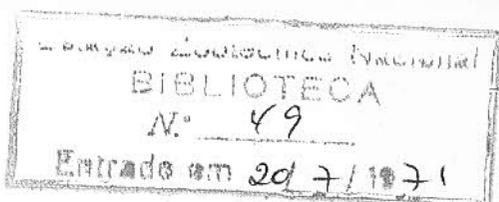


ANO XXXVII—N.º 2



BOLETIM PECUÁRIO

1969

ACÇÃO IMUNOLÓGICA ANTIBACTERIANA

ESTUDO *IN VITRO*

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO
DA IMUNIDADE ESPECÍFICA

Por

JOSÉ LOURENÇO FERREIRA CRISTINA AFONSO

1 — INTRODUÇÃO

A imunidade específica constitui processo de manutenção da integridade estrutural e funcional do organismo; daí a importância do seu conhecimento.

Sabe-se muito acerca dos factores, celulares e humorais, que intervêm na imunidade, mas desconhece-se ainda o seu mecanismo específico. Registam-se factos com ela relacionados, é certo, mas o fenómeno, na sua essência, permanece uma incógnita para esclarecer.

O papel desempenhado por cada tipo de factores varia largamente não só nos processos diferentes, mas também naqueles que são da mesma natureza. Nuns casos, a imunidade parece depender específica e conjuntamente de factores humorais e celulares, noutros pode ser condicionada por um ou outro deles isoladamente.

Contudo, embora relevante a importância do factor celular na imunidade específica, como é focado por SUTER e RAMSEIER (1964), MACKNESS (1964), é na maioria dos casos aos anticorpos circulantes que é atribuído o principal papel. Esta afirmação assenta no facto de na imunidade passiva determinada pelo soro, não intervir o factor celular e ser ela essencialmente específica, como tem sido amplamente referido. Mas apesar da sensibilidade das técnicas imunológicas de pesquisa de que se dispõe, nem sempre se verifica relação directa entre o teor em anticorpos e o grau de imunidade produzida, e fica por esclarecer não só

a relação antigénio-anticorpo como também a maneira específica como actuam no sentido da recuperação e da resistência.

A imunidade antitóxica é altamente efectiva por si só, mais do que a anti-infecciosa ou a anti-celular, visto a eficiência do seu mecanismo não depender de complexos sistemas celulares, mas antes da simples conversão da toxina em agente inócuo. Na imunidade anti-infecciosa ou na anti-celular os anticorpos, para determinados componentes antigénicos da superfície, tornariam o agente infeccioso ou célula mais susceptíveis aos mecanismos da defesa orgânica, WILSON e MILES (1955).

Na imunidade antitóxica observa-se a mais íntima relação entre teores em anticorpos neutralizantes e o grau de imunidade; à medida que aumenta a complexidade da estrutura antigénica dos agentes infecciosos ou celulares, mais acentuadas são as divergências verificadas neste sentido. Os anticorpos susceptíveis de serem revelados por acção biológica parecem diferentes daqueles que podem ser pesquisados *in vitro* por reacções sorológicas.

As diferenças entre anticorpos pesquisáveis *in vitro* e o valor protector da imunidade humoral resultariam do facto de nem todos os antigénios estarem relacionados com a resistência específica. Mas divergem também entre si as diversas reacções com vista à pesquisa de anticorpos. Essa diferença de valores verificada através das várias técnicas imunológicas resulta de ser diferente em cada sistema a constante de sensibilidade, o que faz alterar o valor em relação a cada sistema. Estas reacções podem, além disso, verificar-se a altos títulos entre componentes sem significado na imunidade específica. Todos os testes de pesquisa de anticorpos são, por isso, muito artificiais.

Constituem, é certo, grandes e úteis fontes de informação mas não são elementos relevantes explicativos do complexo mecanismo através do qual o organismo se protege contra a doença.

Por um lado, a imunidade pode existir na ausência de anticorpos pesquisáveis, por outro, pode não ser garantida em absoluto a quando da presença de um título elevado de anticorpos. Dada a divergência entre os resultados dos ensaios sorológicos, *in vitro* e *in vivo*, a forma mais directa e significativa de aquilatar o valor dos anticorpos consiste na apreciação da sua actuação *in vivo*. Para explicar esta divergência opi-

na-se que o poder protector do soro específico não é determinado por anticorpos particulares pesquisáveis por testes *in vitro*.

Constitui o principal argumento desta maneira de pensar o facto da imunidade antibacteriana estar dependente de anticorpos que actuam sobre determinados componentes da estrutura superficial da bactéria, e não de outros, que embora reagindo sorològicamente *in vitro*, são desprovidos de acção protectora. Assim, um antigénio revelado graças à sua intervenção na fenomenologia da imunidade específica pode não ser demonstrado pelos testes, *in vitro*, de reacção antigénio-anticorpo.

A imunidade específica antibacteriana é estritamente particularizada e, na maior parte das vezes, pode identificar-se o componente antigénico de que depende, WILSON e MILES (1955 b). Contudo, mostra-se bastante complexa em relação a determinados componentes antigénicos de superfície e essa complexidade, de que depende a imunidade específica, aumenta ainda em função da espécie animal. Assim, na infecção experimental, verifica-se que a imunidade específica não depende do mesmo agrupamento antigénico em relação a cada espécie animal, isto é, varia com esta, WILSON e MILES (1955 b).

E, dentro da mesma espécie animal, a imunidade específica pode ainda depender das vias de imunização e de infecção ou de transplantação.

O mesmo se verifica no que concerne à imunidade passiva, dependente do sistema experimental utilizado *in vivo*. Varia deste modo com a espécie animal, tipo e via de infecção e, mais ainda, com a técnica de preparação do soro específico que inclui o esquema de hiperimunização, o antigénio e a própria espécie do animal dador.

Os anticorpos que intervêm na imunidade parecem, de facto, actuar sobre antigénios de superfície, uma vez que a absorção pode invalidar o valor protector do soro específico. Mas, sob este aspecto, verifica-se também a maior divergência e nem sempre a absorção anula a capacidade protectora de um soro específico, o que está dependente ainda da espécie animal, tipo e via de infecção.

Os factos imunològicos acima referidos têm sido observados nas bactérias, WILSON e MILES (1955 b), SMITH e CONANT (1960), CRUICKSHANK (1963); nos vírus, BURNET (1960), HALE (1961), BEVE-

RIDGE (1963); nos parasitas, BOYD (1956), SOULSBY (1962), FULTON (1963); na transplantação celular, HASEK *et al* (1961), GORER (1961), WISSLER (1962), STETSON (1963), KLEIN (1966).

Por outro lado, com determinados soros específicos e em certos processos e sob dadas condições, em vez de resistência observa-se fenómeno paradoxal de imunidade que se traduz, por exemplo, em os anticorpos favorecerem o crescimento celular na transformação maligna e na transplantação tumoral, *immunological enhancement*, KALISS (1958).

Tem-se procurado interpretar em termos matemáticos de análise estatística a natureza da reacção antigénio-anticorpo que condiciona a imunidade específica; desta forma, os resultados tornar-se-iam mais significativos e conduziriam a um mais perfeito conhecimento do mecanismo dessa reacção. A maior parte destes estudos têm tido por base a neutralização de vírus por soro específico, BURNET (1960). Tem-se verificado que na neutralização de vírus das bactérias a acção dos anticorpos parece ser irreversível como consequência da interacção, mostrando-se, pelo contrário, reversível a quando de elementos intervenientes mais complexos, como é o caso dos vírus dos animais. À medida que aumenta a complexidade dos sistemas biológicos de ensaio — neutralização em animais — maior se apresenta a divergência dos resultados e a das interpretações que estes sugerem. Contudo, observa-se que a acção dos anticorpos varia não só com os sistemas biológicos utilizados nos ensaios, mas também com a via de inoculação. A fracção persistente de vírus não neutralizado verificada nos ensaios parece resultar da diferente susceptibilidade da heterogénea população vírica à acção dos anticorpos, BURNET (1960).

