

3 — RESULTADOS. DISCUSSÃO

3.1 — ACÇÃO IMUNOLÓGICA ANTIBACTERIANA

Verifica-se que as estirpes bacterianas, cuja divisão celular se processa apenas num plano, se desenvolvem em cadeia quando submetidas *in vitro*, em meios líquidos, à acção de soro tipo específico.

Nas estirpes que normalmente crescem em cadeia *in vitro*, a acção do soro tipo específico traduz-se no aumento do respectivo tamanho. Esta mesma acção do soro tipo específico reflecte-se, nas estirpes que normalmente se dividem em mais dum plano, pelo aumento dos agregados celulares resultantes da divisão nos diferentes planos. A extensão da cadeia, dependente da natureza do crescimento da estirpe bacteriana, está, as mais das vezes, directamente relacionada com o ritmo da divisão celular.

Verifica-se que o desenvolvimento em cadeia sob a acção do soro tipo específico é um fenómeno independente da aglutinação, quer qualitativa quer quantitativamente. Sob a influência do mesmo soro específico, o crescimento em cadeia processa-se nas maiores concentrações enquanto a aglutinação é observada ainda nas menores — Quadro 1.

Sempre que há desenvolvimento em cadeia verifica-se a aglutinação das culturas, mas há soros em que apenas se nota a aglutinação, mesmo nas maiores concentrações — Quadro 2.

A cadeia pode manifestar-se durante todo o ciclo de crescimento da cultura ou apenas nas suas primeiras fases, o que está dependente da concentração do soro tipo específico no meio cultural. Verifica-se ainda que o crescimento em cadeia sob a acção do soro tipo específico está directamente relacionado com o poder imunizante deste *in vivo*.

QUADRO 1
ACÇÃO IMUNOLÓGICA (CADEIA) E AGLUTINAÇÃO

Estirpes ⁽¹⁾	Soros específicos diluição	TEMPO DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS			
		6 horas		24 horas	
		cadeia	aglutinação	cadeia	aglutinação
<i>P. multocida</i> P29 — I	10 ⁻¹	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	+	—	+
	10 ⁻³	—	+	—	+
<i>S. typhi</i> tipo 2	10 ⁻¹	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	+	—	+
	10 ⁻³	—	+	—	+
<i>E. coli</i> H ₁	10 ⁻¹	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	+	—	+
	10 ⁻³	—	+	—	+
<i>P. vulgaris</i> H ₁	10 ⁻¹	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	+	—	+
	10 ⁻³	—	+	—	+

+ = reacção positiva;

— = reacção negativa

(¹) Cultura de 16 horas; concentração inicial 10⁻².

QUADRO 2

ACÇÃO IMUNOLÓGICA (CADEIA) E AGLUTINAÇÃO

Estirpes (1)	Soros específicos (2) diluição 10 ⁻¹	TEMPO DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS			
		6 horas		24 horas	
		cadeia	aglutinação	cadeia	aglutinação
<i>P. multocida</i> P29 — I	1	+	+	+	+
	2	+	+	—	+
	3	+	+	—	+
	4	—	+	—	+
<i>S. typhi</i> tipo 2	1	+	+	+	+
	2	+	+	—	+
	3	—	+	—	+
	4	—	+	—	+
<i>E. coli</i> H ₁	1	+	+	+	+
	2	+	+	—	+
	3	+	+	—	+
	4	—	+	—	+
<i>P. vulgaris</i> H ₁	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	—	+
	4	+	+	—	+

+ = reacção positiva;

— = reacção negativa

(1) Cultura de 16 horas; concentração inicial 10⁻².

(2) Soros individuais.

O soro específico, sem poder imunizante, sòmente aglutinava as respectivas culturas em crescimento. A cadeia podia ainda observar-se num momento dado se, a uma cultura em crescimento, na fase logaritmica, fosse adicionado soro tipo específico. No exame microscópio, em gota pendente, destas culturas a que se juntava o soro verificavam-se pequenas cadeias cuja extensão aumentava com a divisão celular. A cadeia não se visualizava nas culturas desvitalizadas, nem tão pouco nas vivas quando o soro específico não possuía acção imunizante *in vivo*, verificando-se sòmente aglutinação.

A aglutinação polar referida por PFAUNDLER (1898), MANDELBAUN (1932), STUART et al (1948), seria, na realidade, um crescimento em cadeia resultante da acção do soro específico, dado que era observado apenas com culturas vivas.

A cadeia decorrente da acção do soro específico, é um fenómeno imunológico de natureza dinâmica enquanto a aglutinação é de índole estática.

A inactivação dos soros específicos — destruição da função complementar pelo aquecimento a 56 °C durante 30 a 60 minutos — não altera praticamente as suas propriedades específicas, apreciadas através as diferentes técnicas imunológicas *in vitro* e *in vivo*. Em relação à reacção imunológica agora considerada — crescimento em cadeia — observa-se que soros nestas condições mantêm também praticamente o mesmo poder efectivo — Quadro 3.

A confirmá-lo estão ainda as verificações de STOLLERMAN e EKSTEDT (1957) em relação à *long-chain reaction* no *Streptococcus* do Grupo A, que se manifesta indiferentemente com soros específicos inactivados ou não.

A cadeia, nas estirpes cuja divisão celular se processa apenas num plano, e o aumento dos agregados celulares nas estirpes que se dividem em mais de um, parecem ser a expressão da actividade imunológica específica antibacteriana dos anti-soros. A divisão celular bacteriana, sob a acção do respectivo soro específico, não é seguida da separação dos elementos celulares formados.

QUADRO 3

ACÇÃO IMUNOLÓGICA

Soro específico inactivado

Estirpes ⁽¹⁾	Diluição do Soro específico	SORO NÃO INACTIVADO		SORO INACTIVADO ⁽²⁾	
		cadeia		cadeia	
		6 horas	24 horas	6 horas	24 horas
<i>P. multocida</i> P29 — I	10 ⁻¹	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	—	+	—
	10 ⁻³	—	—	—	—
<i>S. typhi</i> tipo 2	10 ⁻¹	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	—	+	—
	10 ⁻³	—	—	—	—
<i>E. coli</i> H ₁	10 ⁻¹	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	—	+	—
	10 ⁻³	—	—	—	—
<i>P. vulgaris</i> H ₁	10 ⁻¹	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	—	+	—
	10 ⁻³	—	—	—	—

+ = reacção positiva;

— = reacção negativa

(1) Cultura de 16 horas; concentração inicial 10⁻²

(2) Inactivação — 30 minutos a 56 °C.

3.2 — TIPO IMUNOLÓGICO

A acção imunológica exercia-se sobre estirpes virulentas e atenuadas pelo respectivo anti-soro. Mas em relação a estirpes da mesma espécie ou de diferentes espécies do mesmo género, os resultados obtidos divergiam largamente.

Verificava-se comportamento homogéneo, cadeia e aglutinação, em relação a estirpes dumas espécies dadas — *B. anthracis*, *E. rhusiopathiae*, *S. choleraesuis* — ao contrário do que ocorria com estirpes doutras espécies — *P. multocida*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Ps. aeruginosa*, *A. aerogenes*.

Nestas espécies o comportamento das estirpes sob a acção do mesmo anti-soro variava, verificando-se o crescimento em cadeia e aglutinação nuns casos, apenas aglutinação noutros, e, mais ainda, estirpes em que o mesmo soro específico não exercia qualquer acção observável, resultando esta diferente actuação da heterogeneidade antigénica das estirpes dentro de uma mesma espécie.

Na generalidade, os soros específicos não exerciam a referida acção — crescimento em cadeia — sobre estirpes de diferentes espécies do mesmo género.

Contudo, constatava-se acção cruzada entre estirpes de *Salmonella* de espécies diferentes, as quais pertenciam ao mesmo grupo sorológico do esquema de Kauffmann-White, isto é, possuíam estruturas antigénicas de superfície bastante semelhantes.

Verifica-se, portanto, que há espécies bacterianas onde o comportamento das estirpes sob a acção do mesmo anti-soro é homogéneo, e outras em que é heterogéneo em relação ao tipo de reacção em causa — crescimento em cadeia. Observava-se ainda certo grau de relação entre estirpes de diferentes espécies do mesmo género.

O Quadro 4 regista o comportamento, em geral, de diferentes estirpes dentro de cada espécie bacteriana considerada, em crescimento *in vitro*, sob a acção do soro específico obtido a partir de determinada estirpe da mesma espécie, e da sua consulta se deduz a homogeneidade dumas espécies e a heterogeneidade doutras, referidas. Dezenas de estirpes foram

ensaiadas, mostrando a disparidade do seu agrupamento em cada espécie em relação à reacção imunológica agora considerada — crescimento em cadeia.

QUADRO 4

RELAÇÃO IMUNOLÓGICA DE ESTIRPES DA MESMA ESPÉCIE

ESPÉCIES BACTERIANAS (1)	ACÇÃO EXERCIDA PELO SORO ESPECÍFICO (2)		
	Cadeia e aglutinação	Aglutinação	Sem acção
<i>B. anthracis</i>	+	—	—
<i>E. rhusiopathiae</i>	+	—	—
<i>L. monocytogenes</i>	+	—	—
<i>P. multocida</i>	+	+	+
<i>S. cholerae suis</i>	+	—	—
<i>S. typhimurium</i>	+	—	—
<i>E. coli</i>	+	+	+
<i>A. aerogenes</i>	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	+	+	+
<i>Ps. aeruginosa</i>	+	+	+

+ = estirpes nas condições referidas

— = não foi verificada estirpe naquelas condições

(1) BERGEY — 1957. Culturas de 16 horas — concentração inicial 10^{-2}

(2) Soro específico duma estirpe de cada espécie; concentração 10^{-1}

O agrupamento das estirpes em espécies tem sido baseado, até agora, noutras características, que não as imunológicas, não tendo ainda sido possível, na maioria das vezes, enquadrá-las sorològicamente consoante as

respectivas estruturas antigénicas — MANUAL DE BERGEY (BREED *et al* — 1957).

Verifica-se, assim, que o desenvolvimento em cadeia sob a acção de soro tipo específico, *in vitro*, representa uma reacção imunológica mais específica do que a aglutinação, e a divergência dos resultados entre estirpes da mesma espécie leva a relacioná-lo com o tipo imunológico da estirpe, conforme se pode apreender da leitura do Quadro 4.

Concretamente sabe-se que, nas espécies *B. anthracis* e *E. rhusiopathiae*, a imunidade cruzada entre as diferentes estirpes da mesma espécie é uma realidade, sendo por conseguinte espécie homogénea, sob o ponto de vista imunológico; facto idêntico se tem verificado em relação a estirpes de *S. cholerae suis*. A mesma uniformidade foi observada *in vitro* — crescimento em cadeia — sob a acção do soro específico, em elevado número das espécies bacterianas acima consideradas.

Notam-se, contudo, diferenças antigénicas, embora em pequena extensão, entre estirpes do mesmo tipo imunológico, à uniformidade deste não correspondendo portanto a de tipo sorológico, KAUFFMANN (1954), STERNE (1959), GLEDHILL (1959).

Sabe-se, por outro lado, que a mesma homogeneidade de tipo imunológico não se revela nas espécies *P. multocida*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *A. aerogenes*, *Ps. aeruginosa*, e, *in vitro*, constata-se também heterogeneidade de comportamento das estirpes destas espécies, sob a acção de soro tipo específico — Quadro 4.

As relações serológicas verificadas — aglutinação microscópica e macroscópica das culturas sob a acção do soro tipo específico duma estirpe da espécie — não traduzem identidade imunológica, mas sim existência de antigénios comuns nas diferentes estirpes da mesma espécie, e podem ser notadas entre estirpes de diferentes espécies pertencentes a um dado género ou a vários. Ocorria ainda divergência de comportamento de estirpes relacionadas imunologicamente. Assim as estirpes do mesmo tipo imunológico cresciam em cadeia em menores concentrações do respectivo anti-soro, que as estirpes relacionadas, sendo a variação da D. M. I. dependente do seu grau de relação imunológica.

O estudo subsequente realizado *in vitro* e *in vivo* com estirpes de *B. anthracis* e de *E. rhusiopathiae*, virulentas e atenuadas, e de *P. multocida* de diferentes tipos imunológicos, ROBERTS (1947), confirma a natureza imunológica do crescimento em cadeia sob a acção do soro tipo específico e mostra o seu valor na identificação do tipo imunológico das bactérias, *in vitro*.

3.2.1 — B. ANTHRACIS

3.2.1.1 — Estirpes virulentas

In vitro obteve-se a confirmação da homogeneidade de tipo imunológico das estirpes de *B. anthracis* — Quadro 4 — desde há muito verificada *in vivo* quer experimentalmente no laboratório quer a partir da infecção natural, principalmente através a imunoprofilaxia e imunoterapêutica. As variações da D. M. I. do mesmo soro específico notadas *in vitro* em relação às diferentes estirpes de *B. anthracis* ensaiadas, atingindo $3 \times$ com algumas estirpes, não eram por conseguinte significativas de diferença de tipo imunológico e filiavam-se possivelmente na natureza do crescimento das estirpes. Devem, deste modo, criar-se as melhores condições de desenvolvimento *in vitro* às estirpes, aproximando-as das *in vivo*, a fim de reduzir a variação da D. M. I., tornando, implicitamente, os resultados da identificação imunológica *in vitro* mais significativos.

3.2.1.2 — Estirpes atenuadas

Estirpes atenuadas de *B. anthracis* — 2.1.1.1 — foram estudadas *in vitro* e *in vivo* sob o ponto de vista imunológico. As características morfológicas e biológicas destas estirpes eram diferentes, correspondendo, por conseguinte, a diversos tipos de populações, seleccionadas nos diferentes ambientes utilizados, a partir de várias estirpes do mesmo tipo imunológico — *B. anthracis*. As suas estruturas antigénicas hão-de portanto diferir em relação às das estirpes tipo, e da extensão dessas divergências dependerá o seu valor imunizante e, consequentemente, a sua identificação como tipo imunológico *B. anthracis*.

respectivas estruturas antigénicas — MANUAL DE BERGEY (BREED *et al* — 1957).

Verifica-se, assim, que o desenvolvimento em cadeia sob a acção de soro tipo específico, *in vitro*, representa uma reacção imunológica mais específica do que a aglutinação, e a divergência dos resultados entre estirpes da mesma espécie leva a relacioná-lo com o tipo imunológico da estirpe, conforme se pode apreender da leitura do Quadro 4.

Concretamente sabe-se que, nas espécies *B. anthracis* e *E. rhusiopathiae*, a imunidade cruzada entre as diferentes estirpes da mesma espécie é uma realidade, sendo por conseguinte espécie homogénea, sob o ponto de vista imunológico; facto idêntico se tem verificado em relação a estirpes de *S. cholerae suis*. A mesma uniformidade foi observada *in vitro* — crescimento em cadeia — sob a acção do soro específico, em elevado número das espécies bacterianas acima consideradas.

Notam-se, contudo, diferenças antigénicas, embora em pequena extensão, entre estirpes do mesmo tipo imunológico, à uniformidade deste não correspondendo portanto a de tipo sorológico, KAUFFMANN (1954), STERNE (1959), GLEDHILL (1959).

Sabe-se, por outro lado, que a mesma homogeneidade de tipo imunológico não se revela nas espécies *P. multocida*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *A. aerogenes*, *Ps. aeruginosa*, e, *in vitro*, constata-se também heterogeneidade de comportamento das estirpes destas espécies, sob a acção de soro tipo específico — Quadro 4.

As relações serológicas verificadas — aglutinação microscópica e macroscópica das culturas sob a acção do soro tipo específico duma estirpe da espécie — não traduzem identidade imunológica, mas sim existência de antigénios comuns nas diferentes estirpes da mesma espécie, e podem ser notadas entre estirpes de diferentes espécies pertencentes a um dado género ou a vários. Ocorria ainda divergência de comportamento de estirpes relacionadas imunologicamente. Assim as estirpes do mesmo tipo imunológico cresciam em cadeia em menores concentrações do respectivo anti-soro, que as estirpes relacionadas, sendo a variação da D. M. I. dependente do seu grau de relação imunológica.

O estudo subsequente realizado *in vitro* e *in vivo* com estirpes de *B. anthracis* e de *E. rhusiopathiae*, virulentas e atenuadas, e de *P. multocida* de diferentes tipos imunológicos, ROBERTS (1947), confirma a natureza imunológica do crescimento em cadeia sob a acção do soro tipo específico e mostra o seu valor na identificação do tipo imunológico das bactérias, *in vitro*.

3.2.1 — B. ANTHRACIS

3.2.1.1 — Estirpes virulentas

In vitro obteve-se a confirmação da homogeneidade de tipo imunológico das estirpes de *B. anthracis* — Quadro 4 — desde há muito verificada *in vivo* quer experimentalmente no laboratório quer a partir da infecção natural, principalmente através a imunoprofilaxia e imunoterapêutica. As variações da D. M. I. do mesmo soro específico notadas *in vitro* em relação às diferentes estirpes de *B. anthracis* ensaiadas, atingindo $3 \times$ com algumas estirpes, não eram por conseguinte significativas de diferença de tipo imunológico e filiavam-se possivelmente na natureza do crescimento das estirpes. Devem, deste modo, criar-se as melhores condições de desenvolvimento *in vitro* às estirpes, aproximando-as das *in vivo*, a fim de reduzir a variação da D. M. I., tornando, implicitamente, os resultados da identificação imunológica *in vitro* mais significativos.

3.2.1.2 — Estirpes atenuadas

Estirpes atenuadas de *B. anthracis* — 2.1.1.1 — foram estudadas *in vitro* e *in vivo* sob o ponto de vista imunológico. As características morfológicas e biológicas destas estirpes eram diferentes, correspondendo, por conseguinte, a diversos tipos de populações, seleccionadas nos diferentes ambientes utilizados, a partir de várias estirpes do mesmo tipo imunológico — *B. anthracis*. As suas estruturas antigénicas hão-de portanto diferir em relação às das estirpes tipo, e da extensão dessas divergências dependerá o seu valor imunizante e, consequentemente, a sua identificação como tipo imunológico *B. anthracis*.

As estirpes atenuadas de *B. anthracis* foram desenvolvidas em meios líquidos com diferentes concentrações de anti-soros do carbúnculo hemático, de diferente poder imunizante. Do estudo realizado deduz-se que as estirpes atenuadas ensaiadas sofriam acção imunológica — aumento da extensão da cadeia — mantendo, por conseguinte, relação imunológica com a estirpe tipo original.

A extensão da cadeia, dependente da estirpe, variava com a concentração do soro no meio e seu valor imunizante. De maneira geral, a um maior poder imunizante do soro específico, correspondia, *in vitro*, mais intensa acção imunológica, verificando-se aumento da cadeia em menores concentrações de soro. Mas em relação a um mesmo soro o comportamento destas estirpes era diferente, isto é, a D. M. I. variava com a estirpe considerada, e nesta, com as condições de crescimento, sendo mais acentuada a variação inicialmente e nas situações menos favoráveis.

As estirpes que cresciam em cadeias mais extensas pareciam sofrer mais intensamente a acção imunológica, verificando-se em relação a elas que menores concentrações do soro específico actuavam ainda imunologicamente, como era o caso das estirpes II-LS e I-FD, em que era manifesta a divergência entre o tipo imunológico *in vitro* e *in vivo*, e o poder imunizante do soro *in vivo*.

Para melhor interpretação dos resultados da acção imunológica *in vitro* em relação a *in vivo*, torna-se necessário criar as condições óptimas de crescimento a cada estirpe, reduzindo-se assim a extensão da cadeia.

O Quadro 5 mostra os resultados obtidos num dos ensaios realizados e representa, na generalidade, o comportamento das estirpes atenuadas *in vitro*, sob a acção do soro específico *B. anthracis*, em relação à estirpe virulenta do mesmo tipo imunológico. O soro específico utilizado neste caso, obtido de equino hiperimunizado com a estirpe virulenta Ba 245, possuía elevado poder imunizante (4 coelhos protegidos — Método de SOBERNHEIM). Verifica-se que a acção imunológica — aumento significativo da extensão da cadeia — se exerce sobre todas as estirpes, durante aquele período, mas em concentrações diferentes do soro específico.

QUADRO 5
ESTIRPES ATENUADAS DE *B. ANTHRACIS*

Relação imunológica

Estirpes ⁽¹⁾ de <i>B. anthracis</i>	IN VITRO					IN VIVO
	Soro específico «B. anthracis 245» dilução					Soro-protecção ⁽²⁾ ratinho
	1/10	1/50	1/100	1/500	1/1000	
I — LNIV	+	+	—	—	—	+
IH — LNIV	+	+	—	—	—	+
I — Sterne	+	+	+	+	—	+
I — IPP	+	+	+	—	—	+
I — FD	+	+	+	—	—	—
II — IPP	+	+	+	+	—	+
II — ISM	+	+	+	—	—	+
II — LS	+	+	+	—	—	—
II — Lederle	+	+	+	—	—	+
III — Lederle	+	+	+	+	—	+
245	+	+	+	+	—	—

+ = acção imunológica, *in vitro*; protecção 70 %, *in vivo*.

— = reacção negativa, *in vitro*; protecção < 30 %, *in vivo*.

(¹) Culturas de 16 horas; concentração 10⁻²

(²) Soro «B. anthracis 245»

Observação — 12 horas, *in vitro*; 7.º dia, *in vivo*.

Assim, é bastante acentuada a diferença do comportamento das estirpes atenuadas I e IH-LNIV em relação à estirpe virulenta 245; o soro exerce sobre aquelas duas estirpes acção imunológica em concentrações mais elevadas, cerca de 10 ×. O comportamento das restantes estirpes atenuadas em relação à estirpe virulenta não varia tão significativamente,

devendo representar uma mais íntima conexão imunológica. Deduz-se, contudo, dos ensaios *in vivo* a seguir analisados, que em relação às estirpes cujo crescimento normal *in vivo* se processa em cadeia, nem sempre é fácil determinar o tipo imunológico.

Verificava-se ainda que a D. M. I., determinada na fase final de crescimento, era, em geral, superior cerca de $10 \times$ à D. M. I. determinada na fase logaritmica.

Soros específicos absorvidos por culturas desvitalizadas das diferentes estirpes atenuadas perdiam grande parte da sua acção imunológica. A absorção era menos acentuada nos soros obtidos por hiperimunização com culturas vivas e variava com a estirpe. A absorção destes soros com culturas vivas, apesar de mais intensa, em geral, não era total, e variava também com a estirpe.

Estes soros absorvidos exerciam ainda acção imunológica, embora de curta duração. A maior divergência nestes estudos de absorção era notada entre as estirpes I e IH-LNIV e as restantes.

Certos soros específicos, principalmente de reduzido valor imunizante, pareciam exercer acção favorável no crescimento de algumas estirpes durante a fase inicial.

3.2.1.2.2 — *In vivo*

O valor imunizante das estirpes atenuadas de *B. anthracis* ensaiadas *in vitro* — QUADRO 5 — foi apreciado *in vivo* em diferentes espécies animais. As estirpes I e IH-LNIV, I-FD e I-Sterne, foram estudadas no cobaia, coelho e ovino; as estirpes II-IPP, II e III-Lederle, II-LS e II-ISM, apenas em animais das duas últimas espécies indicadas.

A fim de tornar mais significativos os resultados destas experiências em relação às obtidas *in vitro*, estas estirpes foram ensaiadas sob a forma de produtos com idêntica preparação vacinal — 2.5.1.2.1 — nas mesmas doses e segundo via de inoculação similar; a contraprova foi feita, após período análogo de imunização, com as mesmas estirpes e doses mortais, e por idêntica via — 2.5.1.2.2.

O Quadro 6 mostra o comportamento das referidas estirpes *in vivo*, quanto ao seu poder imunizante para o cobaia, coelho e ovino, em relação às estirpes de contraprova II-LS, II-IPP, III-Lederle e 245, sendo os resultados referidos, para facilitar a interpretação de conjunto, à protecção 50 %. Verificam-se divergências acentuadas do valor imunizante das estirpes ensaiadas.

As estirpes I-Sterne, I e II-IPP, II-ISM e II e III-Lederle imunizam contra a estirpe virulenta 245, traduzindo desta maneira identidade de tipo imunológico *B. anthracis*. Pela mesma razão, as estirpes I-Sterne e I-IPP imunizam o cobaia contra as estirpes II-IPP e II-Lederle, do mesmo tipo imunológico. Pelo contrário, o deficiente grau de imunidade conferido pelas estirpes e IH-LNIV, I-FD e II-LS não deverá atribuir-se à preparação vacinal, nem a número insuficiente de esporos, uma vez que as estirpes foram ensaiadas nas mesmas condições e o número de esporos é suficientemente elevado, mas antes a divergência de tipo imunológico.

Ensaio effectuados em cobaias e coelhos com número mais elevado de esporos, deram resultados idênticos, isto é, evidenciaram mais uma vez o deficiente poder imunizante destas estirpes em relação ao tipo *B. anthracis*.

Por sua vez, as estirpes I-Sterne e I-IPP, não imunizando o cobaia contra a estirpe II-LS, confirmam a diferença de tipo imunológico.

Divergem também imunologicamente, como se pode verificar, as estirpes I e IH-LNIV e I-FD, em relação à estirpe II-LS. Por outro lado, não se observa variação acentuada no valor imunizante das estirpes em relação às espécies animais utilizadas no ensaios.

O comportamento imunológico destas estirpes foi também estudado *in vivo* por soro-protecção no ratinho — 2.6.1.2 — sendo os resultados expressos no Quadro 5 paralelamente com os obtidos *in vitro* em relação ao mesmo anti-soro.

Este não protegia o ratinho contra as estirpes I-FD e II-LS, estando os resultados de acordo com os obtidos pela imunização activa — Quadro 6; notava-se ainda, com estas duas estirpes, morte antecipada dos ratinhos soro-imunizados em comparação às testemunhas.

QUADRO 6

ESTIRPES ATENUADAS DE *B. ANTHRACIS*

Relação imunológica

Estirpes vacinais	COBAIA				COELHO	OVINO
	Estirpes de contraprova					
	II-IPP	II-LS	III-Lederle	Ba 245	Ba 245	Ba 245
I — LNIV	—	—	—	—	—	—
IH — LNIV	—	—	—	—	—	—
I — Sterne	+	—	+	+	+	+
I — IPP	+	—	+	+	+	+
I — FD	—	—	—	—	—	—
II — IPP	----	----	----	----	+	+
II — ISM	----	----	----	----	+	+
II — LS	----	----	----	----	—	—
II — Lederle	----	----	----	----	+	+
III — Lederle	----	----	----	----	+	+

+ = protecção 50 %

— = protecção < 50 %

---- = não realizável — estirpe virulenta para o cobaia.

Não concordavam, contudo, os resultados da soro-protecção em relação à imunização activa, quanto às estirpes I e IH - LNIV, ou seja, identidade de tipo imunológico pelo soro-protecção e divergência pelo deficiente grau de imunidade activa conferida. Esta discordância de comportamento, embora não seja de excluir a influência da espécie animal — diferente nos diversos ensaios realizados — poderia resultar da fraca

agressividade das referidas estirpes que se traduzia em letalidade irregular para o ratinho, verificando-se protecção com o anti-soro de tipo diferente, mas de acentuada relação imunológica.

O mesmo se não observava com a imunização activa, possivelmente porque as estirpes de contraprova, de maior agressividade, venciam a imunidade criada pelas estirpes relacionadas imunologicamente, embora de diferentes tipos. Contudo, o soro utilizado nestes ensaios, embora de elevado poder imunizante para o coelho, não protegia os ratinhos contra a estirpe virulenta 245, mas a morte destes verificava-se em geral depois da das testemunhas. Nos esfregaços dos baços dos ratinhos soro-imunizados verificava-se elevado número de bacilos, mas normalmente em pequenas cadeias de três elementos.

Em geral não se observa o edema gelatinoso no local de inoculação. A divergência verificada no valor imunizante do mesmo anti-soro em relação ao coelho e ratinho, poderá atribuir-se à elevada sensibilidade deste último à toxina do *B. anthracis* — BEALL *et al* (1962) KLEIN *et al* (1963) — e é variável com a estirpe e anti-soro.

A administração de doses mais elevadas de soro ou a aplicação repetida de doses análogas às iniciais, nos dias seguintes à inoculação da D. S. M. das estirpes de *B. anthracis*, não alteravam, umas ou outras, os resultados da experimentação, o mesmo se verificando quando se recorria à mistura soro/D. S. M. Neste último caso, o soro utilizado era isento de conservador.

Nos estudos de imunidade cruzada, imunização activa ou passiva, nota-se às vezes um fenómeno paradoxal que implica, em vez de resistência, uma acção favorável dos anticorpos. Este facto verifica-se apenas dentro de certo grau de relação imunológica de estirpes de diferentes tipos, e até do mesmo tipo, com vacinas ou soros de deficiente poder imunizante. Nestes casos a morte dos imunizados é antecipada, embora ligeiramente, em comparação à das testemunhas. Este fenómeno é mais acentuado em relação com a dose mínima mortal (D. M. M.), verificando-se nestes casos, por vezes, maior letalidade no grupo imunizado que no grupo testemunha.

In vitro nota-se ocorrência similar, principalmente com estirpes que normalmente crescem em cadeia, e em condições de cultura menos favo-

ráveis. Nestas circunstâncias pode verificar-se a acção favorável dos anticorpos, principalmente em relação à primeira fase de desenvolvimento.

Pensa-se que tal acção benéfica tanto *in vivo* como *in vitro*, resulta da ligeira alteração de permeabilidade da célula bacteriana consequente da reacção antigénio-anticorpo operada em certa extensão da sua superfície e dando lugar a mais fáceis trocas nutritivas no início do crescimento.

Daqui decorrerá a par de mais rápido desenvolvimento da estirpe, a morte antecipada em relação ao grupo testemunha, *in vivo*, e crescimento mais precoce quando comparado ao das outras culturas *in vitro*. Fenómeno idêntico, *in vivo*, foi observado em relação às estirpes I-FD e II-LS, na imunização activa e passiva.

Do estudo realizado *in vivo*, poderá concluir-se que, embora relacionadas imunologicamente, as estirpes de *B. anthracis* atenuadas constituem na realidade tipos imunológicos diferentes, independentes da virulência. Quanto às estirpes I e IH-LNIV, o seu deficiente poder imunizante em relação ao tipo imunológico *B. anthracis*, pode ter resultado do processo de conservação — passagens semanais em agar inclinado, durante vários anos.

Assim se teria obtido novo tipo imunológico por selecção de diferentes populações naquele meio cultural *in vitro*.

Confrontando agora os resultados *in vitro* e *in vivo* — Quadros 5 e 6 — pode discriminar-se que, de maneira geral, o crescimento em cadeia tem nestas estirpes aumento manifesto, representativo, na realidade, de uma acção tipo imunológico. O comportamento *in vivo* e *in vitro* das estirpes I-Sterne, I e II-IPP, II e III-Lederle e II-ISM, é bastante semelhante, traduzindo idêntico tipo imunológico; as diferenças verificadas são pouco significativas dado o seu crescimento normal em cadeia. As estirpes I e IH-LNIV, que *in vivo* conferem deficiente grau de imunidade em relação à estirpe virulenta de *B. anthracis* 245, afastando-se por isso deste tipo imunológico, embora na soro-protecção se comportem como do mesmo tipo, pelas possíveis razões apontadas, também *in vitro* se distanciam do referido tipo, sofrendo apenas acção imunológica em maiores concentrações do anti-soro, variação das D. M. I. cerca de $10 \times$.

Divergem também os resultados *in vitro* e *in vivo* quando se trata das estirpes I-FD e II-LS. Estas, *in vivo*, agem como tipos imunológicos

diferentes em relação ao *B. anthracis*; *in vitro* o comportamento é mais semelhante a este último tipo, isto é, sofrem acção imunológica — aumento significativo da extensão da cadeia — em concentrações mais aproximadas do soro específico.

Esta divergência de comportamento *in vitro* e *in vivo*, parece resultar do normal crescimento em cadeia *in vitro*, e só com este tipo de estirpes foi verificado. Apesar de se ter procurado melhorar as suas condições de desenvolvimento, estas estirpes mostravam ainda cadeias extensas nas culturas. Contudo, *in vivo*, no exame directo do sangue de ratinhos vitimados por estas estirpes, observa-se que a extensão das cadeias se tinha reduzido de forma a contarem apenas 2 a 3 elementos isolados.

A cadeia *in vitro* traduzia na verdade a dificuldade de crescimento nas condições mais precárias, permitindo tal deficiência que a acção dos anticorpos venha a fazer-se sentir numa extensão menor da superfície bacteriana, donde a actividade imunológica *in vitro*.

À medida que melhoram as condições de desenvolvimento, maior extensão da superfície bacteriana deverá ser atingida pelos anticorpos e acção imunológica decorrerá, correspondendo o tipo imunológico à máxima reacção antigénio-anticorpo na superfície bacteriana das populações no ambiente em que se processa o crescimento.

In vitro verifica-se também fenómeno idêntico em relação às fases de crescimento. A acção imunológica resulta da reacção antigénio-anticorpo numa menor extensão da superfície bacteriana, sendo menos acentuadas as divergências das estirpes imunologicamente relacionadas, mas de tipos diferentes. Na fase logarítmica, em que o crescimento se processa a ritmo mais rápido, a acção imunológica deriva duma maior extensão da reacção antigénio-anticorpo na superfície bacteriana, diferenciando-se nesta fase os tipos imunológicos de populações mais semelhantes antigenicamente.

Mais ainda, as populações bacterianas variam antigenicamente em relação ao ambiente em que se processa o crescimento e uma maior ou menor variação, dependente da estirpe, originará diferença de comportamento imunológico. Assim se poderá interpretar a dissemelhante situação das estirpes I-FD e II-LS, *in vivo* e *in vitro*, isto é, em ambientes dispares.

