), na qual se compara o sôro de valor desconhecido e o sôro padrão em duas séries simultâneas, em relação à mesma dose de toxina.

A técnica de dosagem não difere essencialmente da que rege a determinação do L<sup>o</sup> e L+. Apenas, aqui a dose tóxica é invariável, variando a dose da antitoxina de valor ignorado.

Também no caso atual é vantajoso, pela economia de trabalho e de animais de prova, fazer a verificação em dois tempos, comportando inicialmente um tateamento largo e em seguida uma determinação mais aproximada.

Exemplo: Tratando-se de um sôro nativo, não purificado, podem-se tomar como limites extremos da primeira verificação as medidas de 100 U.A. e 1.000 U.A. Tratando-se de um sôro purificado, ficaremos entre os limites de 500 e 5.000 U.A.

É claro que, se na primeira determinação ultrapassarmos o limite de dosagem previsto, nova prova se faz necessária antes de atingir-se a dosagem final.

Para soros não terapêuticos, de caráter experimental e dosando muito baixo, outras técnicas se tornam necessárias. Não serão cuidadas aqui.

Tomando pois, como exemplo, um sôro nativo desconhecido, deveríamos traçar o seguinte esquema para a verificação prévia:

100 U. — 200 U. — 400 U. — 800 U. — 1.600 U.

Devendo o volume estar comprimido em 2 cm<sup>3</sup> e ficando 1 cm<sup>3</sup> reservado à solução de toxina, é necessário que a maior dose de sôro (equivalente a 100 Unidades) não ultrapasse esta medida. Porisso, devemos fazer a diluição inicial do sôro desconhecido de modo a obter a equivalência de 100 U. em 1 cm<sup>3</sup>. Sabendo-se que 100 U. representam 1.000 TD, é evidente que a diluição inicial se fará a 1/1.000. As outras equivalências se obterão tomando partes alíquotas desta diluição inicial e completando o volume com solução fisiológica. Desta forma teremos:

sôro a 1/1.000	Solução fisiológica	Toxina diluída (1 cm <sup>3</sup> contém 1L+)	sôro padrão a 1/50	Dosagem provada
1 cm <sup>3</sup>	—	1 cm <sup>3</sup>	—	100 U.
0,5 cm <sup>3</sup>	0,5 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	—	200 U.
0,25 cm <sup>3</sup>	0,75 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	—	400 U.
0,12 cm <sup>3</sup>	0,88 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	—	800 U.
0,06 cm <sup>3</sup>	0,94 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	—	1.667 U.
—	—	1 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	—

Para simplificar as medições deve-se evitar trabalhar com mais de duas casas decimais. Qualquer conjunto de equivalência pode ser estabelecido conforme for mais conveniente para o caso confrontado. O cálculo das quantidades a medir se obtém de um modo assás singelo, dividindo-se o número de unidades equivalentes à diluição inicial de 1 por mil, correspondendo a 100 unidades, teremos a quantidade correspondente a 125 U., dividindo por 125. Reciprocamente, se quisermos obter o número de unidades de um volume qualquer da diluição inicial, dividiremos o número de unidades nesta contidos pelo volume considerado. Assim, no caso vertente, 0,6 cm<sup>3</sup> equivalem a 100/0,6 ou 167 unidades.

A marcha do método de dosagem em nada difere do já descrito para a determinação do L+. Depois de 30 minutos no ambiente, cada mistura é inoculada sob a pele da coxa da cobaia.

Considerando o grande espaçamento entre os teores verificados é muito provável que os animais que receberam uma dada mistura apresentem sintomas de tétano e os que foram inoculados com a dose imediata, subsequente, morrem com grande rapidez. Estas duas misturas determinarão os limites da nova determinação final; admitamos, para exemplificar, que foram-se representando respectivamente 400 e 800 unidades. O novo esquema deverá guardar uma diferença máxima de 20% entre uma dose de sôro e outra, sendo a ótima 10%. Independente da precisão desejada, a diluição inicial de sôro deve equivaler a 400 unidades, pelo que êle deve ser diluído 4.000 vezes. O 1.º tubo da série receberá 1 cm<sup>3</sup> desta diluição (400 U.) e o último 0,5 cm<sup>3</sup> (800 U.). Os tubos intercalados serão 3 até 6, dependendo da precisão desejada; ao lado da série com o sôro desconhecido, far-se-á uma outra com o padrão, para permitir a comparação final.