Com os elementos actuais acerca da acção específica dos anticorpos na imunidade, não é possível abarcar o problema de conjunto, o que implica, na realidade, a ignorância do mecanismo específico cujo conhecimento seria da maior relevância. A dificuldade da generalização filia-se na complexidade e heterogeneidade dos elementos intervenientes na reacção, nos sistemas de pesquisa de anticorpos e sua relação com a imunidade.

Como em muitos outros problemas biológicos aquilo que a princípio se apresenta sob aparente simplicidade, como factor primordial, passa

gradualmente a ser integrado em um mais complexo sistema em que novos dados entram em equação. Normalmente, esses problemas são encarados consoante os factores susceptíveis de estudo experimental que neles participam. Mas, na realidade, a complexidade dos fenómenos é tal que não é possível ainda, e com os meios de que se dispõe, ter uma ideia susceptível de generalização acerca do papel desempenhado por cada elemento interveniente no respectivo processo biológico. A experimentação tem sido afectada pelo grande número de factores variáveis que participam na imunidade *in vivo*, mas que complicam qualquer extrapolação de mais simples sistemas *in vitro*.

As possíveis variações nos microrganismos e nos hospedeiros utilizados podem contribuir para resultados divergentes verificados no decorrer do tempo, e as diferentes técnicas usadas nos ensaios *in vitro* constituem outro motivo para que sejam muito diversamente interpretados os resultados obtidos na experimentação, e contribuem, conseqüentemente, com a sua quota-parte, para as conclusões contraditórias formuladas acerca do magno problema da imunidade específica.

Na maior parte das vezes conhecem-se apenas efeitos e é com base neles que se procuram as soluções dos problemas cujo mecanismo se ignora. A imunidade específica está neste caso, constituindo matéria cujo conhecimento se tem feito através da experiência e é com base nesta que se tem solucionado, por meio da imunização activa e passiva, a maior parte dos problemas ligados à profilaxia das doenças microbianas.

A imunização, sem fundamento imunológico, assentava e evoluía assim com base na experimentação e cada nova descoberta em relação a componentes antigénicos, parecia tornar mais complexo o mecanismo da imunidade específica. O desconhecimento da acção imunológica e o da sua dinâmica, não permitia a generalização da immuno-profilaxia; mas na complexidade do processo imunológico a intervenção de cada factor deve ter carácter geral, e daí a ideia de estudar essa acção, em relação aos anticorpos, *in vitro*.

As diversas manifestações sorológicas decorrentes da reacção anti-génio-anticorpo *in vitro*, não são representativas da acção imunológica dos anticorpos, ou seja do seu mecanismo específico, dada a sua falta de relação com a imunidade. A complexidade da relação anti-génio-anti-

corpo na imunidade específica, variando com os sistemas biológicos e métodos de apreciação, parece dever implicar um processo ou mecanismo de natureza dinâmica.

A complexidade verificada seria assim de certo modo virtual e consequência do prisma estático sob o qual é encarada a infecção-imunidade.

Parecia-me assim que a acção imunológica do anticorpo haveria que ser apreciada de forma dinâmica, isto é, incidindo sobre os microrganismos vivos, no período de crescimento das suas populações e em sistemas simples — culturas *in vitro* — sem intervenção de factores celulares, e em comparação com o acção *in vivo*. A bactéria, crescendo, em meios de cultura, sujeita apenas a variações ambientes, sem outra influência estranha, parecia constituir o agente mais aconselhável a essa finalidade. Sabe-se mais que, a quando da imunidade passiva, sem a intervenção, portanto, da imunidade celular, a bactéria se comporta como avirulenta, representando assim a imunidade humoral a expressão da acção específica do anticorpo. A avirulência resultaria, deste modo, da perturbação da dinâmica das populações sob a acção dos anticorpos específicos, ou seja da sua acção imunológica. Essa acção deverá exercer-se sobre a bactéria *in vitro* na fase de crescimento.

Dentro deste pensamento inicieei, em 1946, estudos de imunologia no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária e nesse mesmo ano observava a acção imunológica exercida pelo soro específico sobre as bactérias em cultura *in vitro*, acção essa directamente relacionada com a protecção e traduzida pelo desenvolvimento em cadeia. Estudava nessa altura a actuação do soro do carbúnculo hemático, mal rubro e pasteurelose (*P. multocida*), sobre a curva de crescimento *in vitro* dos respectivos agentes bacterianos. As estirpes desenvolviam em meios com diferentes concentrações de soro específico, e a observação microscópica das culturas era realizada nas primeiras 8 horas, a intervalos de 2 horas, e no dia seguinte.

Utilizavam-se soros com poder protector *in vivo*, a par de outros dele desprovidos. Logo nos primeiros exames se patenteou o crescimento em cadeia das estirpes de *E. rhusiopathiae* e *P. multocida* nos respectivos anti-soros.

Os soros sem acção imunizante *in vivo* apenas aglutinavam as respectivas culturas; a estirpe de *B. anthracis*, em presença dos soros dotados de poder protector *in vivo*, crescia em cadeias mais extensas do que aquelas que se obtinham a quando do emprego de soro normal ou de outro sem acção imunizante. O crescimento em cadeia era distinto da aglutinação e processava-se nas maiores concentrações do soro específico.

A aglutinação verificava-se ainda em concentrações menores do soro, quando deixava já de se observar o crescimento em cadeia. Esta e a aglutinação eram portanto manifestações diferentes da actuação dos anticorpos específicos sobre as bactérias em crescimento e dependiam de concentrações diferentes dos respectivos anticorpos, variando sob o aspecto qualitativo-quantitativo. A cadeia traduzia uma manifestação dinâmica e a aglutinação uma representação estática dos anticorpos, assim se justificando a falta de relação entre os testes sorológicos *in vitro* e o grau de imunidade *in vivo*.

Tinha então já notado que o tamanho da cadeia das estirpes de *B. anthracis* e de *Streptococcus* variava com a riqueza em soro do meio, a sua presença fazendo diminuir a extensão dela nestas estirpes, em cultura *in vitro*.

Por outro lado, no exame directo dos esfregaços dos órgãos ou do sangue de animais vitimados por estes dois agentes bacterianos, patenteavam-se estes sob a forma de elementos isolados ou agrupados em pequenas cadeias. Na fase inicial de crescimento, em culturas de estirpes que normalmente desenvolvem em elementos isolados, verificam-se, por vezes, pequenas cadeias, o mesmo se dando a quando do crescimento em condições adversas, de meio e temperatura, principalmente quando esta é elevada, como é o caso do *E. rhusiopathiae* que cresce em grandes cadeias à temperatura de 43-45°C.

A cadeia surgia como manifestação específica dos anticorpos alterando a dinâmica do crescimento bacteriano e conduzindo à imunidade. A partir de então conhecia-se o significado da acção imunológica, sob a influência da qual a bactéria virulenta se comporta no organismo como avirulenta, isto é, com menor capacidade invasora e susceptível de ser dominada pelos factores celulares de defesa.

A cadeia traduzia especificidade, do tipo imunológico, e, como se

disse e verificou, estava directamente relacionada com a imunidade passiva conferida.

Durante todo o tempo, decorrido, desde 1946 até hoje, os mais diversos aspectos da imunidade *in vivo*, relacionados aos anticorpos, foram sucessivamente encarados e apreciados *in vitro*; tais foram o poder imunizante de soros específicos, a identificação imunológica de estirpes bacterianas, o valor imunizante de vacinas pela acção imunológica dos soros de animais vacinados, o estado imune de populações.

O conhecimento da acção imunológica permite agora, através da aplicação de uma técnica *in vitro*, simples, económica e rápida, a identificação imunológica de estirpes avirulentas para os animais de experiência e a apreciação de soros e vacinas principalmente destinados à profilaxia humana, e que, dada a avirulência das estirpes para os animais de prova, não era exequível *in vivo*. Por outro lado, os estudos de verificação no próprio homem e no laboratório, além de difíceis, nem sempre conduzem a resultados significativos como fez notar SOHIER (1960), sobretudo se nos reportarmos à tosse convulsa, à tifoze e paratifoze, à cólera e, nomeadamente, às disenterias bacilares. Acresce ainda que é agora possível estudar o valor imunizante de vacinas mistas no mesmo grupo de animais, através da apreciação da acção imunológica *in vitro* do soro dos vacinados.