Nos anti-soros «I-FD» e «II-LS» são mais nítidas as divergências imunológicas entre estas estirpes e as do tipo *B. anthracis*, *in vitro*, sendo por conseguinte mais significativas de diferença de tipo imunológico.

Em relação às estirpes de *B. anthracis*, com crescimento normal em cadeia *in vitro*, a variação entre as concentrações mínimas do soro específico que sobre elas exercem acção imunológica, só poderá ser representativa de diferença de tipo imunológico, quando bastante acentuada, ao contrário do que ocorre com a *P. multocida* em que a variação da D. M. I., $2 \times$, pode evidenciar já um diferente tipo imunológico. Com estirpes que crescem normalmente em cadeia *in vitro*, mais se justifica a interpretação dos resultados através de métodos estatísticos de análise, susceptíveis de realçar as diferenças de valor encontradas.

3.2.2 — *E. RHUSIOPATHIAE*

3.2.2.1 — Estirpes virulentas

Confirmava-se também *in vitro* a homogeneidade de tipo imunológico das estirpes de *E. rhusiopathiae* — Quadro 4 — desde há muito verificada *in vivo*, quer experimentalmente no laboratório, quer a partir de infecção natural, principalmente através a imunoprofilaxia e imunoterapêutica. As variações da D. M. I. do mesmo soro específico, verificadas *in vitro* em relação às diferentes estirpes de *E. rhusiopathiae*, eram pouco acentuadas, inferiores a $2 \times$, não sendo por conseguinte significativas de diferença de tipo imunológico.

3.2.2.2 — Estirpes atenuadas

As estirpes atenuadas de *E. rhusiopathiae* — 2.1.4.1 — foram estudadas *in vitro* e *in vivo* sob o ponto de vista imunológico. Todas elas divergiam entre si por características morfológicas e biológicas. Da variação das estruturas antigénicas das populações respectivas dependerá o tipo imunológico.

3.2.2.2.1 — *In vitro*

Estas estirpes atenuadas desenvolviam em cadeia nos meios líquidos sob a acção de anti-soros tipo *E. rhusiopathiae*, mantendo por conseguinte relação imunológica com estirpes do mesmo tipo do das originais.

O crescimento em cadeia e a extensão desta, dependentes da estirpe, variavam com a concentração do soro específico no meio e seu poder imunizante. De maneira geral, a um maior valor imunizante do soro correspondia, *in vitro*, mais acentuada acção imunológica, verificando-se a cadeia em menores concentrações daquele. Mas em relação a um mesmo anti-soro, a D. M. I. variava com a estirpe. A D. M. I., em relação à fase final de crescimento, era, na generalidade, bastante superior, cerca de $10 \times$, à D. M. I. determinada na fase logarítmica, de pleno desenvolvimento.

Em geral, as culturas de *E. rhusiopathiae* em meios líquidos adicionados de soro normal de equino, concentração 10^{-1} ou superior, mostravam aspecto ligeiramente aglutinado, formas bacilares maiores e cadeias pequenas; em concentrações inferiores a 10^{-1} o aspecto das culturas é praticamente normal.

O Quadro 7, com o registo dos resultados obtidos em um dos ensaios realizados, mostra, no seu conjunto, o comportamento das estirpes ensaiadas *in vitro* sob a acção do soro específico *E. rhusiopathiae*, em relação à estirpe virulenta do mesmo tipo imunológico.

O soro específico utilizado nestes ensaios, obtido de equino hiperimunizado com a estirpe virulenta 484, possuía elevado poder imunizante (protecção 0,01 cc. — método de Marx). As estirpes atenuadas e a virulenta 484 cresciam em diferentes concentrações do soro específico.

Verifica-se comportamento idêntico das estirpes Staub 55, Connaught e Staub 50 P em relação à estirpe virulenta 484; a estirpe Staub sofre ainda acção imunológica na concentração de soro imediatamente inferior, $2 \times$ menor, e a Staub 100 P apenas em concentração superior, cerca de $10 \times$, em relação à virulenta.

A diferença de comportamento da estirpe Staub é pouco significativa, dada a natureza do seu crescimento *in vitro*, mais lento, sob a forma de bacilos maiores, por vezes filamentosos e em pequenas cadeias.

Pelo contrário, a divergência acentuada de comportamento da estirpe Staub 100 P, em relação à estirpe virulenta 484 no mesmo anti-soro *E. rhusiopathiae*, é bastante representativa da diferença de tipo imunológico.

QUADRO 7

ESTIRPES ATENUADAS DE *E. RHUSIOPATHIAE*

Relação imunológica

Estirpes (¹) de <i>E. rhusiopathiae</i>	IN VITRO					IN VIVO
	Soro específico « <i>E. rhusiopathiae</i> 484» (diluuição)					Poder imuni- zante (²) (ratinho)
	1/10	1/50	1/100	1/500	1/1000	
Staub	+	+	+	+	+	+
Staub 55	+	+	+	+	—	+
Staub 50 P	+	+	+	+	—	+
Staub 100 P	+	+	—	—	—	—
Connaught	+	+	+	+	—	+
484	+	+	+	+	—	— — —

+ = Acção imunológica, *in vitro*; protecção > 70 %, *in vivo*.

— = Reacção negativa, *in vitro*; protecção < 30 %, *in vivo*.

— — — = Prova não realizada.

(¹) Culturas de 16 horas; concentração inicial 10⁻², *in vitro*.

(²) 2.5.1.1.1.; contraprova com a estirpe virulenta 484.

Observação: — 10 horas, *in vitro*; 9.º dia, *in vivo*.

O Quadro 8 assinala como se comportavam as mesmas estirpes em relação ao soro específico preparado em coelhos com a estirpe Staub 100 P. Neste caso, eram as estirpes Staub, Staub 55, Staub 50 P, Connaught e a virulenta 484 que sofriam acção imunológica em concentrações superiores cerca de 10 × em comparação à estirpe Staub 100 P.

Confirma-se assim *in vitro* a diferença imunológica da estirpe Staub 100 P. As estirpes Staub, Staub 55, Staub 50 P e Connaught, comportando-se *in vitro* de maneira semelhante à estirpe virulenta 484 nos soros específicos *E. rhusiopathiae* e Staub 100 P, identificam-se com o tipo imunológico *E. rhusiopathiae*; a estirpe Staub 100 P, embora aparentada imunologicamente com a estirpe original, manifesta-se *in vitro* como um novo tipo — Quadros 7 e 8.

Os resultados obtidos *in vitro* com soros específicos «*E. rhusiopathiae*» e «Staub 100 P» absorvidos — absorção cruzada — confirmam a identidade imunológica das estirpes Staub, Staub 55, Staub 50 P, e Connaught em relação à virulenta 484, e a divergência de tipo da estirpe Staub 100 P.

De facto, verifica-se que soros específicos «*E. rhusiopathiae*», absorvidos por culturas da estirpa Staub 100 P, exerciam ainda acentuada acção imunológica *in vitro* sobre as outras estirpes; por sua vez, soros específicos «Staub 100 P», absorvidos por culturas daquelas estirpes, exerciam também manifesta acção imunológica sobre a estirpe Staub 100 P.

QUADRO 8

ESTIRPES ATENUADAS DE *E. RHUSIOPATHIAE*

Relação imunológica

Estirpes ⁽¹⁾ de <i>E. rhusiopathiae</i>	IN VITRO					IN VIVO
	Soro específico «Staub 100 P» (diluição)					Soro-protec- ção ⁽²⁾ «Staub 100 P» (ratinho)
	1/10	1/50	1/100	1/500	1/1000	
Staub	+	—	—	—	—	— — —
Staub 55	±	—	—	—	—	— — —
Staub 50 P	+	—	—	—	—	— — —
Staub 100 P	+	+	+	—	—	— — —
Connaught	±	—	—	—	—	— — —
484	±	—	—	—	—	—

+ = Acção imunológica, *in vitro*.

± = Acção imunológica de pequena intensidade, *in vitro*.

— = Reacção negativa, *in vitro*, protecção < 50 %, *in vivo*.

— — — = Não realizável — estirpes avirulentas para o ratinho.

(1) Culturas de 16 horas; concentração inicial 10^{-2} , *in vitro*.

(2) 2.6.2.2

Observação: — 10 horas, *in vitro*.

Soros específicos «*E. rhusiopathiae*», obtidos de animais de diferentes espécies — equinos, coelhos e cobaias — hiperimunizados com culturas vivas, e absorvidos com culturas desvitalizadas do mesmo tipo, exerciam ainda *in vitro*, nas maiores concentrações, ligeira acção imunológica. A absorção não era por conseguinte total, dependendo da origem do anti-soro e da estirpe, sendo mais acentuada com culturas vivas. Este facto traduz, possivelmente, diversidade antigénica das diferentes populações das estirpes em relação aos ambientes em que se processa o crescimento.

3.2.2.2.2 — *In vivo*

O valor imunizante das estirpes atenuadas de *E. rhusiopathiae* foi estudado *in vivo*, no ratinho, de harmonia com as indicações de Staub (1940).

O Quadro 7 apresenta também, para melhor confronto, os resultados obtidos *in vivo*, num dos ensaios realizados simultaneamente com as mesmas estirpes. Na contraprova foi utilizada igualmente a estirpe virulenta 484. As estirpes Staub, Staub 55, Staub 50 P e Connaught protegem o ratinho nas condições referidas, identificando-se com o tipo imunológico «*E. rhusiopathiae*»; a estirpe Staub 100 P, não protegendo o ratinho nas mesmas circunstâncias, comporta-se como um tipo diferente.

Dada a avirulência das estirpes, não foi possível proceder à identificação do tipo imunológico por soro-protecção. Contudo, verificou-se que o soro específico «Staub 100 P» empregado nos ensaios *in vitro* — Quadro 8 — não protegia o ratinho contra a estirpe virulenta 484. Observava-se, portanto, concordância dos resultados da acção imunológica *in vitro* — crescimento em cadeia — e dos do poder imunizante, *in vivo*, na identificação do tipo imunológico das estirpes atenuadas de *E. rhusiopathiae*.

A ligeira divergência de comportamento da estirpe Staub em relação à estirpe virulenta 484 — variação da D. M. I. cerca de $2 \times$ — resulta, possivelmente, como se disse, da natureza do seu crescimento, mais lento, sob a forma de bacilos maiores e em pequenas cadeias. Nos meios sólidos — agar em place — este tipo de crescimento traduz-se por colónias ligeiramente rugosas.

No que concerne às estirpes atenuadas de *E. rhusiopathiae* o tipo imunológico é também independente da virulência.

3.2.3 — *P. MULTOCIDA*

As estirpes de *P. multocida* divergem sob o ponto de vista imunológico, tendo ROBERTS (1947) identificado, nas estirpes estudadas, 4 tipos, que denominou I - II - III - IV, apontando ainda, nessa altura, a existência de outros a classificar oportunamente.

Mais tarde HUDSON (1954), prosseguindo os ensaios de identificação imunológica das estirpes de *P. multocida*, constatou, a par da existência dos tipos de ROBERTS, a presença de um novo tipo — o V. Por sua vez, AFONSO *et al* (1964 a) identificam mais um — o tipo VI — além de terem verificado a existência de tipos já conhecidos, e ainda a de outros a cuja identificação se procederá.

Esta heterogeneidade imunológica das estirpes de *P. multocida* observava-se também *in vitro* — Quadro 4 — e os ensaios realizados, *in vitro* e *in vivo*, com estirpes de tipos já identificados, a seguir analisados, permitem relacionar o crescimento em cadeia sob a acção do soro tipo específico com o tipo imunológico da estirpe.

3.2.3.1 — *In vitro*

O Quadro 9 confirma *in vitro* a relação imunológica verificada *in vivo* entre estirpes de *P. multocida* dos tipos II e IV, ROBERTS (1947), AFONSO *et al* (1964 a) e entre estirpes dos tipos I e VI, AFONSO *et al* (1964 a, b). As estirpes do mesmo tipo imunológico crescem em cadeia em menores concentrações do respectivo anti-soro que as estirpes de tipo relacionado, e a variação da D. M. I. depende do seu grau de relação imunológica — Quadros 10 e 11. Normalmente, verificava-se ainda aglutinação da estirpe relacionada, sob a acção da DMI da estirpe tipo.

A relação imunológica entre estirpes dos tipos I (P_{29} e S_1) e VI (S_4 e B_1) era pouco acentuada — variação da DMI cerca de $8 \times$ — Quadro 10 — sendo fácil a sua classificação *in vitro*. Pelo contrário, a relação imunológica entre estirpes dos tipos II (P_{229} e A_4) e IV (P_{12} e 739) — variação da DMI cerca de $2 \times$ — Quadro 11 — era de tal maneira

acentuada que nem sempre era fácil a sua identificação. A variação da DMI em relação a estirpes do mesmo tipo imunológico era normalmente inferior a $2 \times$ — Quadros 10 e 11.

3.2.3.2 — *In vivo*

Os resultados dos ensaios realizados em ratinho — soro protecção cruzada — com as mesmas estirpes e anti-soros — Quadros 12 e 13 — mostram-se intimamente relacionados com os obtidos *in vitro* acima referidos — Quadros 10 e 11 — confirmando assim a natureza imunológica do crescimento em cadeia sob a acção do soro tipo específico.

QUADRO 9

ESTIRPES DE *P. MULTOCIDA* — TIPOS I, II, III, IV, V e VI

Relação imunológica
in vitro

Estirpes de <i>P. multocida</i>	SOROS ESPECÍFICOS					
	Tipos					
	I (P ₂₉)	II (229)	III (P ₈)	IV (P ₁₂)	V (P ₁)	VI B ₁)
P ₂₉ Tipo I	+	—	—	—	—	±
229 Tipo II	—	+	—	±	—	—
P ₈ Tipo III	—	—	+	—	—	—
P ₁₂ Tipo IV	—	±	—	+	—	—
P ₁ Tipo V	—	—	—	—	+	—
B ₁ Tipo VI	±	—	—	—	—	+

+ = Tipo imunológico

± = Relação imunológica

— = Sem relação imunológica

QUADRO 10

ESTIRPES DE *P. MULTOCIDA* — TIPOS I e VI

Relação imunológica
in vitro

Estirpes (¹) de <i>P. multocida</i>	DILUIÇÃO DO SORO	SOROS ESPECÍFICOS Tipos			
		I		VI	
		P ₂₉	S ₁	S ₄	B ₁
P ₂₉ Tipo I	1/10	+	+	+	+
	1/20	+	+	—	+
	1/40	+	+	—	—
	1/80	+	+	—	—
	1/160	+	—	—	—
S ₁ Tipo I	1/10	+	+	+	+
	1/20	+	+	—	+
	1/40	+	+	—	—
	1/80	+	+	—	—
	1/160	+	—	—	—
S ₄ Tipo VI	1/10	+	+	+	+
	1/20	+	—	+	+
	1/40	—	—	+	+
	1/80	—	—	+	+
	1/160	—	—	—	+
B ₁ Tipo VI	1/10	+	+	+	+
	1/20	+	—	+	+
	1/40	—	—	+	+
	1/80	—	—	+	+
	1/160	—	—	—	+

+ = Acção imunológica;

— = reacção negativa

(¹) Cultura de 16 horas;

concentração inicial 10⁻²

Observação — 8 horas

QUADRO II

ESTIRPES DE *P. MULTOCIDA* — TIPOS II e IV

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>P. multocida</i>	DILUIÇÃO DO SORO	SOROS ESPECÍFICOS Tipos			
		II		IV	
		229	A ₄	P ₁₂	739
229 Tipo II	1/10	+	+	+	+
	1/20	+	+	+	+
	1/40	+	+	+	+
	1/80	+	+	+	—
	1/160	+	—	—	—
A ₄ Tipo II	1/10	+	+	+	+
	1/20	+	+	+	+
	1/40	+	+	+	+
	1/80	+	+	+	—
	1/160	+	—	—	—
P ₁₂ Tipo IV	1/10	+	+	+	+
	1/20	+	+	+	+
	1/40	+	+	+	+
	1/80	+	—	+	+
	1/160	—	—	+	—
739 Tipo IV	1/10	+	+	+	+
	1/20	+	+	+	+
	1/40	+	+	+	+
	1/80	+	—	+	+
	1/160	—	—	+	—

+ = Acção imunológica;

— = reacção negativa

(¹) Cultura de 16 horas;

concentração inicial 10⁻²

Observação — 8 horas

Na realidade, a relação imunológica entre as estirpes dos tipos I (P_{29} e S_1) e VI (S_4 e B_1) é menos acentuada — variação da D. M. M. da estirpe na soro-protecção $\pm 10\,000 \times$ — Quadro 12 — que a verificada entre estirpes dos tipos II (P_{229} e A_4) e IV (P_{12} e 739) — variação da D. M. M. da estirpe na soro-protecção $\pm 10 \times$ — Quadro 13 — dependente da virulência das estirpes. A variação da D. M. M. de estirpes do mesmo tipo imunológico era normalmente inferior a $10 \times$. Constatava-se também *in vivo* maior dificuldade na identificação das estirpes dos tipos II e IV, dada a sua acentuada relação imunológica.

A relação imunológica verificada por soro-protecção obtinha confirmação no ratinho por imunização activa — imunidade cruzada.

Elevado número de ensaios efectuados, *in vitro* e *in vivo*, com anti-soros de diferente poder imunizante, confirmavam a natureza imunológica do crescimento em cadeia, e, por conseguinte, o seu valor na classificação de estirpes e na apreciação de soros específicos *in vitro*. Assim, a identidade imunológica de estirpes de *P. multocida* correspondia *in vitro* comportamento semelhante sob a acção dos respectivos anti-soros — variação da D. M. I. inferior a $2 \times$ — nas mesmas condições.

Com estirpes de *P. multocida*, a variação da D. M. I. $\pm 2 \times$ parece ser já significativa de diferença de tipo imunológico.

O grau de relação imunológica das estirpes verifica-se *in vitro* pela variação da D. M. I. em função da estirpe tipo, e varia na razão inversa com a D. M. I. Nem sempre será fácil identificar imunologicamente, *in vitro* e *in vivo*, estirpes de tipos bastante relacionados, como sejam os tipos II e IV; nestes casos, os métodos de análise estatística a utilizar darão mais significado à identificação.

De maneira geral, com soros de menor valor imunizante — protecção do ratinho contra 100 a 1000 D. M. M. da estirpe tipo — obtidos após rápida hiperimunização, a identificação imunológica das estirpes bastante relacionados, tipos II e IV, tornava-se mais fácil *in vitro* e *in vivo*.

Foram também realizados ensaios, *in vitro* e *in vivo*, com anti-soros absorvidos — absorção cruzada — e os resultados confirmavam a relação imunológica verificada entre as estirpes dos tipos I (P_{29} e S_1) e VI (S_4 e B_1), II (P_{229} e A_4) e IV (P_{12} e 739).

QUADRO. 12

ESTIRPES DE *P. MULTOCIDA* — TIPOS I e VI

Relação imunológica

In vivo

<i>P. multocida</i> Estirpes de contraprova	Diluição da cultura	SORO — IMUNIZADOS				Testemu- nhas
		Tipos				
		I		VI		
		P ₂₉	S ₁	S ₄	B ₁	
P ₂₉ Tipo I	10 ⁻³	0/6	4/6	6/6	6/6	—
	10 ⁻⁴	0/6	2/6	6/6	6/6	—
	10 ⁻⁵	0/6	0/6	6/6	5/6	6/6
	10 ⁻⁷	0/6	0/6	3/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁸	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
S ₁ Tipo I	10 ⁻³	2/6	5/6	6/6	6/6	—
	10 ⁻⁴	0/6	2/6	6/6	6/6	—
	10 ⁻⁵	0/6	0/6	5/6	6/6	6/6
	10 ⁻⁷	0/6	0/6	2/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁸	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
S ₄ Tipo VI	10 ⁻³	6/6	6/6	5/6	1/6	—
	10 ⁻⁴	6/6	6/6	3/6	0/6	—
	10 ⁻⁵	6/6	6/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁷	0/6	3/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁸	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
B ₁ Tipo VI	10 ⁻³	6/6	6/6	6/6	2/6	—
	10 ⁻⁴	6/6	6/6	2/6	0/6	—
	10 ⁻⁵	6/6	6/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁷	0/6	4/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁸	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6

Numerador = número de ratinhos mortos.

Denominador = número de ratinhos contraprovados.

— = não realizada.

QUADRO 13

ESTIRPES DE *P. MULTOCIDA* — TIPOS II e IV

Relação imunológica

In vivo

<i>P. multocida</i> Estirpes de contraprova	Diluição da cultura	SORO — IMUNIZADOS				Testemu- nhas
		Tipos				
		II		IV		
		229	A ⁴	P ₁₂	739	
229 Tipo II	10 ⁻³	3/6	6/6	6/6	6/6	—
	10 ⁻⁴	0/6	3/6	4/6	5/6	—
	10 ⁻⁵	0/6	0/6	0/6	3/6	6/6
	10 ⁻⁷	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁸	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
A ₄ Tipo II	10 ⁻³	2/6	5/6	6/6	6/6	—
	10 ⁻⁴	1/6	2/6	5/6	6/6	—
	10 ⁻⁵	0/6	0/6	0/6	4/6	6/6
	10 ⁻⁷	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁸	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
P ₁₂ Tipo IV	10 ⁻³	6/6	6/6	2/6	5/6	—
	10 ⁻⁴	5/6	6/6	1/6	4/6	—
	10 ⁻⁵	1/6	4/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁷	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁸	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
739 Tipo IV	10 ⁻³	5/6	6/6	2/6	3/6	—
	10 ⁻⁴	2/6	4/6	0/6	1/6	—
	10 ⁻⁵	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
	10 ⁻⁷	0/6	0/6	0/6	0/6	4/6
	10 ⁻⁸	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Numerador = número de ratinhos mortos.

Denominador = número de ratinhos contraprova.

— = não realizada.

A acção imunológica, *in vitro*, e o valor imunizante, *in vivo*, dos soros absorvidos, variavam na razão inversa do grau de relação das estirpes de absorção, e esta era menos acentuada nos anti-soros obtidos após hiperimunização com culturas vivas. As suspensões desvitalizadas não absorviam totalmente os anticorpos desses anti-soros, ainda que do mesmo tipo, e em crescimento podiam verificar-se, inicialmente, pequenas cadeias e aglutinação das culturas.

O valor dos anti-soros em D. M. I., *in vitro* variava na razão directa com o seu poder imunizante, *in vivo* — Quadros, 10, 11, 12 e 13.

De facto, os anti-soros dos tipos I (estirpe P₂₉), II (estirpe 229), IV (estirpe P₁₂) e VI (estirpe B₁) protegiam o ratinho contra, pelo menos, 100 000 D. M. M. da estirpe tipo e *in vitro* a D. M. I. correspondia, nas condições de ensaio, à diluição 1/160; por outro lado, nos anti-soros dos tipos I (estirpe S₁), II (estirpe A₄), IV (estirpe 739) e VI (estirpe S₄) que, nas mesmas condições, protegiam o ratinho contra, pelo menos, 10 000 D. M. M., *in vitro* a D. M. I. correspondia à diluição aproximada de 1/80. A mesma relação não se verificava quanto à aglutinação, e soros sem valor imunizante, *in vivo*, e sem acção imunológica, *in vitro*, ainda aglutinavam as culturas, mesmo a elevadas diluições.

A íntima relação verificada entre acção imunológica dos anti-soros, *in vitro*, e o respectivo poder imunizante, *in vivo*, permitirá também a apreciação destes, *in vitro*. Essa relação, embora variando no mesmo sentido, parece ser traduzida por valores de diferente razão. Este facto deve-se em parte à diversa variação dos elementos nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, variava o anti-soro, em face de dose fixa inicial de cultura; *in vivo*, a D. M. M. da cultura em face de dose fixa do soro específico. Contudo, deduzidos os respectivos valores perante o soro e cultura, a razão de variação era, na realidade, mais aproximada.

Conclui-se dos resultados dos ensaios, *in vitro* e *in vivo*, com estirpes naturais e atenuadas, que o crescimento em cadeia ou o aumento significativo da sua extensão, sob a acção de soro específico, é uma manifestação de natureza imunológica.

Normalmente, a cadeia é consequência do crescimento das estirpes bacterianas em situação desfavorável e a sua extensão reduz-se à medida que os meios de cultura se aproximam de um condicionalismo óptimo.

De facto, em esfregaços de sangue de animais vitimados por estirpes cujo crescimento, *in vitro*, se processa em cadeia — *B. anthracis*, *Streptococcus* — observa-se a presença de formas isoladas ou apenas cadeias de 2 a 3 elementos, em média, o que é demonstrativo de que este ambiente biológico oferece as melhores condições para o desenvolvimento das estirpes em referência.

Soros específicos, de valor imunizante semelhante, obtidos de animais de diferentes espécies, hiperimunizados com culturas vivas, mostram ligeiras divergências na acção imunológica, *in vitro*, em relação a estirpes do mesmo tipo. Estas discrepâncias pouco acentuadas encontram possível explicação na diversidade das populações de anti-corpos em cada soro em relação com a variabilidade antigénica das populações bacterianas das estirpes, e verificam-se também *in vivo*. São oscilações de valor, inerentes ao condicionalismo biológico em que se processam e só têm significado quando se afastam da média provável dos ensaios realizados dentro do mesmo âmbito. Devem, por isso, igualar-se, tanto quanto possível, as condições de crescimento bacteriano, *in vitro* e *in vivo*, a fim de tornar mais expressivos os resultados da acção imunológica, a qual — *in vitro* — parece resultar da reacção antigénio-anticorpo, qualitativa-quantitativa, operada em extensão na superfície bacteriana, constatando-se a variação antigénica em relação ao ambiente em que se processa o crescimento. Da mesma acção *in vivo*, resulta por consequência, perturbação da dinâmica das populações bacterianas, a estirpe virulenta comportando-se como avirulenta, donde a imunidade específica.

Identidade imunológica de estirpes bacterianas *in vitro* corresponde normalmente a análogo comportamento sob a acção dos respectivos anti-soros. Com estirpes que em geral crescem sob a forma de bacilos isolados e a ritmo rápido a variação da D. M. I. $2 \times$ em relação à estirpe tipo parece ser já elucidativa da diferença de tipo imunológico; naquelas cujo desenvolvimento se opera mais lentamente ou em cadeia, apenas divergências mais acentuadas da D. M. I. levam a admitir a diferença de tipo imunológico. A identificação imunológica de estirpes relacionadas poderá fazer-se ainda *in vitro* e *in vivo* com anti-soros absorvidos — absorção cruzada.

Os resultados dos estudos efectuados, *in vitro* e *in vivo*, com estirpes atenuadas mostram a variação do tipo imunológico como consequência do crescimento em ambientes diferentes. Da dinâmica das populações bacterianas nos diferentes ambientes resulta não só a variação das características morfológicas e biológicas, mas também a das estruturas antigénicas, tanto mais pronunciada quanto mais afastado do normal é o ambiente em que se processa o crescimento. Da extensão da divergência das estruturas antigénicas das populações bacterianas depende o valor imunizante e, consequentemente, a identificação do tipo imunológico da estirpe. E nesta conformidade novos tipos imunológicos surgem.

Só com base no conceito dinâmico da acção imunológica se poderá compreender a imunidade específica em toda a sua extensão.

3.3 — ACÇÃO IMUNOLÓGICA E ESTRUTURA ANTIGÉNICA DA SUPERFÍCIE BACTERIANA. TIPO IMUNOLÓGICO

Conhecida a acção imunológica e a sua natureza dinâmica, havia que relacioná-la com a estrutura antigénica de superfície das populações bacterianas de que dependia. O género *Salmonella*, em que as estirpes se encontram já classificadas em sorotipos — esquema de KAUFFMANN-WHITE, KAUFFMANN (1954) — mostrava-se do maior interesse para o fim em vista. Assim, foram estudadas *in vitro*, sob o ponto de vista imunológico, estirpes de *Salmonella* do mesmo e de diferentes sorotipos, pertencentes a diversos grupos sorológicos, de modo a discriminar as suas inter-relações.

Os resultados dos ensaios, a seguir apreciados, confirmam a íntima relação entre acção imunológica e estrutura antigénica da superfície bacteriana, evidenciando simultaneamente as relações imunológicas das estirpes agrupadas bioquímica e sorologicamente.

3.3.1 — ESTIRPES DE *SALMONELLA* DE DIFERENTES GRUPOS SOROLÓGICOS

Não se verificam relações imunológicas entre estirpes de *Salmonella* de diferentes grupos sorológicos A, B, C e D, embora algumas possuam determinados antígenos somáticos comuns — Quadro 14. Entre estas últimas estirpes apenas se pode observar a aglutinação cruzada.

QUADRO 14

ESTIRPES DE *SALMONELLA* — GRUPOS A, B, C e D

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>salmonella</i>	Grupo Sorológico	SOROS ESPECÍFICOS						
		<i>S. paratyphi</i> A	<i>S. paratyphi</i> B	<i>S. typhimurium</i> B	<i>S. paratyphi</i> C ₁	<i>S. cholerae suis</i> C ₁	<i>S. typhi</i> D	<i>S. enteritidis</i> D
<i>S. paratyphi</i> 1, 2, 12; a; —	A	+	—	—	—	—	—	—
<i>S. paratyphi</i> 1, 4, 5, 12; b; 1, 2	B	—	+	±	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i> 1, 4, 5, 12; i; 1, 2	B	—	±	+	—	—	—	—
<i>S. paratyphi</i> 6, 7, Vi; c; 1, 5	C ₁	—	—	—	+	±	—	—
<i>S. cholerae suis</i> 6, 7; c; 1, 5	C ₁	—	—	—	±	+	—	—
<i>S. typhi</i> 9, 12, Vi; d; —	D	—	—	—	—	—	+	±
<i>S. enteritidis</i> 1, 9, 12; g, m; —	D	—	—	—	—	—	±	+

+ = Tipo imunológico.

± = Relação imunológica.

— = Sem relação imunológica.

3.3.2 — ESTIRPES DE *SALMONELLA* DO MESMO GRUPO SOROLÓGICO

Verificam-se relações imunológicas entre estirpes de diferentes sorotipos pertencentes ao mesmo grupo sorológico — Quadro 14. A mais íntima relação manifestava-se, de maneira geral, entre estirpes do mesmo sorotipo. A relação imunológica verificada resulta, por conseguinte, de

estruturas antigénicas de superfície bastante aproximadas, dependendo o grau de relação da maior ou menor aproximação dessas estruturas, como se verá.

Passa-se a considerar as relações imunológicas verificadas *in vitro* entre estirpes de *Salmonella*, de idêntico e de diferente sorotipo, pertencentes ao mesmo grupo sorológico.

3.3.2.1 — Estirpes de *Salmonella* do Grupo B

O Quadro 15 mostra as relações imunológicas observadas entre estirpes de *Salmonella* incluídas no grupo sorológico B. Como se disse, a mais íntima conexão patenteava-se entre sorotipos mais semelhantes na parte somática. Assim, a relação imunológica, *in vitro*, entre as estirpes de *S. paratyphi B* e *S. typhimurium*, *S. abortus equi* e *S. abortus ovis*, era de tal maneira acentuada, que nem sempre era fácil a sua distinção; a D. M. I. variava em relação ao tipo imunológico cerca de $2 \times$. A relação imunológica entre outras estirpes do mesmo grupo era menos pronunciada, variação da D. M. I. superior a $2 \times$, sendo mais fácil a sua distinção.

Assim, entre as estirpes de *S. paratyphi B* e *S. abortus equi* ou *S. abortus ovis*, *S. typhimurium* e *S. abortus equi* ou *S. abortus ovis*, *S. abortus bovis* e *S. abortus equi* ou *S. abortus ovis*, a variação da D. M. I. era cerca de $3 \times$; entre as estirpes de *S. abortus bovis* e *S. paratyphi B* ou *S. typhimurium*, cerca de $6 \times$.

A estirpe de *S. abortus ovis*, no meio de cultura utilizado, crescia mais lentamente que as outras estirpes do mesmo grupo e sob a forma de bacilos maiores, inicialmente em pequenas cadeias; nos meios sólidos esta menor capacidade de crescimento traduzia-se por colónias mais pequenas em relação às das outras estirpes do mesmo grupo. Notava-se, por esta razão, mais acentuada acção imunológica sobre esta estirpe pelos soros específicos de diferentes tipos do mesmo grupo. Contudo, as diferenças imunológicas existentes entre esta estirpe e outras do mesmo agrupamento sorológico eram mais nítidas em face do respectivo anti-soro — Quadro 15.

No mesmo grupo sorológico verificava-se relação imunológica entre estirpes cujo sorotipo diferia na sua parte somática, sendo contudo mais

pronunciada entre sorotipos idênticos. Não foram notadas diferenças significativas de tipo imunológico nas estirpes de *S. typhimurium* e *S. abortus equi* analisadas.

3.3.2.2 — Estirpes de *Salmonella* do Grupo C₁

O Quadro 16 mostra a relação imunológica verificada *in vitro* entre estirpes de *Salmonella* incluídas no Grupo C₁. As estirpes *S. cholerae suis* e *S. cholerae suis* var. *kunzendorf* — sorotipos diferindo na fase flagelar — comportavam-se de maneira idêntica e as ligeiras divergências por vezes observadas — variação da D. M. I. inferior a 2 × — não eram indicativas de diferente tipo imunológico. As estirpes de *S. cholerae suis* e *S. typhi suis* — sorotipos idênticos mas biotipos diferentes — embora se mostrassem intimamente relacionadas no soro específico *cholerae suis*, afastavam-se contudo no anti-soro *typhi suis* — variação da D. M. I. superior 2 ×. Variação semelhante era verificada com a mesma estirpe de *S. typhi suis* em relação a outros soros específicos de estirpes do mesmo grupo sorológico, facto este possivelmente devido à natureza do seu crescimento, mais lento, sob a forma de bacilos maiores e, inicialmente, em curtas cadeias; nos meios sólidos a colónia, ligeiramente rugosa, era mais pequena que a das outras estirpes do mesmo grupo.