Não esquecer que tôdas as misturas devem ser feitas em dõbro, para permitir a inoculação em 2 animais. O esquema de dosagem poderia ficar assim constituído:

Sôro desconhecido a 1/4.000	Unidades dosadas	Sol. fisiológica	Toxina padrão diluída de modo a 1 cm <sup>3</sup> = L+	Sôro padrão a 1/50
2 cm <sup>3</sup>	400	—	2 cm <sup>3</sup>	—
1,7 cm <sup>3</sup>	470	0,3 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	—
1,44 cm <sup>3</sup>	555	0,56 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	—
1,2 cm <sup>3</sup>	667	0,8 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	—
1 cm <sup>3</sup>	800	1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	1,8 cm <sup>3</sup>
—	—	0,1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	1,9 cm <sup>3</sup>
—	—	—	2 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>
—	—	—	2 cm <sup>3</sup>	2,1 cm <sup>3</sup>
—	—	—	2 cm <sup>3</sup>	2,2 cm <sup>3</sup>

A razão da inclusão de uma segunda série com a antitoxina padrão reside na pequena probabilidade de se obter a morte de qualquer dos grupos de prova, exatamente em 96 horas e ainda na prevenção de uma sempre possível imprecisão técnica, levando ao não balanceamento perfeito das duas TD estimadas para toxina e sôro padrão. Assim procedendo, pequenos desvios podem ser facilmente corrigidos.

No caso ideal, obteremos na série conhecida, a morte das cobaias que receberam a mistura 1 cm<sup>3</sup>-sôro padrão mais 1 cm<sup>3</sup>-toxina exatamente em 96 horas. Os animais da série desconhecida que morrem mais perto dêste prazo indicam a dosagem do sôro. A precisão desta medida será considerada tanto maior quanto mais próximo das 96 horas se der a morte. Suponhamos a sequência:

O O — CC CC — + 100 hs. — + 95 hs. — + 60 hs. —  
+ 65 hs. — + 30 hs. — + 24 hs.

O que nos daria, com grande aproximação o título de 555 unidades. Se por acaso obtivéssemos na série conhecida ao mesmo tempo a sequência:

+ 72 hs. — + 76 hs. — + 80 hs. — + 88 hs. — + 92 hs. —  
+ 97 hs. — + 100 hs. — + 106 hs. — + 112 hs.

na qual o test dose do sôro padrão contra o TD tóxico empregado seria 5% maior, a dosagem final passaria a ser de 555 + 5% = 583 unidades.

Nas dosagens habituais, feitas com frequência, quando há pouca probabilidade de variação da toxina ou do sôro e demais, onde não há necessidade de se levar a precisão a tão extremados limites, é lícito abstermo-nos da segunda série de comparação, limitando-nos

a manter no esquema um par de cobaias testemunhas que recebem LTD da toxina e 1 TD de sôro standard, para surpreender descuido ou erros possíveis.

Sem dúvida a determinação de soros pode também ser feita em camundongos seguidas as prescrições já citadas em relação à dosagem de DLM e de L+ da toxina. Procedendo dessa maneira, a dosagem final em camundongo corresponderá com grande exatidão à obtida em cobaias.

E' um problema frequente no laboratório a reavaliação do título de um sôro. Neste caso, aplica-se o que ficou dito para a determinação final de um sôro desconhecido, tendo-se o cuidado de colocar o título presumido no meio da série entre dois mais elevados e dois mais baixos; assim, se supomos tratar-se de um sôro de 750 unidades, faremos uma série do seguinte tipo: 620-680-750-825-900.

No caso de ainda a redeterminação de um sôro cujo título se supõe ter baixado, coloca-se o título estabelecido no pé da série: 500-560-620-680-750.

#### PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DE L<sup>o</sup> E L+ DE UMA TOXINA SÊCA. DLM DA TOXINA

##### DETERMINAÇÃO PRÉVIA

Âmbito provável de L<sup>o</sup>: 100-400 gama. Do L+: 250-700 gama.

Diluir a toxina de modo a 1 cm<sup>3</sup> conter 700 gama.

Toxina pesada: 4mgs., 3.

Solução em 6 cm<sup>3</sup>, 14 salina (1 cm<sup>3</sup> contém 700 gama).

O gama, 83. ANIMAL: cobaia 350 grs.

