

Sobre as relações entre precipitinas e precipitinogeno

pelo

Dr. J. DA COSTA CRUZ

A existência concomitante de precipitinas e precipitinogeno em circulação no sangue de animaes vaccinados com sôros de especies afastadas é um facto mencionado de longa data e que pela sua significação aparentemente contraditoria attrahiu desde logo a attenção de numerosos autores.

LINOSSIER e LEMCINE parece terem sido os primeiros a verificar o fenomeno. EISENBERG estudou-o detalhadamente e tentou explicá-lo por um estado de equilibrio chimico regulado pela lei de acção das massas. VON DUNGERN em 1904, em numerosas precipitações demonstrou que esta reacção está fóra da alçada dessa lei e entrando minuciosamente na analyse do phenomeno concluiu por acreditar que nos sôros antigenicos, não existia um unico precipitinogeno, mas multiplos, os quaes despertavam nos animaes immunisados, precipitinas, não uma só, mas varias, com affinidade apenas para o precipitinogeno correspon-

dente, de modo que a presença simultanea de antigeno e anticorpo em circulação, se podia bem comprehender, sem admitir que por isso necessariamente a precipitação se effectuasse.

Comtudo, por outro lado, foram muito discordantes os resultados obtidos por grande numero de autores que se preocuparam em demonstrar a especificidade de precipitinas para determinadas proteínas.

Assim, LEBLANC, immunizando coelhos com albumina e pseudo-globulina de sôro de bôi obteve precipitinas que só precipitavam com os antigenos que tinham servido para a immunização. OBERMAYER e PICK, ROSTOSKI, UMBER, LANDSTEINER e CALVO, acham que pelo contrario uma tal especificidade não se verifica. OBERMAYER e PICK empregaram como antigeno nas suas experiencias diferentes substancias extrahidas da clara do ôvo: quatro globulinas chimicamente distinctas, uma albumina cris-

tallizavel e outra não cristallizavel. LANDSTEINER e CALVO immunizaram animaes com differentes fracções de sôro de cavallo obtidas pelos processos usuaes de precipitação. UMBER usou albuminoides da clara do ôvo, uma albumina e uma globulina sob fórmias cristallinas. ASCOLLI, poudes entretanto por meio da absorpção electiva demonstrar que os immunisôros obtidos pelo tratamento de coelhos com as differentes fracções de sôro de cavallo não eram inteiramente identicas.

A propriedade precipitante é totalmente retirada do sôro se elle fôr tratado pelo antigeno correspondente em dôse sufficiente, ao passo que uma outra fracção de sôro de cavallo, dá uma reacção parcial que permite posteriormente ainda uma precipitação com a reacção que serviu para immunizar o animal. Numerosos autores se preocuparam ainda com esta face do problema, mas os seus resultados não forneceram uma conclusão mais segura que a dos precedentemente indicados. (BERTARELLI, SACCONAGHI, FRANCESCHELLI.) Pensa UHLENHUT que os processos chimicos de preparação e purificação destes antigenos não são sufficientemente perfeitos para fazer pender a opinião neste ou naquelle sentido, porque a reacção de precipitação é muito mais sensivel do que as que podem dar os reagentes chimicos.

E' esta tambem a maneira de ver da maioria dos autores que contribuíram para estes trabalhos. Recentemente autores ha que pretendem explicar a existencia lado a lado de precipitina e precipitogeno tomando como base a analogia que este phenomeno apresenta com certos equilibrios coloidaes, mantidos por coloides protectores (ZINSSER, YOUNG). Entre numerosos argumentos, um dos que mais convence é o da precipitação lenta, expontanea «autoprecipitação» que se dá nos sôros precipitantes conservados. E' sabido, não obstante, que a mesma precipitação se dá nos sôros normaes

guardados nas melhores condições (Uhlenhut). Este ponto de vista, aliaz, foi combatido por WEIL que voltou á velha concepção de V. DUNGERN, depois de numerosas precipitações executadas com albumina cristallisada de ovo. WEIL (§) afirma que se uma proteina pura como albumina de ôvo fôr usada para immunização, nunca antigeno e anticorpo se encontram em circulação conjuntamente. (§) WEIL citado por ZINSSER. *Infection and resistance* 1918 pag. 271.

A questão, porém não terminou ainda e espera uma solução definitiva.

Os resultados que obtivemos nos nossos ensaios não parecem ser totalmente desprovidos de interesse. Pensamos que a prevalecer a opinião de V. DUNGERN, experimentalmente, um caminho poderia ainda ser explorado, e era aquelle que levando em conta o periodo de incubação das precipitinas para as differentes fracções do sôro antigenico usado, pudesse indicar que realmente cada fracção determinaria um periodo de incubação diferente e proximamente especifico na mesma especie animal.

Comquanto sejam conhecidas grandes oscillações individuaes dentro de uma mesma especie na capacidade de produção dos anticorpos que nos interessam, iniciamos o estudo de uma serie de animaes resolvidos a questão sob este ponto de vista. Como as injeções multiplas encurtam o periodo de incubação ao mesmo tempo que reduzem o tempo de permanencia do precipitogeno na circulação, só aproveitamos para as nossas series os animaes que nos forneciam precipitinas submettidos a uma só inoculação. Como é provavel tambem que os differentes precipitogenos não se conservem nos sôros de animaes da mesma especie, na mesma proporção, empregamos sempre como antigeno uma partida de sôro de cavallo, proveniente de uma só sangria.