A acção imunológica neste tipo de crescimento resultará, possivelmente, de reacção antigénio-anticorpo numa extensão menor da superfície bacteriana, e daí a variação verificada. As diferenças imunológicas existentes entre esta estirpe e outras do mesmo grupo sorológico eram contudo mais acentuadas no soro específico *typhi suis*.

A reacção imunológica entre as estirpes de *S. paratyphi C* «Vi» e *S. paratyphi C* — sorotipos divergindo na parte somática pela existência de antigénio «Vi» na primeira delas — era bastante acentuada e nem sempre era fácil a sua distinção; contudo, a variação da D. M. I., cerca de 2 ×, era indicativa de diferenças de tipo imunológico. Evidenciavam-se desta forma divergências imunológicas entre variantes na forma VW e W, KAUFFMANN (1954), do mesmo sorotipo, facto este da maior importância na imunidade.

QUADRO 15

ESTIRPES DE *SALMONELLA* — GRUPO B

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>salmonella</i>	SOROS ESPECÍFICOS				
	<i>S. paratyphi B</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. abortus bovis</i>	<i>S. abortus equi</i>	<i>S. abortus ovis</i>
<i>S. paratyphi B</i> 1, 4, 5, 12; b; 1, 2	DMI	2	6	3	4
<i>S. typhimurium</i> 1, 4, 5, 12; i; 1, 2	2	DMI	6	3	4
<i>S. abortus bovis</i> 1, 4, 12, 27; b; e, n, x	6	6	DMI	3	4
<i>S. abortus equi</i> 4, 12; —; e, n, x	3	3	3	DMI	3
<i>S. abortus ovis</i> 4, 12; c; 1, 6	3	3	3	2	DMI

DMI = Tipo imunológico.

Números = Razão da variação da DMI.

(valores aproximados).

QUADRO 16

ESTIRPES DE *SALMONELLA* — GRUPO C₁

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>salmonella</i>	SOROS ESPECÍFICOS					
	<i>S. paratyphi C</i> «Vi»	<i>S. paratyphi C</i>	<i>S. cholerae suis</i>	<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kundorf</i>	<i>S. typhi suis</i>	<i>S. montevideo</i>
<i>S. paratyphi C</i> 6, 7, Vi; c; 1, 5	DMI	2	3	3	4	4
<i>S. paratyphi C</i> 6, 7; c; 1, 5	2	DMI	2	2	3	3
<i>S. cholerae suis</i> 6, 7; c; 1, 5	3	2	DMI	DMI	2	3
<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 6, 7; —; 1, 5	3	2	DMI	DMI	2	3
<i>S. typhi suis</i> 6, 7; c; 1, 5	3	2	DMI	DMI	DMI	2
<i>S. montevideo</i> 6, 7; g, m, s; —	4	3	3	3	3	DMI

DMI = Tipo imunológico.

Números = Razão da variação da DMI.

(valores aproximados).

Assim, uma dada estirpe virulenta, de capacidade imunizante, pode perder esta por subculturas sucessivas em ambientes diferentes como, aliás, é do conhecimento geral na imunologia experimental.

As estirpes de *S. cholerae suis* e *S. typhi suis*, principalmente esta última, mostravam-se mais intimamente relacionadas com a estirpe de *S. paratyphi C* — variação da D. M. I., cerca de $2 \times$ — que com a estirpe de *S. paratyphi C* «Vi» — variação da D. M. I., cerca de $3 \times$.

A relação imunológica entre as estirpes de *S. montevideo* e *S. paratyphi C* «Vi» é pouco acentuada — variação da D. M. I. cerca de $4 \times$ — mais acentuada, contudo, com a estirpe *S. paratyphi C*. e *S. cholerae suis* — variação da D. M. I. cerca de $3 \times$ — e com a estirpe *S. typhi suis* — variação da D. M. I. cerca de $2 \times$.

Em relação ao grupo sorológico C₁ pode portanto concluir-se da experimentação feita que, apesar de idênticos na parte somática, com exceção da *S. paratyphi C* «Vi» que além do antigénio 6, 7 possui também «Vi», os sorotipos deste agrupamento mostram diferentes graus de relação imunológica. Por outro lado, desses ensaios se deduz ainda que é mais acentuada a relação imunológica entre a estirpe de *S. paratyphi C* «Vi» e *S. paratyphi C*, divergindo na parte somática pela existência do antigénio «Vi», que entre outras estirpes do mesmo grupo sorológico, sorotipos somaticamente idênticos.

Não foram, contudo, verificadas diferenças imunológicas significativas nas estirpes de *S. cholerae suis* e de *S. typhi suis*.

3.3.2.3 — Estirpes de *Salmonella* do Grupo D

O Quadro 17 indica as relações imunológicas observadas *in vitro* entre estirpes de *Salmonella* pertencentes ao grupo sorológico D. Embora relacionadas entre si, estas estirpes mostram diferenças apreciáveis de tipo imunológico. Assim, a relação imunológica entre as estirpes de *S. typhi* «Vi» e *S. typhi*, *S. enteritidis* e *S. enteritidis var. danysz*, *S. gallinarum* e *S. pullorum*, era bastante acentuada e nem sempre era fácil a sua distinção; contudo a variação da D. M. I. verificada, cerca de $2 \times$, era indicativa de diferença de tipo imunológico.

As estirpes de *S. enteritidis* e *S. enteritidis var. danysz*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* mostravam-se mais intimamente relacionadas, respec-

tivamente nos anti-soros *S. enteritidis* e *S. gallinarum* — variação da D. M. I. inferior a $2 \times$ — que nos anti-soros *S. enteritidis var danysz* e *S. pullorum* — variação da D. M. I. cerca de $2 \times$.

Resultado similar era obtido com as estirpes de *S. enteritidis var. danysz* e *S. pullorum*, sobretudo com esta última, em relação a outros soros específicos de estirpes do mesmo grupo sorológico, devido possivelmente a menor capacidade de crescimento destas estirpes no meio utilizado. De facto, o desenvolvimento destas estirpes em relação às outras do mesmo agrupamento, processava-se a ritmo mais lento, sob a forma de bacilos maiores e, inicialmente, em pequenas cadeias; nos meios sólidos a colónia de *S. enteritidis var. danysz* era ligeiramente rugosa e a da *S. pullorum* mais pequena.

Pensa-se, como disse em casos semelhantes, que a acção imunológica neste tipo de crescimento resultará da reacção antigénio-anticorpo numa extensão menor da superfície bacteriana, donde a variação verificada. As diferenças imunológicas existentes entre estas estirpes e outras do mesmo grupo eram, contudo, mais acentuadas nos anti-soros daquelas — *S. enteritidis var. danysz* e *S. pullorum*.

Eram menos pronunciadas as relações imunológicas entre as estirpes de *S. typhi*, *S. enteritidis* e *S. eastbourne*, *S. gallinarum*, *S. enteritidis* e *S. eastbourne*, *S. berta* e *S. eastbourne* — variação da D. M. I. cerca de $3 \times$ — e menos evidente ainda entre as estirpes *S. typhi*, *S. gallinarum* e *S. berta* — variação da D. M. I., cerca de $4 \times$. Entre estas estirpes é maior a variação da D. M. I., por conseguinte mais acentuada e significativa a diferença de tipo imunológico.

As divergências de comportamento entre as estirpes de *S. typhi «Vi»* e *S. typhi*, *S. enteritidis* e *S. enteritidis var. danysz*, *S. gallinarum* e *S. pullorum*, e outras estirpes do mesmo grupo — Quadro 17 — confirmam a dissemelhança de tipo imunológico das referidas estirpes. Verificam-se deste modo diferenças imunológicas entre variantes na forma VW e W — *S. typhi «Vi»* e *S. typhi* — e entre variantes bioquímicas — *S. enteritidis* e *S. enteritidis var. danysz* — do mesmo sorotipo, KAUFFMANN (1954).

Por outro lado, notava-se ainda mais acentuada relação imunológica entre as estirpes de *S. typhi «Vi»* e *S. typhi*, diferindo pela existência de

antigénio «Vi» na primeira das estirpes — que entre outras estirpes do mesmo grupo sorológico, *S. enteritidis*, *S. eastbourn* e *S. gallinarum*, *S. pullorum* e *S. berta*, sorotipos idênticos na parte somática — factos estes da maior relevância na imunidade.

As diferenças imunológicas entre as estirpes do mesmo grupo sorológico eram, em geral, menos pronunciadas quando experimentadas com soros específicos preparados com culturas vivas.

As relações imunológicas entre as estirpes pertencentes aos mesmos grupos sorológicos — Quadros 15, 16 e 17 — obtinham confirmação também *in vitro* mediante ensaios realizados com anti-soros absorvidos — absorção cruzada.

Assim, de maneira geral, soros específicos absorvidos com a respectiva estirpe tipo deixavam de exercer acção imunológica sobre ela e restantes estirpes do grupo. Anti-soros absorvidos com estirpes em que se verificava acentuada relação imunológica perdiam praticamente a sua actividade, embora não fosse total a absorção dos anticorpos, podendo verificar-se ainda, pelo menos, aglutinação da estirpe tipo e, por vezes, doutros com antigénios comuns.

Nos anti-soros absorvidos com estirpes cuja relação imunológica era menos acentuada — variação da D. M. L. $> 3 \times$ — deixava de observar-se a acção imunológica sobre as estirpes de absorção ou outras mais intimamente relacionadas, mantendo-se esta, contudo, sobre as estirpes tipo ou outras mais afins. A extensão da acção imunológica exercida por soros específicos absorvidos nestas condições — absorção cruzada — variava portanto na razão inversa das relações imunológicas verificadas entre as estirpes. Notavam-se também, nos ensaios realizados, diferenças entre anti-soros preparados com culturas vivas e culturas mortas. Assim, soros específicos preparados com culturas vivas e absorvidas com culturas desvitalizadas da mesma estirpe nem sempre perdiam totalmente a acção imunológica, que ainda se podia observar, por vezes, na parte inicial do crescimento da respectiva estirpe, notando-se igualmente aglutinação das culturas.

Eram também menos acentuadas as diferenças imunológicas entre as estirpes do mesmo grupo e, por conseguinte, mais extensa a acção destes anti-soros absorvidos.

QUADRO 17

ESTIRPES DE *SALMONELLA*—GRUPO D

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>salmonella</i>	SOROS ESPECÍFICOS							
	<i>S. typhi</i> «Vi»	<i>S. typhi</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i> «var.»	<i>S. berta</i>	<i>S. eastbourne</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. pullorum</i>
<i>S. typhi</i> 9, 12, Vi; d; —	DMI	2	3	4	4	3	4	4
<i>S. typhi</i> 9, 12; d; —	2	DMI	2	3	3	3	3	3
<i>S. enteritidis</i> 1, 9, 12; g, m; —	3	2	DMI	2	3	3	3	4
<i>S. enteritidis</i> <i>var. danyasz</i> 1, 9, 12; g, m; —	3	2	DMI	DMI	3	3	3	4
<i>S. berta</i> 9, 12; f, g, t; —	4	3	3	4	DMI	3	4	4
<i>S. eastbourne</i> 1, 9, 12; e, h; 1, 5	3	3	3	4	3	DMI	3	3
<i>S. gallinarum</i> 1, 9, 12; —; —	4	3	3	4	4	3	DMI	2
<i>S. pullorum</i> 9, 12; —; —	3	2	3	3	3	2	DMI	DMI

DMI = Tipo imunológico.

Números = Razão da variação da DMI.
(valores aproximados).

3.3.2.4 — Estirpes de *Salmonella* do mesmo sorotipo

Verificavam-se, *in vitro*, divergências imunológicas, por vezes acentuadas, entre estirpes de *Salmonella* do mesmo sorotipo, mas de diferente tipo bioquímico, como era o caso da *S. cholerae suis*, *S. typhi suis* e *S. paratyphi* (variante na forma W) — Quadro 16 — e *S. enteritidis* e *S. enteritidis var. danysz* — Quadro 17. Eram também de relevar as dissimelhanças imunológicas constatadas entre as formas VW e W da *S. paratyphi* — Quadro 16 — e da *S. typhi* — Quadro 17. Não se verificavam, contudo, diferenças imunológicas significativas entre estirpes cujo sorotipo variava apenas na fase flagelar — *S. cholerae suis* e *S. cholerae suis var. kunzendorf* — Quadro 16.

Entre estirpes do mesmo sorotipo e biotipo não foram observadas diferenças imunológicas significativas, não sendo de considerar as ligeiras divergências por vezes verificadas — variação da D. M. I. inferior a $2 \times$.

3.3.2.5 — Estirpes de *Salmonella* do mesmo tipo imunológico

Estudadas as relações imunológicas entre estirpes de *Salmonella* pertencentes a diferentes grupos sorológicos, havia finalmente que considerar o tipo imunológico, da maior importância na imunoprofilaxia das salmoneloses.

A acção imunológica depende, como se verifica, da estrutura antigénica da superfície bacteriana e resulta da reacção antigénio/anticorpo em extensão.

Assim, a mais íntima relação imunológica é constatada entre estirpes cujas estruturas antigénicas são mais semelhantes, consequentemente entre estirpes do mesmo sorotipo. Mas, apesar de acentuadamente interligadas imunologicamente, verificam-se ainda entre estirpes de diferentes tipos bioquímicos do mesmo sorotipo divergências imunológicas significativas — variação da D. M. I. $2 \times$ ou mais — Quadros 16 e 17. Apenas tal não foi verificado entre estirpes do mesmo sorotipo e biotipo, ainda que variantes no comportamento bioquímico, sem valor diferencial, KAUFFMANN (1954), ou na fase flagelar.

Encontram-se nestas condições as estirpes de *S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. cholerae suis* var. *kunzendorf*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum* e *S. pullorum*, ensaiadas *in vitro*, as quais são responsáveis, *in vivo*, de processos definidos sob o ponto de vista imunológico. O mesmo se passa em relação a estirpes de *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* e *S. paratyphi C*.

Verifica-se, portanto, uniformidade de tipo imunológico *in vivo* e idêntico comportamento *in vitro*. Desta maneira, estirpes de *Salmonella* que *in vitro* se comportem de forma análoga — variação da D. M. I. inferior a $2 \times$ — quando submetidas nas mesmas condições à acção dos respectivos soros específicos, deverão enquadrar-se no mesmo tipo imunológico.

Restava conhecer *in vivo* — imunidade cruzada — o comportamento das estirpes imunologicamente relacionadas, *in vitro* — variação da D. M. I. $2 \times$ ou superior — Quadros 15, 16 e 17. Realizaram-se ensaios neste sentido. A imunidade cruzada entre estirpes do grupo C_1 — Quadro 16 — tem vindo a ser estudada no cobaia e no ratinho, e as dos grupos B e D — Quadros 15 e 17, respectivamente — neste último, sob a forma de vacinas desvitalizadas pelo formol, mertiolato, e precipitadas pelo alúmen. A vacina é inoculada por via subcutânea e intraperitoneal no ratinho e cobaia, tendo sido ensaiadas várias doses e diferentes intervalos entre as aplicações vacinais.

A contraprova é feita por via subcutânea e intraperitoneal no cobaia, e por estas mesmas vias e a oral no ratinho, de maneira geral, com as estirpes *S. cholerae suis* (grupo C_1), *S. typhimurium* (grupo B) e *S. enteritidis* var. *danysz* (grupo D). Os resultados destes ensaios, embora não permitam ainda tirar conclusões definitivas, dada a sua irregularidade, são contudo bastante sugestivos nalguns casos, mostrando-se concordantes com os obtidos *in vitro*; a variação da D. M. I. $2 \times$ era representativa de diferença de tipo imunológico.

Verificavam-se ainda divergências bastante acentuadas, nalguns ensaios, no grau de imunidade conferida pelas estirpes do mesmo grupo sorológico em relação à via de inoculação da estirpe de contraprova.

Os ensaios efectuados no ratinho, GREENWOOD *et al* (1931), sem definirem o tipo imunológico, mostram contudo o grau de imunidade cruzada entre estirpes de *S. typhimurium* e *S. paratyphi B*, do mesmo

grupo sorológico, que possuem antígenos somáticos comuns, em grande extensão. *In vitro*, estirpes dessas Salmonelas, diferentes no tipo sorológico mas idênticas na parte somática, evidenciam-se de tal maneira relacionadas imunologicamente que nem sempre é fácil, como se frizou, a sua distinção; contudo, a variação da D. M. I., cerca de $2 \times$, em geral verificada — Quadro 15 — era significativa de divergência de tipo imunológico.

Os resultados obtidos na profilaxia vacinal das paratifoses e tifo no homem, principalmente desta última enfermidade, são bastante elucidativos neste sentido, parecendo confirmar *in vivo*, a diferença de tipo imunológico verificada *in vitro*, variação da D. M. I., cerca de $2 \times$ — Quadros 16 e 17 — em relação às variantes na forma VW e W da *S. paratyphi C* e *S. typhi*. De facto, embora se afigure bastante complexa a relação dos antígenos *Vi* e *O* da *S. typhi* na imunidade antibacteriana, os resultados experimentais, no ratinho e no homem, mostram que o máximo efeito imunizante depende do antígeno *Vi*.

Por outro lado, a imunização do ratinho com a bactéria *Ballerup*, rica em antígeno somático *Vi* semelhante ao da *S. typhi*, mas desprovida de idêntico antígeno *O*, contra a inoculação desta última na forma VW, realça igualmente a importância protectora do antígeno em causa — WILSON e MILES (1955 b).

Vacinas preparadas com estirpes desprovidas de antígeno *Vi*, variante na forma W, de maneira geral, conferiram fraca imunidade nos ensaios realizados. O antígeno *Vi* estaria ligado à patogeneidade da *S. typhi* para o ratinho, devido à sua elevada toxidade, KAUFFMANN (1954), e não à virulência conforme FÉLIX e PITT (1934).

Na generalidade, as estirpes isoladas da tifo humana possuem este antígeno *Vi* em grande extensão na sua superfície, inibindo até a aglutinabilidade do antígeno *O*, KAUFFMANN (1954), donde a necessidade da sua presença na imunização.

São raras as estirpes isoladas na fase W, portanto sem antígeno *Vi*, devendo ser consideradas como variantes. *In vitro*, resultam do crescimento, por passagens sucessivas, em meios simples.

Reconhecida a importância do antígeno *Vi* na imunização, as vacinas passaram a ser preparadas com estirpes virulentas, seleccionadas de

maneira a possuírem elevado teor de antigénio *Vi* e *O*, e de grande estabilidade nesta forma *in vitro*; com a sua aplicação, os melhores resultados têm sido obtidos na profilaxia da tifoze no homem — WILSON e MILES (1955 b).

Com as estirpes de *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* e *S. paratyphi C* passa-se fenómeno análogo, devendo utilizar-se pela mesma razão, na preparação de vacina, estirpes recentemente isoladas e da maior estabilidade antigénica *in vitro*.

Da variação somática destas estirpes resulta, por conseguinte, deficiente poder imunizante. Assim acontece com a variação V - W das estirpes *S. paratyphi C* e *S. typhi*, em que a perda do antigénio *Vi*, variante na forma W, as torna praticamente ineficazes na imunização contra as respectivas estirpes virulentas na fase V.

In vitro, as estirpes de *S. paratyphi C* «*Vi*» e *S. paratyphi C* — Quadro 16 — e *S. typhi* «*Vi*» e *S. typhi* — Quadro 17 — embora imunologicamente tão relacionadas que nem sempre é fácil a sua distinção, mostram significativas diferenças de tipo imunológico, variação da D. M. I., cerca de 2 x. Parecem concordar assim os resultados *in vivo* e *in vitro*, podendo também considerar-se no género *Salmonella* — estirpes cujo crescimento se processa normalmente em elementos isolados e a ritmo rápido — a variação da D. M. I. 2 x demonstrativa de diferentes tipos imunológicos, à semelhança do que se passa com a *P. multocida* — 3.2.3.

Em resumo, os ensaios realizados mostram a íntima relação entre estrutura antigénica da superfície bacteriana e acção imunológica *in vitro*.

Verifica-se relação imunológica entre estirpes de diferentes sorotipos, pertencentes ao mesmo grupo sorológico por possuírem antigénios comuns numa maior extensão da superfície bacteriana — Quadros 15, 16 e 17 —, mas não entre estirpes pertencentes a diferentes grupos sorológicos onde apenas ocorre aglutinação quando da existência de antigénios comuns flagelares, ou somáticos circunscritos a pequena área da superfície. Dentro do mesmo grupo sorológico observam-se diferenças imunológicas mais acentuadas entre estirpes do mesmo sorotipo que entre estirpes de sorotipos idênticos apenas na parte somática, relevando-se assim a importância dos antigénios da superfície em relação aos flagelares na

acção imunológica, *in vitro*, facto este já assinalado na imunidade *in vivo*, WILSON e MILES (1955 b), BIOZZI *et al* (1963).

Verifica-se, por outro lado, mais íntima conexão imunológica entre estirpes variantes na forma VW e W, diferindo por conseguinte na parte somática pela existência do antigénio *Vi* na forma VW, que entre estirpes do mesmo sorotipo — Quadros 16 e 17. Contudo, estas variantes VW e W divergem imunologicamente, com variação da D. M. I., cerca de $2 \times$, indicativa de diferente tipo imunológico. Observa-se ainda aglutinação nas culturas de estirpes pertencentes a sorotipos sem qualquer antigénio comum.

Tem sido verificada a existência de outros antigénios, a divergência do mesmo tipo de antigénio e a variação da sua extensão na superfície bacteriana, em estirpes de um só ou de vários sorotipos enquadrados no mesmo grupo sorológico, o que parece estar em desacordo com o esquema de KAUFFMANN-WHITE, sabendo-se, contudo, que tal discordância é devida a serem apenas considerados nos sorotipos os antigénios de importância na identificação, procedendo-se ao agrupamento segundo o maior antigénio somático — KAUFFMANN (1954).

Verificam-se também diferenças antigénicas, embora limitadas, entre estirpes do mesmo tipo imunológico. A acção imunológica, de que depende a imunidade específica, resulta portanto duma reacção antigénio-anticorpo, qualitativa-quantitativa, em extensão na superfície bacteriana, e não apenas da reacção de determinados antigénios com os respectivos anticorpos. É ainda de natureza dinâmica, dependente das variações antigénicas das populações bacterianas no ambiente em que se processa o crescimento. Assim se justificam e compreendem as relações imunológicas, *in vitro* e *in vivo*, entre estirpes de diferentes tipos.

A variação antigénica bacteriana é um fenómeno geral, decorrente da dinâmica das populações respectivas nos diferentes ambientes — WILSON e MILES (1955 b). Surgem novos tipos imunológicos a partir da mesma estirpe, em função da variação do ambiente.

Nas *Enterobacteriaceae*, que inclui o género *Salmonella*, encontra-se largamente estudada em todos os seus componentes a variação antigénica, que chega a atingir os próprios elementos constitutivos da mesma população bacteriana — KAUFFMANN (1954).

O conhecimento do fenómeno da transdução, assinalado por ZINDER e LEDERBERG (1952), é da maior importância na genética bacteriana e, particularmente, para a compreensão de algumas das condições sob as quais surgem sorotipos na *Salmonella* nas mais complexas combinações e, mais ainda, para elucidação das divergências entre actividade bioquímica e presença de certos antígenos — KAUFFMANN (1954).

As formas V-W, KAUFFMANN (1954), e P, CARLINFANTI (1946), da *S. typhi*, são exemplos objectivos da variação antigénica em relação ao ambiente. A complexa relação desta variação antigénica *Vi*, *O* e *P* da *S. typhi* e a imunidade, referida largamente na literatura, WILSON e MILES (1955 b), só poderá apreender-se dentro dum conceito dinâmico das populações bacterianas nos diferentes ambientes e, por conseguinte, dependente das variações antigénicas dessas mesmas populações.

Só assim se compreenderão também as diferenças de capacidade imunizante das vacinas mortas, tendo em atenção, é certo, a actuação desnaturante na desvitalização, em relação às vacinas vivas.

A acção imunológica é na realidade um fenómeno de natureza dinâmica e, como tal, deve ser tida em conta em todas as suas implicações.

Embora a variação antigénica, somática e flagelar, seja considerada na identificação sorológica das estirpes bacterianas, KAUFFMANN (1954), esta constitui ainda um processo de análise de natureza estática visto não poder considerar a variação antigénica das populações em relação ao ambiente; por sua vez, a acção imunológica, *in vitro*, e a imunidade específica, *in vivo*, representando processos dinâmicos, devem ser tidas como fundamentais na identificação do tipo imunológico das estirpes, de importância basilar na imunoprofilaxia.

3.4 — IDENTIFICAÇÃO IMUNOLÓGICA DE ESTIRPES BACTERIANAS *IN VITRO*

Em medicina, é de fundamental importância a identificação imunológica dos microrganismos, principalmente vírus e bactérias, com vista à imunoprofilaxia e imunoterapêutica.

A soro-neutralização realizada *in vivo*, em animais de laboratório, e *in vitro*, em culturas celulares, tem sido a técnica utilizada na identifica-

ção imunológica dos virus. Esta última constitui um processo simples, rápido e económico de identificação imunológica dos virus, em especial dos não patogénicos para os animais de experiência e que são os mais numerosos.

Faltava, contudo, no que concerne às bactérias uma técnica de identificação imunológica *in vitro*, da mesma simplicidade e eficácia. Essa lacuna acaba agora de ser preenchida com a técnica da acção imunológica *in vitro*, intimamente relacionada com a identificação imunológica *in vivo*.

É simples, de rápida execução, muito económica, dado que se realiza em meros tubos de ensaio, e de fundamental eficiência — e nisto reside a sua maior valia por permitir a identificação imunológica de estirpes bacterianas avirulentas para os animais de experiência, tal como o faz a soro-neutralização em culturas celulares, *in vitro*, em relação aos virus nas mesmas circunstâncias.

É até de maior simplicidade e rapidez que esta última, dada a natureza do crescimento das estirpes bacterianas. Exige apenas, como se disse, meios de culturas apropriados a cada estirpe e soros específicos. Pode ser tornada ainda mais rápida utilizando a microtécnica.

Os métodos de análise estatística conferem maior precisão e significado aos resultados de identificação imunológica.

O estudo realizado em culturas de estirpes, umas causadoras de processos bem definidos imunologicamente, outras experimentadas *in vivo*, confirmam o valor desta técnica *in vitro* na identificação imunológica das estirpes bacterianas.

Passa-se a encarar os ensaios efectuados.

3.4.1 — B. ANTHRACIS

A partir de 1946, elevado número de estirpes de *B. anthracis*, mais de uma centena, isoladas de diferentes espécies animais, de 1920 a 1962, no país, foram verificadas *in vitro* sob o ponto de vista imunológico. Não se observaram diferenças imunológicas significativas entre estas estirpes, tendo-se em atenção a natureza do seu crescimento em cadeia. Confirmava-se *in vitro* a uniformidade de tipo imunológico das estirpes de *B. anthracis*, desde há muito constatada *in vivo*, quer experimentalmente, no labo-

ratório, quer na infecção natural, principalmente através da imunoprofilaxia e imunoterapêutica da doença — WILSON e MILES (1955 b), STERNE (1959).

Assim, em relação às estirpes de *B. anthracis*, a identificação imunológica corresponde à identificação da espécie e, por conseguinte, ao diagnóstico bacteriológico. Para mais, não se verificaram relações imunológicas entre estirpes de *B. anthracis* e *B. cereus*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. subtilis* e outras estirpes não classificadas do mesmo género, o que confere maior significado à identificação imunológica da espécie *B. anthracis* *in vitro*.

Com a técnica simples, rápida e económica, referida, identifica-se *in vitro* a espécie *B. anthracis*, sem necessidade de recorrer a provas morosas e complicadas de aplicar no diagnóstico diferencial de outras espécies do mesmo género, em especial no de estirpes de *B. cereus* e *B. cereus* var. *mycoides*, de maior semelhança morfológica e cultural, com certo grau de patogeneidade para os animais de experiência laboratorial e com mobilidade por vezes pouco aparente ou ausente, e ainda nos casos em que as estirpes de *B. anthracis* se mostram de reduzida virulência ou mesmo avirulentas e acapsuladas — DUMAS (1959), NODBERG (1951 e 1953), BREED *et al* (1955 — Bergey's Manual), STERNE (1959).

A técnica de identificação imunológica *in vitro*, cujo valor os resultados obtidos confirmam, deverá ser utilizada no diagnóstico bacteriológico da espécie *B. anthracis*, dada a uniformidade do tipo imunológico das estirpes nela incluídos e ainda pelas vantagens económicas e de tempo que resultam da sua aplicação e se aliam a uma perfeita eficiência.

É ainda de relevar que, dentro da variação antigénica das estirpes de *B. anthracis*, se mantém a uniformidade do tipo imunológico da espécie.

3.4.2 — E RHUSIOPATHIAE

Mais de duas centenas de estirpes de *E. rhusiopathiae*, isoladas de suínos, de 1917 a 1963, no país, foram também verificadas *in vitro* sob o ponto de vista imunológico, a partir de 1946, não se tendo observado diferenças significativas de tipo imunológico entre elas. Confirmava-se igualmente *in vitro* a uniformidade de tipo imunológico das estirpes de

E. rhusiopathiae, desde sempre verificado *in vivo*, experimentalmente, no laboratório, e na infecção natural, principalmente através da imunoprophylaxia e imunoterapêutica da doença — GLEDHILL (1945, 1959). Tal como sucede com o *B. anthracis*, a identificação imunológica, *in vitro*, das estirpes de *E. rhusiopathiae*, corresponde à da espécie, e portanto ao diagnóstico bacteriológico.

O facto de não se terem observado relações imunológicas entre estirpes de *E. rhusiopathiae* e de *L. monocytogenes*, umas e outras tão semelhantes que para a sua destrição se recorre por vezes a técnicas mais complexas de diagnóstico diferencial, DUMAS (1959), realça o valor da identificação imunológica *in vitro* da espécie em causa e, implicitamente, da técnica para a sua consecução. Esta deverá, pois, passar a ser utilizada no diagnóstico bacteriológico da *E. rhusiopathiae*, dada a uniformidade de tipo imunológico das estirpes, embora verificada dentro da diversidade antigénica das mesmas — GLEDHILL (1945, 1959).

3.4.3 — L. MONOCYTOGENES

Reveste-se também da maior importância a identificação imunológica, *in vitro*, das estirpes de *L. monocytogenes*, patogénicas para o homem, REED (1964), e animais, PATERSON (1959).

Presentemente são agrupadas sorològicamente. Assim., diversas estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de animais de diferentes espécies — 2.1.5 — foram estudadas sob o ponto de vista imunológico, *in vitro* e *in vivo*.

3.4.3.1 — In vitro

O Quadro 18 regista alguns dos resultados obtidos *in vitro*. Culturas de 16 horas — concentração inicial 10^{-2} — são submetidas à acção dos soros específicos «Weybridge», «Camarate» e «Thiery» sendo a observação microscópica feita passadas 10 horas. O comportamento imunológico das estirpes é bastante semelhante — variação da D. M. I. inferior a $2 \times$ — parecendo haver uniformidade de tipo imunológico.

QUADRO 18

ESTIRPES DE *L. MONOCYTOGENES*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes ⁽¹⁾ de <i>L. monocytogenes</i>	SOROS ESPECÍFICOS diluição		
	Camarate 1/100	Thiery 1/50	Weybridge 1/50
Camarate	+	+	+
Thiery	+	+	+
Weybridge	+	+	+
Sintra	+	+	+
Sintra-s	+	+	+
Mortágua	+	+	+
Chinchila	+	+	+
Bragança	+	+	+

+ = Acção imunológica; variação da DMI $< 2 \times$

(1) = Culturas de 16 horas; concentração inicial 10^{-2}
Observação — 10 horas

Os soros específicos utilizados nestes ensaios foram obtidos de cobaias hiperimunizados com suspensões desvitalizadas e vivas das estirpes Weybridge, Camarate e Thiery. Os soros obtidos de coelhos hiperimunizados com as mesmas suspensões, embora com elevado título aglutinativo, sòmente exerciam acção imunológica em maiores concentrações.

Soros obtidos de cobaias e de coelhos, hiperimunizados apenas com suspensões desvitalizadas, também actuavam imunològicamente sobre as referidas estirpes, mas por forma menos pronunciada.

3.4.3.2 — In vivo

Os resultados dos ensaios *in vivo* — Quadro 19 — confirmam os obtidos *in vitro* — Quadro 18. As mesmas estirpes de *L. monocytogenes* comportam-se da mesma maneira nas provas de imunidade cruzada no ratinho. No cobaia, os resultados são também idênticos.

Embora seja muito reduzido o número de estirpes ensaiadas, é-se levado a admitir a uniformidade de tipo imunològico na *L. monocytogenes*, em face das diferentes espécies animais donde foram isoladas e da extensa área geográfica de onde provinham. Assim, à identificação imunològica *in vitro*, corresponderia seguro diagnóstico bacteriològico da *L. monocytogenes*.

Em relação a este agente microbiano a imunidade específica é essencialmente celular, embora aos anticorpos circulantes se atribua papel importante na manutenção da integridade da respectiva célula — SUTER e RAMSEIER (1964), MACKANESS (1964), MIKI e MACKANESS (1964); nestas condições, consequentemente, a imunidade específica não pode ser obtida por meio de anticorpos, mas sim pela intervenção de células imunes.

As vacinas mortas, com base nestes microrganismos, não imunizam, embora originem a formação de anticorpos circulantes com acção imunològica.

Por seu lado, as vacinas vivas dão origem à imunidade celular, factor essencial da resistência específica. No Quadro 19 estão inscritos os resultados obtidos no ratinho imunizado com vacinas inactivadas e com culturas vivas — 2.5.2.2 — os quais confirmam, por sua vez, a ineficácia das primeiras em relação às segundas. Resultados idênticos foram obtidos no cobaia.

