

ANTÍGENOS ADICIONADOS DE LANOLINA E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE SOROS AGLUTINANTES

S. C. CALAZANS

Assistente-chefe do Instituto Butantã

MARIA ARANTES

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

O largo uso de antígenos adicionados de substâncias não específicas para a obtenção de soros antitóxicos data de alguns anos, sendo seu emprego iniciado após os trabalhos de G. Ramon¹ sobre este assunto em 1925. A idéia, porem, é antiga, pois já em 1889, Roux e Yersin², pouco tempo depois de terem descoberto a toxina diftérica observaram, em suas experiências, que o veneno elaborado pelo bacilo de Klebs-Löffler, que matava cobaias no período de 20 a 60 horas, tinha sua ação retardada quando tratado pelo cloreto de cálcio, o que levou os referidos autores a dizerem que "se a substância tóxica aderisse bastante ao corpo insolúvel, ela não se difundiria senão lentamente determinando, talvez, assim, a vacinação gradual do animal".

Em 1916 Le Moignic e Pinoy³ empregaram uma vacina antitífica constituída por germes mortos pelo calor, tendo como veículo a lanolina e o óleo de olivas. Visavam não só eliminar as reações local e geral, mas ainda realizar a vacinação antitífica com uma dose única, reunindo em uma só, a totalidade dos germes empregados nas 4 injeções então em uso.

Utilizando-se também de substância não específica, mas visando, apenas, o desenvolvimento dos germes no local da inoculação e a posterior difusão de sua toxina pelo organismo, Dochez⁴, em 1924, injetou gelose em estado fluido, subcutaneamente, em cavalos, e, na massa de agar acumulada no mesmo local, inoculou culturas de 18 a 20 horas do estreptococo da escarlatina, obtendo, com tal processo, soro antiescarlatinoso bastante ativo.

O emprego, porém, de substâncias não específicas na rotina do preparo de soros e vacinas só foi estabelecido depois das pesquisas memoráveis e fundamentais de G. Ramon¹ que revolucionaram por completo os antigos processos de imunização e hiperimunização.

Este grande e persistente pesquisador, a quem tanto deve a ciência e a humanidade, assinalou, depois de uma série de observações, "o aumento, por vezes considerável, do teor de antitoxina no soro dos cavalos que apresentavam acidentalmente um abcesso no ponto de injeção de uma dose de antígeno (toxina ou anatoxina)".

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

Fixou-se Ramon, no início, no emprego da tapioca pulverizada cuja aplicação passou a ser adotada largamente, sendo logo seguida pelo uso do cloreto de cálcio e das vacinas associadas. Por outro lado, Glenny, Pope, Waddington e Wallace⁵ adicionando alumen às toxinas notaram o aparecimento de um precipitado insolúvel que aumentava também grandemente o poder antigênico das mesmas.

Mais recentemente, Ramon, em estudos realizados com seus colaboradores Lemétayer e Richou⁶, mostrou ser a lanolina de grande utilidade na imunização e, em novas pesquisas ainda com Lemétayer⁷, expôs os resultados da imunização de carneiros e cavalos com a anatoxina tetânica envolta na referida substância. Com o emprego da lanolina os animais não só se imunizaram rapidamente como forneceram soro de alta dosagem.

Prosseguindo em seus estudos Ramon⁸ demonstra ainda o papel importante desempenhado pela lanolina no reforçamento do poder imunizante dos antígenos microbianos. Para isso comparou o poder antigênico de uma mesma raça de bacilo diftérico, inoculando em um grupo de coelhos, os germes contidos na décima parte de um tubo de cultura de 24 horas, suspensos em salina e, em outro grupo, a mesma quantidade de germes envolvidos na mistura oleosa. Com tal técnica, isto é, variando apenas o veículo em que foram suspensos os germes, foi possível conferir aos coelhos inoculados com antígeno oleoso uma forte imunidade, ao passo que no outro grupo, que recebera germes suspensos em soro fisiológico, a imunidade foi nula.

Levando adiante suas pesquisas no que diz respeito à imunização anti-bacteriana, Ramon invade o campo dos esporulados

aeróbios, estudando com Staub⁹ o interessante problema da vacinação anticarbunculosa que, apesar de marcar a genial descoberta de Pasteur, Chamberland e Roux, apresenta falhas e dificuldades tão conhecidas daqueles que se têm ocupado do seu preparo.

Depois de inúmeras experiências, conseguem esses A.A. preparar uma vacina de grande eficiência e apresentando risco mínimo, desprezível mesmo, empregando para isso uma quantidade de germes correspondente a 10 vezes a contida na primeira vacina de Pasteur. À referida vacina adicionava alumen, germes mortos ou lanolina. Com ela imunizaram, com sucesso, coelhos, carneiros, cabras, bois e cavalos, sendo a imunidade obtida bastante precoce e muito sólida, atingindo a proteção a 80% dos animais vacinados.