1ª Serie de experiencias:

Quatro coelhos de peso proximamente igual, foram inoculados, com 10 cc. de sôro normal de cavallo e sangrados no 4º, 5º, 9º, 16º, dia depois da inoculação. Separados os quatro sôros, foram dosados no seu valor precipitante, não só por diluição do precipitinogeno, como por diluição do proprio sôro precipitante em presença de uma diluição a 1/100 de precipitinogeno.

Sôro de 4 dias éra precipitante até 1/1.000 e precipitava diluido a 1/2.

Sôro de 5 dias éra precipitante até 1/10.000 e precipitava diluido a 1/2.

Sôro de 9 dias éra precipitante até 1/10.000 e precipitava diluido a 1/8.

Sôro de 16 dias éra precipitante até 1/10.000 e precipitava diluido a 1/32.

Os sôros precipitantes eram usados em natureza na dóse de 0,5, e precipitinogeno em doses decrescentes de metade até 1/64.

1ª Serie sôro prec. 16 dias 0,5+0,5 cc. de 1/2, 1/4, 1/8 etc. 1/64. Sôro de 4 dias anel até 1/64.

2ª Serie sôro prec. 16 dias 0,5+0,5 cc. de 1/2, 1/4, 1/8 etc. 1/64. Sôro de 5 dias 1/64.
3ª « « « « « 0,5—0,5 « « « « « « « « « 9 « 1/32.
4ª « « « 9 « « « « « « « « « « « 4 « 1/16.
5ª « « « « « « « « « « « « « « « 5 « 1/16.
6ª « « « « « « « « « « « « « « « 16 « 1/2. ♂
7ª « « « 5 « « « « « « « « « « « 4 « 1/2. ♀
8ª « « « « « « « « « « « « « « « 9 « 1/4. ♂
9ª « « « « « « « « « « « « « « « 16 « 1/16. ♂
10ª « « « 4 « « « « « « « « « « « 5 « 0
11ª « « « « « « « « « « « « « « « 9 « 1/4. ♂
12ª « « « « « « « « « « « « « « « 16 « 1/16. ♂

2ª Serie de experiencias:

Tres coelhos de peso proximamente igual, foram inoculados com 15 c.c. de sôro normal de cavallo subcutaneamente e sangrados no 4º, 10º e 16º dia

Sôro de 16 dias éra precipitante até 1/10.000 e precipitava diluido até 1/32.

Sôro de 10 dias éra precipitante até 1/10.000 e precipitava diluido até 1/16. Com 1/100 de antigeno.

Sôro de 4 dias éra precipitante até ((?) e diluido não dava precipitado.

O sôro de 10 dias foi conservado no frigorifico por mais de seis dias, antes da execução das series abaixo.

1ª Serie: Sôro prec. de 16 dias 0,5—0,5 de 1/2. etc. 1/128 sôro de 4 dias 1/128
2ª « « « « « « « « « « « « « « « 10 « 1/64
3ª « 0 « « 10 « « « « « « « « « « 4 « 1/64
4ª « « « « « « « « « « « « « « « 16 « 1/16 ♂
5ª « « « « 4 « « « « « « « « « « 10 « 1/16 ♂
6ª « « « « « « « « « « « « « « « 16 « 1/32 ♂

3ª Serie de experiencias:

Quatro coelhos foram inoculados com 15 c.c. de sôro normal de cavallo e respectivamente sangrados no 6º, 10º, 16º e 21º dias.

Sôro de 21 dias precipitado até 1/10.000 e diluido precipitado até 1/32.

Sôro de 16 dias precipitado até 1/10.000 e diluido precipitado até 1/32. Com 1/100 de antigeno.

Sôro de 10 dias precipitado até 1/10.000 e diluido precipitado até 1/16.

Sôro de 6 dias precipitado até 1/1.000 e diluido precipitado até 1/4.

O precipitado com sôro de 10 dias no tubo a 1/100 de precipitinogeno, foi ligeiramente menor que com sôro de 16 e sensivelmente mais abundante que com sôro de 21 dias.

1a	Serie	sôro	prec.	de	21	dias	0,5—0,5	sôro	de	16	dias	(diluições até	1/256)	1/64			
2a	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	sôro	de	10	dias	1/118	
3a	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	6	«	1/256	
4a	«	«	«	«	16	«	«	«	«	«	«	«	«	21	«	1/8	♂
5a	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	10	«	1/64	
6a	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	6	«	1/256	
7a	«	«	«	«	10	«	»	«	«	«	«	«	«	21	«	1/16	♂
8a	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	16	«	1/16	♂
9a	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	6	«	1/128	
10a	«	«	«	«	6	«	«	«	«	«	«	«	«	21	«	1/32	♂
11a	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	16	«	1/32	♂
12a	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	«	10	«	1/16	♂

Destes resultados infere-se que:

a) O precipitinogeno em circulação no sôro dos animaes tratados, só é demonstravel, por sôros precipitantes com data da sangria posterior.

b) que quando se toma nas mistura de dois sôros precipitantes, para sôro precipitante o que contem precipitinas mais recentes, a precipitação nunca excede o tubo, em que diluido o sôro de data posterior é capaz de precipitar sôro de cavallo a 1/100. (Nas tabellas acima as flexas indicam o sentido em que se tende a dar a precipitação que se difunde pelo sôro que na reação age como precipitante, todas as vezes que se respeitem certas precauções de technica e que o precipitado não seja muito espesso o que é quasi sempre o caso.

c) que a precipitação de precipitinogeno num mesmo sôro é demonstravel até uma diluição tanto maior quanto mais longo fôr o intervallo de sangria entre os dois sôros, (dentro de certos limites).