A presença da cadeia como consequência da acção do soro específico sobre as bactérias, em cultura *in vitro*, poucos vezes tem sido referenciada no decorrer do tempo, apesar de desde há muito ter sido assinalada na *Ps. aeruginosa*, CHARRIN e ROGER (1889); no *Vibrio metchnikovii* e no *Pneumococcus*, METCHNIKOFF (1891); no *Streptococcus*, BORDET (1897). PFAUNDLER (1898) regista o fenómeno que denominou *fadenbildung* verificado em estirpes *E. coli* e *Proteus* em crescimento no soro dos doentes de onde haviam sido isoladas e que julgou ser aglutinação polar.

Durante alguns anos o fenómeno é referido principalmente em relação ao *Pneumococcus*. Assim, BAILEY (1928), ao apreciar a sensibilidade e utilidade deste fenómeno, verificou que o soro de doentes de pneumonia frequentemente não aglutinava, quando do emprego dos métodos usuais, as culturas de *Pneumococcus*, o que não sucedia se este

microrganismo se desenvolvia em meio adicionado do referido soro; neste caso, aglomerava-se em massas e cadeias.

Contudo, pouca atenção foi prestada a este fenómeno pela maior parte dos investigadores e nesse mesmo ano a reacção de PFAUNDLER, *fadenbildung*, era considerada essencialmente uma reacção de aglutinação, FITZGERALD e FRAZER (1928).

Devem ser também do tipo da reacção em causa, a aglutinação polar, MANDELBAUM (1932) e a aglutinação T, *thready*, STUART *et al.* (1948) ambas verificadas com culturas vivas de *Enterobacteriaceae*.

Mais tarde, STOLLERMAN e EKSTEDT (1957) verificam este tipo de reacção, *long-chain reaction*, com estirpes de *Streptococcus* do grupo A e, dada a sua especificidade e sensibilidade, utilizam-na como teste de pesquisa de anticorpos tipo específico; por sua vez, WILSON (1959) utilizou a *long-chain reaction* para identificar a proteína M em componentes deste mesmo agrupamento bacteriano.

Posteriormente, e ainda em relação ao *Streptococcus* do grupo A, STOLLERMAN *et al.* (1959) avaliam a *long-chain reaction* na determinação de anticorpos tipo específico; EKSTEDT e STOLLERMAN (1960 a, b) procuram explicar o seu mecanismo; HAHN e COLE (1962) procuram obter resultados mais significativos com a *long-chain reaction* pelo emprego de métodos de análise estatística. NOSSAL (1962) observa o crescimento em cadeia *in vitro* na *Salmonella*, ao estudar a formação do anticorpo em cultura celular, parecendo-lhe que o fenómeno era mais relevante para teste anti O, que a aglutinação. HAHN e COLE (1963) estudam novamente a *long-chain reaction* no *Streptococcus* do grupo A, procurando agora conhecer o mecanismo da sua formação.

São de facto escassas na bibliografia as referências ao crescimento em cadeia das bactérias sob a acção do soro específico *in vitro*.

Deve ter-se confundido, correntemente, a cadeia com a aglutinação das culturas em crescimento, fenómeno grandemente referenciado desde as primeiras observações de CHARRIN e ROGER em 1889, pois na realidade, poucos, se é que algum, daqueles que procuravam conhecer a acção imunológica dos anticorpos *in vitro* deixaram de a observar.

Embora considerada uma reacção tipo-específica em relação ao *Streptococcus* do grupo A, STOLLERMAN e EKSTEDT (1957) e *Pneumo-*

coccus, EKSTEDT e STOLLERMAN (1960 a), não foi tida como geral, nem lhe foi atribuído qualquer significado imunológico, ou seja, não se estabeleceu relação entre ela e a imunidade específica. HAHN e COLE (1962) indicam até que o crescimento do *Streptococcus* do grupo A em soro normal e em soro tipo específico era equiparável, o que se podia deduzir do número total de cocos em momento dado de observação.

A cadeia representa a manifestação da acção imunológica que conduz à recuperação e resistência específica, e os estudos realizados e a seguir expostos contribuem para o conhecimento da imunidade específica anti-infecciosa e anti-celular. O conceito dinâmico da acção imunológica permite agora a resolução de certos problemas de profilaxia contra os processos infecciosos pela imunização activa e passiva, sendo também de considerar na imunoprofilaxia da transformação maligna.

A acção imunológica resulta da reacção antigénio-anticorpo, qualitativa-quantitativa em certa extensão na superfície bacteriana e depende de variações antigénicas na dinâmica das populações no ambiente em que se processa o crescimento. A infecção-imunidade específica é assim um processo de natureza dinâmica.

Este conceito permite também interpretar o fenómeno *immunological enhancement*, KALISS (1958), em que os anticorpos favorecem paradoxal e trágicamente o crescimento celular, em vez de o impedir. Tratar-se-á de um aspecto qualitativo-quantitativo da reacção antigénio-anticorpo na superfície celular, mas evidenciado em menor extensão que o que conduz à imunidade; um e outro, porém, são dependentes dos mesmos anticorpos e, por conseguinte, dos mesmos antigénios.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

2.1 — ESTIRPES BACTERIANAS E MEIOS DE CULTURA

As estirpes utilizadas nos ensaios, com excepção das mencionadas abaixo, foram isoladas nos Serviços de Bacteriologia e de Soros e Vacinas do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (L. N. I. V.) provindo especialmente do segundo departamento as de origem humana. Dado o seu elevado número essas estirpes serão apenas discriminadas a quando da descrição dos ensaios.

2.1.1 — BACILLUS ANTHRACIS (B. ANTHRACIS)

2.1.1.1 — Estirpes atenuadas:

I — L. N. I. V. (estirpe do L. N. I. V.) — letal para o ratinho; desenvolvimento em cadeias curtas.

IH — L. N. I. V. (estirpe do L. N. I. V., origem holandesa) — matava irregularmente o ratinho; desenvolvia em cadeias curtas.

I — Sterne (estirpe «avirulenta» STERNE, 1939, 1946 — proveniente do Laboratório de Onderstepoort) — letalidade irregular para o ratinho; crescimento em cadeias curtas; no caldo simples apresentava-se em longas cadeias e as colónias no agar simples eram bastante irregulares. As subculturas em meios com maior concentração de soro normal de equino seleccionavam novo tipo de população que, mesmo em meios sem soro, patenteava cadeias curtas. Esta variante era dotada de análogo poder imunizante.

I — F. D. (estirpe dos Laboratórios Fort Dodge, Iowa, U. S. A.) — matava o ratinho e desenvolvia em cadeias mais extensas.

II — I. P. P. (estirpe do Instituto Pasteur de Paris) — letal para o cobaia; crescimento em cadeias curtas.

II — I. S. M. (estirpe do Instituto Seroterápico de Milão) — matava irregularmente o cobaia; desenvolvia em cadeias curtas.

II — L. S. (estirpe do Laboratório Sorológico de Lisboa) — letal para o cobaia; crescimento em cadeias mais extensas.

II — L. L. (estirpe dos Laboratórios Lederle, U. S. A.) — matava o cobaia; desenvolvia em cadeias curtas.

III — L. L. (estirpe dos Laboratórios Lederle, U. S. A.) — vitimava irregularmente o coelho jovem; crescimento em cadeias curtas.

Estas estirpes atenuadas eram, pelos respectivos laboratórios, utilizadas na preparação de vacinas do carbúnculo hemático.

2.1.1.2 — Estirpes virulentas

A estirpes virulentas empregadas, muito numerosas, são discriminadas no decurso dos ensaios. A estirpe B. anthracis 245 utilizava-se normalmente no Serviço de Soro e Vacinas (L. N. I. V.) na apreciação dos produtos destinados à profilaxia do carbúnculo hemático.