O soro específico com mais de 100 D. M. I./c. c., *in vitro*, por razão análoga, não alterava a evolução da infecção quando ministrado

QUADRO 19

ESTIRPES DE *L. MONOCYTOGENES*

Relação imunológica

In vivo

Contraprova estirpes	IMUNIZAÇÃO ACTIVA (a) estirpes							
	Camarate		Thiery		Weybridge		Chinchila	
	morta	viva	morta	viva	morta	viva	morta	viva
Camarate	—	+	—	+	—	+	—	+
Thiery	—	+	—	+	—	+	—	+
Weybridge ...	—	+	—	+	—	+	—	+
Sintra	—	+	—	+	—	+	—	+
Sintra-s	—	+	—	+	—	+	—	+
Mortágua	—	+	—	+	—	+	—	+
Chinchila	—	+	—	+	—	+	—	+
Bragança	—	+	—	+	—	+	—	+

+ = protecção 75 %

— = protecção < 25 %

(a) No ratinho — 2.5.2.2

juntamente com a dose infectante. O mesmo ocorria no caso da aplicação do soro anteceder a inoculação daquela cultura.

Os anticorpos circulantes exercem, da mesma forma, acção imunológica sobre a *L. monocytogenes*, mas esta resiste na célula e aí se multiplica. Daí a imunidade específica ser essencialmente de origem celular.

3.4.4 — *P. MULTOCIDA*

A partir de 1946 começaram a ser verificadas *in vitro*, sob o ponto de vista imunológico, estirpes de *P. multocida* isoladas de diferentes espécies animais. Logo se notaram divergências de comportamento das estirpes, em anti-soros preparados em coelhos, não se observando assim a uniformidade de tipo imunológico das estirpes de *B. anthracis* e *E. rhusiopathiae*. Estava-se, portanto, em presença de tipos imunológicos diversos de *P. multocida*.

A diversidade de tipos imunológicos das estirpes de *P. multocida* justificava a divergência de resultados obtidos na experiência de campo nos diversos países e, portanto, as opiniões contraditórias registadas na literatura da especialidade acerca do valor dos soros e vacinas na profilaxia e terapêutica dos processos em que aqueles agentes intervêm.

São várias as classificações das estirpes de *P. multocida* que têm sido estabelecidas por vários autores, umas baseadas em reacções bioquímicas, outras em reacções sorológicas — HUDSON (1959); contudo, a identificação sob o ponto de vista imunológico, apesar de LIGNIÈRES já em 1906 a ter sugerido, só mais tarde veio a ser iniciada por ROBERTS (1947) com a identificação dos tipos I - II - III e IV. Posteriormente, HUDSON (1954), individualiza o tipo V e confirma a existência dos tipos já descritos por ROBERTS. Daí em diante começou a aparecer na literatura referência à identificação imunológica das estirpes de *P. multocida* em vários países, visando a profilaxia das pasteureloses — BAIN (1954, 1955, 1958, 1963), REPORT (1959, 1962).

A diversidade de tipos imunológicos das estirpes de *P. multocida*, assim assinalada, vinha também entre nós desde há muito a verificar-se, *in vitro* e *in vivo*, o que justificava que se procedesse a trabalhos de identificação para, com base neles, se poder estabelecer uma profilaxia adequada e eficaz contra as pasteureloses no nosso país.

O estudo iniciado em 1957 com a identificação imunológica, segundo o método de ROBERTS (1947), das estirpes existentes no Serviço, e isoladas principalmente na área atribuída ao L. N. I. V., foi mais tarde alargado às estirpes provenientes das diferentes espécies animais em todo o país, visando, como se disse, a profilaxia das pasteureloses animais pela aplicação de soros e vacinas e incluído no programa previsto no II Plano de Fomento Nacional — Investigação Aplicada ao Fomento Nacional — 1959-1964.

No estudo realizado, AFONSO *et al* (1964 a), confirma-se a existência de vários tipos imunológicos das estirpes de *P. multocida*, assinalam-se os tipos I, II e V, identifica-se o tipo VI, analisam-se as relações imunológicas entre os tipos I e VI, II e IV, e reconhece-se a existência de outros tipos a identificar.

QUADRO 20

ESTIRPES DE *P. MULTOCIDA*

Identificação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>P. multocida</i>	IN VITRO						IN VIVO (a)
	Soros específicos Tipos						Tipos imunológicos
	I (P 29)	II (229)	III (P ₈)	IV (P ₁₂)	V (P ₁)	VI (S ₄)	
SS — 49	—	+	—	±	—	—	II
SP ₁	—	—	—	—	+	—	V
SP ₂	—	—	—	—	—	—	—
SM	+	—	—	—	—	±	I
SE ₁	+	—	—	—	—	±	I
SE ₂	+	—	—	—	—	±	I
S ₁	+	—	—	—	—	±	I
S ₂	±	—	—	—	—	+	VI
S ₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₄	±	—	—	—	—	+	VI
S ₅	±	—	—	—	—	+	VI
S ₆	—	—	—	—	—	—	—
S ₇	—	—	—	—	—	—	—
S ₈	—	—	—	—	—	—	—
S ₉	±	—	—	—	—	+	VI
S ₁₀	±	—	—	—	—	+	VI
S ₁₁	±	—	—	—	—	+	VI
S ₁₂	±	—	—	—	—	+	VI
S ₁₃	±	—	—	—	—	+	VI
S ₁₄	±	—	—	—	—	+	VI

QUADRO 20

(continuação)

Estirpes de <i>P. multocida</i>	IN VITRO						IN VIVO (a)
	Soros específicos Tipos						
	I (P 29)	II (229)	III (P ₈)	IV (P ₁₂)	V (P ₁)	VI (S ₄)	Tipos imunológicos
S ₁₅	—	—	—	—	—	—	—
S ₁₆	—	—	—	—	—	—	—
S ₁₇	±	—	—	—	—	+	VI
S ₁₈	—	—	—	—	—	—	—
S ₁₉	—	—	—	—	—	—	—
S ₂₀	—	—	—	—	—	—	—
S ₂₁	—	—	—	—	—	—	—
S ₂₂	—	—	—	—	—	—	—
S ₂₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₂₄	—	—	—	—	—	—	—
S ₂₅	—	—	—	—	—	—	—
S ₂₆	—	—	—	—	—	—	—
S ₂₇	±	—	—	—	—	+	VI
S ₂₈	±	—	—	—	—	+	VI
S ₂₉	±	—	—	—	—	+	VI
S ₃₀	±	—	—	—	—	+	VI
S ₃₁	—	—	—	—	—	—	—
S ₃₂	—	—	—	—	—	—	—
S ₃₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₃₄	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO 20

(continuação)

Estirpes de <i>P. multocida</i>	IN VITRO						IN VIVO (a)
	Soros específicos Tipos						
	I (P 29)	II (229)	III (P ₈)	IV (P ₁₂)	V (P ₁)	VI (S ₄)	
S ₃₅	±	—	—	—	—	+	VI
S ₃₆	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₃₇	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₃₈	—	—	—	—	—	—	—
S ₃₉	±	—	—	—	—	+	VI
S ₄₀	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₄₁	—	—	—	—	—	—	—
S ₄₂	—	—	—	—	—	—	—
S ₄₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₄₄	—	—	—	—	—	—	—
S ₄₅	—	—	—	—	—	—	—
S ₄₆	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₄₇	—	—	—	—	—	—	—
S ₄₈	—	—	—	—	—	—	—
S ₄₉	—	—	—	—	—	—	—
S ₅₀	—	—	—	—	—	—	—
S ₅₁	—	—	—	—	—	—	—
S ₅₂	—	—	—	—	+	—	V
S ₅₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₅₄	—	—	—	—	—	—	(b)

QUADRO 20

(continuação)

Estirpes de <i>P. multocida</i>	IN VITRO						IN VIVO (a)
	Soros específicos Tipos						
	I (P 29)	II (229)	III (P ₃)	IV (P ₁₂)	V (P ₁)	VI (S ₄)	Tipos imunológicos
S ₅₅	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₅₆	±	—	—	—	—	+	VI
S ₅₇	±	—	—	—	—	+	VI
S ₅₈	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₅₉	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₆₀	—	+	—	±	—	—	II
S ₆₁	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₆₂	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₆₃	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₆₄	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₆₅	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₆₆	—	—	—	—	+	—	V
S ₆₇	+	—	—	—	—	±	I
S ₆₈	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₆₉	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₇₀	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₇₁	—	—	—	—	—	—	—
S ₇₂	—	—	—	—	—	—	—
S ₇₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₇₄	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO 20

(continuação)

Estirpes de <i>P. multocida</i>	IN VITRO						IN VIVO (a)
	Soros específicos Tipos						
	I (P 29)	II (229)	III (P ₅)	IV (P ₁₂)	V (P ₁)	VI (S ₄)	Tipos imunológicos
S ₇₅	—	—	—	—	+	—	V
S ₇₆	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₇₇	—	—	—	—	—	—	—
S ₇₈	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₇₉	±	—	—	—	—	+	VI
S ₈₀	±	—	—	—	—	+	VI
S ₈₁	—	—	—	—	—	—	—
S ₈₂	—	—	—	—	—	—	—
S ₈₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₈₄	±	—	—	—	—	+	VI
S ₈₅	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₈₆	±	—	—	—	—	+	VI
S ₈₇	—	—	—	—	—	—	—
S ₈₈	—	—	—	—	—	—	—
S ₈₉	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₉₀	—	—	—	—	—	—	—
S ₉₁	—	—	—	—	—	—	—
S ₉₂	—	—	—	—	—	—	—
S ₉₃	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₉₄	—	—	—	—	—	—	(b)

QUADRO 20

(continuação)

Estirpes de <i>P. multocida</i>	IN VITRO						IN VIVO (a)
	Soros específicos Tipos						Tipos imunológicos
	I (P 29)	II (229)	III (P ₃)	IV (P ₁₂)	V (P ₁)	VI (S ₄)	
S ₉₅	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₉₆	—	—	—	—	—	—	—
S ₉₇	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₉₈	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₉₉	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₀₀	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₀₁	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₀₂	—	—	—	—	—	—	—
S ₁₀₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₁₀₄	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₀₅	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₀₆	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₀₇	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₀₈	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₀₉	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₁₀	—	—	—	—	—	—	(b)
S ₁₁₁	±	—	—	—	—	+	VI
S ₁₁₂	—	—	—	—	—	—	—
S ₁₁₃	—	—	—	—	—	—	—
S ₁₁₄	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO 20

(continuação)

Estirpes de <i>P. multocida</i>	IN VITRO						IN VIVO (a)
	Soros específicos Tipos						Tipos imunológicos
	I (P 29)	II (229)	III (P ₈)	IV (P ₁₂)	V (P ₁)	VI (S ₄)	
S ₁₁₅	—	—	—	—	—	—	—
O ₁	—	—	—	—	—	—	—
O ₂	—	—	—	—	—	—	(b)
O ₃	—	—	—	—	—	—	—
O ₄	—	—	—	—	—	—	—
O ₅	—	—	—	—	—	—	—
B ₁	±	—	—	—	—	+	VI
B ₂	±	—	—	—	—	+	VI
B ₃	—	—	—	—	—	—	—
B ₄	±	—	—	—	—	+	VI
B ₅	±	—	—	—	—	+	VI
B ₆	—	—	—	—	—	—	—
G ₁	—	—	—	—	—	—	—
G ₂	—	—	—	—	—	—	—
G ₃	—	—	—	—	—	—	—
C ₁	—	—	—	—	—	—	—
P ₁	—	—	—	—	—	—	—

+ = Tipo imunológico.

± = Relação imunológica.

— = Sem relação imunológica.

B = bovino.

C = coelho.

G = galinha.

O = ovino.

P = pombo.

S = suíno.

(a) Afonso et al (1964 a).

(b) Não realizada — estirpe avirulenta.

Tinha estudado *in vitro* as mesmas estirpes sob o ponto de vista imunológico — Quadro 20 — concordando os resultados com os obtidos *in vivo*. Foram ainda apreciadas *in vitro*, com o mesmo objectivo, estirpes *P. multocida* cuja virulência para o ratinho não permitira o seu estudo *in vivo* — Quadro 20. Elevado número de estirpes pertencem, como se pode verificar da consulta do mesmo quadro, a outros tipos imunológicos, a identificar, prosseguindo os estudos nesse sentido.

Como acontece em relação a outros agentes bacterianos observa-se maior uniformidade de tipos imunológicos entre estirpes de *P. multocida* de elevada virulência, isoladas de processos agudos septicémicos — estirpes dos tipos I e VI — Quadro 20, que entre estirpes de fraca virulência, procedentes na sua maior parte de focos pulmonares de suínos mortos pela peste.

A diversidade de tipos imunológicos de *P. multocida* torna necessária a caracterização prévia da espécie, procedendo-se seguidamente à identificação imunológica das estirpes. A técnica de identificação imunológica *in vitro*, dada a concordância dos seus resultados com os obtidos *in vivo* — Quadro 20 — deverá ser o processo a utilizar nesse sentido, não só pela sua simplicidade, rapidez e economia, mas ainda por possibilitar o estudo de estirpes, independentemente da sua virulência, o que não é viável com o método *in vivo*.

Em relação às estirpes de *P. multocida* igualmente se verifica diversidade antigénica dentro do mesmo tipo imunológico — REPORT (1959, 1962).

São transcritos também no Quadro 20 os resultados dos ensaios realizados *in vivo* com as mesmas estirpes, AFONSO *et al* (1964 a), por amável deferência dos outros participantes no trabalho.

3.4.5 — BRUCELLA

Foi também estudado *in vivo* o comportamento imunológico da *Bruceella*, agente bacteriano patogénico do homem, ELBERG (1964), e dos animais, STABLEFORT (1959), e que compreende as espécies *melitensis*, *abortus* e *suis*.

In vivo, parece haver imunidade cruzada entre as estirpes de *Br. melitensis* e *Br. abortus*, REPORT (1964), RENOUX *et al* (1964), o que leva a admitir um só tipo imunológico.

As diferenças sorológicas verificadas, principalmente de natureza quantitativa, são mais acentuadas entre estirpes de *Br. melitensis* e *Br. abortus*, o que permite facilmente a sua identificação com soros aglutinantes mono-específicos.

O mesmo não acontece com as estirpes de *Br. abortus* e *Br. suis*, dada a sua maior semelhança antigénica. Dentro de cada espécie de *Brucella* parece haver também uniformidade de tipo sorológico, embora se verifique maior complexidade antigénica na gel difusão.

Esta estabilidade sorológica resultaria, possivelmente, da estrita patogeneidade e da natureza da infecção.

A imunidade celular constitui o principal factor da resistência específica, cabendo aos anticorpos circulantes intervenção de menor relevo. A *Brucella* possui capacidade de sobrevivência e de multiplicação intracelular. A imunidade passiva não pode ser obtida por meio de soro imune, mas sim pela intervenção de células imunes. A diferença no grau de resistência conferida por vacinas mortas e vivas resultaria, essencialmente, da criação da imunidade celular sob a acção dos agentes vivos — SUTER e RAMSEIR (1964), MACKANESS (1964).

O conhecimento do comportamento imunológico da *Brucella* sob a acção do soro específico, *in vitro*, reveste-se, neste caso, do maior interesse.

Assim, as estirpes de *Br. melitensis* 53H38, *Br. abortus* 99, *Br. abortus* 19, *Br. suis* 1330 e *R₆, var. rugosa* da *Br. melitensis* 53H38, foram submetidas, *in vitro*, à acção de soros específicos obtidos de cobaias, e de coelhos hiperimunizados, quer com culturas desvitalizadas pelo formol, quer com culturas vivas, mas apenas das estirpes *Br. abortus* 99, *Br. abortus* 19 e *R₆*.

A acção imunológica exercia-se também sobre as estirpes de *Brucella*, o que permitia mais a verificação da relação imunológica entre as estirpes de *Br. melitensis*, *Br. abortus* e *Br. suis*, em concordância com resultados de imunidade cruzada obtidos na experimentação *in vivo*.

A acção imunológica dos soros específicos preparados com culturas vivas era contudo mais acentuada. A observação microscópica era feita

depois de 16 a 24 horas, dado o ritmo mais lento do crescimento das estirpes de *Brucella*; às 48 horas, havia já intensa aglutinação das culturas.

Da diferença de crescimento das estirpes de *Brucella*, dentro do mesmo tipo imunológico, resulta variação da D. M. I., cuja amplitude sòmente pode ser devidamente considerada pelo recurso aos métodos de análise estatística.

A verificar-se identidade imunológica nas estirpes de *Brucella* — *melitensis*, *abortus* e *suis* — como tudo leva a crer, a respectiva caracterização *in vitro* corresponderá ao diagnóstico bacteriológico.

Notavam-se, contudo, diferenças mais acentuadas no comportamento imunológico das estirpes de *Br. melitensis*, *Br. abortus* e *Br. suis* em relação à R_6 ; sobre esta, os soros específicos daquelas estirpes lisas exerciam reduzida acção imunológica, a par de certo grau de aglutinação. Por sua vez, o soro específico da R_6 exercia reduzida acção sobre as mencionadas estirpes lisas de *Brucella*. Em relação a estas, a diferença de comportamento imunológico, *in vitro*, da R_6 era mais acentuada com soros específicos preparados com suspensões desvitalizadas, o que se harmoniza com os resultados observados *in vivo* — JONES e ALTON (1956), JONES *et al* (1958 a e b).

In vitro, a utilização de meios com soro de animais susceptíveis à infecção reduzirá a variação S-R, permitindo uma melhor apreciação de acção imunológica.

In vivo, o soro específico com mais de 100 DMI/c. c., administrado prèviamente e durante os primeiros dias após a inoculação da *Brucella*, não alterava significativamente a evolução da infecção no cobaia em relação às testemunhas, nem mesmo quando a dose infectante era incorporada no respectivo soro.

Confirma-se, assim, mais uma vez, que a imunidade específica é, na realidade, essencialmente de natureza celular.

3.4.6 — SALMONELLA

O esquema sorológico de KAUFFMANN-WHITE constitui a base fundamental da identificação das estirpes de *Salmonella*. Os sorotipos são ainda sub-divididos em tipos bioquímicos — KAUFFMANN (1954).

Este processo, bastante preciso, tem-se revelado da maior utilidade na identificação das estirpes de *Salmonella* e, em referência às analisadas — 3.3 — Quadros 15, 16 e 17 — correspondia ao tipo imunológico. De facto, verificou-se que, se idênticos sorotipos divergiam imunologicamente, as estirpes do mesmo sorotipo e tipo bioquímico comportavam-se de maneira similar *in vitro* sob a acção dos respectivos anti-soros, não sendo significativas as diferenças por vezes verificadas — variação da DMI inferior a $2 \times$ — isto é, pertenciam ao mesmo imunotipo.

Da variação flagelar nas estirpes de *S. cholerae suis* e *S. cholerae suis* var. *kunzendorf* parecia não derivarem diferenças representativas do tipo imunológico; outro tanto não sucedia com a variação na forma V-W da *S. paratyphi C* e *S. typhi*, donde podem resultar dissemelhanças significativas, como ficou explícito — 3.3. — Quadros 16 e 17.

Em relação às estirpes de *Salmonella*, a variação da D. M. I. $2 \times$ parece já ser indicativa de diferença de tipo imunológico e, dentro deste princípio foram estudadas *in vitro* diversas estirpes de *S. typhimurium*, *S. typhi suis*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum* e *S. pullorum*.

Não se observaram, *in vitro*, diferenças imunológicas significativas nestas estirpes, sendo contudo mais acentuadas as divergências nas estirpes de *S. typhi suis* e *S. pullorum*, dada a modalidade do seu crescimento mais lento — maior grandeza das bactérias, inicialmente em pequenas cadeias — elementos estes tidos em atenção na interpretação dos resultados conforme o estudo realizado nesse sentido — 3.3 — Quadros 17 e 17.

3.4.7 — E. COLI

O esquema sorológico de KAUFFMANN-KNIPSCHILDT-VAHLNE constitui presentemente a base fundamental da identificação das estirpes de *E. coli* — KAUFFMANN (1954). As provas bioquímicas são de limitado valor para fins de diferenciação, salvo dentro dos mesmos sorotipos. Elevado número destes têm sido já assinalados, e outros vão surgindo à medida que se vão processando os estudos de identificação sorológica do *E. coli*, em consequência da complexa e heterogénea estrutura antigénica resultante da variabilidade das estirpes em relação ao ambiente — DUMAS (1959).

Largamente distribuído na natureza, o *E. coli* é agente normal da flora intestinal do homem e dos animais. Atribui-se-lhe, contudo, acção patogénica em frequentes afecções nessas mesmas espécies, principalmente nas crianças, KAUFFMANN (1954), e animais jovens, LOVELL (1959). É frequente também a sua participação em processos infecciosos das vias urinárias no homem.

A maior heterogeneidade de sorotipos é constatada na flora normal do intestino do homem e animais, podendo no mesmo indivíduo verificar-se a existência simultânea de diferentes deles. Embora variando constantemente, a coliflora intestinal mostra, contudo, a presença de alguns sorotipos durante apreciáveis lapsos de tempo. Outros, pelo contrário, evidenciam-se apenas em curtos períodos — KAUFFMANN (1954), LOVELL (1959).

Verifica-se maior uniformidade de sorotipos nos estirpes de *E. coli* isoladas de material patológico que nas de origem fecal. O mesmo se regista em relação à O inaglutinabilidade cuja incidência é mais elevada também nas estirpes isoladas de material patológico que nas de normal — KAUFFMANN (1954), LOVELL (1959).

Determinados sorotipos de *E. coli* estão associados com processos intestinais das crianças e animais jovens, atribuindo-se-lhes, por esta razão, acção patogénica e significado epidemiológico.

Desconhece-se ainda a relação entre sorotipo e imunotipo. Tem-se verificado, contudo, em estudos já realizados neste sentido, certa conexão entre testes de precipitação e aglutinação do antigénio K e testes de protecção no ratinho — BRIGGS (1951), BRIGGS *et al* (1951); assim, a presença da aglutininas K de determinada estirpe de *E. coli* estaria relacionada com a protecção contra essa mesma estirpe — LOVELL (1959).

Dada a crescente incidência do *E. coli* nos processos infecciosos humanos e dos animais — que nas crianças e animais jovens, suínos e bovinos, chega a atingir expansão epidémica — considera-se da maior importância, com vista à imunoprofilaxia, que se proceda à identificação imunológica das estirpes que nos mesmos intervêm. Pensa-se poder iniciar esse estudo num futuro próximo, tendo sido já proposta a sua realização ao abrigo do III Plano de Fomento Nacional — 1968-1973.

Antes, porém, e sem outra finalidade que não fosse a de demonstrar a possibilidade de identificar imunologicamente *in vitro* estirpes de *E. coli*, de estrutura antigénica complexa e da maior heterogeneidade, e ainda estirpes na sua maioria avirulentas para os animais de experiência em condições normais, submeteram-se à acção de anti-soros, preparados em coelhos, dezenas de estirpes, quer de origem humana quer procedentes de diferentes espécies animais. Umas eram isoladas de processos infecciosos de que pareciam ser as responsáveis; outras, e estas eram a maioria, provinham de vísceras de animais mortos por diferentes causas, sendo por isso consideradas agentes banais de conspurcação. Estas estirpes de diferentes tipos bioquímicos, KAUFFMANN (1954), não foram analisadas sorologicamente.

O Quadro 21 inclui os resultados obtidos com estirpes de *E. coli* isoladas de material proveniente de processos infecciosos — cistites humanas, enterites de leitões e vitelos, e coli-granuloma da galinha ou doença de HJÄRRE e WRAMBY (1945). Verifica-se relação imunológica entre algumas estirpes de origem suína e bovina. A estirpe G-m 1 isolada do coli-granuloma da galinha — comportava-se de maneira idêntica à estirpe G-m 67, de origem sueca e procedente de aves atingidas pela mesma doença.

Por sua vez, o Quadro 22 apresenta os resultados obtidos com estirpes de *E. coli* provenientes de vísceras de suínos mortos pela peste. Estas estirpes foram também submetidas à acção dos anti-soros S₉ e B₄ (Ref.^a Quadro 21) para investigar na flora normal o grau de distribuição destes tipos imunológicos relacionados com processos intestinais.

Os antisoros exerciam apenas acção imunológica sobre as estirpes homólogas, o que evidencia a grande diversidade de tipos imunológicos das estirpes de *E. coli*.

Quanto ao Quadro 23, consigna os resultados obtidos com estirpes não mucoides de *E. coli*, isoladas de vísceras de galinhas mortas pela Newcastle. Estas estirpes foram também submetidas à acção dos anti-soros «G-m 1», «G-m 67» (Ref.^a Quadro 21) e «G-67», para se avaliar, na flora normal, o grau de distribuição destes tipos imunológicos relacionados ao coli-granuloma. Os soros específicos apenas exerciam acção imunológica sobre as estirpes homólogas. Tão pouco se verificou na flora normal qual-

QUADRO 21

ESTIRPES DE *E. COLI*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>E. Coli</i>	SOROS ESPECÍFICOS				
	H ₁	B ₄	G-m 1	G-m 67	S ₉
H ₁	+	—	—	—	—
H ₂	—	—	—	—	—
H ₃	—	—	—	—	—
H ₄	—	—	—	—	—
H ₅	—	—	—	—	—
B ₄	—	+	—	—	—
B ₆	—	—	—	—	—
B ₈	—	—	—	—	—
B ₉	—	—	—	—	—
B ₁₀	—	—	—	—	—
B ₁₁	—	+	—	—	—
B ₁₂	—	—	—	—	—
G-m 1	—	—	+	+	—
G-m 67	—	—	+	+	—
S ₄	—	+	—	—	—
S ₆	—	+	—	—	—
S ₈	—	+	—	—	—
S ₉	—	—	—	—	+
S ₁₀	—	—	—	—	+
S ₁₂	—	—	—	—	—

+ = Tipo imunológico.

— = Sem relação imunológica.

H = de Homem.

B = de bovino.

G = de galinha.

S = de suíno.

QUADRO 22
ESTIRPES DE *E. COLI*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>E. Coli</i>	SOROS ESPECÍFICOS				
	S ₉	S ₁₅	S ₂₀	S ₂₅	B ₄
S ₉	+	—	—	—	—
S ₁₅	—	+	—	—	—
S ₁₆	—	—	—	—	—
S ₁₇	—	—	—	—	—
S ₁₈	—	—	—	—	—
S ₁₉	—	—	—	—	—
S ₂₀	—	—	+	—	—
S ₂₁	—	—	—	—	—
S ₂₂	—	—	—	—	—
S ₂₃	—	—	—	—	—
S ₂₄	—	—	—	—	—
S ₂₅	—	—	—	+	—
S ₂₆	—	—	—	—	—
S ₂₇	—	—	—	—	—
S ₂₈	—	—	—	—	—
S ₂₉	—	—	—	—	—
S ₀₃	—	—	—	—	—
S ₃₁	—	—	—	—	—
S ₃₂	—	—	—	—	—
B ₄	—	—	—	—	+

+ = Tipo imunológico.

— = Sem relação imunológica.

B = de bovinos.

S = de suínos.

quer estirpe do mesmo tipo imunológico da G-m 1 e G-m 67, do coli-granuloma.

Estes resultados mostram a grande diversidade de tipos imunológicos de *E. coli* e estão de acordo com a heterogeneidade de sorotipos largamente referidos na literatura da especialidade — KAUFFMANN (1954), LOVELL (1959),

Dentro desta diferenciação observa-se certa relação entre determinados tipos e a natureza do processo infeccioso por que são responsáveis. A este respeito é bastante significativa a identidade imunológica verificada entre a estirpe G-m 1 — única estirpe do coli-granuloma existente no Serviço — isolada em Portugal, e a estirpe G-m 67, originária de outro país, a partir de processos da mesma natureza, ou seja do coli-granuloma da galinha.

A identidade de tipos imunológicos de estirpes como estas, isoladas em países tão distantes e em épocas diferentes, poderá ainda significar uniformidade de tipo imunológico das estirpes do *E. coli* responsáveis pelo coli granuloma da galinha. Mas se o número tão reduzido de apenas duas estirpes é desprovido de qualquer valor probatório neste sentido, pelo menos é bastante indicativo do limitado número de tipos imunológicos do *E. coli* relacionados com a referida doença, salvo se se trata de pura coincidência, ainda menos de admitir.

HJÄRRE e WRAMBY (1945), referem-se a diferentes tipos bioquímicos e sua correspondência sorotípica em estirpes de *E. coli* isoladas do coli-granuloma da galinha. Mas dissemelhanças bioquímicas e sorológicas podem existir dentro do mesmo tipo imunológico, como se verificou no decorrer do estudo das estirpes de *Salmonella* 3.3 — e é do conhecimento geral, principalmente em relação a espécies bacterianas homogêneas sob o ponto de vista imunológico.

Em processos da mesma natureza parece ainda haver predominância de certos tipos sorológicos em relação com a espécie animal KAUFFMANN (1954), LOVELL (1959). Mas sorotipo nem sempre corresponde a imunotipo, como se disse, havendo, contudo, mais íntima correspondência entre estirpes do mesmo sorotipo e biotipo, como se viu — 3.3 — tor-

QUADRO 23

ESTIRPES DE *E. COLI*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>E. Coli</i>	SOROS ESPECÍFICOS				
	G-m1	G-m67	G-67	G ₁	G ₂
G-m1	+	+	—	—	—
G-m67	+	+	—	—	—
G-67	—	—	+	—	—
G ₁	—	—	—	+	—
G ₂	—	—	—	—	+
G ₃	—	—	—	—	—
G ₄	—	—	—	—	—
G ₅	—	—	—	—	—
G ₆	—	—	—	—	—
G ₇	—	—	—	—	—
G ₈	—	—	—	—	—
G ₉	—	—	—	—	—
G ₁₀	—	—	—	—	—
G ₁₁	—	—	—	—	—
G ₁₂	—	—	—	—	—
G ₁₃	—	—	—	—	—
G ₁₄	—	—	—	—	—
G ₁₅	—	—	—	—	—
G ₁₆	—	—	—	—	—
17	—	—	—	—	—

+ = Tipo imunológico

— = Sem relação imunológica

G = de galinhas;

M = mucóide

nando-se necessária na imunoprofilaxia a identificação imunológica das estirpes.

A acção imunológica *in vitro* constitui também no *E. coli* a técnica da eleição para esse fim, não só pela sua simplicidade, mas, principalmente, por a maioria das estirpes serem avirulentas para os animais de experiência.

3.4.8 — A. AEROGENES

Várias estirpes de *A. aerogenes*, isoladas do conteúdo intestinal de animais de diferentes espécies, mortos por outras causas, foram submetidas à acção de anti-soros preparados em coelhos com as estirpes O₁, S₁, C₁ e G₁ — Quadro 24. Os anti-soros apenas exerciam acção imunológica sobre as estirpes homólogas, traduzindo assim larga diversidade de imunotipos nesta espécie bacteriana.

Às estirpes ensaiadas, classificadas bioquimicamente, BREED *et al* (1957 — Bergey's Manual), não foi feito qualquer estudo sorológico. Sabe-se que nem sempre é possível diferenciar bioquimicamente estirpes de *Klebsiella pneumoniae* de estirpes normalmente classificadas como *A. aerogenes*, BREED *et al* (1957 — Bergey's Manual), facto este que levou KAUFFMANN (1954) a incluí-las, na sua totalidade, no mesmo grupo *Klebsiella*. Tal não era ignorado ao denominar-se de *A. aerogenes* as estirpes classificadas bioquimicamente e ensaiadas *in vitro* — Quadro 24 — para o que concorria também a sua proveniência. Mas a finalidade do ensaio visa principalmente mostrar a possibilidade de identificar imunologicamente *in vitro* estirpes desta natureza, quase sempre avirulentas para os animais de experiência.

KAUFFMANN (1954), incluindo estas estirpes no grupo *Klebsiella*, como ficou dito, procede à sua identificação bioquímica e sorológica, assinalando grande diversidade de sorotipos.

A estas estirpes é atribuída acção patogénica na espécie humana — KAUFFMANN (1954), e nas espécies animais, LOVELL (1959), donde a importância da sua identificação imunológica.

QUADRO 24

ESTIRPES DE *A. AEROGENES*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>A. aerogenes</i>	SOROS ESPECÍFICOS			
	C ₁	G ₁	O ₁	S ₁
C ₁	+	—	—	—
C ₂	—	—	—	—
C ₃	—	—	—	—
C ₄	—	—	—	—
C ₅	—	—	—	—
G ₁	—	+	—	—
G ₂	—	—	—	—
G ₃	—	—	—	—
G ₄	—	—	—	—
G ₅	—	—	—	—
O ₁	—	—	+	—
O ₂	—	—	—	—
O ₃	—	—	—	—
O ₄	—	—	—	—
O ₅	—	—	—	—
S ₁	—	—	—	+
S ₂	—	—	—	—
S ₃	—	—	—	—
S ₄	—	—	—	—
S ₅	—	—	—	—

+ = Tipo imunológico

— = Sem relação imunológica

C = de coelho;

G = de galinha;

O = de ovino;

S = de suíno

3.4.9 — A. CLOACAE

Estirpes de *A. cloacae*, classificadas bioquimicamente, BREED *et al* (1957 — *Bergey's Manual*), isoladas do conteúdo intestinal de animais de diferentes espécies, mortos por outras causas, foram submetidas *in vitro* à acção de soros específicos preparados em coelhos com as estirpes O₁, S₁, C₁ e G₁ — Quadro 25 — o que permitiu relevar a heterogeneidade de imunotipos, uma vez que os anti-soros apenas exerciam acção imunológica sobre as estirpes homólogas.

O estudo sorológico das estirpes *A. cloacae* não tem sido feito em larga escala, não havendo ainda, presentemente, esquema de identificação desta espécie bacteriana.