Imunizações feitas com germes da 1.^a vacina de Pasteur, em soro fisiológico, adicionada de tapioca ou de cloreto de cálcio não conferiram imunidade aos coelhos, posteriormente inoculados com a dose de prova.

Apresentando a referida vacina algumas desvantagens, foi a mesma aperfeiçoada, substituindo-se a lanolina pelo alumen (1 a 3%) ou a gelose a 2‰, ou ainda as duas substâncias juntas nas mesmas proporções citadas.

Outros pesquisadores seguem a Ramon. Weinberg e Guillaumie¹⁰ preparam pelo mesmo processo soro anti-gangrenoso em cavalos. Após a 2.^a injeção obtiveram soros aplicáveis na terapêutica e depois da 4.^a e 5.^a os soros atingiram títulos assás elevados, afirmando os A.A. ser muito precoce a formação de anticorpos.

Referindo-se ao método de Ramon, dizem esses autores: "o processo é excelente, quer o antígeno seja representado por uma anatoxina, quer por uma toxina fresca ou mesmo por micróbios vivos".

No Instituto Butantã, tanto no preparo de soros antipeçonhentos, a cargo do Dr. José Bernardino Arantes, como no serviço de preparo do soro anti-diftérico a cargo da Dra. Jandyra Planet, como na secção de soros anaeróbios ainda há pouco tempo dirigida pelo Dr. Büller Souto, e, atualmente, de novo sob a direção de um de nós, todas estas substâncias têm sido empregadas e com grande sucesso, tendo tais métodos sido iniciados em S. Paulo pelo saudoso amigo e colega Lemos Monteiro.

Nicolle e Laigret¹¹ substituíram a lanolina pela lecitina, preparando vacinas com virus amarílico, que foram aplicadas na profilaxia da febre amarela com resultados animadores (Oeste da África).

Velu e Zottner¹² o aplicaram na vacina contra a brucelose, Bell¹³ na vacina contra a coqueluche, aconselhando Ramon e Zoeller¹⁴ as vacinas associadas.

PRODUÇÃO DE AGLUTININAS NOS ANIMAIS INOCULADOS

Mutermilch¹⁵ notou que a inoculação de animais pela via raquidiana produzia soros aglutinantes de títulos nitidamente superiores aos obtidos pela via subcutânea, embora fosse empregada por esta última via uma quantidade de germes 20 vezes maior.

Tal fato sugeriu a Nélis¹⁶ a idéia de tentar a produção de soros aglutinantes de alto valor, pela via subcutânea, baseando suas experiências nos trabalhos de Ramon sobre o envolvimento dos antígenos pela lanolina.

Para isso inoculou Nélis várias séries de coelhos com dose única de bacilos paratíficos B, variando não só a quantidade e o modo de preparo do antígeno como ainda a via empregada.

No 1º grupo inoculou germes mortos pelo calor pela via subcutânea; no 2º a mesma suspensão de germes, diluída ao quinto, pela via meningéia; em uma 3.ª série de coelhos a mesma quantidade de germes do 1º grupo depois de centrifugado e o sedimento ressuspenso em mistura oleosa; e, finalmente, um 4º grupo, no qual se utilizou dos mesmos bacilos, porém, vivos e emulsionados na mistura lanolina-vaselina, após centrifugação.

Dos quatro processos acima citados revelou-se o melhor, pelos títulos obtidos e pela uniformidade dos resultados, o empregado neste último lote de animais.

Procurando estudar a curva da produção de aglutininas de modo a estabelecer aproximadamente sua maior elevação e, consequentemente, a ocasião mais indicada para a sangria dos animais produtores de soros aglutinantes, empreendemos uma série de experiências empregando as seguintes amostras de germes:

Eberthella typhosa 901 — Variação 0 — (Instituto Lister)
Salmonella Schottmülleri, Kauffmann
Salmonella paratyphi, Kauffmann
Shigella dysenteriae, "Parker" — (Instituto Lister)

As suspensões de germes foram preparadas com as culturas de 24 horas de 3 tubos de agar em salina, ressuspenso, após centrifu-

gação, em uma mistura de 2 partes de lanolina para 3 partes de vaselina líquida.

As primeiras inoculações foram feitas com os germes de 3 tubos de cultura adicionados de 3 cc. da mistura oleosa e as seguintes com 1 cc., sendo o intervalo entre as inoculações de 10 a 15 dias.

As injeções foram feitas sempre com germes vivos.

24 horas após a inoculação observamos hiperemia local, apresentando-se a região empastada no começo, tornando-se depois dura, para terminar com a formação de um nódulo que desaparece muito lentamente.

Os coelhos inoculados com a *E.typhosa* e as *Salmonellas Schottmülleri* e *paratyphi* nada apresentaram de anormal, a não ser a reação local.