2.1.1.3 — Meios de cultura

Dada a natureza do desenvolvimento das estirpes do *B. anthracis* *in vitro*, a acção imunológica traduz-se pelo aumento da extensão da cadeia. Torna-se assim necessário, para melhor apreciação dos resultados, criar condições óptimas ao crescimento dessas estirpes a fim de reduzir ao mínimo a extensão das suas cadeias. O soro normal de equino, animal susceptível à infecção carbunculosa, favorecia o desenvolvimento das estirpes de *B. anthracis*, principalmente das virulentas, o qual se processava a ritmo mais rápido em cadeias de menor extensão; facilitava-se, deste modo, a apreciação dos resultados no decorrer do tempo.

A influência do soro na redução do tamanho das cadeias variava com as estirpes, fazendo-se sentir mais pronunciadamente nas virulentas após o isolamento a partir do seu ambiente natural. Para estas estirpes, a maiores concentrações de soro nos meios de cultura correspondia um desenvolvimento mais intenso em cadeias menores.

O crescimento das estirpes atenuadas nem sempre era favorecido pela adição de maiores quantidades de soro, dependendo possivelmente do ambiente em que se processou a atenuação e do meio em que normalmente eram mantidas *in vitro*.

De maneira geral, o crescimento das estirpes atenuadas nos meios líquidos com 10 % ou mais de soro operava-se menos intensamente e as cadeias, nalgumas delas, eram mais extensas, principalmente nas de menor virulência ou com mais pronunciado grau de atenuação. Excepcionalmente a estirpe I-Sterne, cujo crescimento se processava ainda exuberantemente sob a forma de cadeias curtas.

Eram, por conseguinte, diferentes as concentrações do soro que proporcionavam melhores condições de crescimento às estirpes virulentas e às atenuadas. Daí, a utilização de meios de cultura com variáveis concentrações de soro.

2.1.1.3.1 — Estirpes atenuadas

Caldo soro a 2 %, pH 7,2

2.1.1.3.2 — *Estirpes virulentas*

Caldo soro a 20 %, pH 7,2

2.1.2 — *BACILLUS CEREUS* (B. CEREUS)

Estirpe 2599, proveniente da N. C. T. C., Colindale, Londres

2.1.2.1 — Meio de cultura

Caldo simples glucosado a 2 ‰, pH 7,2

2.1.3 — *BACILLUS CEREUS* VAR. *MYCOIDES* (B. MYCOIDES)

Estirpe 926, procedente da N. C. T. C., Colindale, Londres.

2.1.3.1 — Meio de cultura

Caldo simples glucosado a 2 ‰, pH 7,2

2.1.4 — *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* (E. RHUSIOPATHIAE)

2.1.4.1 — *Estirpes atenuadas*

Staub (estirpe do Instituto Pasteur de Paris) — avirulenta para o ratinho branco; crescia, simultâneamente, sob a forma de bacilos maiores, filamentos e pequenas cadeias; a colónia em agar simples tinha aspecto ligeiramente rugoso.

Staub 55 (estirpe do Instituto Veterinário de Pullawy) — avirulenta para o ratinho; crescia sob a forma de bacilos curtos e isolados; a colónia em agar simples tinha aspecto liso, à semelhança do da estirpe virulenta.

Connaught (estirpe dos Laboratórios Connaught, Toronto) — avirulenta para o ratinho; desenvolvia sob a forma de bacilos curtos e isolados; a colónia em agar simples tinha aspecto liso, tal qual o da estirpe Staub 55.

Staub 50 P (50.^a passagem da estirpe Staub — subculturas diárias em caldo simples adicionado de 1 ‰ de glucose, pH 7,2, à temperatura de 37 °C) — matava cerca de 50 % dos ratinhos inoculados por via

subcutânea com 0,10 cc. da cultura de 24 horas em caldo, os quais adoe-
ciam entre o 5.º e 10.º dias com diarreia e conjuntivite. A letalidade
ocorria durante os 21 dias após a inoculação da cultura. Desenvolvia sob
a forma de bacilos mais curtos e a colônia era menos rugosa que a da
estirpe Staub original.

Staub 100 P (100.ª passagem da estirpe Staub — subculturas diá-
rias em meio análogo ao da precedente e nas mesmas condições de tem-
peratura) — avirulenta para o ratinho; crescia sob a forma de bacilos
curtos e a colônia em agar simples tinha aspecto liso. O desenvolvimento
no meio empregado processava-se a ritmo mais rápido que o das estirpes
Staub e Staub 50 P.

De maneira geral, o crescimento destas estirpes atenuadas era mais
lento que o das virulentas.

As estirpes Staub, Staub 55 e Connaught eram utilizadas na pre-
paração de vacinas do mal rubro, tipo Staub (1940), pelos laboratórios
de origem.

2.1.4.2 — Estirpes virulentas

Tipo N (estirpe do Laboratório de Weybridge) e outras que são
indicadas a quando da descrição dos ensaios. A estirpe 484 utilizava-se
normalmente no Serviço de Soros e Vacinas do L. N. I. V. na apreciação
do valor imunizante dos produtos destinados à profilaxia do mau rubro.

2.1.4.3 — Meios de cultura

Caldo simples glucosado a 1 %₀₀, pH 7,2 — normalmente utilizado
tanto para estirpes atenuadas como para virulentas.

A estirpe N, destinada à preparação de vacina morta absorvida,
tipo Traub (1949), crescia no meio indicado para esse fim. Report
(1958).

2.1.5 — LISTERIA MONOCYTOGENES (L. MONOCYTOGENES)

Listéria «Weybridge» — estirpe proveniente do Laboratório de Wey-
bridge, Inglaterra;

Listéria «Thiery» — estirpe de origem ovina, procedente do Laboratório de Alfort, França;

Listéria «Camarate» — estirpe de origem bovina do L. N. I. V.

Todas estas estirpes haviam já sido ensaiadas neste Laboratório Nacional por MOREIRA-JACOB (1956), que amavelmente as cedeu.

Listéria «Sintra» — estirpe de origem aviária;

Listéria «Mortágua» — estirpe de origem aviária;

Listéria «Sintra-S» — estirpe de origem suína.

Estas estirpes foram objecto de estudo neste Laboratório Nacional por parte de MELO e DUARTE (1966), que amavelmente, as facultaram.

Listéria «Bragança» — estirpe de origem suína;

Listéria «Chinchila» — estirpe de chinchila.

Uma e outra foram isoladas no Serviço de Bacteriologia do L. N. I. V.

2.1.5.1 — Meio de cultura

Caldo simples glucosado a 1^o/₀₀, (F₃B — Wadsworth, 1947)

2.1.6 — PASTEURELLA MULTOCIDA (P. MULTOCIDA)

P₂₉, bovino, Kénia — tipo I; 229, galinha, Espanha — tipo II; P₈, furão, Inglaterra — Tipo III; P₁₂, galinha, Índia — tipo IV; P₁, suíno Inglaterra — tipo V.

Estas estirpes foram amavelmente cedidas por HUDSON, Laboratório de Weybridge — Inglaterra, e referidas no seu trabalho em 1954.

A₄, galinha, Inglaterra — tipo II e 739, bovino, Inglaterra — tipo IV, obsequiosamente ofertadas por ROBERTS, Evans Institut — Inglaterra, e mencionadas no seu trabalho em 1947.

Outras estirpes de *P. multocida* utilizadas e referidas na descrição dos ensaios, incluindo a S₄ de suíno e a B₁ de bovino — tipo VI, foram identificadas, imunològicamente, pela soro-protecção no ratinho, por AFONSO *et al* (1964 a).

2.1.6.1 — Meio de cultura

Caldo preconizado por BAIN (1954).

2.1.7 — SALMONELLA (S.)

S. typhi — tipo 2 (8385), *S. typhi* 0-901, *S. paratyphi* A-H.A.6 (8386), *S. paratyphi* B -H.B.3 (8390), *S. paratyphi* C (8053), *S. paratyphi* C «Vi» (5733), *S. abortus bovis* (5729), *S. abortus equi* (5727), *S. abortus ovis* (10.241), *S. berta* (5770), *S. eastbourne* (5771), *S. montevideo* (5747), *S. typhi* suis (5096) — provenientes do National Collection of Type Cultures, Colindale, Londres; *S. enteritidis* var. *danysz* do Instituto Pasteur de Paris.