Toxina diluída	Teor tóxico	DLM	Sol. fisiológica	Sôro a 1/50 1 cm <sup>3</sup> tem 1 TD	Resultado
0,14 cm <sup>3</sup>	98 gama	118	0,86 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.
0,28 cm <sup>3</sup>	196 gama	236	0,72 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.
0,42 cm <sup>3</sup>	294 gama	354	0,58 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	1c 4 ds.
0,56 cm <sup>3</sup>	392 gama	472	0,44 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	cc 4 ds.
0,7 cm <sup>3</sup>	490 gama	590	0,3 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	+ 60 hs.
0,85 cm <sup>3</sup>	595 gama	717	0,15 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	+ 24 hs.
1 cm <sup>3</sup>	700 gama	843	—	1 cm <sup>3</sup>	+ 24 hs.

A mistura obtida e deixada 30 minutos no ambiente, na seringa e inoculada sob a pele da coxa de uma cobaia.

Resultado: L<sup>o</sup> — maior do que 196 gama (236 dlm) menor do que 294 gama (354 dlm).

L+ — maior do que 396 gama (472 dlm) menor do que 490 gama (590 dlm).

## DETERMINAÇÃO FINAL

Abrangendo de 200 a 500 gama. Diluir a toxina de modo a 1 cm<sup>3</sup> conter 500 gama.

Toxina pesada: 8 mgs., 5.

Solução em 17 cm<sup>3</sup> de salina (1 cm<sup>3</sup> contém 500 gama).

Toxina diluída	Teor tóxico	DLM	Sol. fisiológica	Sêro a 1/50 1 cm <sup>3</sup> tem 1 TD	Resultado	
0,8 cm <sup>3</sup>	200 gama	241	1,2 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.	OK 4 ds.
0,9 cm <sup>3</sup>	225 gama	271	1,1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.	OK 4 ds.
1 cm <sup>3</sup>	250 gama	301	1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.	OK 4 ds.
1,1 cm <sup>3</sup>	275 gama	331	0,9 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.	OK 4 ds.
1,2 cm <sup>3</sup>	300 gama	361	0,8 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	1c 4 ds.	1c 4 ds.
1,6 cm <sup>3</sup>	400 gama	482	0,4 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	+ td.	+ td.
1,7 cm <sup>3</sup>	425 gama	512	0,3 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	+ 90 hs.	+ 95 hs.
1,8 cm <sup>3</sup>	450 gama	542	0,2 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	+ 72 hs.	+ 82 hs.
1,9 cm <sup>3</sup>	475 gama	572	0,1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	+ 60 hs.	+ 62 hs.
2 cm <sup>3</sup>	500 gama	602	—	2 cm <sup>3</sup>	+ 48 hs.	+ 52 hs.

A mistura obtida é deixada 30 minutos no ambiente, na seringa, e inoculada em 2 cobaias (2 cm<sup>3</sup> em cada) sob a pele da coxa.

Resultado: L+: 425 gama (512 DLM)

L<sup>o</sup>: 275 gama (331 DLM)

Animal de prova: camundongo de 20 gramas.

Determinação prévia: Diluir a toxina de forma a 1 cm<sup>3</sup> conter 1.400 gama.

Distribuir da mesma maneira que para a cobaia, mas tomando a metade do volume. Também de salina será tomado a metade do volume.

Diluir o sêro padrão a 1/25, de modo a ter 2 TD em cada cm<sup>3</sup>. Desta forma se obterá o volume final de 1 cm<sup>3</sup>.

Dêste, se inoculará 0,25 cm<sup>3</sup> na base da cauda de 1 camundongo. A leitura será feita até o 6.<sup>o</sup> dia.

Determinação final: Exatamente como acima, estando a toxina contida em 1 cm<sup>3</sup> para 1.000 gama.

Inocular 0,25 cm<sup>3</sup> da mistura final em cada um de 4 camundongos

PROTOCOLO DE DOSAGEM DE UMA TOXINA SÊCA DESCONHECIDA  
ANIMAL DE PROVA: Cobaia de 350 grs.

## DETERMINAÇÃO PRÉVIA

Diluição de partida: 1/500.000.

Solução em 18 cm<sup>3</sup> salina (1/10.000).

Diluição: 1 cm<sup>3</sup> em 49 cm<sup>3</sup> salina (1/500.000) 1 cm<sup>3</sup> tem 2 gama.