4a Serie de experiencias:

Um coelho inoculado com 15 c.c. de sôro normal de cavallo foi sangrado ao

fim de 26 dias e forneceu sôro precipitante até 1/1000.000.

Um coelho (sôro nº 1) foi inoculado com 5 c.c. de sôro normal de cavallo, e sangrado seis dias depois o seu sôro era precipitante até 1/1000.

Sôro nº. 1 0,5—0,5 de 1/2 etc. 1/256 sôro nº 2 não precipitado.

Sôro nº 2 0,5—0,5 de 1/2 etc. 1/256 sôro nº 1 não precipitado.

Sôro de 26 dias 0,5—0,5 de 1/2 etc. 1/256 sôro nº 1 precipitado até 1/64.

Sôro de 26 dias 0,5—0,5 de 1/2 etc. 1/256 sôro nº 2 precipitado até 1/256.

Um coelho foi inoculado em:

12/2/920 com 15 c. c. de sôro normal de cavallo.

14/2/920 com 10 c. c. de sôro normal de cavallo.

16/2/920 com 10 c. c. de sôro normal de cavallo.

e sangrado em 20/2/920, isto é 8 dias depois da primeira injeção.

O sôro éra precipitante até 1/100.000.

Um coelho foi inoculado com 15 c.c.

de sôro normal de cavallo e oito dias depois sangrado.

A *mistura destes dois sôros*, obedecendo ao mesmo criterio dos ensaios anteriores *não deu nenhum precipitado*.

Dois coelhos receberam subcutaneamente 15 c.c. de sôro normal de cavallo 1º e 10º dias depois foram sangrados. Um dos sôros precipitava até 1/1.000, o outro ligeiramente hemolizado não ia além de 1/1.000.

A *mistura em series*, destes dois sôros *tambem não deu precipitado*, mesmo usando os sôros em natureza.

Assim conclue-se que:

a) Os sôros precipitantes com o mesmo periodo de sangria, embora possuam o mesmo titulo precipitante e grandes differenças na quantidade de precipitogeno, não dão em geral precipitação quando postos em contacto.

b) Sôros precipitantes com o mesmo tempo de sangria, com titulos precipitantes differentes embora com quantidades proximamente eguaes de precipitogeno, tambem não deram a formação de anel.

Devemos entretanto accrescentar que algumas vezes posteriormente, obtivemos pela junção de sôros precipitantes com o mesmo tempo de sangria (10º dia, 16º dia) a formação lenta de um anel diffuso, sem duvida nenhuma dependente de um phenomeno de precipitação.

Essas relações eram entretanto muito fracas em comparação com as que obtivemos nas series acima mencionadas com os sôros de datas differentes. Somos levados a crêr por isso que os periodos de incubação das diversas precipitinas na especie de animaes empregados, são apenas *proximamente* identicos e que o character de nitidez que apresentam os nossos ensaios, deriva dos intervallos de tempo aproveitados sufficientemente largos para excederem ás oscillações individuais.

5ª Serie de experiencias:

Um coelho foi inoculado com 15 c.c. de sôro normal de cavallo e sangrado com 21 dias, deu precipitinas até 1/10.000

Este sôro misturado com o de 16 dias, já usado anteriormente e de titulo precipitante igual a 1/1.000.000, não mostrou formação de precipitado em nenhum tubo.

Dois coelhos de peso proximamente igual foram inoculados com 15 c.c. de sôro normal de cavallo e quatro dias depois com mais 10 c.c. Sete dias depois da ultima inoculação um dos coelhos (nº 1) foi sangrado em 50 c.c. de sangue o outro (nº 2) só em 10 c.c.

O poder dos dois sôros em precipitinas não iam além de 1/10.000 e a mistura dos dois sôros em qualquer proporção não dava occasião ao apparecimento do anel. Cinco dias mais tarde, foram estes animaes novamente sangrados. O sôro nº 1 precipitava só até 1/1.000 o nº 2 ainda até 1/10.000.

1ª Ser. sôro nº 1 (2ª sangr.) 0,5—0,5
1/2 etc. sôro nº 1 da 1ª sang. 0.

2ª Ser. sôro nº 1 (2ª sangr.) 0,5—0,5
1/2 etc. sôro nº 2 da 1ª sang. 0.

3ª Ser. sôro nº 2 (2ª sangr..) 0,5—0,5
1/2 etc. sôro nº 1 da 1ª sang. 1/16.

4ª Ser. sôro nº 2 (2ª sangr..) 0,5—0,5
1/2 etc. sôro nº 2 da 1ª sang. 1/8

Destes resultados pode-se talvez concluir que:

O precipitinogeno já não se conserva em circulação no coelho em quantidades demonstraveis, quando se injectam 15 c.c. de sôro de cavallo, no 21 dia.