Outras estirpes de salmonelas usadas são referidas na parte descritiva dos ensaios.

2.1.7.1 — Meio de cultura

Caldo preconizado por BAIN (1954) para a *P. multocida*.

2.1.8 — BRUCELLA (BR.)

Br. abortus 19, *Br. abortus* 99, *Br. melitensis* 53H38, *Br. suis* 1330, *R_c*-var. *rugosa* da *Br. melitensis* 53H38, provenientes do Laboratório de Weybridge — Inglaterra.

2.1.8.1 — Meio de cultura

Caldo triptose (Difco B62 — 9.^a edição)

Caldo Albimi (Brucella broth — cat NA — 114 dos Albimi Laboratories, U. S. A.)

2.1.9 — ESCHERICHIA COLI (E. COLI)

E. coli m 67 — estirpe mucoide, de proveniência sueca, a que se atribui o coligranuloma da galinha conforme Hjärre e Wramby (1945) e cedido amavelmente por TABORDA DUARTE; a estirpe *E. coli* 67, não mucoide, foi isolada em placa de agar MacConkey a partir de sementeira da reserva da estirpe m 67 que se apresentava em agar direito. Esta estirpe de *E. coli* não mucoide poderá considerar-se variante da m 67, segundo Hjärre e Wramby (1945), se for excluída a hipótese de conspurcação de origem.

A outras estirpes empregadas é feita referência no capítulo que trata dos ensaios.

2.1.9.1 — Meio de cultura

Caldo simples, glucosado a 1 ‰, pH 7,2

2.1.10 — AEROBACTER AEROGENES (A. AEROGENES)

As estirpes de *A. aerogenes* utilizadas são mencionadas a quando dos registos de experimentação.

2.1.10.1 — Meio de cultura

Caldo simples, glucosado a 1 ‰, pH 7,2

2.1.11 — AEROBACTER CLOACAE (A. CLOACAE)

As estirpes de *A. cloacae* são igualmente referenciadas na parte alusiva aos ensaios.

2.1.11.1 — Meio de cultura

Caldo simples, glucosado a 1 ‰, pH 7,2.

2.1.12 — PROTEUS VULGARIS (P. VULGARIS)

As estirpes de *P. vulgaris* utilizadas constam da descrição dos ensaios.

2.1.12.1 — Meio de cultura

Caldo simples, glucosado a 1 ‰, pH 7,2.

2.1.13 — PROTEUS MIRABILIS (P. MIRABILIS)

As estirpes de *P. mirabilis* utilizadas constam da descrição dos ensaios.

2.1.13.1 — Meio de cultura

Caldo simples, glucosado a 1 ‰, pH 7,2.

2.1.14 — PSEUDOMONAS AERUGINOSA (PS. AERUGINOSA)

As estirpes de *Ps. aeruginosa* utilizadas são indicadas a quando da descrição dos respectivos ensaios.

2.1.14.1 — Meio de cultura

Caldo simples, glucosado a 1 ‰, pH 7,2.

2.1.15 — ACTINOBACILLUS MALLEI (A. MALLEI)

A. mallei 3783, de origem americana, utilizado na preparação de maleína no Serviço de Alergenos do L. N. I. V.

2.1.15.1 — Meios de cultura

Caldo glucosado a 1 ‰, pH 7,6.

Caldo com neopeptona e extracto de levedura, Bain (1954), pH 7,6.

2.1.16 — STREPTOCOCCUS (STR.)

As estirpes de *Streptococcus* são referidas quando da descrição dos ensaios efectuados.

2.1.16.1 — Meios de cultura

Caldo, BAIN (1954), adicionado de soro normal de coelho, 2 a 5 ‰.

2.1.17 — STAPHYLOCOCCUS (ST.)

As estirpes de *Staphylococcus* utilizadas são enumeradas ao tratar-se da experimentação que lhe concerne.

2.1.17.1 — Meio de cultura

Caldo preconizado para a *P. multocida*, BAIN (1954).

2.1.18 — CLOSTRIDIUM CHAUVOEI (CL. CHAUVOEI)

Cl. chauvoei 8070, proveniente da N. C. T. C. Colindale, Inglaterra.

2.1.18.1 — Meio de cultura

Caldo fígado de vitela, pH, 7,6.

2.2 — TEMPERATURA E TEMPO DE INCUBAÇÃO

Normalmente as estirpes desenvolviam à temperatura de 37°C durante 24 horas — período este que no caso da *Brucella* se prolongava até às 72 horas. No entanto, em relação a determinados agentes bacteria-

nos, a temperatura de incubação variava de 7 a 45°C de harmonia com a sua capacidade de crescimento.

Os ensaios descritos sem qualquer referência especial foram realizados à temperatura de 37°C.

2.3 — CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES

As estirpes bacterianas intervenientes nos ensaios mantinham-se liofilizadas. O respectivo veículo era o extracto de levedura, Difco, a 2 %.

2.4 — ANTI-SOROS

Na experimentação foram utilizados soros específicos obtidos de coelhos e destinados a fins puramente laboratoriais e soros preparados em grandes animais — bovinos e equinos — para aplicação profiláctica e terapêutica.

2.4.1 — ANTI-SOROS DE COELHO

Na preparação destes anti-soros recorria-se a coelhos jovens com o peso médio de 2000 gramas.

2.4.1.1 — Antigénios

Normalmente eram constituídos por suspensões de culturas de 16 horas, em soluto fisiológico e inactivadas com 2 % de formol (Merck, pró análise, 35 % em peso) à temperatura ambiente (20-25°C), correspondendo as concentrações ao grau 5 e 10 do nefelómetro de McFarland.

A concentração mais elevada era utilizada na fase final de hiperimunização a fim de evitar o inconveniente resultante de maior volume de inóculo.

2.4.1.2 — Esquema de hiperimunização

Em geral, compreendia inoculações de doses crescentes de antigénio, desde 0,25 a 1 cc., espaçadas de 4 dias e de 1 a 5 cc. a intervalos de 7 dias. Quase sempre 3 séries de inoculações, mediadas de 21 dias, bastavam para a obtenção de anti-soro com acção imunológica *in vitro* — 100 DMI/cc. — e acção protectora *in vivo* nos casos em que era possível a apreciação desta.

2.4.2 — ANTI-SOROS DE BOVINO E DE EQUINO

De bovino — Soros da pasteurelose (*P. multocida*).

De equino — Soros do carbúnculo hemático e do mal rubro.

2.4.2.1 — Antígenos e hiperimunização

Após a imunização eram inoculadas culturas vivas e virulentas de acordo com os esquemas normais de hiperimunização em produtores dos soros mencionados acima.

2.4.3 — CONSERVAÇÃO DOS ANTI-SOROS

Os soros específicos destinados a estudos in vitro, sem conservador, eram mantidos congelados a -25°C para evitar possíveis contaminações, principalmente por fungos, as quais são susceptíveis de ocorrer mesmo à temperatura de geleira ($3-7^{\circ}\text{C}$). Os soros contaminados eram esterilizados por filtração através Seitz-EK7. Para evitar repetidas congelações e descongelações os soros eram mantidos em recipientes de pequena capacidade no congelador.

Os soros adicionados de substâncias conservadoras só poderão ser estudados in vitro após neutralização do respectivo conservador, ou privados dele por diálise.

Em relação a determinados produtos — substâncias bacteriostáticas, quer sais de mercúrio quer antibióticos ou sulfamidas — poder-se-á anular a sua acção com o emprego de meios de cultura especiais dotados de capacidade neutralizante. Os soros conservados por junção de substâncias bactericidas, tais como o fenol, formol, cresol e outros, em concentrações normais, só deverão ser estudados in vitro a partir de 10^{-2} .