Toxina a	Toxina pêso	Sol. fisiológica	Diluição geral	Resultado
1/500.000				
1 cm <sup>3</sup>	2 gama	—	1/500.000	+ 48 hs.
1,5 cm <sup>3</sup>	1 gama	0,5 cm <sup>3</sup>	1/1.000.000	+ 3 dias
1,2 cm <sup>3</sup>	0,4 gama	0,8 cm <sup>3</sup>	1/2.500.000	cc 4 dias
1,1 cm <sup>3</sup>	0,2 gama	0,9 cm <sup>3</sup>	1/5.000.000	OK 4 dias

(mistura inoculada imediatamente sob a pele da coxa)

Resultado: DLM maior do que 0,4 gama menor do que 1 gama  
(entre 1/1.000.000 e 1/2.500.000).

## DETERMINAÇÃO FINAL

Diluição da partida: 1/1.000.000.

Toxina pesada: 2,20 mg. (2.200 gama).

Diluição: 1 cm<sup>3</sup> em 99 cm<sup>3</sup> salina (1/1.000.000) 1 cm<sup>3</sup> tem 1 gama.

Toxina a	Toxina pêso para 1 cm <sup>3</sup> da mistura	Sol. fisiológica	Diluição final	Resultado
1/1.000.000				
2 cm <sup>3</sup>	1 gama	—	1/1.000.000	+ 60 hs. + 66 hs.
2 cm <sup>3</sup>	0,83 gama	0,4 cm <sup>3</sup>	1/1.200.000	+ 86 hs. + 90 hs.
2 cm <sup>3</sup>	0,67 gama	1 cm <sup>3</sup>	1/1.500.000	+ td. + td.
2 cm <sup>3</sup>	0,55 gama	1,6 cm <sup>3</sup>	1/1.800.000	cc 4 ds. td.
2 cm <sup>3</sup>	0,45 gama	2,4 cm <sup>3</sup>	1/2.200.000	c 4 ds. cc 4 ds.

(1 cm<sup>3</sup> de cada mistura inoculado sob a pele da coxa de 2 cobaias).

Resultado: DLM = 0,83 gama (1/1.200.000).

## ANIMAL DE PROVA: CAMONDONGO DE 20 GRS.

Determinação prévia: Todos os passos idênticos. A inoculação se faz sob a pele da raiz da cauda.

Inocula-se 0,25 cm<sup>3</sup> de cada mistura. A leitura é prolongada até o 6.º dia.

Determinação final: Tomam-se 4 animais para cada dose.

PROTOCOLO DE DOSAGEM DE UM SORO NATIVO DESCONHECIDO  
ANIMAL DE PROVA: Cobaia

## DETERMINAÇÃO PRÉVIA

Unidades provadas	Soro diluído a 1/1.000	Solução fisiológica	Toxina diluída	1 cm <sup>3</sup> = 1TD Resultado
100	1 cm <sup>3</sup>	—	1 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.
200	0,5 cm <sup>3</sup>	0,5 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.
400	0,25 cm <sup>3</sup>	0,75 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	OK 4 ds.
833	0,12 cm <sup>3</sup>	0,88 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	+ 3 ds.
1667	0,06 cm <sup>3</sup>	0,94 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	+ 2 ds.
Soro standard a 1/50	1 cm <sup>3</sup>	—	1 cm <sup>3</sup>	+ 90 hs.

Cada mistura é deixada 30 minutos no ambiente, na seringa e injetada sob a pele da coxa de uma cobaia.

Resultado: O título está dentre 400 e 833 unidades.

## DETERMINAÇÃO FINAL

Unidades provadas	Soro desconhecido diluído a 1/4.000	Sol. fisiológica	Toxina diluída 1 cm <sup>3</sup> = 1TD	Soro padrão 1/50	Resultados
400	2 cm <sup>3</sup>	—	2 cm <sup>3</sup>	—	OK 4 ds. OK 4 ds.
470	1,7 cm <sup>3</sup>	0,3 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	—	1c 4 ds. c 4 ds.
555	1,44 cm <sup>3</sup>	0,56 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	—	Morrem tardiam.
667	1,2 cm <sup>3</sup>	0,8 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	—	+ 88 hs. + 94 hs.
800	1 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	—	+ 67 hs. + 75 hs.
—	—	0,2 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	1,8 cm <sup>3</sup>	+ 68 hs. + 72 hs.
—	—	0,1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	1,9 cm <sup>3</sup>	+ 83 hs. + 84 hs.
—	—	—	2 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup>	+ 98 hs. +102 hs.
—	—	—	2 cm <sup>3</sup>	2,1 cm <sup>3</sup>	+108 hs. +118 hs.
—	—	—	2 cm <sup>3</sup>	2,2 cm <sup>3</sup>	Morrem tardiam.