Quando se sangra um animal vaccinado, duas vezes, com um intervallo de tempo regular, o sôro de data posterior, posto que não tenha aumentado o titulo precipitante, adquire a propriedade de demonstrar o precipitinogeno do de data de sangria anterior. Se porém, a quantidade de sangue tirado na 1ª sangria for sufficientemente forte, o sôro desse outro

animal não só baixa visivelmente de título, mas não adquire a propriedade de precipitar o de data anterior. Parece portanto, que neste caso a sangria não só retira as precipitinas já existentes em grande parte, mas também retira o precipinogeno, em circulação no sangue, precipitinogeno que se deve por isso considerar como necessario para a formação das precipitinas que precipitam o precipitinogeno da 1ª sangria. *Tudo se passa pois, no processo de vacinação, como se as diversas fracções do sôro fossem retiradas da circulação á medida que vão aparecendo no sangue os anticorpos, que as precipitam, anticorpos que se vão sommando em qualidade até o dia 21º, ou mesmo talvez até mais tarde.*

Para o assumpto de que nos vimos ocupando, outro facto entretanto, nos poderia servir para orientação. E' sabido que muitos anticorpos funcionam, se não como precipitinogenos, como substancias extremamente proximas destes corpos. (KRAUS e PRIBRAM). DEHNE e HAMBURGER verificaram em 1904 que os sôros precipitantes para cavallo (coelho), eram capazes de fazer cair juntamente com o precipitado, a antitoxina tetanica dos sôros de cavallos immunisados activamente, contra essa toxina. Que essa reacção era absolutamente especifica e não corria por conta de um phenomeno physico ficou exuberantemente provado além do desses autores pelos trabalhos de KRAUS e PRIBRAM e de V. EISLER e TSURU'.

Começamos por determinar até que intervallo de tempo, a antoxina tetanica podia ser encontrada na circulação de coelhos inoculados em quantidade sufficiente, e os nossos resultados aproximam-se dos autores que estudaram esse ponto. (DENNE e HAMBURGER TIZZONI, etc.)

Tres coelhos de tamanho regular, foram inoculados em intervallos de cinco dias, com 3, 5, 7, c.c. de sôro antitetanico representando um total de 15.000

U. A. O sôro dos coelhos tinha-se mostrado previamente indifferente em face da antitoxina como cuidadosamente verificamos.

Ao fim de 13 dias depois da ultima inoculação, restavam-nos dois animaes que sangrados forneceram sôro para exame.

Reacção das precipitinas presente.

1ª Cobaia—1/2.000 s. ant.—2 cc. ag. fis. Test. dóse. Fal. tet. no 5º dia.

2ª Cobaia—1/1.000 s. ant.—2 cc. ag. fis. Test. dóse. Sobreviveu.

3ª Cobaia—1/2.000 s. ant.—2 cc. s. coelho nº 1 Test. dóse. Fal. tet. no 8º dia.

4ª Cobaia—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. coelho nº 1 Test. dóse. Sobreviveu.

5ª Cobaia—1/2.000 s. ant.—2 cc. s. coelho nº 2 Tes. dóse. Fal. tet. no 7º dia.

6ª Cobaia—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. coelho nº 2 Tes. dóse. Sobreviveu.

7ª Cobaia—2 cc. sôro coelho nº 1—0,0025 tox. tet. Sobreviveu.

8ª Cobaia—2 cc. sôro coelho nº 2—0,0025 tox. tet. Sobreviveu.

9ª Cobaia—0,0005 tox. tet. Falleceu do 4º para o 5º dia.

Os sôros dos coelhos foram collocados com as diluições de sôro antitoxico, durante uma hora na estufa, ao fim da qual se juntava a testemunha dóse da toxina que se deixava mais uma hora á temperatura ambiente. A antitoxina usada foi sempre a mesma e as dosagens foram sempre executadas segundo o metodo de ROSENAU ANDERSON.

Vê-se assim que á distancia de treze dias da ultima inoculação, existia ainda em quantidade muito apreciavel antitoxina de cavallo em circulação, embora existissem já precipitinas em abundancia.

Oito dias mais tarde, por nos ter fallecido um dos animaes, foi sangrado outra vez o restante e examinado o sôro.

Reacção das precipitinas presente.

1ª Cobaya—1/2.000 s. ant.—2 cc. ag.

fis. Test. dóse. Tet. local no 3º dia, fal. 4º
2ª Cobaya—1/2.000 s. ant.—2 cc. ag.
fis. Test. dóse. Tet. dóse. Bôa saude. Sobreviveu.

3ª Cobaya—1/2.000 s. ant.—2 cc. ag.
sôro coelho nº 1—Test. dóse. Tet. dia-
phragmatico. Falleceu no 2º dia á tarde.

4ª Cobaya—1/1.000 s. ant. — 2 cc.
sôro coelho nº 1—Test. dóse. Tet. local
nitido no 1º dia. Amanheceu morta no 2º.

Como se vê dessa vez a antitoxina foi inteiramente subtrahida do sôro antitoxico. Pudemos observar nitidamente que a inactivação a 56º, meia hora, não altera em nada o poder inactivante para a antitoxina, e assim tambem como DENNE e HAMBURGER, conseguimos facilmente regenerar a propriedade antitoxica dissolvendo o precipitado em excesso de precipitinogeno (sôro normal de cavallo). Parece que a não se tratar aqui de um papel precipitinogenico da antitoxina, a interpretação do phenomeno fica muito obscura, visto que uma vez ligada á toxina correspondente como pudemos assegurar-nos, o sôro precipitante é incapaz de libertar a toxina do seu anticorpo:

1ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. Sôro precipitado.—Test. dóse.

2ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—Test dóse —2 cc. sôro precipitado.

3ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. ag. physiol—Test. dóse.

Na 2ª cobaya a toxina depois de uma hora de contacto com a antitoxina, foi deixada mais uma hora na estufa com sôro precipitante.

A 1ªcobaya morreu de tetano em dois dias. As outras duas sobreviveram quarenta e um dias depois da ultima inoculação, o sôro deste mesmo animal, outra vez sangrado, conservava ainda nitidamente a propriedade de inactivar a antitoxina.

Cinco coelhos foram inoculados subcutaneamente com 15 c.c. de sôro normal de cavallo e sangrado no 6º, 10º, 16º, 21º e 26º dias.

(Sôros empregados a pag. 111).

1ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. pre. 6º dia—Test. dóse.

2ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. pre. 10º dia—Test. dóse.

3ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. pre. 16º dia—Test. dóse.

4ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. pre. 21º dia—Test. dóse.

5ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. pre. 26º dia—Test. dóse.

6ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. ag. physiol. dia—Test. dóse.

No segundo dia depois da inoculação falleceram de tetano a 3ª, 4ª e 5ª cobayas; as outras tres permaneceram em bom estado sempre. D'aqui resulta que as precipitinas capazes de arrastar a antitoxina só apparecem na visinhança do 16º dia depois da inoculação, independentemente do titulo precipitante do sôro ou da quantidade do precipitado que se forme.

Um coelho recebeu tres inoculações subcutaneas de sôro normal de cavallo na seguinte ordem:

Em 10/1/1920—15 c. c.

Em 12/1/1920—10 c. c.

Em 15/1/1920—10 c. c.

Sangrado em 21 deu precipitinas até 1/100.000 com precipitado muito abundante até a diluição de 1/1.000 de precipitinogeno.

Em 23/1/1920.

1ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. pre. Test. dóse.

2ª Cobaya—1/2.000 s. ant.—2 cc. s. pre. Tes. dóse.

3ª Cobaya—1/1.000 s. ant.—2 cc. s. ag. fis. Tes. dóse.

4ª Cobaya—1/2.000 s. ant.—2 cc. ag. fis. Tes. dóse.

A quarta cobaya morreu em 60 horas; a segunda em 72 horas. As duas sobreviveram.

Um coelho vaccinado com sôro concentrado antitetânico (estalão americano), por meio de tres inoculações espaçadas de cinco em cinco dias, foi sangrado 24 dias, depois da ultima injeção e o seu sôro precipitava a antitoxina tão bem quanto os outros anteriormente usados.

Com a antitoxina diphterica nunca pudemos, porem, apesar de todos os esforços verificar a desaparição da antitoxina pelo emprego de sôros precipitantes, bem que tivéssemos usado sôros antitoxicos da proveniencia differente e de titulo sufficientemente alto para os podermos empregar nas dosagens em diluições eguaes as que eram usadas para a antitoxina tetanica; e bem que todos os sôros precipitantes tivessem sido previamente verificados activos para a antitoxina tetanicas.

Cobayas de 250 grs.

1ª Cobaya—1/700 s. ant. dift. 2 cc. s. prec.—21 dias—Test. dóse.

2ª Cobaya—1/1.000 s. ant. dift. 2 cc. s. prec.—21 dias—Test. dóse.

3ª Cobaya—1/700 s. ant. dift. 2 cc. ag. physiol.—Test. dóse.

4ª Cobaya—1/1.000 s. ant. dift. 2 cc. ag. physiol.—Test. dóse.

Destas cobayas a ultima morreu do quarto para o quinto dia, assim como a segunda cinco horas depois, ambas com congestão das capsulas suprarenaes, e infiltrações hemorragicas do ponto de inoculação.

Cobayas de 250 grs. Sôro precipitante de 36 dias.

1ª Cobaya—0,1 sôro ant. stalão—2 cc. s. prec.—0,7 toxina (tes. dóse)

2ª Cobaya—0,1 sôro ant. stalão—3 cc. s. prec.—0,7 toxina (tes. dóse).

3ª Cobaya—0,1 sôro ant. stalão—2 cc. ag. physiol.—0,1 toxina (test. dóse).

Estas cobayas morreram com intervalo de horas do quarto para o quinto dia.

Sôro precipitante de 30 dias.

1º Pombo—1/800 s. ant.—dift.—2 cc. s. prec.—test. dóse.

2º Pombo—1/1.000 s. ant.—dift.—2 cc. s. prec.—test. dóse.

3º Pombo—1/800 s. ant.—dift.—2 cc. ag. physiol.—test. dóse.

4º Pombo—1/1.000 s. ant.—dift.—2 cc. ag. physiol.—test. dóse.

Todos os animaes sobreviveram excepto o ultimo que falleceu no 6º dia

Não obstante a nossa diligencia em obter as melhores condições para se encontrarem resultados positivos, foi-nos sempre impossivel retirar a antitoxina diphterica por meio de sôro coelho-anticavallo.

O resultado desses ensaios explica porem porque razão discordam inteiramente das de DEHNE e HAMBURGER as experiencias de KRAUS e PRIBRAM, sobre a precipitação de antitoxinas em «vivo» é que enquanto os primeiros trabalhavam com antitoxina tetanica os outros serviam-se para suas indagações de antitoxica diphterica. As conclusões de KRAUS e PRIBRAM sobre esse ponto, não têm por isso um valor inquestionavel.