Normalmente é considerado agente banal de conspurcação, atribuindo-se-lhe apenas, em condições especiais, acção patogénica. DUMAS (1959). Sempre que for julgada necessária a identificação imunológica destas estirpes, a técnica mais simples a empregar é a *in vitro* e, mesmo, a única viável, dada a avirulência da maioria delas.

3.4.10 — P. VULGARIS E P. MIRABILIS

Estirpes de *P. vulgaris* e *P. Mirabilis*, isoladas do homem e de animais de diferentes espécies, foram submetidas *in vitro* à acção dos soros específicos preparados em coelhos com estirpes das referidas espécies de *Proteus*. O Quadro 26 engloba os resultados obtidos com algumas dessas estirpes submetidas à acção dos anti-soros «H-m₁», «H-v₁», «C-v₁», «G-m₁» e «S-m₁». Verifica-se também grande heterogeneidade de tipos imunológicos, apenas a estirpe H-m₁ evidenciando relação imunológica com a estirpe H-m₃.

As estirpes de origem humana foram isoladas de urina de doentes com cistite, a elas se atribuindo a etiologia do processo. As outras estirpes provinham de vísceras de animais mortos por causas determinadas, sendo consideradas agentes banais de conspurcação.

Isolava-se com maior frequência o *P. mirabilis* que o *P. vulgaris*, facto este já assinalado na literatura — DUMAS (1959), KAUFFMANN (1954).

QUADRO 25
ESTIRPES DE *A. CLOACAE*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>A. cloacae</i>	SOROS ESPECÍFICOS			
	C ₁	G ₁	O ₁	S ₁
C ₁	+	—	—	—
C ₂	—	—	—	—
C ₃	—	—	—	—
C ₄	—	—	—	—
C ₅	—	—	—	—
G ₁	—	+	—	—
G ₂	—	—	—	—
G ₃	—	—	—	—
G ₄	—	—	—	—
G ₅	—	—	—	—
O ₁	—	—	+	—
O ₂	—	—	—	—
O ₃	—	—	—	—
O ₄	—	—	—	—
O ₅	—	—	—	—
S ₁	—	—	—	+
S ₂	—	—	—	—
S ₃	—	—	—	—
S ₄	—	—	—	—
S ₅	—	—	—	—

+ = Tipo imunológico

— = Sem relação imunológica

C = de coelho;

G = de galinha;

O = de ovino;

S = de suíno

Presentemente, a identificação das estirpes de *P. mirabilis* e *P. vulgaris* baseia-se no esquema sorológico de KAUFFMANN e PERCH, KAUFFMANN (1954), que inclui estas duas espécies por constituírem grupo uniforme. Por esta razão figuram no mesmo Quadro 26 estirpes de *P. vulgaris* e de *P. Mirabilis* e, por motivo análogo, foram submetidas à acção dos mesmos anti-soros.

A heterogeneidade de tipos imunológicos — Quadro 26 — está de acordo com a diversidade de sorotipos já apontados nas duas espécies de *Proteus*, KAUFFMANN (1954), e resulta da sua grande variabilidade antigénica em relação ao ambiente onde se encontram largamente distribuídas. São contudo responsáveis por processos infecciosos no homem e nos animais e certas estirpes possuem acção patogénica para animais de laboratório, principalmente o coelho e o cobaia — DUMAS (1959), KAUFFMANN (1954). Assinala-se também maior uniformidade de tipos sorológicos nas estirpes isoladas de processos infecciosos por elas originados.

A técnica de identificação imunológica *in vitro* mostra-se, como anteriormente, da maior utilidade em relação às estirpes destas espécies bacterianas, em especial quando avirulentas para os animais de experiência.

3.4.11 — PS. AERUGINOSA

A *Ps. aeruginosa*, espécie bacteriana saprofítica, muito disseminada na natureza, encontra-se normalmente na pele, cavidades naturais e intestino do homem e dos animais. Em determinadas condições estas estirpes de *Ps. aeruginosa* mostram-se patogénicas, originando diversos processos infecciosos.

Intervêm muitas vezes como agentes de infecção secundária em focos supurativos, quer superficiais, quer profundos — DUMAS (1959), WILSON e MILES (1955 b), SMITH e CONANT (1960).

Da alteração da flora bacteriana no organismo pela aplicação de antibióticos tem resultado, ultimamente, mais frequente e mais acentuada a intervenção da *Ps. aeruginosa* como agente secundário de infecção, dada a sua resistência àqueles fármacos. Daí, o interesse da identificação imu-

QUADRO 26

ESTIRPES DE *P. MIRABILIS* E *P. VULGARIS*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>P. mirabilis</i> e <i>P. vulgaris</i>	SOROS ESPECÍFICOS				
	H-m ₁	H-V ₁	C-V ₁	G-m ₁	S-m ₁
H-m ₁	+	—	—	—	—
H-m ₂	—	—	—	—	—
H-m ₃	±	—	—	—	—
H-V ₁	—	+	—	—	—
H-V ₂	—	—	—	—	—
C-m ₁	—	—	—	—	—
C-m ₂	—	—	—	—	—
C-m ₃	—	—	—	—	—
C-V ₁	—	—	+	—	—
C-V ₂	—	—	—	—	—
G-m ₁	—	—	—	+	—
G-m ₂	—	—	—	—	—
G-m ₃	—	—	—	—	—
G-v ₁	—	—	—	—	—
G-v ₂	—	—	—	—	—
S-m ₁	—	—	—	—	+
S-m ₂	—	—	—	—	—
S-m ₃	—	—	—	—	—
S-v ₁	—	—	—	—	—
S-v ₂	—	—	—	—	—

+ = Tipo imunológico

± = Relação imunológica

— = Sem relação imunológica

m = mirabilis

v = vulgaris

H = do Homem;

G = de galinha;

C = do coelho;

S = do suíno

nológica das estirpes da bactéria em causa; novamente, a técnica *in vitro* é de aplicar dada a sua fácil execução e tanto mais que é a única viável em face da avirulência do maior número dos componentes do grupo.

Diversas estirpes de *Ps. aeruginosa*, isoladas do homem e de animais de diferentes espécies, foram submetidas *in vitro* à acção dos anti-soros preparados em coelhos com as estirpes H₁, C₁, G₁, O₁ e S₂. Os resultados obtidos — Quadro 27 — põem em relevo a grande diversidade de imunotipos, apenas as estirpes H₁ e H₄, C₁ e C₃ mostrando conexões imunológicas. Não se exclui, contudo, a possibilidade destas estirpes relacionadas terem sido obtidas dos mesmos indivíduos, em diferentes estádios da evolução da doença.

A estirpes de origem humana foram isoladas de material proveniente de otites e conjuntivites; os de incidência canina, de lesões supuradas da pele e de otites; os de procedência ovina, de lesões supuradas cutâneas complicação da varíola experimental; e as referentes a suínos e galináceos, de visceras de animais mortos por outras causas.

Não existe ainda esquema sorológico que constitua base de identificação da *Ps. aeruginosa*. Os resultados dos estudos realizados nesse sentido mostram-se contraditórios. Contudo, pode verificar-se nalguns deles grande heterogeneidade de sorotipos DUMAS (1959), o que estaria de acordo com os resultados obtidos *in vitro* na identificação imunológica de diversas estirpes — Quadro 27 — onde se evidencia a diversidade de imunotipos.

O número reduzido de estirpes ensaiadas, aliado à diversidade de processos infecciosos e espécies animais donde foram isoladas, não permite qualquer conclusão acerca da relação entre imunotipo, natureza do processo, e espécie animal. Mas o objectivo destes ensaios visava, de preferência, demonstrar em mais uma ocasião a simplicidade e possibilidade de utilização desta técnica de identificação imunológica *in vitro*.

3.4.12 — A. MALLEI

Apenas a estirpe de *A. mallei* 3783, de proveniência estrangeira e utilizada na preparação de maleína no Serviço de Alergenos do L. N. I. V., foi estudada *in vitro* sob o ponto de vista imunológico.

QUADRO 27

ESTIRPES DE *PS. AERUGINOSA*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>Ps. aeruginosa</i>	SOROS ESPECÍFICOS				
	H ₁	C ₁	G ₁	O ₁	S ₁
H ₁	+	—	—	—	—
H ₂	—	—	—	—	—
H ₃	—	—	—	—	—
H ₄	±	—	—	—	—
C ₁	—	+	—	—	—
C ₂	—	—	—	—	—
C ₃	—	±	—	—	—
C ₄	—	—	—	—	—
Ch ₁	—	—	—	—	—
Ch ₂	—	—	—	—	—
Ch ₃	—	—	—	—	—
G ₁	—	—	+	—	—
G ₂	—	—	—	—	—
G ₃	—	—	—	—	—
O ₁	—	—	—	+	—
O ₂	—	—	—	—	—
O ₃	—	—	—	—	—
S ₁	—	—	—	—	+
S ₂	—	—	—	—	—
S ₃	—	—	—	—	—

+ = Tipo imunológico

± = Relação imunológica

— = Sem relação imunológica

H = do homem;

G = de galinha;

C = de canino;

O = de ovino;

Ch = de chinchila;

S = de suíno

Submetida à acção do respectivo anti-soro, preparado em coelho com culturas desvitalizadas pelo formol, sofria intensa acção imunológica que se verificava nas primeiras 8 horas de crescimento.

Assim, num período de algumas horas apenas, era também possível proceder à identificação imunológica *in vitro* de estirpes de *A. mallei*, sem recorrer a provas *in vivo* mais complexas, exigindo o mais estrito isolamento dado o perigo de contágio e suas graves complicações para o homem e animais susceptíveis, e nem sempre concludentes e exequíveis tendo em atenção a natureza da infecção experimental e a virulência das estirpes.

Não foi possível ajuizar-se das relações imunológicas entre as estirpes de *A. mallei*, dada a sua inexistência nos Serviços do L. N. I. V. Mas tratando-se duma espécie bacteriana estritamente patogénica, encontrando-se apenas no organismo infectado ou em material patológico dele proveniente, é natural que se verifique a uniformidade imunológica das estirpes nela incluídas, ou, quando muito, se constate a exiguidade do número de tipos.

As diferenças sorológicas apontadas nestas estirpes, DUMAS (1951—*mise à jour* 1958), MINETT (1959), podem enquadrar-se na uniformidade de tipo imunológico, como se sabe. São escassos e ainda contraditórios os resultados dos ensaios laboratoriais realizados nesse sentido, MINETT (1959), e a infecção natural não permitiu, através dos tempos, qualquer conclusão imunológica sobre as estirpes de *A. mallei*. Também são pouco numerosos e ainda discordantes os resultados dos estudos, no campo sorológico, efectuados com estas estirpes, não permitindo estabelecer uma base de identificação.

Indicam-se contudo 2 grupos sorológicos onde as estirpes ensaiadas parecem poder ser incluídas. As estirpes pertencentes a um dos grupos possuem antigénios comuns às estirpes de *Ps. pseudomallei*, MINETT (1959). Indicam-se também relações sorológicas com estirpes de *A. lignieresii* e *A. equuli*, BREED *et al* (1957 — *Bergey's Manual*).

A doença, devido às drásticas medidas de polícia sanitária levadas a efeito em Portugal, desde há muito que não se verifica, o mesmo sucede na maior parte dos outros países. Tem, por esta razão, diminuído a importância do estudo do *A. mallei*, agente etiológico dessa grave enfermi-

dade dos equídeos, transmissível ao homem e patogénica também para animais de laboratório. Contudo, alguma experimentação continua a ser feita, principalmente em Institutos daqueles países, em pequeno número aliás, onde a doença ainda se manifesta. Aí, pelo menos, a técnica de identificação imunológica *in vitro* poderá ser da maior utilidade, contribuindo para o melhor conhecimento das estirpes de *A. mallei* e da imunidade da doença por ele determinada.

3.4.13 — STREPTOCOCCUS

O *Streptococcus*, agente bacteriano largamente distribuído na natureza, é responsável por diversos processos infecciosos no homem, MAC CARTY (1964), e nos animais, STABLEFORTH (1959), de onde a importância da sua identificação imunológica.

A classificação que lhe respeita tem assentado principalmente em dados sorológicos, desde LANCEFIELD (1933); a do grupo baseia-se na presença de substâncias antigénicas de natureza polissacarídica — substância «C» do grupo-específico; a do tipo, dentro de cada grupo, fundamenta-se na presença de substância antigénica de natureza proteica ou polissacarídica — substância tipo-específico.

O tipo sorológico parece corresponder ao tipo imunológico, segundo testes de protecção, *in vivo*. Pouca relação tem sido verificada entre o tipo sorológico e a espécie definida por características bioquímicas. Por outro lado, tem-se registado a existência de antígenos tipo-específico comuns a estirpes pertencentes a grupos sorológicos diferentes.

É elevado o número de tipos sorológicos já assinalados dentro de cada grupo, o que torna praticamente difícil a imunoprofilaxia.

A acção imunológica exercida pelos soros específicos sobre as estirpes cujo crescimento, *in vitro*, se processa em cadeia, traduz-se, como se disse, no aumento da extensão desta; tal acontece com as estirpes de *Streptococcus*. Elevado número destas estirpes B. hemolíticas, isoladas do homem e de animais de diferentes espécies, foram também estudadas sob o ponto de vista imunológico, *in vitro*. No Quadro 28 são consignados os resultados alcançados com algumas estirpes procedentes de processos

QUADRO 28

ESTIRPES DE *STREPTOCOCCUS*

Relação imunológica

In vitro

Estirpes de <i>Streptococcus</i>	SOROS ESPECÍFICOS			
	H _{1a}	H _{2a}	H _{3a}	H _{4a}
H ₁ a	+	—	—	—
H ₁ b	+	—	—	—
H ₁ c	+	—	—	—
H ₂ a	—	+	—	—
H ₂ b	—	+	—	—
H ₃ a	—	—	+	—
H ₃ b	—	—	+	—
H ₃ c	—	—	+	—
H ₄ a	—	—	—	+
H ₄ b	—	—	—	+
H ₅	—	—	—	—
H ₆	—	—	—	—
H ₇	—	—	—	—
H ₈	—	—	—	—
H ₉	—	—	—	—
H ₁₀	—	—	—	—
H ₁₁	—	—	—	—
H ₁₂	—	—	—	—
H ₁₃	—	—	—	—
H ₁₄	—	—	—	—

+ = Relação imunológica.

— = Sem relação imunológica.

H = do homem.

a, b, c = indivíduos atingidos em cada surto.

amigdalíticos humanos, as quais foram submetidas, *in vitro*, à acção dos soros específicos preparados em coelhos com as estirpes H_{1a}, H_{2a}, H_{3a}, e H_{4a}, isoladas de indivíduos do mesmo agregado familiar. Nota-se relação imunológica nas estirpes isoladas do mesmo surto, traduzindo contágio entre os componentes do referido agregado num momento dado; contudo, diferem imunologicamente, com o intervalo de 1 a 2 anos, no mesmo agrupamento familiar. Do Quadro 29 constam os resultados obtidos com algumas estirpes isoladas de animais de diferentes espécies, submetidas a acção de soros específicos, preparados em coelhos, respectivamente, com as estirpes S₁, E₁, C_{a1}, C₁ e R₁. Esses soros exerciam apenas acção imunológicas sobre as estirpes correspondentes.

Os resultados confirmam igualmente a origem imunológica da extensão da cadeia sob a acção do soro tipo-específico e mostram também, simultaneamente, a grande diversidade de imunotipos. Há que ter do mesmo modo em conta na identificação imunológica *in vitro*, a natureza do crescimento destas estirpes.

Desconhece-se ainda variação da D. M. I. significativa de diferença de tipo imunológico, por se não terem realizado ensaios nesse sentido. Os métodos de análise estatística permitirão obter também na identificação imunológica destas estirpes, *in vitro*, resultados mais válidos, tal como o evidenciam HAHN e COLE (1962) a quando da apreciação da *long-chain reaction* — a reacção imunológica em causa — em estirpes de *Streptococcus* do grupo A, crescendo em soro tipo-específico.

A *long-chain reaction*, introduzida, como se referiu, por STOLLERMAN e EKSTEDT (1957) como teste de grande sensibilidade para pesquisa de anticorpos tipo-específicos das estirpes de *Streptococcus* do grupo A, dada a sua íntima relação com os resultados dos ensaios de soro-protecção, identifica também, consequentemente, a estirpe em face do soro tipo-específico conhecido.

A identificação imunológica das estirpes de *Streptococcus* baseada na variação da DMI em face do soro tipo-específico, controlada estatisticamente, evita o emprego de soros absorvidos como foram utilizados por STOLLERMAN e EKSTEDT (1957). A absorção, dada a natureza da acção imunológica — reacção antigénio-anticorpo, qualitativa-quantitativa, em

certa extensão na superfície bacteriana — pode, mais discriminadamente, delimitar os imunotipos, aumentando assim o seu número e afastando-se da realidade objectiva das observações *in vivo*.

Não se procedeu à classificação sorológica das estirpes de *Streptococcus* ensaiadas.

QUADRO 29

ESTIRPES DE *STREPTOCOCCUS*

Relação imunológica
in vitro

Estirpes de <i>Streptococcus</i>	SOROS ESPECÍFICOS				
	Ca ₁	C ₁	E ₁	R ₁	S ₁
Ca ₁	+	—	—	—	—
Ca ₂	—	—	—	—	—
Ca ₃	—	—	—	—	—
Ca ₄	—	—	—	—	—
C ₁	—	+	—	—	—
C ₂	—	—	—	—	—
C ₃	—	—	—	—	—
C ₄	—	—	—	—	—
E ₁	—	—	+	—	—
E ₂	—	—	—	—	—
E ₃	—	—	—	—	—
E ₄	—	—	—	—	—
R ₁	—	—	—	+	—
R ₂	—	—	—	—	—
R ₃	—	—	—	—	—
R ₄	—	—	—	—	—
S ₁	—	—	—	—	+
S ₂	—	—	—	—	—
S ₃	—	—	—	—	—
S ₄	—	—	—	—	—

+ = Tipo imunológico

— = Sem relação imunológica

Ca = de canino;

C = de coelho;

E = de equino

R = de ratinho;

S = de suíno.

Nas estirpes bacterianas que normalmente dividem apenas num plano, a acção imunológica traduz-se *in vitro* pelo crescimento em cadeia ou aumento da sua extensão, como tem vindo a ser assinalado. Faltava, por conseguinte, conhecer o comportamento imunológico *in vitro* de estirpes bacterianas que dividem normalmente em mais dum plano, dando origem a vários tipos de agregação dos seus elementos celulares nas culturas.

O estudo realizado neste sentido incidiu principalmente sobre estirpes de *St. aureus*, dada a sua importância na patologia humana, MORSE (1964), e animal, SMITH (1959). Nestas estirpes a divisão ocorre normalmente em 2 ou 3 planos, podendo verificar-se nas culturas líquidas elementos isolados, aos pares, tétradas, aglomerados irregulares de 5 ou 6 elementos, e pequenas cadeias cuja número de cocos raramente vai além de 8.

A acção imunológica traduz-se nestas estirpes pelo aumento do número de elementos celulares nos vários tipos de agregados resultantes da divisão em diferentes planos, podendo confundir-se com a simples aglutinação da cultura. A forma mais ou menos esférica dos seus elementos celulares, contribui ainda mais para aumentar a dificuldade de distinguir os dois fenómenos — acção imunológica e aglutinação.

Foram estudadas diversas estirpes de *St. aureus* isoladas do homem e de animais de diferentes espécies, criando-se, *in vitro*, as melhores condições de crescimento em meios líquidos, a fim de reduzir ao mínimo o número de elementos celulares nos agregados. Nas culturas continuavam a verificar-se os diversos tipos de agregação embora nalgumas estirpes predominassem as pequenas cadeias. É interessante notar que estas culturas com predomínio da cadeia mostravam nos meios sólidos colónias mais pequenas.

Nestas culturas tornava-se mais fácil apreciar a acção imunológica exercida pelo respectivo anti-soro. Contudo, a extensão da cadeia resultante da acção imunológica não atingia a observada nas culturas de *Streptococcus* sob a acção do respectivo anti-soro.

Diversas estirpes de *St. aureus* foram submetidas à acção de anti-

-soros preparados em coelho com algumas delas. Apesar de certa dificuldade criada pelo tipo de divisão celular destas estirpes — divisão em diferentes planos — lograva-se distinguir a acção imunológica da aglutinação nas primeiras horas de crescimento, não ultrapassando a fase logarítmica. A acção imunológica traduzia-se pelo aumento do número de elementos dos diversos tipos de agregação na cultura, com predomínio das pequenas cadeias; verificava-se também aumento do volume dos elementos celulares, cuja forma ainda se evidenciava mais elíptica.

A aglutinação, nesta fase de crescimento, manifestava-se pela presença de diferentes aglomerados, resultantes da adesão dos vários tipos de agregação celular. Passada a fase logarítmica os dois fenómenos dificilmente se podiam distinguir, verificando-se nas culturas de 16 a 24 horas apenas grandes aglomerados celulares.

A observação directa — contraste fase — evidenciando a acção do anti-soro, TOMCSIK (1956), poderá facilitar a identificação imunológica destas estirpes que normalmente crescem em diferentes planos. Por sua vez, a absorção dos anti-soros, dentro de certos limites, poderá também contribuir para tornar mais fácil o estudo da identificação imunológica das mesmas estirpes, *in vitro*.

Nos ensaios realizados *in vitro* verificava-se grande heterogeneidade imunológica das estirpes de *St. aureus*. Constatava-se, contudo, certa relação antigénica entre algumas das estirpes que, pelo aspecto da reacção observada, se considerava simples aglutinação.

Não foi feita qualquer investigação sorológica às estirpes ensaiadas, e também se ignora a variação da D. M. I., *in vitro*, significativa de diferença de tipo imunológico, uma vez que não foram realizados nesse sentido ensaios *in vivo*.

Procurou-se apenas avaliar a possibilidade da aplicação da técnica de identificação imunológica *in vitro* a estirpes bacterianas que dividem em diferentes planos.

Não há ainda esquema de identificação sorológico das estirpes de *St. aureus*, embora vários trabalhos tenham sido realizados nesse sentido. Nesses estudos assinala-se heterogeneidade sorológica das estirpes — SMITH (1959), YOSHIDA e HEDEN (1962), LENHART *et al* (1963), YOSHIDA *et al* (1963), COHEN e SMITH (1964), MORSE (1964). A hete-

rogeneidade imunológica verificada *in vitro* nas estirpes de *St. aureus* estaria deste modo de acordo com a diversidade sorológica já assinalada e com os resultados deficientes da imunoprofilaxia dos processos infecciosos por eles determinados.

A identificação das estirpes do agente em causa pelo bacteriófago, hoje largamente realizada, é de considerável valor, principalmente na epidemiologia da infecção.

Mas sorotipo e fagotipo nem sempre correspondem a imunotipo e, dada a incidência cada vez maior do *St. aureus* resistente aos antibióticos mais largamente aplicados na patologia infecciosa humana e animal, torna-se necessária a identificação imunológica visando a imunoprofilaxia desses processos. Julga-se que a técnica de identificação imunológica *in vitro* poderá também ser da maior utilidade em relação a estas estirpes.

3.4.15 — CL. CHAUVOEI

O soro anti *Cl. Chauvoei* exercia, *in vitro*, acção imunológica sobre a respectiva estirpe. É, por conseguinte, de considerar também esta técnica *in vitro*, na identificação imunológica das bactérias anaeróbias.

3.5 — SOROS IMUNES: ACÇÃO IMUNOLÓGICA E PODER IMUNIZANTE

A falta de relação entre o teor em anticorpos determinado *in vitro* pelos diversos métodos imunológicos e o poder imunizante *in vivo* dos soros específicos foi, desde logo, assinalada e é largamente referida na literatura — WILSON e MILES (1955 b).

O poder imunizante dos soros específicos parecia não depender de anticorpos particulares reveláveis por testes *in vitro*. E, de facto, começou a verificar-se certa relação entre imunidade específica e a presença nos soros imunes de anticorpos actuando sobre dados componentes antigénicos da célula bacteriana. Outros anticorpos determinados por reacções

sorológicas *in vitro*, mesmo a altos títulos, podiam não exercer qualquer efeito imunizante *in vivo*. Daqui, a falta de correspondência evidenciada entre os testes *in vitro* e *in vivo*. Mas embora se tenha verificado últimamente, nestes casos em particular, mais íntima relação entre o poder imunizante dos soros específicos e o seu teor em determinados anticorpos, pela utilização de técnicas mais sensíveis e ainda pela análise estatística dos resultados, WILSON e MILES (1955 *b*), continuava-se a observar, em muitos outros casos e até naqueles, falta de correspondência entre resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*.

Este facto derivava do desconhecimento da acção imunológica antibacteriana. A imunidade específica era encarada, a este respeito, como fenómeno estrito de reacção antigénio/anticorpo, de natureza estática. Agora, conhecida a acção imunológica *in vitro* e verificada a sua natureza dinâmica, havia que relacioná-la com o poder imunizante *in vivo*, visando a apreciação dos soros imunes *in vitro*.

O crescimento em cadeia ou o aumento da extensão desta nas estirpes que dividem apenas num plano, o aumento dos agregados celulares resultantes da divisão em mais de um, são, *in vitro*, a expressão da acção imunológica antibacteriana dos soros específicos — a divisão celular bacteriana sob a acção do soro imune não é seguida da separação dos elementos formados — e, desde logo, se verificou a sua íntima relação com o poder imunizante *in vivo*.

A mesma conexão nem sempre se assinalava nestes ensaios *in vitro* entre aglutinação das culturas em crescimento — reacção dinâmica — e o poder imunizante *in vivo*. E soros havia que, embora aglutinando em elevada diluição as culturas, não exerciam acção imunológica *in vitro*, nem acção imunizante *in vivo*.

A relação entre acção imunológica e aglutinação variava com o tipo de soro e a estirpe bacteriana.

A íntima relação entre acção imunológica *in vitro* e poder imunizante *in vivo* dos soros específicos foi largamente confirmada através de elevado número de ensaios, principalmente em soros de carbúnculo hemático, mal rubro e pasteurelose (*P. multocida*).

Transcrevem-se seguidamente alguns dos ensaios realizados e analisam-se os resultados.

O soro do carbúnculo hemático, obtido de equídeos hiperimunizados com culturas vivas e virulentas de *B. anthracis*, destinado à profilaxia e terapêutica da doença, foi largamente ensaiado porquanto a sua preparação cabia no âmbito das atribuições do Serviço a meu cargo. Assim, dezenas de soros foram estudados simultâneamente *in vivo* e *in vitro* durante um período de vários anos. *In vivo*, o poder imunizante era apreciado pelo método de Sobernheim (cit. GERLACH — 1934); *in vitro* verificava-se a acção imunológica e a aglutinação.

O Quadro 30 consigna os resultados de alguns dos ensaios realizados em devido tempo, *in vivo* e *in vitro*, com soros de diferente valor imunizante, para melhor se poder compará-los. E, para tornar mais significativos os resultados, utilizava-se nos ensaios *in vivo* e *in vitro* cultura obtida a partir da mesma reserva de *B. anthracis*, estirpe 245. Por outro lado, o meio de cultura era sempre o caldo simples glucosado a 1 ‰, adicionado de 20 % de soro normal de coelho — espécie animal empregada nos ensaios *in vivo*; procurava-se, desta maneira, aproximar os ambientes de crescimento da mesma estirpe durante a experimentação. A diluição do soro *in vitro* variava na razão de 10 e a concentração da cultura era de 10^{-2} ; a observação microscópica era feita, dada a natureza do crescimento das estirpes de *B. anthracis*, decorridas 10 e 24 horas a partir da sementeira.

Considerava-se já indicativa de acção imunológica *in vitro* a cadeia cuja extensão — número de elementos celulares bacterianos — era superior em média $2 \times$ à da cultura testemunha. A aglutinação era também verificada microscòpicamente na mesma cultura.

Os resultados transcritos — Quadro 30 — bem como todos os obtidos nos ensaios efectuados confirmam a íntima relação entre poder imunizante *in vivo* e acção imunológica *in vitro*. De maneira geral, a D. M. I. na fase logarítmica variava cerca de $10 \times$ da D. M. I. na fase final de crescimento.

A aglutinação, verificada simultâneamente nas mesmas culturas, nem sempre se mostrava directamente relacionada com o poder imunizante *in vivo*, e variava em relação à acção imunológica 100 a $1000 \times$.

Contudo, em soros de coelhos hiperimunizados com culturas desvitalizadas, estas diferenças eram mais acentuadas, principalmente no que respeita à D. M. I. na fase final de crescimento.

Com estes soros, a variação dependia ainda da hiperimunização — antigénio utilizado e esquema seguido.

QUADRO 30

SORO DE CARBÚNCULO HEMÁTICO

Acção imunológica e poder imunizante

SOROS	Estirpes <i>B. anthracis</i> 245				
	IN VITRO ⁽¹⁾			IN VIVO ⁽²⁾	
	diluição do soro			Soro-imunizados	Testemunhas
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
1	±	—	—	4/5	5/5
2	±	—	—	5/5	4/5
3	±	—	—	5/5	5/5
4	±	—	—	5/5	5/5
5	±	—	—	4/5	4/5
6	±	—	—	4/5	3/5
7	+	±	—	2/5	5/5
8	+	±	—	2/5	4/5
9	+	±	—	3/5	5/5
10	+	±	—	1/5	4/5
11	+	±	—	3/5	5/5
12	+	±	—	2/5	5/5
13	+	±	—	2/5	5/5
14	+	±	—	2/5	5/5
15	+	+	±	1/5	5/5
16	+	+	±	0/5	4/5
17	+	+	±	2/5	5/5
18	+	+	±	0/5	5/5
19	+	+	±	1/5	5/5
20	+	+	±	1/5	4/5

(¹) + = Acção imunológica nas 24 horas.

± = Acção imunológica nas 10 horas.

— = Sem acção imunológica.

(²) Numerador = animais mortos.

Denominador = animais inoculados.

Em geral, os soros que exerciam acção imunológica na fase logarítmica na diluição 10^{-2} ou na fase final de diluição 10^{-1} satisfaziam, *in vivo*, às exigências de aprovação do método de Sobernheim, Quadro 30. A ligeira divergência de resultados, por vezes notada neste sentido, encontra justificação não só na diferença dos ambientes em que se processam os ensaios *in vivo* e *in vitro*, embora se tenha diligenciado aproximá-los o mais possível, mas também no próprio método de apreciação *in vivo*.

De facto, o mesmo soro experimentado no decorrer do tempo pelo método de Sobernheim, mostrava, por vezes, divergência de valor. Este método, apesar de fornecer indicações válidas acerca do soro, está longe de se poder considerar preciso sob o ponto de vista quantitativo. Acrescente-se ainda a dificuldade de apreciação, nas condições de ensaio, dos resultados da acção imunológica, dada a natureza do crescimento em cadeia das estirpes de *B. anthracis*, *in vitro*.

3.5.2 — SORO DO MAL RUBRO

O soro do mal rubro, obtido de equinos hiperimunizados com culturas vivas e virulentas de *E. rhusiopathiae*, foi também largamente ensaiado, uma vez que a sua preparação fazia parte das atribuições do Serviço de que estava encarregado.

Este soro destinava-se à profilaxia e terapêutica do mal rubro; e, durante vários anos, dezenas de soros de diferente poder imunizante foram estudados simultâneamente *in vivo* e *in vitro*.

O poder imunizante era apreciado no ratinho pelo método de MARX (1907); *in vitro*, verifica-se a acção imunológica e a aglutinação.

O Quadro 31 regista os resultados de alguns dos ensaios realizados no decurso do tempo com soros de diferente poder imunizante, para melhor se avaliar da sua relação *in vivo* e *in vitro*. E, para tornar mais significativos os resultados, utilizava-se nos ensaios *in vivo* e *in vitro* a mesma cultura, normalmente de 16 horas, da *E. rhusiopathiae* — estirpe 484. O meio de cultura era o caldo simples glucosado a 1 %, pH 7,2. A este

meio não se juntava soro normal de ratinho, espécie utilizada na apreciação do soro, dada a quantidade necessária para os ensaios em relação com o volume individual de sangue. Não era, por conseguinte, prático o seu emprego, embora aconselhado para o efeito de maior aproximação dos ambientes em que se processava o crescimento do *E. rhusiopathiae*.

QUADRO 31

SORO DO MAL RUBRO

Acção imunológica e poder imunizante

SOROS	Estirpe <i>E. rhusiopathiae</i> 484					
	<i>IN VITRO</i> ⁽¹⁾			<i>IN VIVO</i> ⁽²⁾		
	Diluição do soro			Soro-imunizado		Testemunhas
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	0,01 c. c.	0,025 c. c.	
1	±	—	—	9/10	8/10	10/10
2	±	—	—	10/10	7/10	10/10
3	±	—	—	10/10	8/10	10/10
4	±	—	—	9/10	7/10	10/10
5	±	—	—	10/10	9/10	10/10
6	±	—	—	9/10	7/10	10/10
7	+	±	—	8/10	4/10	10/10
8	+	±	—	9/10	5/10	10/10
9	+	±	—	8/10	3/10	10/10
10	+	±	—	8/10	4/10	10/10
11	+	±	—	10/10	5/10	10/10
12	+	±	—	7/10	4/10	10/10
13	+	±	—	8/10	4/10	10/10
14	+	±	—	7/10	3/10	10/10
15	+	+	±	3/10	1/10	10/10
16	+	+	±	2/10	0/10	10/10
17	+	+	±	4/10	2/10	10/10
18	+	+	±	3/10	1/10	10/10
19	+	+	±	5/10	2/10	10/10
20	+	+	±	3/10	1/10	10/10

(¹) + = Acção imunológica nas 24 horas.

± = Acção imunológica nas 10 horas.

— = Sem acção imunológica.

