

ESTUDO COMPARATIVO DA IMUNIZAÇÃO ANTITETÂNICA COM O USO DO TOXÓIDE TETÂNICO FLUIDO E PRECIPITADO PELO ALÚMEN *

Roched A. Seba, ** Walter Tavares *** Nair de Souza ****

Os autores fazem um estudo comparativo da imunização antitetânica em um grupo de crianças, utilizando toxóide fluido contendo 20 Lf/cm³ e toxóide precipitado pelo alúmen contendo 2 Lf/cm³. O esquema utilizado foi de 3 doses com intervalos de 21 dias entre cada dose, aplicando o toxóide fluido na dose de 1 cm³ em um grupo de crianças; 0,5 cm³ em outro grupo e em um terceiro grupo o toxóide tetânico precipitado pelo alúmen na dose de 1 cm³. Foram realizadas dosagens de antitoxinas no 7º e 21º dia após cada aplicação dos toxóides. Os autores obtiveram níveis protetores em todos os casos após a 3.ª dose com ambos os toxóides. Com o toxóide tetânico precipitado pelo alúmen observaram que os níveis protetores surgiram já com a 2.ª dose, enquanto que com o toxóide fluido houve necessidade da 3.ª dose para serem atingidos níveis protetores na totalidade dos casos. A titulação realizada após a 3.ª dose não mostrou diferenças significativas entre os títulos obtidos com 2 Lf do toxóide precipitado e os obtidos com 20 Lf do toxóide fluido, sendo porém, alcançados níveis menores com a dose de 10 Lf do toxóide fluido. Não observaram para efeitos graves com nenhum dos toxóides, sendo referido, contudo, manifestações dolorosas no local da aplicação do toxóide precipitado.

INTRODUÇÃO

O tétano constitui um dos mais graves problemas de Saúde Pública no Brasil, apresentando altos índices de morbidade e mortalidade (6, 15, 32, 36). Paradoxalmente, não existe em nosso País uma lei que torne compulsória a vacinação antitetânica, com o que se evitaria o grande número de vidas perdidas e o elevado custo do tratamento dos pacientes. A vacinação antitetânica é utilizada regularmente em vários países, entre os quais a França, Bulgária, Hungria, Estados Unidos, Alemanha, Polônia (37) e, graças a esta medida de Saúde Pública, o número de casos clínicos

de tétano diminuiu consideravelmente nestes países. Como exemplo do que afirmamos, lembrariamos que nos Estados Unidos, em 1965 e 1966, foram notificados 535 casos de tétano em todo país (14); na França, em 1966, foram declarados 430 casos (24), enquanto que em 1966, somente em um dos hospitais especializados do Rio de Janeiro, GB, foram internados 564 tetânicos (12) e no Estado do Rio de Janeiro foram notificados 454 casos (1), este último dado, por certo, muito aquém da realidade, levando-se em conta que a notificação de tétano em nosso País é, geralmente, precária.

A imunização ativa é reconhecidamente o método mais eficaz na prevenção do tétano.

* Trabalho do Instituto Vital Brazil e da Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense. Laureado com Menção Honrosa no julgamento do Prêmio ABIF.

** Diretor Científico do Instituto Vital Brazil.

*** Professor Assistente da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Fac. de Medicina da Universidade Federal Fluminense.

**** Chefe da Divisão de Imunologia e Sorologia Instituto Vital Brazil.
Recebido para publicação em 3/3/70.

tano, sendo ao mesmo tempo de baixo custo e efeitos colaterais mínimos. A profilaxia realizada através da aplicação do soro antitetânico em pacientes traumatizados pode falhar (5, 20, 23, 28, 35), explicando-se a falha pelas doses insuficientes, pela rápida eliminação das antitoxinas em pessoas anteriormente imunizadas passivamente ou pela permanência do bacilo tetânico no foco de infecção por tempo superior ao da circulação dos anticorpos passivos. Também o uso de antibióticos é, com certa frequência, ineficaz, devido ao emprêgo de doses e tempo de administração inadequados, à presença de bacilos primariamente resistentes ao antibiótico ou à presença de estafilococos produtores de penicilinase no foco de infecção (26, 38). O uso inadequado de antibióticos, particularmente a penicilina-benzatina, para a profilaxia do tétano tem sido, mesmo, causa de vários casos da doença que puderam ser observados por um de nós (31). Os elementos mais importantes no atendimento de pacientes *traumatizados* não imunizados são, sem dúvida, o cuidado adequado aos ferimentos através do perfeito debridamento com a retirada de corpos estranhos e de tecidos desvitalizados; os cuidados primários de higiene e assepsia aos atos cirúrgicos; a assistência adequada aos atos obstétricos e ao recém-nascido após o parto. Entretanto, esta assistência aos traumatizados e recém-nascidos, com frequência, não é valorizada, seja por ignorância da população ou por falha dos órgãos de assistência médica.

Nos inúmeros trabalhos publicados sobre o problema da profilaxia do tétano, é ponto de vista unânime que o uso do toxóide tetânico nas populações é o meio mais seguro para prevenção da doença. Desde 1892 se conhecem as propriedades vacinantes da toxina tetânica tratada pelo tricloreto de iodo e, mais tarde, pelo formol (2). O toxóide atualmente em uso é obtido por ação do formol sobre a toxina do *C. tetani*, resultando uma solução imunizante atóxica conhecida como toxóide fluido, expressão empregada na literatura mundial para diferenciá-lo do toxóide tetânico precipitado por adjuvantes minerais, onde encontramos na fase sólida as substâncias antigênicas. O toxóide fluido pode ser adsorvido em compostos de alumínio com o hidróxido, o fosfato, o sulfato de alumínio e potássio

(alume) e outras substâncias que agem como "adjuvantes", aumentando a potência antigênica e sendo usadas para aumentar e prolongar a imunidade (20). Dêstes adjuvantes, o mais utilizado é o alume. Ambos os toxóides (fluido e precipitado pelo alume) são utilizados na profilaxia do tétano produzindo títulos de anticorpos superiores a 0,01 U/ml após a imunização básica, considerando-se o título de 0,01 U/ml o limiar de proteção (3, 5, 8, 29).