2.4.4 — APRECIACÃO DO PODER IMUNIZANTE DOS SOROS ESPECÍFICOS

O poder imunizante dos soros específicos utilizados nos ensaios era apreciado, sempre que possível, de harmonia com os métodos preconizados pelos tratadistas e normalmente seguidos no Serviço de Contraste do L. N. I. V. Indicamo-los seguidamente:

2.4.4.1 — Soro do mal rubro

No ratinho branco, método de MARX, 1907.

2.4.4.2 — Soro do carbúnculo hemático

No coelho, método de SOBERNHEIM (cit. GERLACH, 1934).

2.4.4.3 — Soro da pasteurelose (*P. multocida*)

No ratinho branco, AFONSO *et al* (1964 c).

2.4.4.4 — Outros soros

No ratinho branco, segundo técnicas descritas a quando do relato dos ensaios.

2.5 — VACINAS

No estudo da dinâmica da imunização, foram empregadas, como produtos vacinais, bactérias vivas e desvitalizadas.

Discriminam-se seguidamente:

2.5.1 — VACINAS «VIVAS»

2.5.1.1 — Mal rubro

Culturas de 24 horas, à temperatura de 37°C, em caldo simples glucosado a 1‰, pH 7,2, das estirpes avirulentas de *E. rhusiopathiae* anteriormente designadas — 2.1.4.1.

2.5.1.1.1 — Inocuidade e poder imunizante

Verificados no ratinho branco segundo as indicações de STAUB (1940) e TRAWINSKI (1949).

2.5.1.2 — Carbúnculo hemático

Suspensão de esporos em soluto fisiológico glicerinado a 50 % das estirpes atenuadas de *B. anthracis* referidas no articulado 2.1.1.1.

2.5.1.2.1 — Preparação

Idêntica à da «vacina avirulenta» STERNE (1946).

Número de esporos por cc. — 10^7 .

Precipitada — alúmen (pró-análise — Merck), concentração 0,50 %.
Saponinada — Saponina branca (Merck), concentração 0,25 %.

2.5.1.2.2 — Poder imunizante

Verificado no cobaia, coelho e ovino conforme o protocolo seguinte:
Os cobaias e coelhos eram inoculados com 0,50 cc. de vacina e os ovinos com 1 cc. — uns e outros por via subcutânea. .

O número de animais utilizados de cada espécie era de 8, a par de grupo idêntico de testemunhas.

A contraprova era realizada 21 dias depois por via subcutânea, sendo o ponto de inoculação em região do organismo oposta à que fora aplicada a vacina; no cobaia o inóculo continha cerca de 100 doses mínimas mortais (D. M. M.) das estirpes atenuadas de *B. anthracis*, ou 1 dose seguramente mortal (D. S. M.) da estirpe virulenta e no coelho e ovino 1 D. S. M. desta última. Simultaneamente, era inoculado, pela mesma via e com igual dose de contraprova, um grupo análogo de animais não vacinados que serviam de testemunhas.

Período de observação — 12 dias.

Era empregada na contraprova uma suspensão de esporos de *B. anthracis* — estirpes atenuadas e virulentas — em soluto fisiológico glicerinado a 50 % conforme a prescrição de Sterne (1937, 1946).

— Dose mínima mortal (D. M. M.) — era a mínima dose de esporos contida em 0,10 cc. da suspensão glicerniada que matava nas 72 horas cerca de 50 % dos cobaias inoculados por via subcutânea na região da coxa.

— Dose seguramente mortal (D. S. M.) — era a mínima dose de esporos, existente em 0,10 cc. da suspensão glicerinada que normalmente matava no mesmo período 100 % dos animais inoculados em condições similares.

2.5.1.3 — Outros agentes bacterianos vivos

Foram utilizados na imunização outros agentes vivos conforme se pode apreender da descrição dos respectivos ensaios.

2.5.2 — VACINAS «MORTAS»

2.5.2.1 — Mal rubro, tipo Traub

2.5.2.1.1 — Preparação

Segundo as indicações aconselhadas pelo Instituto Paul Ehrlich, REPORT (1958).

2.5.2.1.2 — Poder imunizante

Estudado no ratinho branco conforme técnica descrita por SHUMAN (1954), mas apreciado dentro dos limites prescritos por Schellner (cit. SHUMAN, 1954).

2.5.2.2 — Listeriose

2.5.2.2.1 — Preparação

Suspensão de *Listeria monocytogenes* obtida a partir de culturas em caldo glucosado a 1‰ com 16 horas de desenvolvimento a 37°C, inativada a temperatura ambiente (20-25°C) por junção de 2‰ de formol (Merck, pró análise 35 % em peso); o seu teor microbiano era correspondente à escala 5 do nefelómetro de McFarland; era depois precipitado pelo alumen (Merck, pró análise) — concentração 1 %.

2.5.2.2.2 — Poder imunizante

Verificado no ratinho branco e no cobaia segundo os esquemas seguintes:

No ratinho branco, com peso médio de 17 gramas, 3 inoculações de 0,25 cc. de vacina por via subcutânea ou intraperitoneal, com o intervalo de 14 dias; contraprova 14 dias depois da última inoculação vacinal, com 1 D. S. M. da cultura de 16 horas de *L. monocytogenes*, em 0,10 cc., igualmente por via subcutânea ou intraperitoneal.

No cobaia, com peso médio de 350 gramas, 3 inoculações de 1 cc. da vacina por via subcutânea ou intraperitoneal com o intervalo de 14 dias; contraprova 14 dias depois da última inoculação vacinal com uma

gota de cultura de 16 horas em caldo por via ocular ou com 1 D. S. M. de idêntica cultura por via intraperitoneal.

Dose seguramente mortal (D. S. M.) — era a mínima dose de cultura de 16 horas de *L. monocytogenes* que matava cerca de 100 % dos animais inoculados; era determinada em função da espécie animal e via de inoculação.

2.5.2.3 — Pasteurelose (*P. multocida*)

2.5.2.3.1 — Preparação

Suspensão de *P. multocida* com teor microbiano correspondente à escala 5 do nefelômetro de McFarland e obtida a partir de cultura com 16 horas de desenvolvimento em caldo Bain; inativado à temperatura ambiente (20-25°C) com 2 ‰ de formol (Merck, pró análise, 35 % em peso); a suspensão era precipitada, a 1 %, pelo alumen (Merck, pró análise), AFONSO *et al* (1964 b).

2.5.2.3.2 — Poder imunizante

Apreciado no ratinho branco, segundo os métodos de CARTER (1950), AFONSO *et al* (1964 b).

2.5.2.4 — Salmonelose (*S. cholerae suis*)

2.5.2.4.1 — Preparação

Suspensão de *S. cholerae suis* com teor microbiano correspondente ao grau 5 do nefelômetro de McFarland, obtida a partir de cultura em caldo BAIN com 16 horas de desenvolvimento, inativada à temperatura ambiente (20-25°C) por adição de 2 ‰ de formol (Merck, pró análise, 35 % em peso); precipitada, a 1 %, pelo alumen (Merck, pró análise).

2.5.2.4.2 — Poder imunizante

Apreciado no cobaia e coelho conforme consta da descrição dos ensaios.

2.5.2.5 — Outras preparações vacinais

Foram ensaiadas diferentes preparações vacinais de *B. anthracis*, *E. rhusiopathiae*, *P. multocida* e *S. cholerae suis*, a fim de se verificar a influência que tinham na imunização, o meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação, a inativação e o adjuvante.

2.5.2.5.1 — Meios de cultura

Utilizaram-se meios com soro normal de diferentes espécies animais até à concentração 1/3, e meios sem soro. O soro normal adicionado aos meios de cultura era previamente inativado a 56°C durante 30 minutos.

2.5.2.5.2 — Temperatura de incubação

Ambiente (20-25°C) e na estufa 37°C.

2.5.2.5.3 — Tempo de incubação

8, 16, 24 e 48 horas.

2.5.2.5.4 — Inativação

2.5.2.5.4.1 — Agentes químicos e concentração

Formol (Merck, pró análise, 35 % em peso) 2 ‰.

Ácido félico (Merck, pró análise) 5 ‰.

Mertiolato de sódio Lilly 1/10 000.

Temperatura de inativação: geleira — 3-7°C., ambiente — 20-26°C e estufa — 37°C.