(²) Numerador = animais mortos.

Denominador = animais inoculados.

Mas dada a natureza do desenvolvimento destas esirpes — elementos isolados — e ainda a relatividade dos ensaios, era possível, dentro deste condicionalismo, comparar os resultados *in vivo* e *in vitro*. A diluição do soro *in vitro* variava na razão 10 e a concentração da cultura era de 10^{-2} ; a observação microscópica — acção imunológica e aglutinação — fazia-se após 10 e 24 horas da sementeira.

Os resultados transcritos — Quadro 31 — bem como todos os obtidos nos ensaios realizados, confirmam também a íntima relação entre poder imunizante *in vivo* e acção imunológica *in vitro*. Em geral, a variação entre a D. M. I. na fase logarítmica e a D. M. I. na fase final do crescimento era inferior a $10 \times$. A aglutinação, verificada simultaneamente nas mesmas culturas, nem sempre se mostrava directamente relacionada com o poder imunizante *in vivo*, e variava em relação à acção imunológica 100 a $1000 \times$.

Estas diferenças eram, contudo, mais pronunciadas, principalmente em relação à D. M. I. na fase final de crescimento, nos soros obtidos de coelhos hiperimunizados com culturas desvitalizadas, dependendo ainda essas dissemelhanças do esquema de hiperimunização e do antigénio.

Na generalidade, os soros que na diluição 10^{-2} exerciam acção imunológica na fase logarítmica ou na fase final de crescimento na diluição 10^{-1} protegiam o ratinho na dose 0,025 c. c., segundo o método de MARX, e aqueles que ainda actuavam imunologicamente em 10^{-3} e 10^{-2} , respectivamente nas mesmas fases de crescimento das culturas protegiam-no na dose 0,01 c. c. — Quadro 31.

As ligeiras divergências, por vezes verificadas, poderiam filiar-se nas diferenças dos ambientes em que se processavam os ensaios *in vivo* e *in vitro*, tanto mais que não foi praticamente possível a adição de soro normal de ratinho ao meio de cultura, como seria aconselhado para os aproximar e, consequentemente, para dar mais significado aos resultados.

3.5.3 — SORO DA PASTEURELOSE (*P. MULTOCIDA*)

O soro da pasteurelose obtido de bovinos hiperimunizados com culturas vivas e virulentas foi, desde início, também ensaiado *in vivo* no pombo, cobaia e ratinho e, paralelamente, *in vitro*. Nesses ensaios utiliza-

vam-se as estirpes de hiperimunização, nessa altura ainda não identificadas imunologicamente. Mas a reduzida produção deste soro, destinado à profilaxia e terapêutica da pasteurelose dos animais, veio cedo a terminar, e os ensaios posteriores foram realizados principalmente com soros obtidos de coelhos hiperimunizados com culturas desvitalizadas de *P. multocida* de diferentes tipos imunológicos, ROBERTS (1947), HUDSON (1954), AFONSO *et al* (1964 a).

O Quadro 32 inscreve os resultados de alguns dos ensaios realizados com soros de diferentes tipos imunológicos e de diverso valor imunizante para melhor se avaliar da sua relação *in vivo* e *in vitro*. O poder imunizante era verificado no ratinho, conforme AFONSO *et al* (1964 c).

In vitro, apreciava-se a acção imunológica e a aglutinação. E, para tornar mais significativos os resultados, utilizava-se nos ensaios *in vivo* e *in vitro* cultura obtida a partir da mesma reserva de *P. multocida*. O meio de cultura utilizado *in vitro* era o caldo BAIN (1954). Mais uma vez, e pelas razões já referidas, não foi praticamente viável a adição de soro normal de ratinho ao meio de cultura, embora aconselhado para maior aproximação dos ambientes em que se processava o crescimento da *P. multocida*. Contudo, o meio utilizado, devidamente estudado por BAIN (1954), proporcionava conveniente desenvolvimento das estirpes de *P. multocida* utilizadas, de modo a criar um condicionalismo que permitisse comparar os resultados *in vivo* e *in vitro*.

A diluição de soro *in vitro* variava na razão 10 e a concentração da cultura era de 10^{-2} ; a observação microscópica — acção imunológica e aglutinação — fazia-se decorridas 8 e 24 horas após a sementeira.

Os resultados constantes do Quadro 32, como todos os obtidos nos ensaios realizados com soros da pasteurelose, confirmam igualmente a íntima relação entre acção imunológica *in vitro* e poder imunizante *in vivo*. De maneira geral, a variação entre a D. M. I. na fase logarítmica e a D. M. I. na fase final de crescimento era cerca de $10 \times$; nalguns casos, era mesmo superior. A aglutinação, verificada simultâneamente nas mesmas culturas, nem sempre se mostrava directamente relacionada com o poder imunizante *in vivo*. Por outro lado, era bastante variável a relação entre aglutinação e acção imunológica, verificando-se, contudo, maior regularidade nos soros obtidos de coelhos hiperimunizados com culturas vivas.

QUADRO 32

SORO DA PASTEURELOSE

Ação imunológica e poder imunizante

SOROS		IN VITRO ⁽¹⁾			IN VIVO ⁽²⁾				
TIPOS	N.ºs	Diluição do soro			Dose de cultura				
					Soro-imunizados			Testemunhas	
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
I P ₂₉	1	±	—	—	10/10	8/10	3/10	10/10	4/10
	2	+	±	—	8/10	2/10	0/10	10/10	6/10
	3	+	±	—	7/10	2/10	0/10	10/10	4/10
	4	+	+	±	0/10	0/10	0/10	10/10	5/10
II 229	1	±	—	—	10/10	9/10	4/10	10/10	5/10
	2	+	±	—	7/10	3/10	1/10	10/10	6/10
	3	+	±	—	6/10	2/10	0/10	10/10	4/10
	4	+	±	—	7/10	0/10	0/10	10/10	3/10
III P ₈	1	±	—	—	10/10	8/10	2/10	9/10	2/10
	2	±	—	—	10/10	9/10	2/10	10/10	4/10
	3	+	±	—	6/10	0/10	0/10	10/10	3/10
	4	+	±	—	8/10	2/10	1/10	9/10	3/10
IV P ₁₂	1	±	—	—	10/10	8/10	3/10	10/10	4/10
	2	+	±	—	5/10	2/10	0/10	10/10	3/10
	3	+	±	—	6/10	1/10	0/10	10/10	4/10
	4	+	±	—	8/10	2/10	0/10	10/10	6/10

(¹) + = Acção imunológica nas 24 horas.

± = Acção imunológica nas 8 horas.

— = Sem acção imunológica.

(²) Numerador = animais mortos.

Denominador = animais inoculados.

Os soros que na diluição 10⁻³ exerciam acção imunológica na fase logarítmica protegiam o ratinho contra mais de 10⁶ D. M. M.; os que exerciam a mesma acção apenas na diluição 10⁻² protegiam o ratinho contra mais de 10⁴ D. M. M.; e aqueles em que essa acção era limitada à diluição 10⁻¹ protegiam o ratinho contra mais de 10² D. M. M.

As pequenas divergências, por vezes observadas entre acção imunológica e poder imunizante, filiam-se naturalmente nas diferenças de ambiente em que se processavam os ensaios *in vivo* e *in vitro*, tanto mais que não era praticamente possível a adição de soro normal de ratinho ao meio de cultura *in vitro*, para os aproximar, de modo a permitir uma comparação mais significativa dos resultados, facto aliás já relevado a propósito dos soros estudados nas alíneas anteriores.

Discriminados os resultados das observações feitas em relação a cada tipo de soro, procura-se agora relacioná-los de forma a obter um panorama de conjunto que permita uma conclusão sobre o instante problema que representa a relação entre testes *in vivo* e *in vitro* dos soros imunes.

Nos ensaios realizados com soros do carbúnculo hemático, mal rubro e pasteurelose observava-se relação íntima entre acção imunológica *in vitro* e poder imunizante *in vivo*. A mesma relação nem sempre se constatava quanto à aglutinação das mesmas culturas, e a variação verificada dependia principalmente da hiperimunização — antígeno e esquema seguido — do animal produtor do soro.

A maior divergência manifestava-se com soros obtidos de animais hiperimunizados com culturas desvitalizadas. Alguns destes soros somente exerciam acção aglutinante, mesmo ao fim de prolongada hiperimunização.

Verificava-se, contudo, mais directa relação entre acção imunológica, poder imunizante e aglutinação, com soros obtidos de animais hiperimunizados com culturas vivas e virulentas. Com estes soros, a variação entre aglutinação e acção imunológica normalmente era em média de $100 \times$, raro ascendendo além de 1000, sendo dependente da estirpe, isto é, na sua maior ou menor diversidade antigénica. Verificava-se assim falta de relação entre aglutinação das culturas em crescimento — aglutinação dinâmica — e acção imunológica *in vitro* ou poder imunizante *in vivo* do soro específico.

Maior divergência e maior variação eram ainda notadas se o valor da aglutinação do soro era determinado em relação a suspensões bacterianas desvitalizadas ou mesmo vivas, como normalmente se preceitua e encontra largamente consignado na literatura respectiva. Neste caso, a

variação dependia, além da estirpe utilizada na preparação das suspensões, do meio de cultura, temperatura e tempo de crescimento, desvitalização, bem como do teor em elementos bacterianos e método seguido na apreciação.

A estandardização das suspensões antigénicas e a aplicação do mesmo método de aglutinação apenas conduzem a maior uniformidade de resultados, obtidos em tempo e locais diversos, continuando a verificar-se a divergência largamente assinalada e referida em relação ao poder imunizante. O mesmo se observa em relação ao teor em anticorpos dos soros imunes, determinado por outros métodos sorológicos *in vitro* e seu poder imunizante *in vivo*.

Por absorção os soros específicos podem perder a sua acção imunológica *in vitro* e, simultâneamente, o seu poder imunizante *in vivo*, continuando, contudo, a aglutinar as culturas ou suspensões bacterianas; podem, pelo contrário, perder a acção aglutinante para as suspensões desvitalizadas de absorção e manter ainda acção imunológica *in vitro* e poder imunizante *in vivo*. Neste último caso, os soros aglutinam ainda as culturas em crescimento — aglutinação dinâmica — pois, como se disse, pode verificar-se em relação a um soro específico acção aglutinante sem acção imunológica, mas não o contrário, verificando-se sempre aglutinação das culturas nos soros com acção imunológica *in vitro*.

Podem ainda não aglutinarem suspensões desvitalizadas e exercerem acção imunológica *in vitro* e possuírem poder imunizante *in vivo*, o que está dependente da estirpe utilizada na aglutinação e na hiperimunização do animal produtor do soro.

Esta divergência é a expressão da natureza da acção imunológica dos soros específicos, resultando assim da reacção antigénio/anticorpo, qualitativa/quantitativa, em extensão na superfície bacteriana, da qual, em suma, depende o poder imunizante. Daqui, a íntima relação observada entre poder imunizante e acção imunológica. Mas a acção imunológica é ainda de natureza dinâmica, dependendo das variações antigénicas das populações bacterianas no ambiente em que se processa o crescimento, como tem vindo a ser verificado através dos ensaios realizados.

Assim, resulta ainda maior divergência entre o teor dos anticorpos determinado *in vitro* pelos diversos métodos sorológicos de pesquisa e o

poder imunizante. O método sorológico — reacção antigénio/anticorpo — é, por conseguinte, desprovido de significado imunológico dada a sua natureza estática.

O poder imunizante do soro antibacteriano poderá assim ser apreciado pela sua acção imunológica *in vitro*, dada a íntima relação verificada nos ensaios efectuados.

Uma vez que nos ensaios *in vitro* se diluam os soros imunes na razão 2 e se analisem estatisticamente os resultados, mais precisa indicação se logrará acerca do valor de cada soro.

3.6 — APRECIACÃO DO PODER IMUNIZANTE DE SOROS ANTIBACTERIA- NOS *IN VITRO*

Verificada a relação directa entre acção imunológica *in vitro* e valor imunizante *in vivo*, torna-se possível fazer a apreciação dos soros antibacterianos *in vitro* segundo técnica da maior simplicidade, rapidez e economia, a qual permite ainda, e nisto reside a sua fundamental importância, apreciar soros cuja verificação sob o ponto de vista imunológico não era praticamente viável, dada a avirulência ds estirpes para os animais normalmente utilizados na experimentação laboratorial, principalmente os destinados à espécie humana.

É ainda mais simples, dada a natureza do crescimento das estirpes bacterianas, que a técnica de soro-neutralização utilizada em culturas celulares para o mesmo fim mas em relação a vírus e toxinas. Exige apenas meio de cultura apropriado a cada estirpe bacteriana de harmonia com o tipo do soro específico e espécie animal a que este se destina.

Haverá sòmente que encarar as normas de apreciação *in vitro* para cada tipo de soro, sempre que possível em função dos resultados obtidos *in vivo*, isto é, estabelecer um método para tal fim.

Do estudo realizado *in vivo* e *in vitro* com soros do carbúnculo hemático, mal rubro e pasteurelose (*P. multocida*), a seguir analisados, deduzem-se as normas de apreciação dos respectivos valores imunizantes *in vitro*.

3.6.1 — ACÇÃO DE SOROS ESPECÍFICOS DE DIFERENTE VALOR IMUNIZANTE SOBRE UMA MESMA ESTIRPE

Como se disse, verificava-se íntima relação entre poder imunizante *in vivo* e acção imunológica *in vitro* nos ensaios realizados com diferentes soros do carbúnculo hemático, mal rubro e pasteurelose — 3.5 — Quadros 30, 31 e 42. Nestes ensaios foi utilizada apenas uma estirpe correspondente a cada tipo de soro.

3.6.2 — ACÇÃO DE UM MESMO SORO ESPECÍFICO SOBRE DIVERSAS ESTIRPES

Várias estirpes de idêntico tipo imunológico foram submetidas à acção dum mesmo soro tipo-específico, *in vivo* e *in vitro*, a fim de se verificar se havia divergência apreciável de comportamento entre elas, ou se os resultados, como seria natural, traduziam valores aproximados para o soro em causa. Foram ensaiados neste sentido vários soros do carbúnculo hemático, mal rubro e pasteurelose, e utilizados diversas estirpes de *B. anthracis*, *E. rhusiopathiae* e *P. multocida*, respectivamente, isoladas no decorrer do tempo em regiões diferentes do país — estirpes essas com idênticas características culturais e de virulência, para tornar mais significativos os resultados da experimentação.

Alguns destes constam dos Quadros 33, 34 e 35, de cuja consulta se pode inferir que, de maneira geral, o mesmo soro se comportava de forma semelhante em relação às diferentes estirpes do respectivo tipo imunológico, *in vivo* e *in vitro*. As pequenas variações verificadas não eram significativas, mantendo-se no seu conjunto o valor médio do soro. As variações mais acentuadas eram observadas em relação ao do carbúnculo hemático, dada a natureza do crescimento em cadeia das estirpes de *B. anthracis in vitro*.

Divergências pronunciadas e de relevar em relação ao valor do mesmo soro eram notadas quando se utilizavam estirpes com diferentes características culturais e de virulência, principalmente no que respeita ao poder imunizante. Essas divergências virão a ser evitadas pela utilização de soro padrão nos ensaios.

3.6.3—ACÇÃO IMUNOLÓGICA: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SORO ESPECÍFICO E DA CULTURA

Estudou-se também *in vitro* a acção imunológica em função das concentrações do soro específico e da cultura. Para isso, fazia-se variar simultaneamente a concentração do soro específico e da cultura no meio de crescimento.

QUADRO 33
SORO DO CARBÚNCULO HEMÁTICO
Acção imunológica e poder imunizante

SOROS	Estirpes de <i>B. anthracis</i>	IN VITRO (°)			IN VIVO (°)	
		diluição do soro			Soro-imunizados	Testemunhas
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
21	245	±	—	—	4/5	3/5
	2.56	±	—	—	5/5	5/5
	1.57	±	—	—	5/5	5/5
	3.58	±	—	—	4/5	4/5
22	245	+	±	—	2/5	5/5
	2.56	+	±	—	3/5	5/5
	1.57	+	±	—	2/5	4/5
	3.58	+	±	—	2/5	5/5
23	245	+	±	—	1/5	4/5
	2.56	+	±	—	2/5	5/5
	1.57	+	±	—	2/5	5/5
	3.58	+	±	—	3/5	5/5
24	245	+	+	±	1/5	5/5
	2.56	+	+	±	2/5	5/5
	1.57	+	+	±	1/5	5/5
	3.58	+	+	±	0/5	4/5

(1) + = Acção imunológica nas 24 horas.

± = Acção imunológica nas 10 horas.

— = Sem acção imunológica.

(2) Numerador = animais mortos.

Denominador = animais inoculados.

Nos Quadros 36, 37 e 38 constam os resultados de alguns dos ensaios realizados neste sentido com soro anti-carbúnculo hemático, mal rubro e pasteurelose, respectivamente. A concentração do soro e a da cultura variam na razão 10 e a observação microscópica dos resultados efectuava-se nos soros do carbúnculo hemático e mal rubro passados 10

QUADRO 34

SORO DO MAL RUBRO

Ação imunológica e poder imunizante

SOROS	Estirpes de <i>E. rhusiopathiae</i>	IN VITRO (1)			IN VIVO (2)		
		Diluição do soro			Soro-imunizados		Testemunha
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	0,01 c. c.	0,025 c. c.	
21	484	±	—	—	8/10	6/10	10/10
	1.57	±	—	—	10/10	8/10	10/10
	1.58	±	—	—	9/10	6/10	10/10
	2.59	±	—	—	9/10	7/10	10/10
22	484	+	±	—	7/10	4/10	10/10
	1.57	+	±	—	8/10	5/10	10/10
	1.58	+	±	—	6/10	2/10	10/10
	2.59	+	±	—	7/10	3/10	10/10
23	484	+	±	—	6/10	3/10	10/10
	1.57	+	±	—	9/10	4/10	10/10
	1.58	+	±	—	7/10	3/10	10/10
	2.59	+	±	—	6/10	2/10	10/10
24	484	+	+	±	3/10	2/10	10/10
	1.57	+	+	±	4/10	1/10	10/10
	1.58	+	+	±	2/10	0/10	10/10
	2.59	+	+	±	4/10	2/10	10/10

(1) + = Acção imunológica nas 24 horas.

± = Acção imunológica nas 10 horas.

— = Sem acção imunológica.

(2) Numerador = animais mortos.

Denominador = animais inoculados.

e 24 horas, no soro de pasteurelose passadas 8 e 24 horas, isto de harmonia com a capacidade de crescimento das estirpes utilizadas nos ensaios, como já se frisou.

Nem sempre se verificava cultura em pleno crescimento nas primeiras horas com as menores concentrações, 10^{-3} , das estirpes empregadas,

QUADRO 35

SORO DA PASTEURELOSE

Ação imunológica e poder imunizante

Soros Tipos VI «B ₁ »	Estirpes de <i>P. multo- cida</i> Tipo VI	IN VITRO (1)			IN VIVO (2)				
		Diluição do soro			Dose de cultura				
					Soro-imunizados			Testemunhas	
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
1	S ⁴	±	—	—	10/10	9/10	3/10	10/10	4/10
	S ¹¹	±	—	—	10/10	8/10	3/10	10/10	6/10
	B ¹	±	—	—	10/10	8/10	2/10	10/10	5/10
	B ⁵	±	—	—	10/10	7/10	2/10	10/10	4/10
2	S ⁴	+	±	—	8/10	2/10	0/10	10/10	3/10
	S ¹¹	+	±	—	7/10	3/10	0/10	10/10	4/10
	B ¹	+	±	—	6/10	2/10	0/10	10/10	4/10
	B ⁵	+	±	—	8/10	4/10	1/10	10/10	6/10
3	S ⁴	+	±	—	7/10	2/10	0/10	10/10	4/10
	S ¹¹	+	±	—	8/10	3/10	1/10	10/10	5/10
	B ¹	+	±	—	6/10	2/10	0/10	10/10	3/10
	B ⁵	+	±	—	8/10	2/10	1/10	10/10	5/10
4	S ⁴	+	+	±	2/10	1/10	0/10	10/10	4/10
	S ¹¹	+	+	±	3/10	0/10	0/10	10/10	3/10
	B ¹	+	+	±	1/10	0/10	0/10	10/10	4/10
	B ⁵	+	+	±	3/10	1/10	0/10	10/10	6/10

(1) + = Ação imunológica nas 24 horas.

(2) Numerador = animais mortos.

± = Ação imunológica nas 8 horas.

Denominador = animais inoculados.

— = Sem ação imunológica.

principalmente com as da *P. multocida* que, por vezes, mesmo às 24 horas, não mostravam desenvolvimento. Eram utilizadas nos ensaios culturas de 16 horas das estirpes referidas.

Os resultados — Quadros 36, 37 e 38 — exprimindo o que de maneira geral se passava em ensaios desta natureza, evidenciam que, dentro de certos limites de variação da concentração da cultura, não se verificavam diferenças significativas em relação à mesma concentração de qualquer dos soros específicos considerados. Nestas condições, a acção imunológica variava principalmente com a concentração do soro e o tempo de crescimento da cultura.

QUADRO 36

SORO DO CARBÚNCULO HEMÁTICO

Ação imunológica

In vitro

SORO		CULTURA Diluição e tempo de observação ⁽¹⁾								
N.º	Diluição	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³		
		5	10	24	5	10	24	5	10	24
1	10 ⁻¹	+	—	—	+	+	—	+	+	—
	10 ⁻²	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	—	—	+	+	—	+	+	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻³	+	—	—	+	+	—	+	+	—

+ = Acção imunológica.

— = Sem acção imunológica.

(1) = Número de horas após a sementeira.

A acção imunológica pode exercer-se durante todo o ciclo de crescimento da cultura ou apenas nas primeiras fases, o que depende da concentração do soro específico; neste último caso, varia ainda, no decurso do tempo, com a natureza da estirpe e a concentração inicial desta no meio. Há, por conseguinte, que ter também em conta a variável tempo no método de apreciação *in vitro*.

Assim, pode observar-se sob esse aspecto, toda a dinâmica imunológica do complexo soro específico-estirpe tipo.

Em face dos resultados dos ensaios realizados parece mais aceitável determinar o valor do soro específico, *in vitro*, em função da dose mínima por c. c. do meio que exerce acção imunológica apenas durante parte do ciclo de crescimento da cultura. A fase logarítmica, de pleno

QUADRO 37
SORO DO MAL RUBRO
Acção imunológica
In vitro

SORO		CULTURA Diluição e tempo de observação ⁽¹⁾								
N.º	Diluição	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³		
		5	10	24	5	10	24	5	10	24
1	10 ⁻¹	+	—	—	+	+	—	+	+	—
	10 ⁻²	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	—	—	+	+	—	+	+	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻³	+	—	—	+	+	—	+	+	—

+ = Acção imunológica.

— = Sem acção imunológica.

(1) = Número de horas após a sementeira.

desenvolvimento, seria a mais aconselhável para definir a dose mínima imunológica (D. M. I.); nessa fase, de maior e mais intensa actividade biológica, as populações bacterianas atingem a máxima expressão antigénica e a acção imunológica resulta da reacção antigénio/anticorpo, qualitativa/quantitativa, numa maior extensão da sua superfície.

Dado o limite das populações bacterianas em cultura *in vitro*, com excepção do sistema contínuo, compreende-se que a variação seja mais acentuada em relação à concentração do soro específico do que à da cultura. De facto, mantendo-se em toda a extensão a acção imunológica, em relação a diferentes concentrações da cultura apenas se altera no tempo a sua curva de crescimento.

QUADRO 38

SORO DA PASTEURELOSE

Acção imunológica

In vitro

SORO		CULTURA Diluição e tempo de observação ⁽¹⁾								
N.º	Diluição	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³		
		4	8	24	4	8	24	4	8	24
1	10 ⁻¹	+	—	—	+	+	—	+	+	—
	10 ⁻²	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	—	—	+	+	—	+	+	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻³	+	—	—	+	+	—	+	+	—

+ = Acção imunológica.

— = Sem acção imunológica.

(1) = Número de horas após a sementeira.

De contrário, a acção imunológica exercida pela mesma concentração do soro específico variava no tempo na razão inversa da concentração da cultura.

Assim, dada a natureza das estirpes bacterianas utilizadas nos ensaios, cujo crescimento se processava a ritmo rápido *in vitro*, eram idênticos às 24 horas os resultados da acção imunológica da mesma concentração de soro específico em relação às diferentes concentrações da cultura. Por esta razão, pensa-se ser mais aconselhável fazer variar a concentração do soro específico, mantendo a da cultura, e limitar o tempo de observação à fase logarítmica, de pleno desenvolvimento. Este facto implica o conhecimento das estirpes bacterianas intervenientes nos ensaios *in vitro*.

3.6.4 — MÉTODO DE APRECIACÃO

Do estudo efectuado deduzem-se as normas de apreciação dos soros imunes *in vitro*, e estabelecem-se as bases fundamentais do método.

3.6.4.1 — Meio de cultura

Deve utilizar-se um meio que reúna as condições óptimas de crescimento para a estirpe bacteriana de ensaio. Dada a variação antigénica das populações bacterianas no ambiente em que se processa o crescimento, sempre que a finalidade seja a apreciação *in vitro* do valor imunizante do soro, deverá adicionar-se ao meio de cultura soro normal da espécie animal empregada no ensaio *in vivo* ou o daquela a que se destina, se praticamente viável, a fim de aproximar quanto possível as condições culturais *in vivo* e *in vitro*; tornam-se deste modo mais significativos os resultados da apreciação *in vitro*. A percentagem do soro utilizado nestas condições, era, normalmente, nos ensaios realizados, de 20 %.

3.6.4.2 — Volume do meio de cultura

Foram experimentados diversos volumes do meio de cultura, principalmente 1, 5 e 10 c. c., sem que se observassem diferenças apreciáveis nos resultados. Contudo, nas condições de ensaio — incubação na estufa —

os volumes mais reduzidos sofriam maior variação térmica durante as observações microscópicas. Por esta razão, embora com maior dispêndio de meio de cultura e de soro específico, era utilizado o volume de 10 c. c. nos ensaios de apreciação do poder imunizante *in vitro*.

Mas é de aconselhar em tal experimentação o volume de 1 c. c. e a incubação em banho-maria para reduzir as variações térmicas durante os exames microscópicos, evitando-se assim maior dispêndio de meio de cultura e de soro específico.

3.6.4.3 — Concentração do soro específico

No estudo de apreciação *in vitro* do poder imunizante dos soros específicos destinados à profilaxia e terapêutica, a concentração mais elevada do soro será 10^{-1} . De facto, nos vários ensaios realizados — e foram centenas — verificou-se ser desprovido de valor imunizante o soro que não exercia *in vitro*, na diluição citada, acção imunológica durante todo o ciclo de crescimento da cultura. Este soro actuava ainda imunologicamente na diluição 10^{-2} na fase logarítmica — pleno desenvolvimento.

Fácilmente se aceitará a realidade desta limitação, principalmente nos soros destinados à profilaxia e terapêutica. A concentração 10^{-1} na corrente sanguínea exigiria já um volume bastante elevado de soro específico, variável com a espécie animal e sua corpulência; mais difícil se tornaria ainda obter maior concentração de soro se o seu valor fosse inferior, isto é, se a acção imunológica apenas se exercesse *in vitro* em concentração superior à indicada. Assim, será 10^{-1} a concentração mais elevada do soro específico a considerar nos ensaios de apreciação *in vitro* do poder imunizante.

Verificou-se, por outro lado, que, salvo nos soros concentrados, a acção imunológica raramente se observava *in vitro* em diluições superiores a 10^{-3} . Foi apenas notada até à diluição 10^{-4} , e nas primeiras fases do crescimento da cultura em soros do mal rubro de elevado poder imunizante. Nestas condições será 10^{-4} a menor concentração do soro específico a ter em conta nos ensaios de apreciação *in vitro* do poder imunizante.

Os soros específicos, considerados de valor imunizante *in vivo* pelos respectivos métodos de apreciação, exerciam acção imunológica *in vitro*

na fase logarítmica, na concentração 10^{-2} . Esta concentração, facilmente obtida *in vivo* na corrente sanguínea, aproxima-se dos valores que a experiência aconselha na prática da imunoprofilaxia.

A variação da concentração de soro nos ensaios *in vitro* dependerá da aproximação de valor desejada. Normalmente, nos ensaios realizados, ela variava na razão 10, e sempre que se queria mais precisa indicação acerca do valor do soro, este era então ensaiado na razão 2. Era esta a norma seguida e que se julga aconselhável na experimentação desta natureza.

No entanto, verifica-se que a variação da concentração do soro específico na razão 10 permite a apreciação do valor deste *in vitro* em relação à protecção *in vivo* de harmonia com os métodos normalmente adoptados.

3.6.4.4 — Concentração da cultura

Verificou-se que, dentro de certos limites de variação da concentração da cultura e do soro específico, os resultados da acção imunológica em relação à mesma concentração de soro se aproximavam após 24 horas de crescimento. Variavam apenas, e na razão inversa da concentração da cultura, os tempos em que era observada a acção imunológica — fase logarítmica, de pleno desenvolvimento — em relação à mesma concentração do soro específico. Consequentemente, parece mais aconselhável fixar a concentração da cultura nos ensaios *in vitro* e variar a do soro.

A concentração mais elevada da cultura nos ensaios *in vitro* será 10^{-1} e a menor 10^{-3} . De facto, a maior concentração — 10^{-1} — já se sobre põe bastante à dose de cultura utilizada na maioria dos ensaios de apreciação *in vivo*; a menor — 10^{-3} — bastante reduzida, atinge ainda normalmente, com estirpes cujo crescimento se processa a ritmo rápido, o pleno desenvolvimento nas 12 horas — período conveniente a ter em conta na prática, em ensaios desta índole; na inferior a 10^{-3} , em geral, não atinge o pleno crescimento naquele prazo.

Nalguns casos a concentração 10^{-3} da cultura de *P. multocida* não origina desenvolvimento, mesmo às 24 horas.

Com estirpes, cujo crescimento se efectuava a ritmo rápido, a concentração 10^{-2} parecia ser a mais apropriada, tendo passado por isso a ser empregada na experimentação *in vitro* considerada.

3.6.4.5 — Temperatura de incubação

Dado que ocorre variação antigénica nas populações bacterianas em relação ao ambiente em que se processa o crescimento, nos estudos de acção imunológica *in vitro* haverá que obter condições óptimas tão aproximadas quanto possível das naturais. A temperatura é uma delas. As estirpes patogénicas para o homem e as espécies animais têm a sua temperatura óptima de crescimento numa zona bastante limitada, de maneira geral 36-39°C, não se tendo verificado nela, nas experiências realizadas, diferenças da D. M. I. dignas de relevo. E, assim, os ensaios de apreciação do poder imunizante dos soros específicos *in vitro* passaram a ser efectuados a cerca de 37°C — temperatura normal de crescimento das estirpes patogénicas.

3.6.4.6 — Período de observação da acção imunológica

A acção imunológica *in vitro* pode exercer-se, como se verificou, durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura ou apenas em parte desse mesmo ciclo, dependendo a duração principalmente da concentração do soro específico e do seu valor imunizante. A fase logarítmica, de pleno crescimento, em que é maior a expressão antigénica das populações bacterianas, e a fase final do desenvolvimento da cultura serão, por conseguinte, as mais apropriadas para a observação da acção imunológica, devendo, assim, a D. M. I. ser determinada em relação a elas.

Contudo, os resultados da apreciação do soro específico *in vitro* pareciam ser mais significativos quando baseados nos dois valores da D. M. I. correspondentes àqueles períodos.

De maneira geral, as D. M. I. determinadas na fase logarítmica e na fase final de crescimento da mesma cultura variavam entre si cerca de $10 \times$ e a acção do soro específico *in vivo* afigurava-se relacionada em sentido inverso com o valor desta determinação.

Assim, dos soros destinados à imunoprofilaxia ensaiados *in vitro*, era o soro do mal rubro o de menor variação das D. M. I. nas condições referidas, e também o de mais eficiente acção *in vivo*. A variação da D. M. I. na curva de crescimento das culturas virulentas é representativa, portanto, da dinâmica imunológica que condiciona a imunidade específica *in vivo*.

O período de observação da acção imunológica dependerá assim da estirpe e das condições de ensaio, sendo pois necessário conhecer nestas a curva de crescimento da cultura utilizada para o fazer nas referidas fases.

Na apreciação do valor imunizante dos soros específicos *in vitro* a observação da acção imunológica fazia-se, nas condições apontadas, passadas 6 a 8 e 24 horas para a *P. multocida*, 8 a 10 e 24 para o *B. anthracis* e o *E. rhusiopathiae*.

Quanto às outras espécies bacterianas serão indicados a seu tempo os respectivos períodos de observação.

3.6.4.7 — Apreciação do soro imune

Nos estudos realizados paralelamente *in vivo* e *in vitro* com soros de carbúnculo hemático, mal rubro e pasteurelose, conforme os Quadros 30, 31, 32, 33, 34 e 35, pôde verificar-se a relação entre acção imunológica e acção imunizante, na qual se baseará a apreciação desses soros *in vitro* consoante os Quadros 39, 40 e 41.

Esta relação terá, por conseguinte, de ser previamente estabelecida para cada tipo de soro nas condições de experimentação comparada a que se procederá *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, a apreciação feita em paralelo com soro padrão e de harmonia com métodos de análise estatística terá valor mais significativo, quer no tempo, quer no espaço.

De maneira geral, nos ensaios realizados, os soros que na fase logarítmica exerciam acção imunológica *in vitro*, na concentração 10^{-2} , protegiam *in vivo* consoante as exigências mínimas dos respectivos métodos de apreciação, sendo considerados de valor na imunoprofilaxia nas doses aconselhadas pela experiência clínica. Assim, a dose mínima imunológica *in vitro* na fase logarítmica parece corresponder à dose mínima imunizante nas condições normais *in vivo*.