No Brasil e em vários países o toxóide correntemente utilizado é o precipitado pelo alume. Recentemente o Instituto Vital Brazil iniciou a produção do toxóide tetânico fluido purificado e contendo 20 Lf por cm³, o qual em experiências animais mostrou elevado poder imunizante. A fim de testar o valor profilático dêste toxóide e analisar, comparativamente ao toxóide precipitado pelo alume, os níveis de antitoxinas no homem, realizamos a vacinação de 40 crianças híginas, não apresentando ferimentos ou outros focos aparentes sujeitos à infecção tetânica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a imunização de 40 crianças internadas em uma instituição de Niterói, RJ, utilizando-se 3 esquemas de vacinação. Em um grupo de crianças aplicou-se o toxóide tetânico fluido na dose de 0,5 cm³ por via intramuscular em 3 doses com intervalos de 21 dias; o mesmo toxóide foi utilizado em outro grupo, empregando-se, porém, a dose de 1 cm³; em um terceiro grupo usou-se o toxóide tetânico precipitado pelo alume na dose de 1 cm³, seguindo o mesmo esquema. Todas as crianças eram do sexo feminino, com idade variável entre 4 e 14 anos. Procedeu-se a dosagem de antitoxinas circulantes antes da aplicação das vacinas e no 7.º e 21.º dia após a aplicação de cada dose. Ao final da vacinação realizamos a titulação de anticorpos no 21.º dia após a 3.ª dose, dosando-se títulos de 0,1; 0,5 e 1 U/cm³. Em 7 crianças não proseguimos a vacinação por apresentarem títulos de anticorpos circulantes superiores a 0,01 U/cm³ previamente. As vacinas foram aplicadas por via intramuscular, utilizando-se o deltóide como local de aplicação. A colheita de sangue para as dosagens foi baseada na técnica descrita por Coura e col. (4) a qual modificamos a fim de sim-

plificar ainda mais o método. Utilizamos somente agulhas esterilizadas, com o que fizemos punção venosa após limpeza da pele, colhendo-se o sangue diretamente em vidros próprios, dispensando-se a necessidade de seringas na maioria dos casos.

As dosagens de antitoxinas nos sôros foram realizadas no Instituto Vital Brazil, não sendo do conhecimento dos técnicos a procedência do material. A técnica utilizada nas dosagens obedeceu ao método descrito na padronização de antitoxinas tetânicas (22), sendo o "Limens Mortis" da toxina estabelecido em relação a 0,01 U da antitoxina padrão da O.M.S. A verificação desta prova biológica foi feita em camundongos, pesando 18 a 20 g, observados durante 120 horas.

Os toxóides empregados foram cedidos pelo Instituto Vital Brazil, sendo utilizado o toxóide tetânico precipitado pelo alumínio contendo 2 Lf/cm³ e o toxóide tetânico fluido altamente purificado, ensaiado e padronizado por este Instituto, contendo 20 Lf/cm³.

RESULTADOS

Os resultados estão sumarizados nos quadros 1, 2 e 3. No quadro I observamos a resposta imunológica à aplicação do toxóide fluido na dose de 0,5 cm³ por via I.M. em 13 casos, todos apresentando títulos de antitoxinas inferiores a 0,01 U/cm³ antes da aplicação da vacina. Notamos que ao ser realizada a dosagem 7 dias após a primeira dose de vacina, obtivemos níveis de anticorpos superiores a 0,01 U/cm³ em 3 casos (casos 3, 7 e 8) e títulos iguais a 0,01 U/cm³ em 2 casos (casos 6 e 10). Procuramos verificar, junto aos responsáveis destas crianças sobre a imunização prévia realizada e apuramos que o caso 3 havia sido vacinado com 3 doses de vacina triplice há 9 anos, não recebendo doses de reforço posteriores; os casos 8 e 10 haviam recebido 1 dose do toxóide tetânico respectivamente há 1 e 3 anos atrás; os casos 6 e 7, segundo informação das mães, nunca tinham sido vacinados contra o tétano. As demais crianças não apresentaram títulos significativos de proteção nas dosagens feitas no 7.^o e 21.^o dia da primeira dose de toxóide. As dosagens realizadas 7 dias após a segunda aplicação da vacina, revelaram

que além dos 5 casos já relatados, existiam níveis de anticorpos protetores em 2 novas crianças, casos 9 e 13, os quais segundo informação dos responsáveis não haviam sido imunizados previamente. As dosagens no 21.^o dia da segunda dose mostraram títulos protetores em um novo caso (n.^o 3). As dosagens após a terceira dose mostraram títulos superiores a 0,01 U/cm³ em todos os casos e no 21.^o dia fizemos a titulação observando-se que, em 11 casos, os títulos foram superiores a 0,01 U/cm³, sendo mesmo superiores a 0,5 U/cm³ em 10 casos.

No quadro n.^o 2 relacionamos a resposta imunológica à aplicação do toxóide tetânico fluido na dose de 1 cm³ por via I.M. em 9 indivíduos, todos com títulos de antitoxinas inferiores a 0,01 U/cm³ antes da vacinação. Observamos que 7 dias após a aplicação da primeira dose surgiram anticorpos protetores em 1 dos casos cujo responsável não referia vacinação prévia, enquanto os demais não apresentaram níveis de antitoxinas mesmo após 21 dias da 1.^a dose. Sete dias após a aplicação da 2.^a dose realizamos dosagens somente em 5 casos tendo havido dificuldades técnicas nos demais, porém no 21.^o dia observamos que em 6 outras crianças surgiram níveis iguais ou superiores a 0,01 U/ml restando somente 2 casos onde não havia títulos eficazes, o que ocorreu após a 3.^a dose do toxóide, quando obtivemos títulos em todos os casos em 7 dias. Por fim as titulações realizadas 21 dias após mostraram títulos iguais ou superiores a 0,5 U/cm³ em 8 casos.