Mas não só com antitoxina diphterica deixamos de ter resultados positivos, os ensaios com antitoxina botropica levaram-no a resultados analogos. Estes ensaios entretanto são mais passíveis de critica visto que para as dosagens do sôro não se podem fazer grandes diluições do precipitinogeno, condição segundo KRAUS e PRIBRAM essencial para que se obtenham resultados seguros. Para obviar esse inconveniente, empregamos quantidades excessivas de sôro precipitante que tinha sido como nos casos de diphteria previamente provado com antitoxina tetanica.

O sôro antitoxico empregado, provinha de I. S. B. de S. Paulo e trazia como indicação de dosagem, 1 c. c. de sôro para 1,6 de veneno de LACHESIS.

LANCEOLATUS. O nosso veneno provinha de Bello Horizonte. Todas as dosagens foram feitas pelo processo de VITAL BRASIL. Antes de juntar o veneno, deixavam-se os tubos com sôro antitoxico e sôro precipitante, 2 horas na estufa a 37°. Depois da adiçào do veneno demoravam ainda uma hora a 37° antes da injeçào que era feita na veia axillar do pombo.

1° Pombo—1 cc. sôro botr. 3 cc. s. prec.—1,6 venen. L. lanceolatus.

2° Pombo—1 cc. sôro botr. 2 cc. s. sprec.—1,6 venen. L. lanceolatus.

3° Pombo—1 cc. sôro botr. 1 cc. s. prec.—1,6 venen. L. lanceolatus.

4° Pombo—1 cc. sôro botr. 2 cc. ag. dis.—1,6 venen. L. lanceolatus.

5° Pombo—1,6 de veneno de L. lanceolatus.

Todos os pombos se conservaram em bom estado depois da inoculaçào e sobreviveram, excepto o ultimo que teve morte immediata.

2ª Serie:

1° Pombo—1/10. de sôro botr. 2 cc. s. prec. 0,16 ven. L. lanceolatus.

2° Pombo—1/10 de sôro botr. 1,5 s. prec. 0,16 ven. L. lanceolatus.

3° Pombo—1/10 de sôro botr. 1 cc. s. prec. 0,16 ven. L. lanceolatus.

4° Pombo—1/10 de sôro botr. 2 cc. ag. fis. 0,16 ven. L. lanceolatus

5° Pombo—1,16 veneno de L. lanceolatus.

Todos os animaes resistiram sem alteraçào do estado de saude, com excepçào do ultimo que morreu antes de cinco minutos.

A carencia do sôro no mercado impediu-nos de executar outros ensaios e de determinar dosagens com sôro anticrotalico. O sôro precipitante aqui empregado era de 24 dias.

Mais interessantes ainda foram os resultados achados para antitoxina teta-

nica, com sôro precipitante humano anticavallo.

A. S. recebeu em dois dias 300 c. c. de sôro anti-pestoso em tres injeçõe, duas na veia e uma debaixo da péle. Ultima injeçào em 11-11-1919.

Em 19-11-1919, foi sangrado e o sôro demonstrou:

Presença de precipitinogeno até a diluiçào de 1/10.

Presença de precipitinas até á uma diluiçào superior a 1/1000.

Ausencia de precipitina para a antitoxina tetanica.

Em 26-11-1919, outra vez sangrado o sôro mostrou:

Presença de precipitinogeno até 1/10.

Presença de precipitinas até 1/1000.

Ausencia completa de precipitinas para a antitoxina tetanica.

Em 24-12-1919, pela ultima vez sangrado a analise do sôro demonstrou:

Presença de precipitinogeno até 1/2.

Presença de precipitinas até 1/10.000.

Ausencia de precipitina para a antitoxina tetanica.

C. R. Recebeu 320 c.c. de sôro anti-pestoso em tres inoculaçõe endovenosas, a ultima datando de 11-11-1919.

Em 22-11-1919, sangrado o sôro examinado mostrou:

Presença de precipitinogeno até 1/10.

Presença de precipitinas até 1/1000.

Ausencia de precipitina para a antitoxina tetanica.

Em 5-12-1919:

Presença de precipitinogeno até 1/2.

Presença de precipitinas até 1/1000.

Ausencia de qualquer acçào sobre a antitoxina tetanica.

Em 29-12-1919:

Ausencia de precipitinogeno.

Presença de precipitinas até 1/10.000.

Ausencia de quaquer efeito nocivo sobre a antitoxina tetanica. O precipitinogeno foi pesquisado com sôro precipitante de coelho para cavallo, de 17 dias, As dosagens da antitoxina foram execu-

tadas tão proximo do titulo antitoxico do sôro, que se obteve nas cobayas tetano local nitido.

Posteriormente tivemos ainda ocasião de examinar mais tres individuos, mas eximimo-nos de mencionar detalhadamente os resultados por que não diferem nada dos mencionados. Em nenhum caso pudemos obter um resultado que pudesse ser considerado duvidoso.

Demonstra isso portante que o precipitinogenos para determinadas especies animaes, podem deixar de se-lo para outras, bem que essas outras possam responder com precipitinas a outras fracções de sôro empregado.

Estudando no coelho, com antitoxina disenterica, obtivemos resultados completamente diferentes.

Technica:

Collocados 0,1 de sôro anti-Shiga concentrado 6 vezes, durante duas horas a 37° em presença de sôro precipitante de 16 dias, de 4 dias, e de sôro normal de coelho. Inoculada a mistura na veia marginal da orelha, depois de centrifugação e decantação, deixou-se passar meia hora e então na veia da orelha oposta, inocularam-se 0,4 de extracto Shiga.