2.5.2.5.4.2 — Agentes físicos

Calor — 65°C, durante 30-60 minutos em banho-maria.

2.5.2.5.5 — Teor microbiano

Normalmente correspondente ao grau 5 do nefelómetro de McFarland.

2.5.2.5.6 — Adjuvantes e concentração

Alumen (Merck, pró análise)	1 %
Hidróxido de alumínio (preparado no Serviço de Química do L. N. I. V.)	50 %
Saponina branca (Merck)	0,25 %
Glicerina medicinal (Sovena)	50 %
+ Oleoso, tipo incompleto de Freund (1,5 cc. de Arlacel A + 8,5 cc. de óleo de parafina ou de mayoline)	50 %

+ Utilizaram-se o Arlacel A, lote 3123 da Atlas Powder Company — Delaware, U. S. A.; o óleo de parafina 2044 da Backer & Adamson — Gen. Chem. Div. — New York, U. S. A.; e a Mayoline 2214 da Esso Standard — França.

2.6 — IDENTIFICAÇÃO IMUNOLÓGICA DE ESTIRPES BACTERIANAS *IN VIVO*

2.6.1 — B. ANTHRACIS

A identificação imunológica das estirpes de *B. anthracis* era feita através a imunização activa e passiva.

2.6.1.1 — Imunização activa

Realizada no cobaia, coelho e ovino, segundo esquemas já referidos — 2.5.1.2.2.

2.6.1.2 — Imunização passiva

Efectuada no ratinho branco, peso médio 17 gramas, de seguinte maneira: cada ratinho, de um grupo de 10, era inoculado por via intra-peritoneal ou subcutânea com 0,50 cc. de soro do carbúnculo hemático; passadas 6 a 24 horas, respectivamente, eram injectados, por via subcutânea, com 1 D. S. M. numa suspensão de esporos em soluto fisiológico

glicerinado a 50 % das estirpes a identificar. Simultâneamente eram inoculados, mas apenas com 1 D. S. M., os ratinhos que, no mesmo quantitativo, formavam o grupo testemunha.

Dose seguramente mortal (D. S. M.) — era a mínima dose de esporos, em 0,10 cc., que matava, no período de 96 horas, cerca de 100 % dos ratinhos inoculados por via subcutânea.

2.6.2—E. RHUSIOPATHIAE

A identificação das estirpes de *E. rhusiopathiae* fazia-se no ratinho branco com o peso médio de 15 gramas, imunizado activa e passivamente.

2.6.2.1 — Imunização activa

Utilizava-se na imunização do ratinho vacina atenuada, tipo STAUB; cada ratinho era inoculado por via subcutânea com 0,10 cc. da vacina. Passados 21 dias da vacinação, cada ratinho — num grupo de 10 — era inoculado por via intraperitoneal com cerca de 1000 D. M. M., contidas em 0,10 cc., numa cultura de 16 horas em caldo da estirpe em estudo. Um grupo idêntico de ratinhos, não imunizados — grupo testemunha — era inoculado com a mesma cultura e em condições idênticas.

2.6.2.2 — Imunização passiva

Prova executada no ratinho branco com o mesmo peso, segundo o seguinte esquema: cada ratinho — num grupo de 10 — era inoculado por via subcutânea com 0,10 cc. de soro do mal rubro de elevado poder imunizante, ou seja, 0,01 cc. protegendo o ratinho, conforme o método de Marx empregado na apreciação; 1 hora depois eram injectados por via intraperitoneal com a dose individual de 0,10 cc., contendo 100 a 200 D. M. M. numa cultura de 16 horas em caldo da estirpe em estudo. Um grupo idêntico de ratinhos — grupo testemunha — era apenas inoculado com a mesma cultura e em condições idênticas.

Dose mínima mortal (D. M. M.) — consistia na mínima dose de cultura de *E. rhusiopathiae* de 16 horas em caldo e contida em 0,10 cc., que matava, no período de 96 horas, cerca de 50 % dos ratinhos inoculados por via intraperitoneal.

2.6.3 — L. MONOCYTOGENES

A identificação imunológica das estirpes de *L. monocytogenes* era feita através a imunização activa. O soro específico não conferia imunidade; esta é essencialmente celular em relação à *Listeria*.

2.6.3.1 — Imunização activa

A imunidade resultante da aplicação de preparações vacinais desvitalizadas com base em estirpes de *L. monocytogenes* — 2.5.2.2.2 — era deficiente. Contudo, obtinha-se sólida imunidade com cultura viva no ratinho e no cobaia, animais utilizados nos ensaios de identificação imunológica das estirpes, conforme se discrimina:

Ratinhos brancos, peso médio 17 gramas, eram imunizados por via subcutânea com doses subletais de cultura de 16 horas em caldo.

A dose de cultura inoculada variava com a virulência da estirpe. Passados 21 a 30 dias eram inoculados por via intraperitoneal com 1 D. S. M., contido em 0,10 cc., numa cultura de 16 horas em caldo, da estirpe a identificar.

Um grupo com igual número de ratinhos, não imunizados — grupo testemunha — era inoculado com a mesma cultura e em condições idênticas. Normalmente, utilizavam-se nos ensaios, grupos de 10 ratinhos.

Cobaias, peso médio 350 gramas, eram imunizados por via subcutânea com cultura de 16 horas em caldo de determinada estirpe. Passados 21 a 30 dias eram inoculados por via ocular com uma gota de cultura de 16 horas em caldo da estirpe a identificar. Um grupo com igual número de cobaias, não imunizado — grupo testemunha — era inoculado com a mesma cultura e em condições idênticas.

Em geral, utilizavam-se nos ensaios grupos de 8 cobaias.

Cada ensaio, quer no ratinho, quer no cobaia, era ainda testemunhado com a estirpe utilizada na imunização.

D. S. M. — 2.5.2.2.2.

2.6.4 — P. MULTOCIDA

A identificação imunológica das estirpes de *P. multocida* era feita no ratinho branco, segundo o método de ROBERTS (1947), AFONSO *et al* (1964 a).

2.7 — ABSORÇÃO DE SOROS ESPECIFICOS

Os soros eram absorvidos com suspensões microbianas desvitalizadas, quer à temperatura ambiente — 20 a 25°C — quer, de harmonia com as prescrições de KAUFFMANN (1954), a 37°C durante 2 horas, a que se seguia um período de 20 horas na geleira a 3-7°C. Com suspensões de microrganismos vivos, a absorção era feita na geleira a 3-7°C.

A absorção era dada por completada após testes negativos de aglutinação.

2.8 — ACÇÃO IMUNOLÓGICA *IN VITRO*

Este estudo tem por base, como se disse — 1 —, o conhecimento da acção imunológica *in vitro* exercida pelo soro específico sobre as estirpes bacterianas durante o seu crescimento. A imunidade específica resulta da acção imunológica exercida pelos anticorpos sobre as bactérias no decorrer da infecção, a qual se traduz *in vitro*, como se verificou do confronto *in vivo*, quer pelo desenvolvimento em cadeia das estirpes que normalmente dividem apenas num plano, quer pelo aumento dos agregados bacterianos das estirpes que o fazem em mais de um. Nas estirpes que normalmente crescem em cadeia *in vitro*, a acção imunológica do soro específico repercute-se na extensão da cadeia em relação às testemunhas, cujo crescimento se processa em meio com soro normal e sob condicionalismo análogo.

Nos ensaios realizados considera-se como significativa da acção imunológica a extensão dupla da cadeia no soro específico em relação à do soro normal.

Com base neste conhecimento logrou-se transferir para o tubo de ensaio — estudo *in vitro* — o complexo problema da imunidade específica e da identificação imunológica das estirpes bacterianas.

Esta técnica *in vitro*, para as bactérias, e a soro-neutralização, para os virus, permitem relevar a íntima relação dos resultados através elas obtidos com os da imunidade específica *in vivo*.

A técnica seguida no estudo da acção imunológica *in vitro* consiste em promover o desenvolvimento do agente bacteriano na presença de soro tipo específico, sendo cada ensaio devidamente testemunhado pela mesma

estirpe cultivada na presença de soro normal e em condições idênticas de experimentação.