No quadro n.^o 3 verificamos os resultados com o uso do toxóide tetânico precipitado pelo alumínio na dose de 1 cm³. I.M. em 10 crianças que apresentavam títulos inferiores a 0,01 U/cm³ antes da vacinação. No 7.^o dia da 1.^a aplicação, observamos que havia títulos significativos de imunidade em 3 casos, possivelmente já imunizados previamente com vacina triplice. No 21.^o dia notamos títulos protetores em um novo caso, tratando-se de criança que não havia sido vacinada antes. As dosagens feitas 7 dias após a 2.^a dose mostraram títulos eficazes em 2 novos casos e ao fim de 21 dias todos apresentaram níveis de antitoxinas superiores ao nível mínimo considerado. Após a 3.^a dose realizamos titulações ao fim de 21 dias obtendo-se resul-

QUADRO I

TOXÓIDE TETÂNICO FLUIDO
0.5 cm³ em 3 doses com 21 dias de intervalo

IDENTIFICAÇÃO	DOSAGEM DE ANTITOXINAS (U/ml)						
	Antes da Vacinação	7. ^o dia da 1. ^a dose	21. ^o dia da 1. ^a dose	7. ^o dia da 2. ^a dose	21. ^o dia da 2. ^a dose	7. ^o dia da 3. ^a dose	21. ^o dia da 3. ^a dose
1 — M.A.P.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	—	< 0,01	> 0,01	> 0,01 < 0,1
2 — S.M.S.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	= 0,01	> 0,01	= 0,5
3 — R.M.F.	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 1
4 — A.M.N.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,5 < 1
5 — R.C.	< 0,01	< 0,01	—	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,5 < 1
6 — S.R.Q.	< 0,01	= 0,01	> 0,01	> 0,01	—	—	> 0,5 < 1
7 — S.S.M.	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	—	> 1
8 — Y.D.B.	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	—	> 1
9 — A.R.C.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,5 < 1
10 — S.C.M.	< 0,01	= 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	—	> 1
11 — E.P.F.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,1 < 0,5
12 — G.V.L.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,01 < 0,1
13 — S.G.L.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	= 0,01	< 0,01	> 0,01	= 0,5

tados iguais ou superiores a 0,1 U/cm³ em 2 indivíduos e níveis superiores a 0,5 U/cm³ em 8 casos.

Não observamos efeitos colaterais importantes em nenhum caso, sendo de notar, porém, que em algumas crianças que receberam o toxóide precipitado pelo alumínio houve queixas de dor no local na injeção, surgindo induração no local em 1 caso, enquanto que naquelas em que se usou o toxóide fluido praticamente não houve queixas.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

A profilaxia do tétano realizada regular e sistematicamente através da imunização ativa em todos os indivíduos é o método mais seguro para que esta grave doença possa ser extingüida. Tal objetivo vem sendo alcançado em países de maior desenvolvimento onde a medicina preventiva apresenta notável destaque, trazendo benefícios não só de ordem humana mas, também, social e econômica.

Tanto o toxóide tetânico fluido como o precipitado pelo alumínio são considerados eficazes no sentido de produzir antitoxinas circulantes sendo referidas, entretanto, algumas diferenças imunológicas. Assim, ao se utilizar o toxóide fluido há necessidade de 3 doses para a imunização básica enquanto com o toxóide precipitado pelo alumínio são suficientes 2 doses; a ascensão do título de anticorpos após a dose de reforço em indivíduos previamente imunizados é mais rápida com o toxóide fluido do que com o precipitado; as doses de reforço após a imunização básica se fazem necessárias cada 5 anos quando é utilizado o toxóide fluido enquanto com o precipitado o intervalo entre os reforços pode ser prolongado por 8 ou 10 anos; o toxóide fluido praticamente não apresenta efeitos colaterais, que, entretanto, ocorrem com o toxóide precipitado pelo alumínio, manifestando-se, principalmente, por dor no local da injeção e mais raramente por eritema e induração (5, 10, 16, 20, 21, 25, 29, 39).

Não existe concordância absoluta entre os pesquisadores sobre as vantagens do uso de um tipo de toxóide sobre o outro. O trabalho inicial sobre o valor das respostas imunológicas em crianças com o uso de toxóides tetânicos fluidos e adsorvidos foi realizado por Jones e Moss em 1936 (13) que

demonstraram que 2 injeções de toxóide tetânico alumino-precipitado imunizavam em maior proporção que três injeções do toxóide fluido, tendo, contudo, verificado duas reações severas em 41 crianças vacinadas com o toxóide precipitado. Nesta oportunidade, todavia, não se havia estabelecido a importância do conceito de unidades flocculantes (Lf). Parish e Cannon (20) recomendam a imunização ativa com o toxóide fluido em 2 doses com intervalo de 1 mês e uma 3.^a dose 6 a 12 meses após. O American College of Surgeons e The Massachusetts Public Health Laboratories (cit. Brown — 3) utilizam tanto o toxóide fluido como o precipitado, recomendando que o esquema de vacinação básica com o toxóide fluido seja de 3 doses de 1 cm³ com intervalos de 1 mês e reforço após 1 ano, enquanto que o esquema com o toxóide precipitado é de 2 doses de 0,5 cm³ com intervalos de 1 mês e reforço após 1 ano. Em 1965 MacLennan e col (17) em estudo comparativo, empregaram 4 tipos de toxóides tetânicos, a saber: toxóide fluido, toxóide adsorvido pelo fosfato de alumínio, e dois tipos de toxóides em emulsão de óleo e água, sendo os dois primeiro com aplicações de duas doses de 5 Lf com intervalos de 42 dias e os dois seguintes numa única injeção de 10 Lf. Observaram respostas imunológicas superiores com o toxóide adsorvido e os toxóides emulsionados, ressaltando, contudo, que uma das preparações oleosas produziu reações tóxicas severas o que impossibilita seu uso em larga escala. Peebles e col. (21) em estudo sobre o tempo de proteção da vacinação e a necessidade de doses de reforço utilizam o toxóide fluido na dose de 0,1 cm³ contendo 1 Lf como reforço de pacientes com imunidade prévia, obtendo boas respostas antitóxicas. Rubbo (25) citando experiências animais e no homem, refere níveis maiores de antitoxinas com o uso de toxóide adsorvido do que com o fluido, não achando razão para que se continue a utilização do toxóide fluido, inclusive porque a resposta em indivíduos com imunidade básica é tão rápida com o toxóide adsorvido como o fluido.