1° Coelho—1 c. c. de sôro de 16 dias—0,1 Shiga—0,4 ext. Shiga.

2° Coelho—1 c. c. de sôro de 4 dias—0,1 Shiga—0,4 ext. Shiga.

3° Coelho—1 c. c. de sôro normal de coelho—0,1 S. Shiga—0,4 ext. Shiga.

4° Coelho—0,1 S. Shiga—0,4 ext. Shiga.

O primeiro coelho morreu em tres dias com paralisia generalizada, o segundo que desde o segundo dia se mostrou quasi totalmente paralitico resistiu até o 9° dia. Os outros dois animaes não mostraram alteração do estado de saude.

A repetição deste ensaio, levou-nos a resultados analogos. O 10° coelho morreu no 3° dia, o segundo faleceu no 7°

com paralisias iniciaes no 2°. O sôro precipitante do 4° dia aqui empregado tinha-se mostrado inteiramente incapaz de retirar a antitoxina tetanica do sôro antitoxico. Estendendo as nossas investigações ás aglutininas, empregamos não só a tecnica de KRAUS e PRIBRAM, partindo para as diluições de precipitações mães, mas tambem usando para cada diluição a juntar germens, 0,5 de sôro precipitante.

Technica:

A cada tubo contendo, 0,5 de sôro precipitante foram juntados 0,5 de diluições a 1/25, 1/125, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000 de sôro agglutinante disenterico e depois de duas horas na estufa a 37°, retiraram-se os precipitados formados por centrifugação e decantação. Adicionado 1 c.c. de uma emulsão de b. Shiga em cada tubo, levou-se a mistura á estufa por mais duas horas e procedeu-se a leitura.

Fizemos varias series para as precipitinas que possuímos, 4, 10, 16, 21 e 26 dias.

A aglutinação deu positiva até 1/16.000 (ultimo tubo) na serie em que se trabalhava com precipitinas do 4° dia e completamente negativa em todas as outras, desde o primeiro tubo, bem que a diluição do sôro empregado, não excedesse 1/25.

Uma serie testemunha, demonstrou que o sôro agglutinante até 1/500.

A aglutinação até 1/16000 na serie das precipitinas do 4° dia, corria por conta do sôro de coelho empregado.

Para as agglutininas typhicas o sôro empregado era agglutinante para a amostra que usamos até 1/10.000.

Como precedentemente para os bacilos disentericos a aglutinação foi negativa com precipitinas do 10°, 16°, 21° e 26° dias e positiva na do quarto dia. Além da tecnica empregada acima, fizemos series de diluições de sôro agglutinante a 1/500 e 1/1000 em 0,5 c. c., que

juntamos a 0,5 dos sôros precipitantes. Depois da demora indicada na estufa, e de retirado o precipitado, partimos do liquido, sobrenadante para diluições que adicionadas á emulsão de *B. typhicos* nos permittissem titulos a 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/8000, 1/16.000, 1/32.000, 1/64.000.

A leitura permittiu ainda aqui com as precipitinas do quarto dia, agglutinação positiva até 1/32.000 que provavelmente provinha do sôro de coelho.

Estes dados indicam que os differentes anticorpos se encontram em circulação fazendo parte de precipitinogenos differentes, que se podem em parte distinguir pela demora por que no organismo do coelho se processa a produção de precipitinas. Assim a antitoxina disenterica, já é parcialmente precipitada por precipitinas do quarto dia, ao passo que as agglutininas para o mesmo germen só são precipitadas por sôros do 10º dia e que a antitoxina tetanica só ainda com sôros mais tardios é retirada do sôro antitoxico (16º dia).

Para as duas agglutininas que investigamos a precipitação começava em sôro da mesma data, enquanto para a antitoxina diphtherica e botropica, foi-nos sempre impossivel obter resultados positivos, apesar de todos os cuidados com que se examinou a questão. Assim chegamos á conclusão que os diversos anticorpos se encontram presos a precipitinogenos differentes, alguns dos quaes se podem nitidamente differençar, e outros em que essa differenciação é prejudicada pelo facto de provocarem no coelho um periodo de inoculação proxivamente igual. KRAUS e PRIBRAM, por algumas precipitinas retirarem agglutininas para um mesmo germen de determinados sôros, em certa quantidade e necessitarem de muito mais sôro precipitante para produzirem o mesmo effeito em agglutininas de outros animaes da mesma especie, acham até que o mesmo anticorpo possa estar ligado a precipitinogenos differentes nesses animaes (cavallos). Essa con-

clusão nos parece excessiva e cremos que se trate aí antes de uma relação quantitativa entre o precipitinogeno a que está ligada a agglutinina e a parte desse mesmo precipitinogeno sem grupos agglutinantes, que circula certamente ao lado, e que é precipitada pela mesma especie de precipitinas.

Como estava imediatamente indicado, depois disso, encetamos o estudo das relações entre precipitinas e outros anticorpos (agglutininas e antitoxinas).

Um coelho marcado de acido picrico, foi inoculado em:

24—1—1920—com 10 c. c. de uma emulsão de bacillos de môrmo mortos a 70º
28—1—920—durante duas horas e simultaneamente com 10 c. c. de sôro normal
2—2—920—de cavallo.

Sangrado em 9—2—920, forneceu sôro precipitante até 1/100.000 e agglutinante até 1/1.600.