Quanto à *Shigella dysenteriae*, além dessa reação inflamatória local, processaram-se fenômenos mais acentuados para o lado da pele, terminando com forte descamação. Em um dos coelhos houve mesmo a formação de um abcesso.

No que diz respeito aos germes altamente tóxicos como o bacilo Shiga, torna-se necessário inocular menor quantidade de germes para se evitar a morte dos animais durante o período de inoculação. Um ou meio tubo de cultura viva em 3 cc. de lanolina já pode ser empregado para o início da imunização, o que representa, sem dúvida, dose enorme comparada com as quantidades de germes mortos comumente empregadas.

É a lanolina adicionada ao antígeno que impede a ação tóxica dos germes como se vê no quadro abaixo.

COELHOS IMUNIZADOS COM A *S. DYSENTERIAE* (PARKER)

Coelhos	Quantidade de antígeno	Mistura lanolina-vaselina	Resultados	
1	3 tubos agar	1 cm. ³	s.g.	+ 6 dias
2	3 tubos agar	1 cm. ³	s.g.	sobrevive
3	3 tubos agar	3 cm. ³	s.g.	+ 10 dias
4	3 tubos agar	5 cm. ³	s.s.	sobrevive
5	Quinta parte de 3 tubos de agar	3 cm. ³	s.s.	"

s.g. = sintoma grave; s.s. = sem sintoma; + = morte.

O coelho nº 2, vinte e cinco dias depois de completamente restabelecido, foi novamente inoculado com a mesma quantidade da primeira injeção, suportando-a perfeitamente bem.

Os títulos obtidos após 4 inoculações foram os seguintes:

Germes	SANGRIAS			
	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a
<i>E. typhosa</i> 901	1/800	1/6.400	1/14.000	1/32.000
<i>S. Schottmülleri</i>	1/8.000	1/20.000	1/51.000	1/32.000
<i>S. paratyphi</i>	1/4.000	1/32.000	1/80.000	1/36.000
<i>Shigella dysenteriae</i> "Parker"	1/800	1/3.200	1/12.000	1/12.800 (*)
<i>Shigella dysenteriae</i> "Parker"	1/800	1/3.200	1/6.400 (*)	1/3.200 (*)
<i>Shigella dysenteriae</i> "Parker"	1/400	1/1.600	1/3.200 (*)	1/3.200 (*)

(*) = aglutinação microscópica.

Do quadro acima deduz-se que os títulos máximos foram obtidos nas 3.^a e 4.^a sangrias, isto é, após a 3.^a e a 4.^a inoculações.

Com os processos geralmente empregados nos laboratórios as sangrias costumam ser feitas depois de sete inoculações, não sendo tão altos os títulos obtidos, havendo ainda certa dificuldade em se obterem sôros aglutinantes, quando se trata de germes muito tóxicos.

DISCUSSÃO

A que se deve atribuir a ação das substâncias não específicas sobre o aumento da capacidade dos antígenos na produção de anticorpos?

Ramon a atribue à lenta reabsorção dos antígenos e à reação inflamatória local determinada pelos mesmos.

Para Weinberg e Guillaumie¹⁰, que compartilham da opinião de Ramon, o aumento do poder imunizante dos antígenos é devido "à reabsorção lenta e contínua do antígeno em consequência do seu envolvimento pela lanolina, e à forte reação local e geral do orga-

nismo, fator comum a todos os processos de imunização, mas que se manifesta, em geral, de uma maneira mais violenta, quando se emprega o processo da lanolina”.

Thibault¹⁷, em interessantes pesquisas, estudou as modificações histológicas determinadas pela inoculação subcutânea, em cobaias, de 4 misturas diferentes, a saber:

- 1.º — Caldo
Solução fisiológica
- 2.º — Anatoxina tetânica
Solução fisiológica
- 3.º — Solução fisiológica
Lanolina
Óleo de olivas
- 4.º — Anatoxina tetânica
Lanolina
Óleo de olivas

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

Norman¹⁸, em 1934, empreendeu uma série de experiências nas quais estudou a influência das emulsões finamente divididas de óleos e gorduras sobre as toxinas bacterianas. Empregou para isso substâncias de origem vegetal, animal e mineral, como o óleo de oliva, parafina e o creme de leite, emulsionadas com goma acácia, estudando sua influência sobre a ação das toxinas produzidas pelos bacilos tetânico, diftérico, perfríngico e V. séptico.

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

Walsh e Frazer¹⁹, independentemente do autor anterior, investigaram problemas semelhantes, inoculando em coelhos grandes doses de toxinas misturadas a emulsões de óleo de fígado de bacalhau e óleo de olivas, chegando às mesmas conclusões que Norman. Trabalhando com tuberculina verificou que a mesma, misturada com emulsão de óleo de olivas não produzia reação alguma em doentes de tuberculose que reagiam nitidamente com quantidades muito menores da mesma tuberculina, inoculada sem a referida proteção oleosa.