Acreditamos que as divergências existentes entre os diversos autores que estudaram a profilaxia ativa do tétano, provavelmente se devem às características dos toxóides usados, devendo ser levado em

Q U A D R O I I

TOXÓIDE TETÂNICO FLUIDO

1 cm³ em 3 doses com 21 dias de intervalo

DOSAGEM DE ANTITOXINAS (U/ml)

IDENTIFICAÇÃO	Antes da Vacinação	7.º dia da 1.ª dose	21.º dia da 1.ª dose	7.º dia da 2.ª dose	21.º dia da 2.ª dose	7.º dia da 3.ª dose	21.º dia da 3.ª dose
1 — M.G.M.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	= 0,01	= 0,01	—	= 0,5
2 — L.R.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	= 0,01	= 0,01	—	= 0,5
3 — N.R.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	—	> 0,01	> 0,01	= 0,5
4 — I.R.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	—	< 0,01	> 0,01	< 0,1
5 — M.A.S.	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	—	> 0,5 < 1
6 — M.A.G.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	—	> 0,01	> 0,01	> 0,5 < 1
7 — C.R.L.S.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	= 0,5
8 — S.R.L.S.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,01	—	> 0,5 < 1
9 — J.S.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	—	= 0,01	> 0,01	= 0,5

consideração, na avaliação dos resultados, a potência em Lf dos toxóides utilizados.

O número de casos por nós estudados em cada esquema de vacinação é pequeno para que se obter conclusões estatísticas sobre as vantagens de um tipo de toxóide sobre o outro. Não obstante, verificamos nesta pequena amostragem que em 11 casos os níveis de antitoxinas se elevaram a títulos protetores já com a primeira dose, tanto com o uso de toxóide fluido como com o alume, devendo-se considerar, porém, que 6 destas crianças apresentavam imunidade básica provocada por vacinação prévia, enquanto em 5 crianças não se apurou imunização anterior. A observação de algum grau de imunidade em pessoas não vacinadas tem sido referida por Tenbroeck e col. (34) e Vakil e col. (35) que admitem que a estimulação antigênica da toxina produzida no intestino pelo *C. tetani* possa ser responsável por este fato. Considerando-se estas crianças notamos, portanto, que os toxóides usados foram eficazes no sentido de elevar rapidamente os títulos de antitoxinas. Observamos que nas crianças não imunizadas anteriormente, tanto o toxóide fluido como o precipitado pelo alume promoveram níveis de anticorpos superiores aquêles considerados protetores quando utilizados em 3 doses com in-

tervalos de 21 dias. Verificamos, ainda, 2 Lf do toxóide precipitado pelo alume provocaram níveis protetores em todos os casos após a 2.^a dose básica enquanto com o toxóide fluido na dose de 20 Lf obtivemos anticorpos protetores em 7 dos 9 casos após a 2.^a dose básica. Com o toxóide fluido na dose de 0,5 cm³ (10 Lf) houve necessidade da 3.^a dose para elevar os títulos protetores em todos os casos, sendo alcançados nas crianças sem imunidade prévia, níveis menores do que os atingidos com a dose de 1 cm³. Na dosagem final não observamos diferenças significativas entre os títulos obtidos com 2 Lf do toxóide precipitado e os obtidos com 20 Lf de toxóide fluido. Deve-se ressaltar a ausência de para-efeitos com a utilização do toxóide fluido que ocorreram, porém, com o toxóide precipitado manifestando-se principalmente por fenômenos dolorosos no local da aplicação.

AGRADECIMENTOS

Os autores manifestam sua gratidão à Diretoria do Instituto Dr. March pelo apoio e facilidades que proporcionaram à realização deste trabalho. Agradecemos em particular à Sra. Virgínia Marques Moreira pelo auxílio prestado na seleção das crianças e na aplicação dos toxóides.

S U M M A R Y

The authors make a comparative study of tetanus immunization in a group of children using fluid toxoid containing 20 Lf/cm³ and alum precipitated toxoid containing 2 Lf/cm³. The schedule was 3 doses at 21 days interval, using 1 ml fluid toxoid in the first group; 0.5 ml fluid toxoid in the 2nd. one and 1 ml alum precipitated toxoid in the 3rd. one. Antitoxins were measured in blood on the 7th. and 21st. days after each toxoid injection. Protective levels were obtained in all cases after 3rd. dose of both toxoids. When using alum precipitated toxoid the authors noticed that protective levels were reached as early as after the 2nd. dose. With fluid toxoid a 3rd. dose was necessary to reach protective levels in all cases. Antitoxin titers measured after 3rd. dose did not demonstrate significant differences between levels obtained with 2 Lf of precipitated toxoid and with 20 Lf of fluid toxoid. Lower titers were obtained when 10 Lf of fluid toxoid was used. Serious side-effects were not observed with any toxoid, though pain was referred at the injection site with precipitated toxoid.