Technica:

A 0,5 de sôro de coelho foram adicionadas quantidades decrescentes de sôro de cavallo a 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 e 1/100.000. Depois de duas horas na estufa a 37º e 24 horas no frigorifico, retiraram-se os precipitados formados por centrifugação e decantação e diluiram-se os liquidos sobrenadantes de modo a se obterem diluições de sôro a 1/200, 1/400, etc. até 1/6.400, depois de juntar a todos os tubos 1 c. c. de uma emulsão de germens. A tubos testemunhas submettidos a tratamento identico substitui-se o sôro precipitinogenico de cavallo por agua physiologica. A leitura foi feita com 24 horas de estufa a 37º. Em todos os tubos e mesmo no primeiro em que o precipitado foi muito abundante o liquido sobrenadante agglutinou os germens até 1/1600, como nos tubos testemunhas.

Conclue-se d'aqui, que as precipitinas não estão ligadas no sôro á mesma fracção a que pertencem as agglutininas e que a retirada dessa fracção não dá ás agglutininas, nem maior affinidade nem

maior actividade para os germens especificos.

Com as antitoxinas fomos levado a resultados identicos:

Um cavallo foi inoculado em:

17-9-919 com 100 cc. de toxoides tetanicos.

25-9-919 com 250 cc. de toxoides tetanicos.

6-10-919 com 250 cc. de toxoides tetanicos.

17-10-919 com 300 cc. de toxoides tetanicos.

29-10-919 com 400 cc. de toxoides tetanicos.

9-11-919 com 400 cc. de toxoides tetanicos.

19-11-919 com 450 cc. de toxoides tetanicos.

27-11-919 com 100 cc. de toxina e formol (3 dias de contacto).

10-12-919 com 150 cc. de toxina.

18-12-919 com 200 cc. de toxina.

19-12-919 com 500 cc. de sôro normal de carneiro.

30-12-919 com 250 cc. de toxina.

31-12-919 com 250 cc. de sôro normal de carneiro.

Sangrado em 9-1-920, forneceu sôro antitoxico com 500 u. a. por centimetro cubico e precipitante até 1/100.

Em 15-1-920, a 0,5 de sôro desse cavallo, foi juntado sôro de carneiro diluido a 1/10. Depois de duas horas a 37° e 24 horas no frigorifico foi centrifugado e o liquido proveniente da decantação foi de tal forma diluido que o sôro antitoxico ficou a 1/1000, 1/2000 e 1/5000. Testemunhas acompanharam o tratamento com agua physiologica em vez de sôro de carneiro. A cada diluição juntou-se a test. dóse de toxina, e decorrida uma hora foram feitas as inoculações em cobayas de 350 grs.

1°—cobaya—1/1000 s. ant. precipitado — 2 cc. ag. physiol.—Test. — dóse.

2°—cobaya—1/2000 s. ant. precipitado — 2 cc. ag. physiol.—Test. — dóse.

3°—cobaya—1/500 s. ant. precipitado — 2 cc. ag. physiol.—Test. — dóse.

4°—cobaya—1/1.000 s. ant. não prec. — 2 cc. ag. physiol. — Test.—dóse.

5°—cobaya—1/2.000 s. ant. não prec. — 2 cc. ag. physiol. — Test.—dóse.

6°—cobaya—1/5.000 s. ant. não prec. — 2 cc. ag. physiol. — Test.—dóse.

A terceira e a sexta cobayas falleceram de tetano em 20-1-920; as outras quatro sobreviveram.

Um bóde foi inoculado em:

28-10-919 com 50 cc. de toxoides

7-11-919 com 100 cc. de toxoides

17-11-919 com 100cc. de toxoides

27-11-919 com 150 cc. de toxoides

10-12-919 com 150 cc. de toxoides

20-12-919 com 20 cc. de toxina

30-12-920 com 40 cc. de toxina

9-1-920 com 50 cc. de toxina

19-1-920 com 50 cc. de toxina

20-1-920 com 100 cc. de sôro normal de cavallo.

29-1-920 com 50 cc. de toxina

30-1-920 com 100 cc. de sôro normal de cavallo.

Em 13-2-920, o animal foi sangrado e o sôro dava 50 u. a. por centimetro cubico e era precipitante até 1/1000.

A technica aqui empregada foi exactamente igual á precedente, o sôro foi precipitado por uma diluição a 1/10, tubo em que o precipitado foi mais abundante.

1° cobaya—1/500 s. ant. precipitado—2 cc. de ag. physiol.—Test.—dóse.

2° cobaya—1/1.000 s. ant. precipitado—2 cc. de ag. physiol.—Test.—dóse.

3° cobaya—1/500 s. ant. não prec.—2 cc. de ag. physiol.—Test.—dóse.

4° cobaya—1/1.000 s. ant. não prec.—2 cc. de ag. physiol.—Test.—dóse.

A segunda e a quarta cobayas falleceram de tetano durante o curso do segundo dia, a terceira durante a tarde do quarto dia e a primeira appareceu morta na manhã do quinto dia.

Vê-se pois tambem d'aqui que a retirada da fracção do sôro que n'elles constitue a parte precipitante, é inteiramente

independente da parte que forma a antitoxina tetanica em animaes de variada especie. A retirada dessa parte não dá ao sôro melhores propriedades antitoxicas nem maior affinidade para a toxina.

Rio, 12 de Março de 1920.