Admitido este princípio, será agora possível apreciar *in vitro* o valor imunizante dos soros em D. M. I., principalmente o daqueles cuja verificação *in vivo* nem sempre era exequível dada a avirulência para os animais de experiência das estirpes a utilizar.

Estão neste caso certos tipos de soros destinados a uso humano, para os quais há que estabelecer, com maior precisão, os respectivos esquemas profiláticos e terapêuticos.

De facto, só agora se torna viável estudar *in vitro* a dinâmica imunológica — absorção e eliminação — do soro específico no organismo animal, e estabelecer em função do tempo o esquema adequado à manutenção na corrente sanguínea da concentração necessária à eficiente acção imune. Esta será condicionada por vários factores, principalmente a espécie animal, tipo do soro, via de inoculação, sensibilização e agente bacteriano interveniente.

O esquema imunoprofilático basear-se-á na D. M. I. em relação à fase logarítmica *in vitro*, e o imunoterapêutico, uma vez que o agente infeccioso se encontra já em pleno desenvolvimento no organismo, assentará na D. M. I. determinada na fase final do crescimento da cultura.

Compreende-se assim a exigência, ditada pela experiência clínica, da aplicação de maiores doses de soro específico e da necessidade da sua administração por via endovenosa, na cura dos processos infecciosos, ao contrário do que sucede na profilaxia. Essa diferença poderá mesmo atingir $10 \times$ conforme a evolução da doença, a espécie animal e a natureza da infecção, estando de acordo com a variação normalmente verificada *in vitro* entre a D. M. I. na fase logarítmica e a D. M. I. na fase final de crescimento da mesma cultura.

Assim, enquanto não existirem no mercado soros específicos antibacterianos concentrados, está indicado utilizar na profilaxia os soros que possuam pelo menos 100 D. M. I. e na terapêutica aqueles com 1000 D. M. I., determinadas na fase logarítmica de crescimento da cultura. Daqui se infere a marcada acção profiláctica e curativa do soro do mal rubro, normalmente com elevado título em D. M. I. e em que, principalmente, é de realçar a menor diferença entre a D. M. I. na fase logarítmica e a D. M. I. na fase final do mesmo ciclo de crescimento da cultura *in vitro*.

Doses relativamente menores destes soros exercem acção curativa mais eficaz, o que está de acordo ainda com as exigências de protecção que o método de verificação de GERLACH (1934) para eles prescreve.

Até aqui, os esquemas imunoprophiláticos e imunoterapêuticos eram deduzidos praticamente da experiência clínica, sem que a análise estatística lhes atribuisse apreciável valor, sendo por isso pouco precisos. Por seu turno, os testes sorológicos *in vitro*, sem significado imunológico, e a experimentação *in vivo*, de maior complexidade e nem sempre exequível, não os conseguiram ainda estabelecer em bases mais seguras. Assim, a técnica *in vitro* mostra-se, mais uma vez, de importância fundamental nesta matéria.

Mas há que ter em conta que, dadas as variações antigénicas nas populações bacterianas em relação ao ambiente, o poder imunizante do soro específico depende da espécie animal, natureza e via de infecção, tal qual se verifica em relação aos vírus na soro-neutralização. Assim, a acção

QUADRO 39

SORO DO CARBÚNCULO HEMÁTICO

Poder imunizante

Esquema de apreciação *in vitro*

IN VITRO (a) Acção imunológica			IN VIVO (b) Acção imune
Diluição do soro			Soro-protecção no coelho
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
±	—	—	Sem acção protectora
+	±	—	2 a 3 coelhos sobrevivem
+	+	±	3 a 5 coelhos sobrevivem

(a) = Cultura de 16 horas; concentração inicial 10⁻².

Tempo de observação — decorridas 8 a 12 e 24 horas.

+ = Acção imunológica durante 24 horas.

± = Acção imunológica durante 8 a 12 horas.

— = Sem acção imunológica.

(b) = Método de SOBERNHEIM (cit. GERLACH 1934).

Apreciação — Só devem ser utilizados na imunoprofilaxia soros que exerçam acção imunológica na fase logarítmica na concentração 10⁻² — 100 D. M. I/c. c., valor mínimo.

imunológica *in vitro*, obtida em meio com elevada percentagem de soro normal da espécie a que se destina o soro específico, e a partir de estirpe virulenta sem subculturas ou passagens por animais de diferente espécie, dará indicações mais precisas acerca do valor imunizante para a espécie considerada, por serem *in vivo* e *in vitro* menos divergentes, antigénicamente, as populações bacterianas.

O mesmo se verificará com os vírus na soro-neutralização em cultura de tecidos *in vitro*. Os resultados *in vivo* e *in vitro* serão mais harmónicos, se a soro-neutralização for realizada em culturas primárias de células susceptíveis da espécie em causa e em meio o mais aproximado possível, com vírus virulento sem passagens por organismos ou espécies celulares diferentes.

QUADRO 40 SORO DO MAL RUBRO

Poder imunizante

Esquema de apreciação *in vitro*

IN VITRO (a) Acção imunológica			IN VIVO (b) Acção imune
Diluição do soro			Soro-protecção no ratinho
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
±	—	—	Protecção — 0,10 c. c.
+	±	—	Protecção — 0,025 c. c.
+	+	±	Protecção — 0,01 c. c.

(a) = Cultura de 16 horas; concentração inicial 10⁻².

Tempo de observação — decorridas 8 a 12 e 24 horas.

+

± = Acção imunológica durante 24 horas.

— = Acção imunológica durante 8 a 12 horas.

— = Sem acção imunológica.

(b) = Método de MARX (1907).

Apreciação — Só devem ser utilizados na imunoprofilaxia soros que exerçam acção imunológica na fase logarítmica na concentração 10⁻² — 100 D. M. I/c. c., valor mínimo.

3.7 — VACINAS: ACÇÃO IMUNOLÓGICA E PODER IMUNIZANTE

As reacções sorológicas, sem significado imunológico, não permitiam apreciar *in vitro* o grau de imunidade das populações vacinadas e, consequentemente, o valor das respectivas vacinas; as provas *in vivo*, de maior complexidade, nem sempre eram exequíveis dada a avirulência das estirpes bacterianas para os animais de experiência, principalmente as de origem humana — WILSON e MILES (1955 b), SOHIER (1960).

Uma vez conhecida a acção imunológica antibacteriana, de que depende *in vivo* a imunidade específica, torna-se possível fazer essa apre-

QUADRO 41

SORO DA PASTEURELOSE

Poder imunizante

Esquema de apreciação *in vitro*

IN VITRO (a)			IN VIVO (b)
Acção imunológica			Acção imune
Diluição do soro			Soro-protecção no ratinho
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
±	—	—	Protecção $\geq 10^2$ D. M. M.
+	±	—	Protecção $\geq 10^4$ D. M. M.
+	+	±	Protecção $\geq 10^6$ D. M. M.

(a) = Cultura de 16 horas; concentração inicial 10⁻².

Tempo de observação — decorridas 6 a 8 e 24 horas.

— = Acção imunológica durante 24 horas.

± = Acção imunológica durante 6 a 8 horas.

— = Sem acção imunológica.

(b) = AFONSO *et al* (1964 c).

Apreciação — Só devem ser utilizados na imunoprofilaxia soros que exerçam acção imunológica na fase logarítmica na concentração 10⁻² — 100 D. M. I/c. c., valor mínimo.

ciação *in vitro* e estabelecer em bases mais precisas os esquemas imunoprofiláticos, nomeadamente os que concernem ao homem.

Nesse sentido foram realizados vários ensaios com vacinas do carbúnculo hemático, mal rubro, pasteurelose e salmonelose. Algumas destas destinavam-se à profilaxia e foram utilizadas no campo com bons resultados segundo informações fornecidas pelos técnicos responsáveis; tornam-se assim expressivos os ensaios laboratoriais, a seguir analisados.

3.7.1 — ACÇÃO IMUNOLÓGICA *IN VITRO* E IMUNIDADE *IN VIVO*

O conhecimento da relação entre a acção imunológica exercida por soros de animais vacinados e o grau de imunidade constitui a base da apreciação desta *in vitro* e, consequentemente, do valor das vacinas.

3.7.1.1 — Acção imunológica

Os animais vacinados, normalmente cobaias, em grupos de 4, eram sangrados — no quantitativo de 5 c. c. para obtenção de soro — respectivamente ao 4.º, 6.º, 8.º, 10.º, 12.º, 14.º, 21.º, 30.º, 60.º e 90.º dias a fim de ser verificada, no decurso do tempo, a evolução da acção imunológica adquirida. Os animais vacinados de cada agrupamento eram sangrados em geral uma vez e contraprovados a seguir, sempre que possível. Deste modo, os resultados são expressos em valores médios de conjunto.

Normalmente, as diluições do soro imune nos ensaios eram: 1/3, 1/5, 1/7 e 1/9. Concentrações maiores dificultavam o crescimento das estirpes avirulentas para a respectiva espécie animal enquanto as menores raramente exerciam acção imunológica nas condições de ensaio. Eram também pouco significativas as diferenças verificadas entre diluições mais aproximadas. Era ajustada com soro normal a concentração 1/3, no ensaio. Para evitar possível acção bactericida do complemento nestas elevadas concentrações do soro, procedia-se à sua prévia inactivação — 30 minutos a 56°C.

A concentração da cultura nos ensaios era de 10^{-2} . Utilizava-se normalmente uma hemocultura de 16 horas em caldo soro a 1/3 ou subcul-

turas, em idêntico meio, da mesma estirpe empregada nos ensaios de imunidade, a fim de tornar mais significativos os resultados.

Para utilizar menores quantidades de soro imune os ensaios eram realizados num volume de 1 c. c. em tubos apropriados.

A acção imunológica era verificada durante a fase logarítmica, num período de tempo variável com a natureza da estirpe, iniciando-se a observação normalmente decorridas 2 horas. Os soros de animais vacinados, de maneira geral, apenas exerciam acção imunológica durante parte da fase logarítmica, mesmo nas maiores concentrações. Na fase final de crescimento observava-se principalmente aglutinação das culturas.

3.7.1.2 — Imunidade

A fim de se apreciar também, no decurso do tempo, a evolução da imunidade adquirida e relacioná-la com a acção imunológica — 3.7.1.1 — os animais vacinados, normalmente o cobaia, eram contraprovados em grupos de 4, logo a seguir à colheita de sangue para a obtenção do soro imune. Era utilizado grupo idêntico de animais não vacinados, como testemunhas. Os resultados de ensaios realizados paralelamente mostraram não ser significativa a influência do trauma causado pela colheita de sangue nos animais vacinados.

Nos estudos de imunidade, mas em menor número de ensaios, foi empregado também o coelho segundo esquema indicado na devida altura.

3.7.1.3 — Vacina do carbúnculo hemático

Foram ensaiados diversos tipos de vacinas do carbúnculo hemático no cobaia, coelho e ovino.

O Quadro 42 sintetiza o que de maneira geral se verificava em relação ao cobaia com a vacina «Sterne» — glicerinada e precipitada pelo alumen — destinada à campanha empreendida oficialmente contra o carbúnculo hemático no país.

Os cobaias eram vacinados com 0,50 c. c. — 5×10^6 esporos — e contraprovados com 100 a 200 D. M. M. da estirpe atenuada de *B. anthracis*, II Pasteur, SERNE (1946) — 2.5.1.2.2 — podendo notar-se íntima

relação entre a acção imunológica exercida pelos soros dos cobaias vacinados e o grau de imunidade.

De maneira geral, resistiam à contraprova os cobaias cujos soros actuavam imunologicamente na diluição 1/3 na fase logarítmica. A protecção verificava-se a partir do 6.º dia; ao 8.º era cerca de 50 % e ao 10.º superior a esta percentagem, o que está de acordo com as afirmações de STERNE (1946) sobre o assunto. Aos 21 e 30 dias notava-se a maior protecção, praticamente 100 %, a qual depois decrescia lentamente; aos 90 dias, normalmente, ainda mais de 50 % dos cobaias vacinados resistiam à contraprova.

A acção imunológica *in vitro* corria paralela com o grau de imunidade, principalmente em relação à máxima concentração ensaiada — 1/3;

QUADRO 42

VACINA DO CARBÚNCULO HEMÁTICO

Acção imunológica e imunidade

Tempo de imunização (a)	IN VITRO				IN VIVO
	Acção imunológica (b) Diluição do soro				Protecção (c)
	1/3	1/5	1/7	1/9	
4	—	—	—	—	—
6	±	—	—	—	±
8	±	—	—	—	±
10	±	—	—	—	+
12	+	—	—	—	+
14	+	±	—	—	+
21	+	±	—	—	+
30	+	±	—	—	+
60	±	—	—	—	+
90	±	—	—	—	+

+ = mais de 50 %

± = cerca de 50 %

± = menos de 50 %

— = 0

(a) = dias; (b) = fase logarítmica; (c) = 2.5.1.2.2.

é se em relação a valores superiores do soro *in vitro* — acção imunológica em maiores diluições — as diferenças parecem mais acentuadas, isto deve-se a ser fixa a dose de contraprova na apreciação de imunidade.

Os soros dos cobaias vacinados mostravam menor acção imunológico sobre a estirpe virulenta Ba 245 e a imunidade estabelecia-se mais tardiamente em relação à D. S. M. da mesma estirpe. De maneira geral, só a partir do 10.º dia se começava a verificar protecção que atingia os 50 % ao 14.º; nesta altura, a maioria dos soros exercia acção imunológica na diluição 1/3. Aos 21 e 30 dias notava-se também maior protecção e acção imunológica — a primeira superior a 50 %, raramente 100 %, e a segunda, nalguns soros, era observada na diluição 1/5. Aos 90 dias o poder protector era ainda superior a 50 % e a acção imunológica verificava-se na diluição 1/3 em cerca de 50 % dos cobaias vacinados, mas em período menor da fase logarítmica.

Outros tipos de preparação da vacina «Sterne» — glicerinada/saponinada, glicerinada e sem adjuvante — foram também ensaiados nestas condições, no cobaia. Os resultados obtidos com as vacinas glicerinada/saponinada e glicerinada pouco divergiam dos alcançados com a vacina glicerinada/precipitada. Contudo, a protecção e acção imunológica afiguravam-se mais acentuadas nos primeiros dias com as vacinas glicerinada/saponinada e só glicerinada, principalmente com aquela; dos 21 aos 30 dias o comportamento mostrava-se semelhante e, depois, dos 30 aos 90 dias, a maior protecção e acção imunológica verificavam-se com a vacina glicerinada/precipitada.

Estes resultados, embora não concludentes dado o reduzido número de ensaios e de animais utilizados, merecem ser tidos em atenção pelo que sugerem no âmbito do estudo, a que se procedeu. A vacina sem adjuvante — suspensão de esporos em soluto fisiológico — praticamente não protegia nestas condições, o que está de acordo com a experimentação de STERNE (1948); normalmente, os soros diluídos a 1/3 não exerciam acção imunológica significativa na fase logarítmica, principalmente em relação à estirpe virulenta Ba 245.

Os resultados dos ensaios em coelhos vacinados com 1 c. c. da vacina «Sterne» — glicerinada/precipitada — e contraprovados com 1 D. S.

M. da estirpe virulenta Ba 245 — 2.5.1.2.2 — revelam igualmente a estreita relação entre acção imunológica e imunidade.

Ao 7.º dia raramente ocorria protecção e escassos eram os soros que exerciam acção imunológica na diluição 1/3 sobre a mesma estirpe; ao 14.º dia a protecção era de cerca de 50 % e a acção imunológica observava-se na diluição 1/3, igualmente em cerca de 50 % dos soros; aos 21 e 30 dias a protecção era superior a 50 % e a acção imunológica patenteava-se na diluição 1/3 na maioria dos soros; aos 60 dias a protecção era superior a 50 % e a acção imunológica observava-se apenas em cerca de 50 % dos soros na diluição referida; aos 90 dias a protecção andava andava ainda à volta de 50 %, quando menos de 50 % dos soros exerciam acção imunológica na diluição 1/3 e em menor período da fase logarítmica.

Nos ovinos, inoculados com 1 c.c. da mesma vacina, a protecção aos 21 dias era de cerca de 100 %; a maioria dos soros exerciam acção imunológica na diluição 1/3 sobre a mesma estirpe, embora em período menor da fase logarítmica.

A acção imunológica foi também apreciada em soros de animais vacinados com as diversas estirpes atenuadas a que se refere o quadro 6, concordando os resultados com os obtidos nas experiências da imunidade.

Foram também ensaiadas no cobaia e coelho vacinas desvitalizadas pelo formol, com e sem adjuvante, e tendo por base da sua preparação as estirpes II-IPP e Ba 245. O teor em microrganismos destas vacinas correspondia ao grau 5 da escala do nefelómetro de McFARLAND. A dose vacinal era de 1 c. c. por via subcutânea e a contraprova realizada com 100 a 200 D. M. M. da estirpe II-IPP e 1 D. S. M. da estirpe virulenta Ba 245 no cobaia; no coelho fazia-se com 1 D. S. M. da estirpe Ba 245.

A acção imunológica e o grau de imunidade eram verificados normalmente 21 a 30 dias após a vacinação. Os resultados *in vitro* e *in vivo* concordavam, mas as diferenças observadas em relação às estirpes utilizadas na preparação das vacinas e nas contraprovas eram agora mais acentuadas, apesar de serem do mesmo tipo imunológico; esses resultados variavam ainda com o modo de preparação da vacina. Assim, vacinas a partir de culturas das estirpes II-IPP e Ba 245 em caldo simples e desvitalizadas às 24 horas não protegiam os animais de ensaio, mesmo quando

precipitadas pelo alumen ou adicionadas de adjuvante oleoso; os soros dos animais vacinados também não exerciam acção imunológica na diluição 1/3 sobre as referidas estirpes.

Contudo, a vacina preparada a partir de hemoculturas em caldo soro de cobaia, a 1/3, obtidas de animais desta espécie inoculados, respectivamente, com II-IPP e Ba 245, conferia ao cobaia expressivo grau de resistência à acção destas estirpes; os soros destes animais exerciam acção imunológica *in vitro* sobre as mesmas, na diluição 1/3. Similar comportamento se verificava no coelho em relação à estirpe virulenta Ba 245.

As vacinas preparadas com culturas de 12 a 14 horas mostravam maior poder imunizante. Porém, a vacina preparada com a estirpe atenuada II-IPP, que exercia significativa acção protectora no cobaia contra a respectiva estirpe, mostrava-se ineficaz no que concerne à estirpe virulenta Ba 245 nas duas espécies animais de ensaio; contudo, a vacina com base na estirpe virulenta conferia certa protecção contra as duas estirpes no cobaia.

Os resultados da acção imunológica concordavam com os da imunidade cruzada, isto é, era menos acentuada sobre a Ba 245 a acção exercida pelos soros dos animais vacinados com a estirpe atenuada II-IPP.

Nestes ensaios a imunidade conferida era inferior à da vacina viva, e a acção imunológica exercida pelos soros na diluição 1/3 era também de menor intensidade e duração na fase logarítmica. Com vacina viva as diferenças verificadas em relação às estirpes de contraprova eram menos expressivas.

Uma segunda dose de vacina morta, inoculada aos 14 dias da primeira, tornava mais sólida a imunidade e determinava em relação a maior número de soros mais intensa acção imunológica na diluição 1/3, na fase logarítmica. No que concerne uma segunda inoculação da vacina «Sterne» era menos evidente a divergência dos resultados.

A imunização parecia mais intensa com as vacinas mortas a partir de culturas em meios líquidos adicionados de soro normal da espécie animal interveniente no ensaio. Contudo, as experiências realizadas, em reduzido número, neste sentido, não permitem ainda dar significado a esta observação. Parecia também ser mais acentuada a partir dos 30 dias

a imunidade conferida pelas preparações vacinais adicionadas de adjuvante oleoso em relação às precipitadas pelo alumen.

A imunização contra o carbúnculo hemático com antígenos desvitalizados tem sido objecto de vários estudos por parte dos mais diversos investigadores — PUZISS e WRIGHT (1954), BELTON e STRANGE (1954), STRANGE e BELTON (1954), BOOR e TRESSELET (1955), PUZISS e WRIGHT (1959), WRIGHT *et al* (1962).

Estudou-se também a aglutinação dinâmica das culturas nalguns soros de animais inoculados com vacinas mortas e vivas. Para esse efeito as diluições dos soros eram mais elevadas. A aglutinação normalmente verificava-se nas culturas a partir do 4.º dia, atingindo valores variáveis, 10 a 100 ×, em relação à acção imunológica.

Com vacinas mortas era mais acentuada e irregular esta variação, não se notando igualmente relação directa com a imunidade. Ao contrário da acção imunológica, observava-se praticamente aglutinação em todos os soros, sendo mais evidente entre os 21 e 30 dias. As variações verificadas na D. M. I. das diferentes estirpes de *B. anthracis*, chegando por vezes a atingir 3 × em relação ao mesmo soro imune, são agora de considerar na apreciação da acção imunológica dos soros dos animais vacinados, dada a estreiteza dos limites de diluição e da sua aproximação nos ensaios.

Deve utilizar-se por esse motivo neste estudo *in vitro* uma estirpe virulenta, cujo crescimento se processe em cadeias com o menor número possível de elementos, a fim de tornar mais precisos os resultados.

3.7.1.4 — Vacina do mal rubro

Com o mesmo fim, foram também ensaiadas vacinas do mal rubro, principalmente a do tipo Traub. No ratinho, verificava-se a imunidade específica; no cobaia, resistente ao *E. rhusiopathiae*, observava-se a acção imunológica dos soros; no coelho, de relativa susceptibilidade, esta mesma acção e ainda a imunidade.

O Quadro 43 apresenta os valores médios da acção imunológica verificada *in vitro* nos soros de cobaias inoculados por via subcutânea com 1 c. c. de vacina tipo Traub. Esta vacina protegia o ratinho na diluição 1/8, SHUMAN (1954). De maneira geral, ao 6.º dia começava a notar-se

acção imunológica. Ao 10.º dia cerca de 50 % dos soros exerciam já essa acção na diluição 1/3, ao 14.º dia mais de 50 % e aos 21 e 30 dias era atingido o maior grau de actuação; neste último período alguns soros actuavam na diluição 1/5.

Depois, a acção imunológica decrescia lentamente e aos 90 dias era ainda verificada em cerca de 50% dos soros, mas menos intensamente. Uma segunda inoculação da vacina aos 14 dias tornava mais acentuada a acção imunológica que era verificada em maior número de soros na diluição 1/5.

QUADRO 43

VACINA DO MAL RUBRO (a)

Acção imunológica

In vitro

Tempo de imunização (b)	ACÇÃO IMUNOLÓGICA (c) diluição do soro			
	1/3	1/5	1/7	1/9
4	—	—	—	—
6	±	—	—	—
8	±	—	—	—
10	±	—	—	—
12	+	—	—	—
14	+	—	—	—
21	+	±	—	—
30	+	±	—	—
60	±	—	—	—
90	±	—	—	—

+ = mais de 50 %

± = cerca de 50 %

— = menos de 50 %

— = 0

(a) = protegia o ratinho na diluição 1/8 — 2.5.1.1.1

(b) = dias; (c) = fase logarítmica.

No coelho, inoculado com 2 c. c. da mesma vacina por via subcutânea, os resultados da acção imunológica pouco deferiam dos obtidos na experimentação no cobaia, constante do Quadro 43. Os valores médios eram ligeiramente inferiores aos alcançados no cobaia. Ao 7.º dia raramente se notava acção imunológica na diluição 1/3; ao 14.º dia cerca de 50 % dos soros exerciam-na nessa diluição; aos 21 e 30 dias verificava-se a acção imunológica em mais de 50 % dos soros na diluição 1/3 e em alguns, ainda que em número reduzido, na diluição 1/5 — isto, tal como no cobaia.

Depois, processava-se lentamente o declínio, e aos 90 dias menos de 50 % dos soros exerciam acção imunológica na diluição 1/3, e ainda menos intensamente. A imunidade, verificada por via endovenosa, apesar de certa irregularidade, mostrava-se directamente relacionada com a acção imunológica. Notava-se, contudo, no que se refere aos valores médios, maior protecção que acção imunológica na diluição 1/3; assim, ao 7.º e 90.º dias cerca de 50 % dos coelhos resistiam à infecção na altura em que menos de 50 % dos soros exerciam acção imunológica a 1/3 — facto este devido possivelmente à menor susceptibilidade do coelho ao *E rhusiopathiae* e ao maior período de evolução da doença.

Os soros de coelhos a que se ministraram duas doses de vacina, espaçadas de 14 dias, mostravam ao 30.º dia mais intensa acção imunológica, observada em maior número de soros na diluição 1/5, tal como no cobaia. Ela era também mais acentuada se partes iguais da dose vacinal fossem inoculadas em 4 zonas diferentes — inguinais e axilares.

Outras preparações foram ensaiadas no cobaia e coelho, sendo a acção imunológica e a imunidade verificadas apenas 21 a 30 dias depois da inoculação da vacina. Assim, os soros de cobaias e de coelhos inoculados com vacinas do mesmo tipo mas sem valor imunizante para o ratinho evidenciaram fraca acção imunológica. Podia ela verificar-se com algumas destas vacinas nos soros diluídos a 1/3, mas a sua intensidade era menor e menos duradoura na fase logarítmica.

Contudo, notava-se ainda nestas condições certo grau de resistência à infecção no coelho. Neste tipo de vacina a substituição do hidróxido de alumínio por adjuvante oleoso — Arlacel A e parafina líquida — não originava aumento significativo no valor imunizante para o ratinho, nem

na acção imunológica dos soros dos cobaias e coelhos vacinados. Por outro lado, os soros de cobaias e de coelhos inoculados com vacinas preparadas a partir de culturas em caldo soro a 1/3 da respectiva espécie actuavam mais intensamente, sendo a imunidade conferida ao coelho, nestas condições, mais acentuada que no ratinho.

Os soros de cobaias e de coelhos inoculados por via subcutânea com suspensões vivas de *E. rhusiopathiae*, principalmente quando obtidas de culturas em caldo soro a 1/3 da respectiva espécie e absorvidas pelo hidróxido de alumínio, exerciam pronunciada acção imunológica. Neste último caso, havia maior letalidade no coelho, mas os sobreviventes revelavam acentuada imunidade à infecção por via endovenosa.

A acção imunológica verificada nos soros de cobaias e de coelhos inoculados com culturas atenuadas de *E. rhusiopathiae* — estirpes Staub e Connaught — era menos evidente apesar da manifesta capacidade imunizante. Com culturas desvitalizadas destas estirpes essa acção era ainda menos intensa e de menor duração na fase logarítmica, notando-se apenas nos soros diluídos a 1/3 e sendo, nestas condições, deficiente a resistência conferida ao coelho.

A aglutinação observada, de maneira geral, a partir do 4.º dia, atingia os valores mais elevados aos 21 e 30 dias. A relação entre ela e a acção imunológica variava acentuadamente — 10 a 100 × — principalmente com suspensões desvitalizadas.

Tão pouco a reacção aglutinante mostrava ligação directa com a imunidade.

3.7.1.5 — Vacina da salmonelose (*S. cholerae suis*)

Foram, igualmente, ensaiadas no cobaia e no coelho vacinas de rebanho destinadas à profilaxia da salmonelose por *S. cholerae suis*. Os resultados obtidos na prática de campo com a aplicação destas vacinas foram satisfatórios.

No Quadro 44 constam os valores médios da acção imunológica e os da imunidade verificados em cobaias inoculados com 1 c. c. de vacina por via subcutânea. De maneira geral, ao 6.º dia começava-se a observar

acção imunológica na diluição 1/3, que ao 14.º se mostrava extensiva a cerca de 50 % dos soros nas mesmas condições. Aos 21 e 30 dias mais de 50 % dos soros actuavam imunològicamente na diluição referida e alguns deles, menos de 50 %, na diluição 1/5. Aos 60 dias a acção imunológica apenas se verificava em cerca de 50 % dos soros na diluição 1/3, e aos 90 dias abaixo daquela percentagem, sendo pouco intensa e manifestando-se apenas em curto período da fase logarítmica. A imunidade, por via intraperitoneal, mostrava-se também directamente relacionada com a acção imunológica.

QUADRO 44

VACINA DA SALMONELOSE *S. CHOLERAE SUIS*
ACÇÃO IMUNOLÓGICA E IMUNIDADE

Tempo de imunização (a)	IN VITRO (b)				IN VIVO
	Acção imunológica diluição do soro				Protecção (c)
	1/3	1/5	1/7	1/9	
4	—	—	—	—	—
6	+	—	—	—	+
8	+	—	—	—	+
10	+	—	—	—	+
12	+	—	—	—	+
14	±	—	—	—	±
21	+	+	—	—	+
30	+	+	—	—	+
60	±	—	—	—	±
90	+	—	—	—	±

+ = mais de 50 %

± = cerca de 50 %

— = menos de 50 %

— = 0

(a) = dias;

(b) = fase logarítmica;

(c) = 14 dias.

Assim, a partir do 6.º dia notava-se resistência à infecção, sendo esta mais intensa aos 21 e 30 dias; contudo, aos 60 e 90 ela era ainda bastante acentuada, com protecção de cerca de 50 %. Vê-se que em relação à acção imunológica na diluição 1/3 o poder protector é ligeiramente superior, possivelmente devido à menor susceptibilidade do cobaia, já então com mais idade e maior peso, e ao maior período de evolução da doença.

Os resultados respeitantes à imunidade eram contudo bastante irregulares, em parte como admissível consequência da dificuldade em controlar a D. S. M., variável nas condições de ensaio.

A acção imunológica e a imunidade foram também verificadas em coelhos inoculados com 2 c. c. da mesma vacina por via subcutânea. Ao 7.º dia, na generalidade dos casos, observava-se aglutinação das culturas; a acção imunológica exercida por alguns soros na diluição 1/3 era pouco intensa e apenas, inicialmente, na fase logarítmica. Aos 14 dias cerca de 50 % dos soros eram actuaes na diluição apontada, posto que fracamente. Aos 21 e 30 dias a acção imunológica era mais intensa e verificava-se em mais de 50 % dos soros na diluição 1/3, e em menos de 50 % na diluição 1/5. Aos 60 dias caía a cerca de 50 %, baixando aos 90 dias para menos daquela percentagem na mesma diluição 1/3.

A imunidade mostrava-se igualmente relacionada com a acção imunológica. A protecção, verificada por via subcutânea, era contudo inferior à do cobaia, menos susceptível à infecção pela *S. cholerae suis*. Os resultados evidenciavam certa irregularidade não só devido à dificuldade de controlar a D. S. M. de contraprova, mas também à heterogeneidade dos animais de experiência adquiridos no mercado abastecedor e não procedentes de criação própria.

Uma segunda inoculação de vacina, decorridos 14 dias da primeira, aumentava sensivelmente a resistência do cobaia e do coelho à infecção e mais elevado número de soros actuavam imunologicamente nas diluições 1/3 e 1/5 e, como nos casos precedentes, em maior período de tempo na fase logarítmica. Os resultados da imunidade mostravam-se também mais regulares.

Eram igualmente mais acentuadas a resistência à infecção e a acção imunológica se partes iguais da dose vacinal fossem simultaneamente inoculadas em 4 regiões diferentes do organismo — axilares e inguinais.

Foram também ensaiadas no cobaia vacinas de *S. cholerae suis* com o mesmo teor bacteriano — escala 5 do nefelómetro de McFarland — mas de diferente preparação, a saber:

- Temperaturas de crescimento das culturas — 25° e 37°C;
- Tempos de incubação das culturas — 8, 16, 24 e 48 horas;
- Inactivação das culturas com mertiolato, formol ou ácido fénico às temperaturas de cerca de 5°, 25° e 37°C, e pelo calor à de 65°C;
- Meios de cultura — caldo BAIN e este adicionado de 30 % de soro normal, inactivado, de cobaia, coelho, ovino, suino, equino, bovino e galinha;
- Sem adjuvante, precipitadas pelo alumen, absorvidas pelo hidróxido de alumínio e com adjuvante oleoso.

A acção imunológica e a imunidade eram apreciadas cerca de 30 dias depois da inoculação de 1 c. c. da vacina por via subcutânea. A contraprova era feita por via intraperitoneal. Nestes ensaios utilizava-se igualmente nas duas provas uma hemocultura de *S. cholerae suis* de 16 horas em caldo soro de cobaia a 30 %.

A maior acção imunológica e imunidade pareciam corresponder à vacina preparada com suspensões obtidas de hemoculturas em caldo soro de cobaia a 30 % com 16 horas de desenvolvimento a 37°C, desvitalizadas pelo mertiolato na geleira a 5°C e adicionada de adjuvante oleoso. As divergências verificadas eram mais acentuadas em relação às preparações — caldo soro de cobaia/e de outras espécies, principalmente de galinha, ovino, equino e bovino; temperatura de crescimento 25°-37°C; tempos de incubação 8, 16 e 24-48 horas; inactivada pelo mertiolato, formol/ácido fénico, calor; sem adjuvante/com adjuvante.

A acção imunológica e a imunidade eram ainda mais pronunciadas com suspensões vivas, não patogénicas para o cobaia por via subcutânea.

Estes resultados necessitam de confirmação baseada em análise estatística, uma vez que, a par de determinados tipos de preparação em que as diferenças eram mais acentuadas, outros havia em que eram pouco evidentes e nalguns ensaios mesmo praticamente idênticos os resultados da experimentação.

A aglutinação das culturas observava-se igualmente a partir do 4.º dia; atingido normalmente os valores mais elevados aos 21 dias. Se as suspensões vacinais eram adicionadas de adjuvante oleoso aquele período, de maneira geral, ascendia a 30 dias.

A relação entre a aglutinação e a acção imunológica variava acentuadamente — 10 a 100 ×; não se verificava, mais uma vez, qualquer conexão directa com a imunidade.