QUADRO III
TOXÓIDE TETÂNICO ALÚMEN
1 cm³ em 3 doses com 21 dias de intervalo

IDENTIFICAÇÃO	DOSAGEM DE ANTITOXINAS (U/ml)						
	Antes da Vacinação	7.º dia da 1.ª dose	21.º dia da 1.ª dose	7.º dia da 2.ª dose	21.º dia da 2.ª dose	7.º dia da 3.ª dose	21.º dia da 3.ª dose
1 — J.R.S.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	—	> 0,01	> 0,01	> 0,1 < 0,5
2 — V.P.C.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,01	= 0,5
3 — R.P.S.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,5 < 1
4 — E.D.S.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,5 < 1
5 — I.R.R.	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	—	> 0,5 < 1
6 — M.S.	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	—	> 1
7 — S.P.	< 0,01	—	—	—	> 0,01	> 0,01	> 0,5 < 1
8 — R.F.	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	—	= 1
9 — L.F.	< 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	—	> 0,5 < 1
10 — A.R.F.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,01	> 0,01	—	= 0,1

A D E N D O

CARACTERÍSTICAS DOS TOXÓIDES
UTILIZADOS

Tiamina (Cloridrato)	0,25 mg	0,25 mg
Riboflavina	0,25 mg	0,25 mg
Piridoxina (Cloridrato)	0,25 mg	0,25 mg
Biotina	2,5 g	2,5 g
Ferro reduzido	0,5 g	0,5 g

I — PREPARAÇÃO DA TOXINA TETANICA

1. Descrição dos métodos e técnicas

a) Amostra Bacteriana

Foi utilizada uma variante do *Clostridium tetani* IOC-54, existente na coleção de anaeróbios do Instituto Vital Brazil. A amostra foi repicada diariamente, durante 15 a 20 dias, com a finalidade de induzir a cêpa a fermentar rapidamente o meio de Taylor (33) contendo 1% de glicose. As sementes foram incubadas 35-36°C. A partir deste momento dispomos de um bacilo produtor de toxinas de elevada potência e produção uniforme;

b) Meio de Cultura

Dentre os meios de cultura usuais, para obtenção de toxinas tetânicas, o proposto por Mueller e Miller (18, 19) é o mais empregado, não só devido a ser constituído de mínimas quantidades de substâncias alergizantes como também por ser um cultivo que proporciona apreciáveis quantidades de toxinas (até 150 Lf).

MEIO de MÜELLER-MILLER
(Componentes por litro)

	NOR- MAL	MODIFI- CADO
Digerido de caseína	22,5 g	330 ml
Infusão de coração bovino	50 ml	50 ml
Glicose	11 g	11 g
NaCl	2,5 mg	—
Na ₂ HPO ₄	2 g	2 g
Mg SO ₄ + 7H ₂ O	0,15 g	0,15 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g	0,15 g
Cistina	0,25 g	—
Cisteína	—	0,25 g
Tirosina	0,5 g	0,5 g
Pantotenato de cálcio	1 mg	1 mg
Uracil	2,5 mg	2,5 mg
Ácido orótico	—	0,1 g

O digerido do triptico de caseína foi por nós adsorvido com fosfato de cálcio para remover as substâncias inibidoras da toxigênese.

Os ingredientes foram dissolvidos em quantidade adequada de água destilada, distribuídos em recipientes de boca larga (5 litros do meio por frasco) e autoclavados durante 20 minutos a 110°C.

Como podemos notar, o meio de Mueller e Miller contém como nutriente bacteriano fundamental o digerido de caseína ("N-Z-Case", "Casitone" e "Trypticase") compostos esses produzidos por firmas estrangeiras. Tal fato resulta na dificuldade de importação e alto custo, razão pela qual resolvemos prepará-lo a partir da hidrólise enzimática da caseína pela pancreatina (Phillips Duphar 6 NF) ou como temos preferido ultimamente, através do uso adicional de macerado de pâncreas de suínos. Devemos ressaltar que a digestão da caseína pelo extrato de pâncreas de suíno resulta num produto eficaz e de baixo custo.

Para obtenção do digerido de caseína utilizamos a seguinte fórmula:

	F. I	F. II
Caseína	1.000 g	1.000 g
Pancreatina 6 NF	5 g	—
Extrato de pâncreas	—	500 ml
Carbonato de sódio	10 g	10 g
Água destilada q.s.p.	10 L	10 L

O carbonato de sódio foi dissolvido na água destilada e a solução aquecida a 80°C. Gradativamente e sob agitação constante, adicionamos a caseína até se tornar totalmente dissolvida. Depois, resfriamos a solução à temperatura ambiente e acrescentamos o extrato de pâncreas; juntamos finalmente, como preservativo, 200 ml de clorofórmio. A mistura obtida foi mantida em estufa a 37°C durante 30 dias, e seu pH ajustado a 7.0 — 7.2 com carbonato de cálcio, semanalmente.

O extrato de pâncreas é obtido do seguinte modo:

Pâncreas de suínos (moído)	1.000 g
Álcool etílico	500 ml
Ácido clorídrico concentrado	5 ml
Água destilada q.s.p.	3.000 ml

O pâncreas é macerado em 1 litro de água; filtra-se em gaze dobrada e em seguida adiciona-se álcool acidulado, de acôrdo com a fórmula acima. Acondiciona-se em garrafão âmbar e mantém-se em geladeira (4° C) durante 10 dias.

O meio de Müeller e Miller assim modificado foi preparado mediante a mesma técnica proposta pelo autor à qual, no entanto, introduzimos o ácido orótico que se revelou, comparativamente, excelente potencializador da toxigênese;

c) Semeadura e Período de Incubação

A semeadura foi efetuada mediante a introdução de 5 ml do inóculo para cada 5.000 ml do meio de Müeller e Miller modificado e incubado durante 7 dias à temperatura de 34°C;

d) Filtração

Após o período de incubação as culturas foram classificadas em filtros compostos de pólpia de celulose com espessura aproximada de 3 cm, acamado sobre funil tipo Buchner de aço inoxidável. A toxina foi esterilizada por filtração, sob pressão negativa, em velas de porcelana tipo Chamberlain.