Em colaboração com Falchetti, Ramon²⁰ investigou o efeito da inoculação dos esporos do bacilo do carbúnculo envolvidos ou não na mistura óleo-lanolina.

De suas pesquisas concluíram os autores que os germes adicionados de lanolina se desenvolvem *in loco*, não passando nem para o sangue, nem para os órgãos internos, mas produzem, sem dúvida, uma substância que, modificada pelos elementos inflamatórios locais, confere ao organismo a imunidade contra a infecção.

Por outro lado sabe-se que a infecção carbunculosa no homem é tanto menos grave quanto maior é a reação que se processa no ponto de inoculação.

No cão, animal refratário ao carbúnculo, observa-se no local da injeção a formação de abcesso onde a fagocitose é intensa.

Nos animais sensíveis à infecção carbunculosa, pelo contrário, o que se nota é a formação de abundante exsudato gelatinoso, muito pobre em leucócitos e rico em germes que invadem rapidamente o organismo.

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

CONCLUSÕES

1. Os títulos aglutinantes mais elevados foram verificados após a terceira e quarta inoculações.

2. A função da lanolina é tornar lenta a absorção dos antígenos, favorecendo a formação precoce de anticorpos.

3. É necessário observar um intervalo maior entre a primeira e a segunda inoculação quando se tratar de germes de poder tóxico elevado.

4. É condição essencial para a primeira inoculação empregar pequena quantidade de germes ou germes atenuados.

5. O processo empregado permite imunizar, com germes vivos e virulentos, pequenos animais de laboratório para diferentes finalidades.

SUMMARY

1. The highest agglutinant titers were observed after the third and fourth inoculations.

2. The lanoline exerts a retarding effect on the absorption of the antigens, favouring the premature formation of antibodies.

3. When working with highly toxic germs, it is necessary to separate the first and second inoculations by a longer interval.

4. It is absolutely necessary to use small quantities or attenuated germs for the first inoculation.

5. By this method it is possible to immunize, with living and virulent germs, small laboratory animals for different purposes.

REFERÊNCIAS

- 1 — RAMON, G. — 1925, *C. R. Soc. Biol.*, XCIII, 506; 1925, *C. R. Acad. Sciences*, CLXXXI, 157.
- 2 — ROUX, E. e YERSIN — 1889, *A. Inst. Pasteur*.
- 3 — MOIGNIC e PINOY — 1916, *C. R. Soc. Biol.*, 29, p. 201 e 352.
- 4 — DOCHEZ, A. R. — 1924, *J. A. M. A.*, 82, 729 ou 1924, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 21, 194.
- 5 — GLENNY, A. T., POPE, C. G., WADDINGTON, H. e WALLACE, U. — 1926, *J. Path. and Bacteriology*, XXIX, 38.
- 6 — RAMON, G., LEMÉTAYER, E. e RICHOU, R. — 1934, *C. R. Soc. Biol.*, 115; 1027; *ibid.*, 116, 823; 1935, *Revue d'Immunologie*, 1, 199.
- 7 — RAMON, G. e LEMÉTAYER, E. — 1935, *C. R. Soc. Biol.*, 119, 248.
- 8 — RAMON, G. — 1934, *C. R. Soc. Biol.*, 117, 952; 1934, *R. C. Acad. des Sciences*, 199, 985.
- 9 — RAMON, G. e STAUB, A. — 1936, *Revue d'Immunologie*, 2, 401.
- 10 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1935, *C. R. Soc. Biol.*, 119, 719.
- 11 — NICOLLE, CH. e LAIGRET — 1935, *C. R. Acad. des Sciences*, 201, 312 e 372.
- 12 — VELU, H. e ZOTTNER, G. — 19.., *C. R. Soc. Biol.*, 118, 225 e 1137.
- 13 — BELL, J. A. — 1941, *Public Health Reports*, 56, 31, 1535.
- 14 — RAMON, G. e ZOELLER, C. — 1926, *Bul. Acad. de Med.*, I, n.º 5, 95.
- 15 — MUTERMILCH S. — 1926, *C. R. Sos. Biol.*, 95, 945, 1018.
- 16 — NÉLIS, P. — 1938, *C. R. Soc. Biol.*, CXXVII, 6, 487.
- 17 — THIBAUT, P. — 1936, *Revue d'Immunologie*, 2, 508.
- 18 — NORMAN MYERS, G. — 1934, *The Jour. of Hygiene*, 34, 250.
- 19 — WALSH, V. G. e FRAZER, A. C. — 1934, *British Med. Jour.*, I, 557.
- 20 — RAMON, G. e FALCHETTI, E. — 1935, *C. R. Soc. Biol.* 119, 1077.