Do estudo efectuado deduzem-se as normas de execução da técnica da acção imunológica *in vitro*:

— O meio de cultura e a temperatura de incubação são variáveis, dependentes do agente bacteriano em causa e devem corresponder às condições óptimas de desenvolvimento *in vitro*. Nestas condições, é reduzida ao mínimo a extensão das cadeias das estirpes de *B. anthracis*, de *Streptococcus* e de outros agentes bacterianos com tipo de crescimento análogo, o que permite melhor apreciação dos resultados. Normalmente, era de 37°C a temperatura de incubação das estirpes virulentas ou avirulentas, isoladas de animais de diferentes espécies. Ao serem semeados, os meios devem encontrar-se à temperatura de incubação — 37°C.

— O tempo de incubação deverá, normalmente, permitir que seja atingida a fase estacionária no ciclo de desenvolvimento do agente bacteriano em causa. É portanto também uma variável a ter em conta e que se encontra dependente da espécie bacteriana e estirpe. Nos ensaios realizados, o tempo de incubação não ultrapassava as 24 horas, à excepção dos respeitantes às estirpes de *Brucella* em que aquele prazo se prolongava até às 72 horas.

— O volume de meio utilizado pode ser variável consoante a finalidade do estudo em causa ou a modalidade dos ensaios. Nas provas realizadas foi de 10 cc. quando dos soros hiperimunes, e de 1 cc. no caso dos soros imunes, isto para evitar grande dispêndio de soro específico e, implicitamente, tornar menos onerosa a experimentação.

— A dose de cultura a semear deverá ser fixa, variando a concentração do soro específico; a de 0,01 cc. por cc. de meio (10^{-2}) mostra-se a mais de aconselhar em ensaios desta natureza.

A sementeira a partir de cultura em plena fase logarítmica permite a realização da prova em mais curto período de tempo. Quase sempre empregavam-se nos ensaios culturas de 16 horas, pelo que o agente bacteriano era submetido à acção do soro específico durante mais extenso período do seu ciclo de crescimento. Salvo os casos especiais em que se pretenda conhecer o comportamento imunológico das populações bacterianas de determinada estirpe e para tal se procede ao estudo de elementos

isolados em câmara microscópica — microteste — a dose a ser utilizada nos ensaios *in vitro* é, como se disse, de 0,01 cc. da cultura por cc. de meio.

Aquela dose é a que permite maior acordo com o que normalmente se passa na experimentação *in vivo*, em que fracção de dada população de bactérias é igualmente submetida à acção dos anticorpos. De harmonia com o que vem de ser dito, nos ensaios realizados, era de 0,01 cc. por cc. de meio a dose de cultura as mais das vezes utilizada, ou seja a «dose infectante».

— A concentração do soro específico no ensaio deve ser variável, mantendo-se fixa, como se disse, a da cultura, elemento dinâmico. A variação simultânea das duas, a do soro e a da cultura foi também objecto de estudo, não parecendo que assim se obtivessem resultados mais significativos e que dessem maior valia aos ensaios. O aumento ou diminuição, dentro de certos limites das doses da cultura ou das do soro, apenas altera a dinâmica da acção imunológica no decorrer do tempo.

No caso de soros hiperimunes a concentração máxima será de 0,1 cc. por cc. de meio (10^{-1}); ela ir-se-á, contudo, reduzindo conforme o valor imunizante do soro em causa. Normalmente, nos ensaios efectuados, a concentração do soro varia na base 10, desde 10^{-1} a 10^{-5} . Nos ensaios com soros imune — soros de animais vacinados — a concentração no meio de cultura varia em geral de $1/3$ a $1/9$.

— Observação microscópica das culturas: — constava de exame directo ao microscópio óptico, cerca de $600 \times$, dos esfregaços das culturas em lâmina de vidro, após coloração simples pelo azul de toluidina. A secagem dos esfregaços operava-se na estufa a 37°C e a fixação era feita pelo álcool puro. O exame das culturas submetidas à acção imunológica dos soros específicos deve ser efectuado durante o período de crescimento, principalmente na fase logarítmica, porquanto, mais tarde, há intensa aglutinação cuja presença pode prejudicar, dentro de certos limites, a observação da cadeia. O momento do exame é condicionado pela espécie bacteriana, mas com as estirpes empregadas nos ensaios, exceptuadas as da *Brucella*, as observações eram normalmente feitas entre as 2 e 10 horas após a sementeira, e, mais tarde, decorridas 16 ou 24 horas. No caso de se desejar proceder ao estudo da acção imunológica durante o ciclo com-

pleto de crescimento de determinada bactéria, consoante a espécie desta assim serão os intervalos das observações.

— Dose mínima imunológica (D. M. I.): — era a mínima dose de soro específico que, *in vitro*, exercia acção imunológica — crescimento em cadeia ou aumento significativo na extensão das cadeias no caso de estirpes que se desenvolvem normalmente sob esta forma; era determinada durante a fase logarítmica, de pleno desenvolvimento, ou na fase final de crescimento. Considerava-se aumento significativo da extensão da cadeia, quando esta atingia em média, pelo menos, $2 \times$ a grandeza da verificada em presença do soro normal.

2.8.1 — APRECIACÃO DO PODER IMUNIZANTE DO SORO ESPECÍFICO *IN VITRO*

A apreciação do poder imunizante dos soros específicos, em D. M. I., deverá ser sempre controlada em face de soro de reconhecido valor *in vivo*, padrão de preferência. A D. M. I. haverá que ser determinada na fase logarítmica, no período de pleno desenvolvimento, e nas condições já referidas. Se se desejar mais perfeito conhecimento do valor do soro, a apreciação far-se-á em função da D. M. I. tanto na fase logarítmica como na fase final de crescimento. Haverá ainda que ser realizada mediante meios com elevada concentração de soro normal procedente de animal da espécie a que diz respeito a experimentação *in vivo*, a fim de aproximar tanto quanto possível o condicionalismo *in vitro* e *in vivo* e, conseqüentemente, obter populações bacterianas menos divergentes, o que torna mais significativos e válidos os resultados.

2.8.2 — IDENTIFICAÇÃO IMUNOLÓGICA DE ESTIRPES BACTERIANAS *IN VITRO*

A identificação imunológica de estirpes bacterianas pressupõe, em relação ao soro específico sob a acção da qual crescem *in vitro*, comportamento idêntico ao da estirpe tipo, sob condicionalismo análogo.

As variações da D. M. I. dentro do mesmo tipo imunológico dependem da espécie bacteriana e da estirpe, como se depreende da descrição dos ensaios realizados sobre este assunto. Nas estirpes que sob a forma de elementos isolados crescem rapidamente, atingindo o pleno desenvolvi-

mento no período de 4 a 6 horas, a variação da D. M. I. $2 \times$ parece ser significativa da diferença de tipo imunológico.

O mesmo não acontece com as estirpes cujo crescimento se processa, igualmente, em elementos isolados, mas de maneira mais lenta, em que o pleno desenvolvimento só é atingido passadas 8 a 10 horas; neste caso, só a variação da D. M. I. superior a $2 \times$ permite admitir a divergência do tipo imunológico. Com estirpes cujo crescimento é mais lento ainda, ou se faz em cadeia, as variações, dentro do mesmo tipo, são mais acentuadas e dependentes da própria estirpe.

Os soros destinados à identificação imunológica de estirpes bacterianas e à verificação do poder imunizante de anti-soros a empregar na profilaxia e terapêutica, devem possuir, pelo menos, 100 D. M. I. por cc., conforme determinação feita durante a fase logarítmica, de pleno desenvolvimento.

A técnica da acção imunológica *in vitro* terá de ser sujeita a estudos da adaptação *in loco*, como é natural, e os resultados com ela obtidos tornar-se-ão mais significativos quando apreciados segundo métodos de análise estatística, hoje universalmente empregados.

Por sua vez, a microtécnica em cinematografia dará a conhecer, em toda a extensão do ciclo de crescimento, a dinâmica da acção imunológica.