2. Métodos e técnicas de dosagem

a) Determinação do poder flocculante (Lf)

Foram obtidas toxinas com poder flocculante equivalente a 30 — 50 Lf/ml, verificadas com uma antitoxina tetânica dosando 100 U.I./ml e produzida por digestão péptica, sendo padronizada comparativamente à amostra fornecida pelo N.I.H.;

b) Determinação do "Limens Mortins" (L+) (40)

Verificamos na quase totalidade das toxinas obtidas a relação de 10 L+ para cada

Lf da mesma. O padrão utilizado na determinação do L+ procede da OMS e é distribuído pelo Serum Institute of Copenhagen;

c) Determinação da Dose Mínima Mortal (D.M.M.)

As toxinas foram retiradas dos diversos lotes (garrafões) logo após a filtração, sendo diluídas em concentrações crescentes desde 1:100.000 até 1:2.000.000, em solução peptonada e tamponada pelo fosfato de sódio, de pH 7.4 e resfriada em geladeira por ocasião de seu emprego, a fim de manter-se inalterada a toxina tetânica. Em seguida foi feita inoculação em cobaios e em camundongos, aplicando-se por via intramuscular 1 ml da diluição e procedendo-se a leitura até 120 horas após a inoculação.

Nas diluições compreendidas entre ... 1:700.000 e 1:1.000.000 verificamos, com maior frequência, a dose mínima mortal de nossas toxinas, sendo que cada Lf da toxina tetânica corresponde de 10.000 a 20.000 D.M.M. para o camundongo.

II — PREPARAÇÃO DO TOXÓIDE TETÂNICO FLUIDO

1. Detoxificação e provas determinativas de inocuidade

A toxina tetânica produzida pelo método acima descrito, com 30 a 50 Lf, foi convertida em toxóide pela ação do formol na concentração de 0,4% e incubada a 35°C durante 21 a 25 dias. O toxóide assim obtido passou a ser testado em cobaios de 330 a 380 gramas de peso, mediante inoculação de 5 ml por via subcutânea, sendo os animais observados durante 21 dias e pesados semanalmente. Findo o prazo de observação, não se apresentando sintomas de intoxicação tetânica nos animais, foi o toxóide utilizado para concentração e purificação. Ainda ao fim do período de observação, receberam os animais, por via venosa e/ou cardíaca, a dose de 1 ml do toxóide bruto, não se verificando sintomas característicos de choque anafilático.

2. Concentração

Após o processo de detoxificação, de modo satisfatório, foi o toxóide bruto subme-

tido à ultrafiltração e lavagem sucessivas com solução salina a 9‰, através de uma membrana de colódio a 8%. Para impedir a contaminação do líquido, cobriu-se o mesmo com uma camada fina de toluol enquanto perdurou o processo. A membrana de colódio foi moldada por imersão numa solução acética de algodão pólvora. Velas tipo Berkefeld (Senum de porosidade média) foram utilizadas com o suporte da membrana ultrafiltrante.

O meio de Müller e Miller, tal como o modificado, dá origem a culturas intensamente pigmentadas, apresentando coloração castanho escura. Pela ultrafiltração a maior parte dos pigmentos e demais substâncias nitrogenadas, bem como os sais minerais, passam através do ultrafiltro, porém os componentes protéicos e antigênicos são retidos e mantêm-se dissolvidos no líquido exterior. Após sucessivas adições de solução salina a 9‰ ao concentrado, é este libertado de grande parte dos compostos inespecíficos e de baixo peso molecular.

O concentrado assim obtido representou de 1:20 até 1:30 do toxóide bruto inicial. A camada de tolueno foi separada por decantação e por filtração através de papel de filtro umedecido. Resultou, desse modo, um concentrado praticamente livre de pigmentos, tendo em solução os antígenos e outras proteínas derivadas do *C. tetani*.

3. Precipitação das substâncias antigênicas pelo sulfato de amônio

O líquido ultrafiltrado e libertado dos ingredientes impurificantes de baixo peso molecular foi submetido à precipitação pelo sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na concentração final de 60% de saturação. Para precipitação das frações antigênicamente ativas, adicionamos 46 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro de ultrafiltrado, deixamos repousar durante 24 horas em temperatura de 2 a 4°C e coletamos o precipitado flutuante com uma espátula de porcelana. O precipitado, gelatinoso, de coloração marrom foi comprimido com a espátula até não mais libertar a solução original.

4. Diálise

Sendo distribuído o precipitado em sacos de papel celofane, são esses colocados em

panelas de aço inoxidável contendo água destilada e resfriada a 2°C, permitindo-se entrada contínua de água destilada resfriada a partir de depósitos dispostos no interior da câmara frigorífica. A diálise perdurou durante 4 a 5 dias, ocasião em que o teor do líquido dialisado passou a apresentar somente traços de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o que foi verificado pelo reativo de Nessler. O dialisado foi isotonicado com cloreto de sódio e deixado em congelador a — 20°C, até ulterior manipulação.

5. Preparação da membrana de colódio

Na obtenção das membranas para ultrafiltração, devemos levar em consideração os diâmetros dos seus poros, estes dependendo da concentração de nitrocelulose em ácido acético. Quanto maior for a concentração da nitrocelulose menor será o diâmetro dos poros da membrana. Utilizamos velas de terra de infusórios tipo Serum AG9, mergulhadas em água destilada e lavadas internamente através da passagem de grande quantidade de água.

Após isso, foram as velas esvaziadas por sucção com bomba de vácuo e deixadas invertidas aproximadamente duas horas sobre papel de filtro. Ainda úmidas e em tais condições, as velas foram imersas em solução acética de algodão pólvora. A seguir, foram submetidas à pressão negativa de uma potente bomba de vácuo durante 20 minutos.

Prosseguindo, retiramos lentamente as velas da solução do colódio, permitindo que o líquido escorresse uniformemente, evitando a formação de bolhas de ar; rapidamente, mergulhamos as velas para coagulação do colódio em água destilada e deixamos durante 24 horas.