Cada mistura é deixada 30 minutos no ambiente, na seringa, e injetada subcutaneamente na coxa de 2 cobaias, 2 cm<sup>3</sup> em cada uma (Para as duas últimas injeções da série, as cobaias recebem, respectivamente, 2,05 cm<sup>3</sup> e 2,1 cm<sup>3</sup>).

Resultado: o título do soro é 667 unidades americanas.

Determinação em camondongo de 20 grs.

Determinação prévia: Diluir a toxina de forma a 1 cm<sup>3</sup> conter 2 TD (2 L).

Diluir o sêro desconhecido de forma a conter em 1 cm<sup>3</sup> o dôbro das unidades previstas.

Diluir o sêro padrão de forma a conter 2 TD em 1 cm<sup>3</sup> (1/25).

Tomar apenas a metade dos volumes indicados na tabela supra, inclusive a solução fisiológica. Desta forma, obtêm-se um volume final de 1 cm<sup>3</sup> para a mistura.

Inocular 0,25 cm<sup>3</sup> desta mistura na cauda de um camondongo.

Determinação final: Exatamente como acima.

Inoculam-se 4 camondongos com 0,25 cm<sup>3</sup> de cada mistura.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 — BENGTON, J. A. — 1931 — Rapport de la Commission Permanente de Standardisation Biologique. C. H. C. P., 31: 23.
- 2 — BENGTON, J. A. — 1934 — *Public Health Reports*, 49: 1567.
- 3 — BENGTON, J. A. — 1936 — *Public Health Reports*, 51: 266.
- 4 — BENGTON, J. A. — 1936 — *Public Health Reports*, 51: 1263.
- 5 — GLOTOVA, H. W. — 1937 — *An. Inst. Pasteur*, 5: 526.
- 6 — HARTLEY, P. — — Rapport de la Commission Permanente de Standardisation Biologique, C. H. C. P., 31:
- 7 — HARTLEY, P. e WHITE, B. P. — 1935 — *Bull. Trim. de l'Organis. d'Hygiene*, número especial, 33.
- 8 — JENSEN, Cl. — 1936 — *Bull. Trim. de l'Organis. d'Hyg.*, 5: 720.
- 9 — JENSEN, Cl. — 1936 — *Bull. Trim. de l'Organis. d'Hyg.*, 5: 790.
- 10 — KOLMER, J. — 1942 — *Jour. of Immun.*, 42: 289.
- 11 — "Memorandum on the Standard for gas gangrene antitoxin (perfringens) and its application" — 1935 — Permanent Commission on Biological Standardisation, League of Nations, C. H. C. P. S. B., 23, Geneve.
- 12 — ROSENAU, M. J. e ANDERSON, J. F. — 1908 — *Hyg. Laborat. Bull.*, 43: 1.
- 13 — "Serum antigangreneus (perfringens)" — 1931 — Rapport de la Commission Permanente de Standardisation Biologique, C. H., 1056: 5.
- 15 — "Serum antigangreneux a) vibrion septique" — 1935 — Rapport de la commission Permanente de Standardisation Biologique, *Bull. Trim. de l'Organisation d'Hyg.*, número especial, 1.
- 16 — SOUTO, A. B. e RIVAROLA, J. B. — 1938 — *Rev. Sanidad Militar*, 103/106: 658.
- 17 — SOUTO, A. B. e VON UBISH, G. — 1939 — *Rev. d'Immunologie*, 5: 54.
- 18 — "Vorschriften für die staatliche Prüfung der Gasbrand (Perfringens) Sera". Ministerioblatt d. Reich — und Preus Ministeriums des Intern., — 1937 — 15: 591.

- 19 — WALBUM, L. E. e REYMANN, C. — 1935 — *Bull. Trint. de l'Org. d'Hyg.*, número especial, 42
- 20 — WALBUM, L. E. e REYMANN, C. — 1936 — *Bull. Trint. de l'Org. d'Hyg.*, 5: 752.
- 21 — WALL, A. D. — 1939 — *Brit. Med. Jour.*, 2: 1106.
- 22 — WEINBERG, M., DAVESNE, J. e PREVOT, A. — 1932 — *An. Inst. Pasteur*, 49: 386.
- 23 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1936 — *C. R. Soc. Biol.*, 123: 661.
- 24 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1937 — *C. R. Soc. Biol.*, 126: 656.
- 25 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1936 — *C. R. Acad. Sc.*, 204: 1012.
- 26 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1938 — *C. R. Soc. Biol.*, 1084: 127.