Os ultrafiltros obtidos foram então lavados demoradamente com água destilada até não apresentarem reação fortemente ácida ao papel indicador de pH (Merck). Os filtros assim preparados puderam ser conservados em geladeira e em solução fenicada a 2% durante alguns meses, sem alteração de suas principais características.

Na preparação da solução de nitrocelulose temos utilizado algodão pólvora da Fá-

brica Nacional de Piquete, apresentando-se praticamente sêco, não havendo necessidade de dessecá-lo sob a ação desidratante do hidróxido de sódio ou de potássio.

O algodão pólvora foi manipulado com extrema precaução por se tratar de substâncias altamente inflamável e explosiva.

Na preparação da solução de colóidio utilizamos 480 g de algodão pólvora dispersos por agitação em 5 litros de ácido acético. A solução fêz-se durante aproximadamente 20 dias com agitação diária. Após quase completa dissolução, adicionamos uma solução recém preparada de 120 g de carbonato de potássio em 800 ml de ácido acético; misturamos convenientemente e completamos o volume para 6.000 ml. Isso feito, deixamos em repouso e usamos ao fim de 48 a 72 horas.

As partículas de algodão não dissolvidas e as impurezas insolúveis foram separadas por decantação ou filtração em filtro de Buchner com uma camada de lã de vidro.

6. Padronização e ensaios com o toxóide purificado

A técnica descrita por Ramon, para determinação do valor floculante do toxóide tetânico, foi utilizada com orientação básica para a diluição do produto.

A diluição foi feita em solução salina a 9^o/₁₀₀, adicionando-se, como preservativo, tiomerosal na concentração final de ... 1:10000.

As seguinte provas foram executadas:

a) Determinação da antigenicidade, feita de acôrdo com o "Minimu Requirements for tetanus toxoid" ou segundo a Farmacopéia Brasileira (7);

b) Poder de ligação (Lb ou B.U.) entre antígeno e anticorpo, misturando-se 0,1 U.I. de antitoxina tetânica com diluições do toxóide, de modo a corresponder a 10 vezes o valor em Lf. Ao fim de 40 minutos de incubação acrescentamos toxina tetânica equivalente a 10 doses mínimas mortais em camundongos (18-20 g) e guardamos novamente, pelo mesmo período de incubação, em estufa a 37°C. Fimdo êsse período, injetamos pela via intramuscular

a mistura. A morte ou a sobrevida dos animais indicam respectivamente o excesso de antígeno ou de anticorpo;

c) Prova de imunodifusão comparativa entre o toxóide com uma toxina tetânica com Lf estabelecido por floculação, pelas determinações do L+ (limens mortis) e pela verificação da dose mínima mortal (d.m.m.) em camundongos (18 a 20 g);

d) Prova de toxicidade em cobaios com pêso de 330 a 380 g, seguindo-se a injeção de 5 ml do toxóide por via subcutânea, sendo os cobaios observados e pesados semanalmente, durante 21 dias;

e) Prova de toxicidade em camundongos com pêso de 18 a 20 g, por injeção de 0,5 ml pela via venosa, observando-se os animais durante 24 horas.

Uma vez estabelecida a potência do toxóide tetânico purificado e concentrado, êste foi diluído em solução isotônica tampoadada de cloreto de sódio, fosfato disódico e monossódico e glicina na concentração de 0,25 g%. O produto final, com 20 Lf contém como preservativo o tiomerosal na concentração de 1:10000.

O produto foi então esterilizado por filtração à vela e uma vez mais foi testado quanto à sua antigenicidade e esterilidade, sendo finalmente envasado em frasco com rôlha de borracha e selado com tampa de alumínio.

III — MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO TOXÓIDE TETÂNICO COM ADJUVANTE

O toxóide tetânico com adjuvante foi obtido pela precipitação do toxóide bruto pelo alúmen, obedecendo aos métodos de preparação estabelecidos inicialmente por Glenny e Barr (9).

As reações químicas que intervêm na precipitação pelo alume, das frações antigênicas dos toxóides brutos, estão relacionadas com seu pH inicial e com a presença de bicarbonato, fosfatos inorgânicos, proteínas e proteoses existentes no meio de cultivo.

O bicarbonato e as substâncias de natureza alcalina reagem com o alume para dar origem ao hidróxido de alumínio $Al(OH)_3$, enquanto as proteínas derivadas do C.

tetani podem produzir, segundo Holt, (11) uma anatoxina aluminada. Os fosfatos são encontrados em relativa proporção nos meios de Taylor e de Müller-Miller.

No produto obtido por nós o precipitado é formado principalmente por hidróxido de alumínio e matérias orgânicas adsorvidas (proteínas e pigmentos).

Após a precipitação o toxóide foi lavado exaustivamente mediante o sistema de si-

fão fechado, sendo preservado com tiomerosal a 1: 10000.

O produto é padronizado de acôrdo com a Farm. Bras. (7) de modo a conter um mínimo de 2 unidades na mistura dos soros de 6 cobaios pesando aproximadamente 500 g e inoculados por via subcutânea 42 dias antes de serem sangrados. O produto foi testado quanto ao seu poder floclante, tendo-se encontrado 2 Lf por ml.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANUÁRIO DO SERVIÇO DE ESTATÍSTICA DE SAÚDE — Secretaria de Saúde e Assistência do Estado do Rio de Janeiro — 1966/1967.
- 2 — BIER, O. — Bacteriologia e Imunologia, pg. 530 — Ed. Melhoramentos, 9.^a ed., 1959.
- 3 — BROWN, H. — Tetanus — J.A.M.A. 204:614, 1968.
- 4 — COURA, J.R.; NOGUEIRA, E.S. & VIEIRA, J.J. — Método simplificado de colheita de sangue para exames sorológicos em massa — Vida Médica, 30: n.^a 2, 1963.
- 5 — EDSALL, G. — Specific prophylaxis of tetanus — J.A.M.A. 171:417, 1959.
- 6 — FALCÃO NETO, J.C.M. — O problema da prevenção do tétano nas coletividades civis e militares — Rev. Hig. e Saúde Publ. 6:87, 1948.
- 7 — FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL — 2.^a ed., pg. 835 — Indústria Gráf. Siqueira S.A., S.P., 1959.
- 8 — FILLER, R.M. & ELLERBECK, W. — Tetanus prophylaxis — J.A.M.A. — 174:1, 1960.
- 9 — GLENNY, A.T. & BARR, M. — Alum Toxoid precipitates as antigens — J. Path. Bact. 34:118, 1931.
- 10 — HOLDEN, J.M. & STANG, D.U. — Reactions to tetanus toxoid: comparison of fluid and adsorbed toxoids — New Zeal. Med. J. — 64:574, 1965.
- 11 — HOLT, L.B. — Developments in Diphtheria Prophylaxis — Wam Heine-mann Ltd., London, 1950.
- 12 — HOSPITAL ESTADUAL FRANCISCO DE CASTRO (GB) — Relatório da Atividades Médicas e Administrativas — 1966.
- 13 — JONES, F. G. & MOSS, J.M. — Studies on tetanus toxoid — J. Immunol. 30:115, 1936.
- 14 — LA FORCE, F.M.; YOUNG, L.S. & BENNET, J.V. — Tetanus in the United States. Epidemiologic and clinical features — New Engl. J. Med. 280:569, 1969.
- 15 — LACAZ, C.S. — O problema do tétano no Brasil — Rev. Ass. Med. Bras. 12:33, 1966.
- 16 — "LEADING ARTICLE" — Active immunization against tetanus — Lancet 2:662, 1967.
- 17 — MACLENNAN, R. & COL. — Citado por Aprile M.A. & Wardlaw, A.C. — Aluminium compounds as adjuvants for vaccines and toxoids in man: a review — Canad. J. Pub. Health 57:343, 1966.
- 18 — MÜELLER, J.H. & MILLER, P.A. — Production of tetanal toxin J. Immunol 50:377, 1945.
- 19 — MÜELLER, J.H. & MILLER, P.A. — Variable factors influencing the production of tetanus toxin — J. Bact. 67:271, 1954.
- 20 — PARISH, H.J. & CANNON, D.A. — Antiserum, Toxoids, Vaccines and Tuberculin in Prophylaxis and Treatment — E. & S. Livingstone Ltda. — Edinburg and London, 6th ed., 1962.
- 21 — PEEBLES, T.C.; LEVINE, L.; ELDRED, M.C. & EDSALL, G. — Tetanus toxoid emergency booster — New Engl. J. Med. 280:575, 1969.
- 22 — PHARMACOPEIA INTERNACIONALIS — 1.^o ed., pg. 338. World Health Organization, Geneva, 1951.
- 23 — PRUDOVSKY, S. & TURNER, T. — Studies on the prophylaxis and treatment of tetanus. I — Studies pertaining to active and passive immunization — Bull. John's Hopkins Hosp. — 102:55, 1958.
- 24 — RAPIN, M. & NOUAILHAT, F. — Aspects actuels du tétanos en France. Presse Med. 775:2675, 1967.

- 25 — RUBBO, S.D. — Prophylaxis against tetanus — in Principles on Tetanus — Proceedings of the International Conference on Tetanus, Bern, 1966, pg. 341, Hans Huber Publishers, Bern and Stuttgart.
- 26 — SMITH, J. G. W. — Penicillin in prevention of tetanus — Brit. Med. J. 2:1293, 1964.
- 27 — SMITH, J.W.G.; EVANS, D.G.; JONES, D.A.; GEAR, M.W.L., CUNLIFFE, A.C. & BARR, M. — Simultaneous active and passive immunization against tetanus — Brit. Med. J. — 1:237, 1963.
- 28 — SPAETH, R. — Immunization against tetanus — J.A.M.A. 132:667, 1946.
- 29 — STEIGMAN, A.J. — Abuse of tetanus toxoid — J. Pediat. 72:753, 1968.
- 30 — TASMAN, A. & HUYGEN, F.J.A. — Immunization against tetanus of patients given injections of antitetanus serum — Bull. of WHO 26:397, 1962.
- 31 — TAVARES, W. — Trabalho não publicado.
- 32 — TAVARES, W.; CLAUSSEN, A.R.; MONLOUIS, J.E.T. & COURA, J.R. — Aspectos evolutivos de 250 casos de tétano — Trabalho apresentado ao X Cong. Med. Fluminense, 1969.
- 33 — TAYLOR, E.M. — Production of tetanal toxin — J. Immunol. 50:385, 1945.
- 34 — TENBROECK, C. & BAUER, J.H. — The tetanus bacillus as an intestinal saprophyte in man — J. Exp. Med. 36:261, 1922.
- 35 — VAKIL, B.J.; TULPUL, T.H.; RAO S.S. & BARBER, M.B. — A comparison of 1500 units and 5000 units of tetanus antitoxin in simultaneous active and passive immunization against tetanus. — Ind. Jour. Med. Res. 56:1188, 1968.
- 36 — VERONESI, R. — Contribuição para o estudo clínico e experimental do tétano — Tese, S. Paulo, 1960.
- 37 — VERONESI, R. — Tétano — Doenças Infecciosas e Parasitárias, pg. 496 — Ed. Guanabara — Koogan, 4.^a ed. 1969.
- 38 — VERONESI, R.; LACAZ, C.S. & FURLANETTO, R.S. — Profilaxia do tétano continua controversa — Médico Moderno, agosto 1965, pg. 53.
- 39 — VERONESI, R.; MARTINEZ, A.A.; GUIDOLIN, R.; CORREIA, A. & MEIRA, D.A. — Toxóide tetânico e gammaglobulina antitetânica humana — Como, porque e para quê? — J. Bras. Med. 10:549, 1966.
- 40 — WADSWORTH, A.B. — Standard Methods, pg. 807, 3th. ed. — The Willians & Wilkins Company, 1947.