3.7.1.6 — Vacina da pasteurelose (*P. multocida*)

Com a mesma finalidade e dentro de idêntico esquema foram também ensaiadas no cobaia vacinas de rebanho destinadas à profilaxia da pasteurelose suína. As estirpes de *P. multocida* pertenciam ao tipo VI de ROBERTS, AFONSO *et al* (1964 a). Estas vacinas protegiam o ratinho, segundo o método de CARTER (1950), contra cerca de 10 000 DL 50 e os resultados obtidos com a sua aplicação foram satisfatórios.

Do Quadro 45 constam os valores médios respeitantes à acção imunológica e imunidade verificados em cobaia inoculadas por via subcutânea com 1 c. c. da vacina, de novo se observando relação directa entre uma e outra. Os resultados pouco diferem dos obtidos nas mesmas condições com a vacina *S. cholerae suis* de preparação similar. Quadro 44.

A acção imunológica era da mesma forma pouco acentuada, exercendo-se apenas em certo período da fase logarítmica. A imunidade era menos pronunciada dada a maior susceptibilidade do cobaia à *P. multocida*. Por via subcutânea, aos 14 dias, a protecção era de cerca de 50 % e aos 21 e 30 dias superior a esta percentagem. Por via intraperitoneal era ainda menos evidente. Aos 21 e 30 dias, altura em que se verificava maior acção imunológica, a protecção por esta via nem sempre atingia os 50 %.

QUADRO 45

VACINA DA PASTEURELOSE (*P. MULTOCIDA*)

Ação imunológica e imunidade

Tempo de imunização (a)	IN VITRO (b)				IN VIVO (c)	
	Acção imunológica Diluição do soro				Protecção	
	1/3	1/5	1/7	1/9	subc.	intrap.
4	—	—	—	—	—	—
6	±	—	—	—	—	—
8	±	—	—	—	±	—
10	±	—	—	—	±	—
12	±	—	—	—	±	±
14	±	—	—	—	±	±
21	+	±	—	—	+	±
30	+	±	—	—	+	±
60	±	—	—	—	±	±
90	±	—	—	—	±	±

+ = mais de 50 %

± = cerca de 50 %

± = menos de 50 %

— = 0

(a) = dias;

(b) = fase logarítmica;

(c) = 7 dias.

No coelho, inoculado com 2 c. c. da mesma vacina por via subcutânea, observava-se normalmente aglutinação ao 7.º dia; alguns soros actuavam imunologicamente na diluição 1/3, por curto prazo na fase logarítmica. Aos 14 dias, cerca de 50 % dos soros exerciam acção imunológica na diluição apontada mas ainda com fraca intensidade, enquanto aos 21 e 30 dias excediam aquela percentagem e alguns mesmo, menos de 50 %, actuavam na diluição 1/5. A acção imunológica era igualmente nesta altura mais pronunciada, decrescendo aos 60 e 90 dias em que ficava restringida a menor número de soros — cerca de 50 % e menos de 50 % respectivamente — e apenas na diluição 1/3. A imunidade mostrava-se

da mesma forma relacionada directamente com a acção imunológica, mas era inferior à do cobaia, menos susceptível à infecção pela *P. multocida*.

Uma segunda inoculação de vacina, após 14 dias da primeira, aumentava de maneira sensível a resistência do cobaia e do coelho à pasteurelose, fosse qual fosse a via empregada, mas mais aparentemente quando se utilizava a intraperitoneal, mais soros actuando imunologicamente então nas diluições 1/3 e 1/5 numa maior extensão da fase logarítmica. Eram também mais acentuadas a resistência à infecção e a acção imunológica decorrentes da inoculação simultânea de partes iguais da dose vacinal em 4 pontos diferentes do organismo, no caso, as regiões axilares e inguinais. Os resultados da imunidade mostravam-se paralelamente mais regulares.

Tal como em relação à *S. cholerae suis* foram ensaiadas no cobaia vacinas de *P. multocida* com o mesmo teor bacteriano — grau 5 do nefelómetro de McFarland — mas de diferente preparação.

A acção imunológica e a imunidade eram verificadas também 21 a 30 dias depois da vacinação, com contraprova feita por via intraperitoneal. Era utilizada, da mesma forma, nestes ensaios, hemocultura de *P. multocida* de 16 horas a 37°C em caldo BAIN adicionado de 30 % de soro normal de cobaia.

A maior acção imunológica e imunidade pareciam corresponder novamente à vacina preparada com suspensões obtidas de hemocultura em caldo soro de cobaia a 30 %, com 16 horas de crescimento a 37°C, desvitalizadas pelo mertiolato na geleira a 5°C e com adjuvante oleoso. As diferenças mais acentuadas eram verificadas igualmente em relação às preparações — caldo soro de cobaia/e de outras espécies, agora principalmente equino, ovino e galinha; temperatura de incubação 25°-37°C; tempo de desenvolvimento 8, 16 e 24-48 horas; inactivação pelo mertiolato, formol/ácido fénico, calor; sem adjuvante/com adjuvante.

Mas estes dados são também condicionais, havendo necessidade de os basear estatisticamente, tanto mais que as diferenças entre determinadas preparações eram pouco evidentes e, nalguns ensaios, os resultados praticamente idênticos.

De maneira geral, de novo se observava aglutinação a partir do 4.º dia, atingindo os valores mais elevados aos 21 dias e, se com adjuvante oleoso, normalmente aos 30 dias.

A relação entre aglutinação e acção imunológica variava acentuadamente — 10 a 100 × ; não se observava qualquer relação directa com a imunidade.

3.7.1.7 — Vacinas mistas

Foram também ensaiadas no cobaia vacinas mistas de diferente composição imunológica em cuja preparação eram utilizadas, em partes iguais, suspensões de estirpes de *P. multocida* e de *Salmonella* de diferentes tipos. A preparação era idêntica — culturas de 16 horas a 37°C em caldo BAIN, desvitalizadas pelo formol à temperatura ambiente, precipitadas pelo alumen; teor bacteriano do grau 5 do nefalómetro de McFarland.

QUADRO 46
VACINAS MISTAS (a)

Acção imunológica

In vitro

Número de tipos imunológicos	ACÇÃO IMUNOLÓGICA (b)		
	Diluição do soro a 1/3		
	Número de inoculações de vacina		
	1	2	3
2	+	+	+
3	+	±	+
4	—	+	±
5	—	—	+
6	—	—	—

+

±

+

—

(a) = Salmonelose e pasteurelose;

(b) = Fase logarítmica.

De maneira geral era verificada a acção imunológica dos soros dos cobaias vacinados. Apenas era possível a observação da imunidade em relação às estirpes virulentas para o cobaia, animal de ensaio. Contudo, na preparação das vacinas ensaiadas entrava sempre uma ou mais estirpes virulentas para os animais daquela espécie. Pelo menos, no que concerne a estas, era verificada a imunidade nas diferentes composições imunológicas e esquemas vacinais.

As vacinas ensaiadas eram preparadas com 2 a 6 tipos imunológicos e os cobaias inoculados com 1, 2 e 3 doses de 1 c. c. por via subcutânea. O intervalo entre as inoculações era de 21 dias e estas feitas em zonas diferentes. A acção imunológica e a imunidade eram verificadas passados 21 dias sobre a última inoculação.

O Quadro 46 abrange, em conjunto, o que de maneira geral se verificava nos ensaios realizados quanto à acção imunológica, evidenciando assim a sua dinâmica em relação a diferentes composições e esquemas vacinais. O cobaia, dentro do condicionalismo da experimentação, não se imunizava simultâneamente contra os diversos tipos imunológicos constantes da vacina.

Mesmo após três inoculações, a maior parte dos soros não exercia acção imunológica na diluição 1/3 contra os 5 e 6 tipos. Pelo contrário, verificava-se aglutinação nas culturas em relação aos diversos imunotipos representados nas vacinas depois de uma inoculação.

Maiores doses ou vacinas mais concentradas não aumentavam proporcionalmente a acção imunológica e a imunidade em relação aos diversos imunotipos nos cobaias inoculados. Dentro de certos limites de teor bacteriano era mais acentuada a acção das inoculações ou, seja, estava-se mais na dependência dos esquemas vacinais.

Não era também perceptível qualquer ligação directa entre acção imunológica e aglutinação.

A acção imunológica em função dos diferentes imunotipos intervinientes nas vacinas era bastante irregular, sendo igualmente variável a sua intensidade na fase logarítmica.

A imunidade, verificada apenas em relação a determinados tipos, mostrava-se directamente relacionada com a acção imunológica.

A técnica da acção imunológica *in vitro* é assim de maior utilidade na avaliação da capacidade imunizante das vacinas mistas. No mesmo grupo de animais é agora possível verificar essa acção, directamente relacionada com a imunidade, em função dos diversos imunotipos das vacinas e estabelecer mais apropriados esquemas profilácticos.

3.7.2 — PODER IMUNIZANTE DAS VACINAS

Nos ensaios de imunização realizados, dependia do método de apreciação e da estirpe de contraprova a relação entre a imunidade e a acção imunológica.

De maneira geral observava-se protecção dos animais cujos soros exerciam acção imunológica *in vitro*, em certa extensão da fase logarítmica na diluição 1/3. Estes soros actuavam ainda na diluição 1/5, mas em menor período de tempo da fase referida. Por via subcutânea, contudo, ainda se verificava nítida resistência nos animais cujos soros exerciam acção imunológica apenas na diluição 1/3 e em mais curto período da fase logarítmica, o que dependia, também, da espécie animal, tipo de infecção e via de contraprova.

Na infecção natural poderá ainda verificar-se imunidade com valores mais baixos da acção imunológica e o seu grau dependerá desta, fora da corrente sanguínea e, por conseguinte, da espécie animal e do tipo de infecção.

Torna-se pois necessário proceder a estudos de imunização em que estes dois factores entrem em jogo de forma a ser viável o estabelecimento dos índices mínimos na apreciação das vacinas e bem assim a elaboração dos respectivos esquemas profilácticos. O calendário das vacinações será baseado no conhecimento da imunidade das populações no decorrer do tempo, obtido através dos resultados da infecção natural, estatisticamente analisados. Nesse mesmo estudo se baseará igualmente a correlação da acção imunológica, simultâneamente verificada.

Os resultados dos ensaios de imunização, agora realizados, mostram que a evolução da imunidade em função do tempo se processa de harmo-

nia com os já obtidos na experimentação anterior e referenciados na literatura da especialidade — WILSON e MILES (1955 b). Da mesma maneira evolui no tempo a acção imunológica, de que depende a imunidade.

3.8 — ESTADO IMUNE DAS POPULAÇÕES

O conhecimento do estado imune das populações é da maior importância sob o ponto de vista epidemiológico, e nele se devem basear, por conseguinte, os programas de imunoprofilaxia e sanidade.

As reacções sorológicas *in vitro* não permitem esse conhecimento, dada a sua falta de relação com a imunidade. Poder-se-á, contudo, vir a tomar consciência do estado imune das populações através da acção imunológica *in vitro*, uma vez verificada a sua correlação com a imunidade na infecção natural.

3.9 — IMUNIZAÇÃO

De maneira geral a infecção natural origina no organismo imunidade específica contra a reinfecção.

Nem sempre, porém, tem sido possível obter idêntica resistência com os microrganismos desvitalizados ou atenuados na sua virulência. Mesmo com estirpes naturais, inoculadas ao homem ou a animais, pouco susceptíveis por determinada via, a resistência criada é menor que a resultante da infecção natural. A imunidade obtida com microrganismos atenuados, ainda que menor que aquela, é de maneira geral maior que a originada com microrganismos desvitalizados e é só com base naqueles que se tem logrado a imunização contra determinadas doenças infecciosas.

A imunização depende, contudo, de factores como a estirpe microbiana e condições de crescimento, espécie animal e via de inoculação, e tipo de infecção; com os microrganismos desvitalizados as variações são ainda maiores, dependendo também da inactivação.

A imunização, sem base imunológica, assentava na experimentação e evoluía durante esta por tal forma que se afigurava cada vez mais complexo o mecanismo da imunidade específica.

O desconhecimento da acção imunológica e da sua dinâmica impedia a generalização da prática da imunoprofilaxia.

Os resultados dos ensaios de imunização agora realizados contribuem para o conhecimento da dinâmica imunológica, da qual depende em última análise, *in vivo*, a imunidade específica.

De facto, verifica-se que a acção imunológica e a imunidade variam com a estirpe bacteriana utilizada na preparação da vacina, meio de cultura, temperatura e tempo de incubação, desvitalização das culturas e, ainda, com a espécie animal e tipo de infecção.

De maneira geral, as estirpes atenuadas desvitalizadas não originam imunidade contra a infecção natural. Com agentes vivos atenuados a acção imunológica e a imunidade são mais acentuadas, dependendo da estirpe e condições de crescimento, espécie animal, via de inoculação, e tipo de infecção, sendo, contudo, menores as variações observadas.

Com estirpes naturais inoculadas em animais, pouco susceptíveis por determinadas vias, são ainda mais pronunciadas a acção imunológica e a imunidade.

A acção imunológica e a imunidade específica dependem, por conseguinte, da dinâmica das populações bacterianas, ou seja, das variações antigénicas de superfície no ambiente em que se processa o crescimento, como se pode inferir da experimentação *in vitro* abrangendo a aglutinação e acção imunológica e, *in vivo*, compreendendo a soro-protecção.

A composição genética das populações dos microrganismos varia com o ambiente, e alterações fenotípicas de natureza antigénica com expressão imunológica foram já assinaladas entre alguns dos seus componentes. Estão neste caso a *S. typhi*, FÉLIX e PITT (1934 a, b), FÉLIX *et al* (1934), FÉLIX e BHATNAGAR (1935), FÉLIX (1935), FÉLIX e PITT (1936), CARLINFANTI (1946); a *B. pertussis*, LESLIE e GARDNER (1931), STANDFAST (1951), KUWAJIMA *et al* (1956), ELDERING *et al* (1966); a *P. pestis*, BURROWS e BACON (1956), BEN-EFRAIM *et al* (1961), MEYER (1964); a *P. tularensis*, PANNELL (1958), PANNELL e CORDLE (1962), HATCH e NICHOLS (1964); a *P. multocida*, BAIN (1954, 1955, 1958, 1963); o *E. rhusiopathiae*, GLEDHILL (1947, 1952), TRAUB (1949); o *B. anthracis*, PUZISS e WRIGHT (1954, 1959), BELTON e STRANGE (1954), STRANGE e BELTON (1954), WRIGHT *et al* (1962); a *E. coli*, BRIGGS (1951), KAUFFMANN

(1954), LOVELL (1959), BOLAÑOS e DEWITT (1966); outras espécies bacterianas, WILSON e MILES (1955 a, b).

Nos vírus, mais dependentes do meio ambiente, FRANCIS (1959), BURNET (1960), as variações antigénicas são mais expressivas imunológicamente, facto largamente verificado no estudo da preparação de vacinas, principalmente no das inactivadas, e referenciado na literatura da especialidade.

Assim, a acção imunológica, da qual, na realidade, parece depender *in vivo* a imunidade específica, é de natureza dinâmica, resultando da reacção antigénio/anticorpo, qualitativa/quantitativa, em extensão na superfície microbiana das populações e não apenas circunscrita a determinados antigénios. Implicitamente, é uma consequência da natureza dinâmica do tipo imunológico.

Da acção dos adjuvantes resulta maior formação de anticorpos, principalmente sob o ponto de vista da especificidade; situação idêntica deriva das inoculações em locais diferentes do organismo ou espaçadas por vários lapsos de tempo. Daqui, mais intensa acção imunológica e, por conseguinte, mais eficiente imunidade.

Pensa-se, pois, que é na natureza dinâmica do tipo imunológico e acção imunológica que se filia toda a complexa fenomenologia da imunidade específica largamente referida na bibliografia, principalmente em relação aos microrganismos desvitalizados, utilizados na imunização.

Assim se compreende que o mais alto grau de imunidade corresponda à infecção natural — máxima expressão antigénica das populações no complexo ambiente orgânico e respectiva acção imunológica — que seja menos acentuada a imunidade conferida por agentes virulentos inoculados por via diferente da da infecção natural, sem manifestação da doença e, por conseguinte sem invasão, e que seja ainda menos pronunciada a imunidade derivada da intervenção de microrganismos atenuados.

Neste caso, há ainda a considerar, além da diminuição de virulência, diferenças mais acentuadas de estrutura antigénica das populações em relação ao ambiente. Essa base dinâmica justifica mais a razão por que a imunidade obtida por agentes desvitalizados seja a menos intensa e nem sempre eficaz, dada a profunda divergência entre os meios de crescimento *in vitro* e *in vivo*, donde resulta variação mais acentuada da es-

estrutura antigénica de superfície das populações microbianas. Compreende-se, assim, em relação às bactérias, a maior acção imunizante das vacinas mortas, preparadas em meios especiais, com estirpes recentemente isoladas ou procedentes de passagens por animais susceptíveis — hemoculturas — do que a obtida com produtos vacinais a partir de meios simples e de estirpes mantidas *in vitro* através de subculturas nos mesmos meios, conforme se encontra largamente referenciado na literatura da especialidade.

Neste caso, o mais alto grau de imunidade será obtido com microrganismos cultivados em meios com elevada percentagem de soro normal da espécie animal considerada e, melhor ainda, com hemoculturas nas mesmas condições, como se verificou. A estirpe bacteriana deverá, nestas circunstâncias, ser isolada e cultivada *in vitro* em meio apropriado com elevada concentração de soro da espécie animal em causa, evitando-se assim maior divergência das estruturas antigénicas das populações, o que se traduz em mais acentuada imunidade.

O mesmo se verifica em relação aos vírus, principalmente com as vacinas inactivadas. Neste caso, o mais alto grau de imunidade é obtido com vacinas preparadas a partir de tecidos e fluidos de animais mortos pela infecção experimental ou, melhor ainda, pela natural. Com vacinas inactivadas de vírus virulento proveniente de cultura de tecidos, *in vitro*, a imunidade é menos acentuada, e ainda menor, se de vírus atenuado.

O valor imunizante destas vacinas depende igualmente da estirpe de vírus e sua proveniência, do tipo celular e sua origem, e do meio de cultura — peste suína, COLE *et al* (1962), AIRAPETIAN *et al* (1963); febre aftosa, LEUNEN *et al* (1966), MAMMERICKX e LEUNEN (1966); Newcastle, LARIN (1964). O vírus de tecidos ou de culturas primárias de células, susceptíveis *in vivo*, da espécie animal a que se destina a vacina é mais imunizante que o vírus de culturas primárias de células de animal de outra espécie, embora receptível; o vírus proveniente de culturas primárias de células de animais resistentes ou de estirpes celulares é o menos imunizante.

É de salientar, contudo, que na generalidade dos casos se verifica maior acção imunizante se o vírus virulento da cultura de tecidos utilizado na preparação de vacina inactivada procede da espécie animal a que a mesma se destina.

Com vírus vivo atenuado o valor imunizante depende também da sua proveniência ou, seja, da espécie animal em que cultiva *in vivo*., ou do tipo e origem da célula em que cultiva *in vitro* — raiva, CABASSO *et al* (1965); peste suína, COLE *et al* (1962); Newcastle, GELENCZEI e BORDT (1960), LARIN (1964). É ainda de relevar que é mais imunizante o vírus vivo atenuado cultivado em tecidos ou células susceptíveis da espécie animal a que se destina.

O valor imunizante das vacinas varia, por conseguinte, com a espécie animal, tipo e via de infecção, especialmente quando se trata de microorganismos desvitalizados, facto este a ter em conta na sua apreciação. Na literatura encontram-se referências a diferente acção imunizante de vacinas em relação à espécie animal e via de contraprova — *Pneumococcus*, SMITH e CONANT (1960); *P. pestis*, GIRARD (1955); *V. cholerae*, BURROWS (1953); *P. multocida*, YAW e KAKAVAS (1957); *P. tularensis*, DOWNS e MOODY (1955); *E. rhusiopathiae*, ROEMMELE (1943); *vaccinia*, BURNET (1960); raiva, CABASSO *et al* (1965). O mesmo se verifica com os soros.

Os métodos laboratoriais de apreciação de vacinas destinadas ao homem e diferentes espécies animais só podem fornecer indicações de valor quando baseados em estudos comparativos nas espécies em causa e estatisticamente comprovados. De contrário, as indicações fornecidas podem não ser significativas. O mesmo sucede nas bactérias no que concerne à acção imunológica, dada a elevada percentagem de soro da espécie imune no meio *in vitro* por ser baixa a diluição, em que a mesma se verifica. Assim, divergem mais, antigénicamente, as populações bacterianas *in vivo* e *in vitro* em relação à espécie a imunizar e as indicações fornecidas podem igualmente não serem elucidativas.

Outro tanto acontece nos virus com a soro-neutralização *in vivo* e *in vitro*. O estudo comparativo nem sempre é exequível, principalmente no que respeita às vacinas destinadas à profilaxia humana, dada a avirulência dos respectivos agentes infecciosos para os animais de laboratório; por outro lado, a experimentação no homem tem-se fundamentado principalmente na análise estatística na infecção natural, dada a falta de relação entre teores de anticorpos determinados *in vitro* e imunidade.

Em relação às bactérias este problema poderá agora encontrar solução no conhecimento da acção imunológica *in vitro*, directamente relacionada com a imunidade, da qual na realidade depende, como tem sido observado. A acção imunológica *in vitro*, verificada em meio com elevada percentagem de soro homólogo e com estirpe virulenta sem subculturas ou passagens por animais de diferente espécie, dará indicações mais significativas acerca da imunidade por serem menos divergentes antigénicamente as populações bacterianas *in vivo* e *in vitro*.

O mesmo ocorrerá com os vírus na soro-neutralização em culturas de tecidos *in vitro*. Os resultados *in vivo* e *in vitro* serão menos divergentes se a soro-neutralização for realizada em tecidos ou culturas primárias de células susceptíveis da espécie animal em causa e em meio o mais aproximado possível, com o vírus virulento sem passagens por organismos ou espécies celulares diferentes. As estirpes celulares diploides, FERNANDES *et al* (1964), poderão também ser úteis neste sentido, por manterem *in vitro* características normais da espécie, permitindo assim o crescimento do vírus sem grande variação.

Da exposição feita pode aperceber-se — numa panorâmica de conjunto — o porquê das divergências que se registam na imunização e que estão relacionadas com os mais diversos factores, tais como: espécie bacteriana, meio de cultura, temperatura e tempo de incubação, inactivação; espécie animal, tipo de infecção e respectiva via.

Quanto maior é a variação antigénica nas populações microbianas em função do ambiente, maior é também a variação verificada na imunização, principalmente com microrganismos desvitalizados, dada a maior divergência *in vitro* e *in vivo*.

Assim se compreende também a falta de relação entre teores de anticorpos determinados *in vitro* pelas diferentes técnicas imunológicas e a imunidade específica, largamente observada e referida na literatura: nas bactérias, WILSON e MILES (1955 b); nos vírus BURNET (1960); nos parasitas, BOYD (1956), SOULSBY (1962), FULTON (1963); na transplantação, HASEK *et al* (1961), GORER (1961), STETSON (1963), KLEIN (1966).

3.10 — INFECÇÃO E IMUNIDADE

No estudo da acção imunológica *in vitro*, principalmente com soros em elevada concentração no meio de cultura, superior a 1/10, verificava-se diferente crescimento das diversas estirpes bacterianas utilizadas nos ensaios. Era também variável o crescimento da mesma estirpe em relação a soros de diferentes espécies animais. A influência do soro no desenvolvimento das várias estirpes não dependia da acção do complemento, uma vez que os soros eram inactivados a 56°C durante 30 minutos.

Assim, a susceptibilidade e resistência natural, embora se admita a sua relação com acção bactericida tissular e humoral — WILSON e MILES (1955 b), ROWLEY (1956, 1962), SKARNES e WILSON (1957), OSLER (1961), JENKIN (1963 a), SUTER e RAMSEIER (1964), SPITZNAGEL (1966 a, b) SPITZNAGEL e WILSON (1966), SCHWAB e REEVES (1966) — parece depender essencialmente da dinâmica das populações bacterianas no organismo, ambiente da maior complexidade bioquímica.

BRAUN (1949 a) aponta diferença das populações de *Brucella abortus in vitro* em meios com soro de animais susceptíveis e resistentes. O soro de animal susceptível seleccionava a forma S, virulenta, o do resistente condicionava a forma R, avirulenta. Os resultados *in vitro* estavam de acordo com o que se passava *in vivo* em relação à susceptibilidade e resistência natural à infecção nas respectivas espécies animais. A dinâmica das populações S-R da *Brucella abortus* foi depois largamente estudada *in vitro* — BRAUN (1949 b), GOODLOW *et al* (1950), BRAUN *et al* (1951), COLE (1952), ALTENBERN *et al* (1957), ALTENBERN *et al* (1959). O mesmo se tem verificado em relação a outras bactérias: *Salmonella typhimurium*, PAGE *et al* (1951); *Pasteurella pestis*, DELWICHE *et al* (1959); *Pasteurella tularensis*, MOODY (1955); *Diplococcus pneumoniae*, CARTA e FIRSHEIN (1962); *Escherichia coli*, HIRSCH (1961); *Aerobacter aerogenes*, HARRISON e LAWRENCE (1963); *Staphylococcus*, CYBULSKA e JELJASZEWICZ (1966).

De maneira geral, parecia também haver relação entre crescimento do vírus *in vivo* e *in vitro*, ENDERS (1949). Contudo, regista-se desenvolvimento do vírus *in vitro* em células resistentes *in vivo* de animais susceptíveis, e bem assim nas de animais resistentes à infecção — vírus da

poliomielite, KAPLAN (1955); vírus do fibroma e mixoma, CHAPRONIERE ANDREWES (1957). Células e vírus comportam-se diferentemente *in vivo* e *in vitro*.

A composição genética das populações microbianas varia com o ambiente. As variações de virulência e antigénicas são da maior importância na infecção e imunidade, neste sentido se tendo efectuado alguns ensaios *in vitro*.

3.10.1 — SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA À INFECÇÃO

Foi estudada *in vitro* a curva de crescimento de diferentes estirpes bacterianas em meios líquidos adicionados de soro de diversas espécies animais. Os soros eram inactivados a 56 °C durante 30 minutos para evitar possível acção bactericida associada à presença do complemento, e a sua concentração no meio de cultura variava normalmente de 1/3 a 1/10. Nos ensaios, simultaneamente e em condições idênticas, promovia-se o crescimento da mesma estirpe nos soros de diferentes espécies animais, a fim de tornar mais significativos os resultados. O grau de crescimento das diversas culturas era verificado, na mesma altura, por contagem em placas.

Observavam-se diferenças de crescimento da mesma estirpe, por vezes bastante acentuadas, em relação aos diversos soros, as quais aumentavam com a concentração destes no meio de cultura. Facto idêntico ocorria com diferentes estirpes bacterianas em função do mesmo soro, sendo as divergências de crescimento mais evidentes na fase logarítmica.

O desenvolvimento *in vitro* mostrava-se, em geral, relacionado com a susceptibilidade *in vivo*. O soro de animal susceptível favorecia o crescimento das estirpes virulentas em concentração superior a 1/10 e dificultava o das estirpes avirulentas. Com algumas destas últimas o desenvolvimento era já bastante reduzido a 1/10 e de tal maneira exíguo a 1/5 que em concentrações superiores se poderia considerar praticamente nulo. O maior crescimento destas estirpes verificava-se em meios simples sem soro.

As curvas de crescimento eram sensivelmente alteradas pelas subculturas em vários meios ou pelas passagens em animais de diversas

espécies. A maior capacidade de adaptação a meios com soro de diferentes espécies, em concentração superior a 1/10, verificava-se nas estirpes virulentas. Por sua vez, era diminuta, nas mesmas condições de experimentação, a capacidade adaptativa das estirpes avirulentas, mesmo que o soro proviesse de espécie animal susceptível a estirpe virulenta do mesmo tipo imunológico.

Em concentração de 1/5, ou superior, a curva de crescimento pouco diferia da inicial, traduzindo certa estabilidade na dinâmica das populações das estirpes atenuadas.

O crescimento da estirpe virulenta divergia intensamente após o isolamento em meios com soro de animal susceptível, na concentração superior a 1/10, e em meio sem soro, principalmente naqueles casos em que o desenvolvimento *in vitro* se processava em cadeia — *B. anthracis* e *Streptococcus*.

A disparidade de crescimento tornava-se menos acentuada com as subculturas da estirpe virulenta em meio sem soro, as quais faziam perder virulência à estirpe; por outro lado, as subculturas em meios com soro de animal susceptível, em elevada concentração, mantinham-na. O mesmo se observava *in vivo* em relação à passagem por animais de diferente susceptibilidade.

A estirpe virulenta cresce mais rapidamente nos meios com elevada concentração de soro de animal susceptível; os elementos bacterianos mostram-se, de maneira geral, isolados, mais pequenos e mais uniformes; o crescimento do *B. anthracis* e *Streptococcus* processa-se em pequenas cadeias, aproximando-se do que se passa *in vivo*. Pelo contrário, a estirpe avirulenta desenvolve-se nesses meios mais lentamente sob a forma de elementos isolados e maiores, por vezes em filamentos e em pequenas cadeias; a sua morfologia é, por conseguinte, mais irregular. Passava-se o inverso com as estirpes virulentas e as avirulentas em relação aos meios sem soro. A estirpe virulenta cresce, em geral, mais lentamente em meios com mais de 10 % de soro de animal resistente; a morfologia é mais irregular e maiores os elementos bacterianos. Contudo, em concentrações inferiores a 10 % o soro de animal resistente pode ainda constituir elemento de enriquecimento em relação a estirpes virulentas para outras espécies animais.

Era todavia possível, com determinadas estirpes, obter *in vitro* certo grau de virulência para um organismo que se mostrava resistente à sua acção, através de subculturas em meios com soro da respectiva espécie animal, em concentração crescente a partir de 1/10. A passagem subsequente por animais da mesma espécie aumentava ainda mais a virulência da estirpe em causa.

Verifica-se, nestas circunstâncias, certa relação entre crescimento *in vitro* de determinada estirpe em elevada concentração de soro e a susceptibilidade ou resistência da respectiva espécie animal à sua acção, as quais, *in vivo*, parece assim depender principalmente da dinâmica das populações bacterianas no organismo. Dentro deste critério, essa relação poderá permitir a colheita de úteis indicações a partir da experimentação *in vitro*. Algumas das divergências verificadas em estudos desta natureza poderiam filiar-se nas diferentes condições de ensaio, principalmente no que se refere a concentração de soro no meio de cultura. Para obviar a tal e alcançar maior uniformidade nos resultados, as experiências deste tipo deverão ser realizadas em meios líquidos com elevada concentração de soro, superior a 1/10.

3.10.2 — VARIAÇÃO ANTIGÉNICA NAS POPULAÇÕES MICROBIANAS NA DINÂMICA DA INFECCÃO E IMUNIDADE ESPECÍFICA

Verifica-se — 3.9 — que o valor imunizante das vacinas desvitalizadas dependia, além de outras condições, do ambiente em que se processava o crescimento das populações bacterianas utilizadas na sua preparação. Variava com a espécie bacteriana e dependia ainda da estirpe, espécie animal de ensaio, estirpe de contraprova e método de apreciação. O maior valor imunizante parecia corresponder à vacina preparada com suspensões bacterianas obtidas de hemoculturas em caldo com elevada concentração de soro da espécie animal do ensaio.

O mesmo se verificava com a acção imunológica *in vitro*. Mas esta acção, de que parece depender a imunidade específica, é consequência da reacção antígeno/anticorpo, qualitativa/quantitativa, em certa extensão na superfície bacteriana, como já se frisou. Por outro lado, as diferenças

imunológicas resultavam da variação antigénica bacteriana na dinâmica das populações, facto também verificado pela aglutinação nos ensaios de soro-absorção *in vitro*.

A composição genética das populações bacterianas variava com o ambiente e, daí o comportamento imunológico decorrente das variações antigénicas.

As diferenças imunológicas diminuíam à medida que se aproximavam os ambientes de crescimento bacteriano; daí, a maior acção imunizante das vacinas desvitalizadas preparadas a partir de culturas virulentas em meio líquido com elevada percentagem de soro normal de espécie em causa. Aproximando-se, desta maneira, os ambientes de crescimento *in vivo* e *in vitro*, mais semelhantes antigénicamente são as duas populações.

O mesmo se passa nos vírus com as vacinas inactivadas em que o maior grau de imunidade é obtido com vacinas preparadas a partir de material virulento, procedente de animais mortos da espécie dada, e em consequência da infecção natural. As variações imunológicas são mais acentuadas nos vírus dada a sua maior dependência do ambiente de crescimento, ou seja, da célula.

A imunidade, consequência da acção imunológica *in vivo*, é condicionada assim pelos antígenos de superfície das populações microbianas no decurso da infecção.

Desde a descoberta do antígeno *Vi* nas estirpes de *S. typhi* procedentes do organismo infectado, FÉLIX e PITT (1934), e dada a sua expressão imunológica, o deficiente poder imunizante das vacinas mortas tem sido atribuído a diferenças antigénicas das populações bacterianas *in vivo* e *in vitro*. Antígenos da mesma categoria têm sido assinalados em condições idênticas na *P. pestis*, *P. multocida*, *B. pertussis*, *E. coli* — 3.9; foram ainda registados em estirpes de outras espécies bacterianas, WILSON e MILES (1955) a, b) tendo-se procurado mantê-los *in vitro*, na sua máxima expressão, pela promoção de condições especiais de conservação e de crescimento dos microrganismos.

Mas, mesmo nas doenças infecciosas em que os anticorpos parecem constituir o principal factor de recuperação e resistência específica, a imunidade das vacinas inactivadas é, de maneira geral, inferior à das vacinas vivas, principalmente quando dos vírus, devendo mais acrescen-

tar-se que é dependente ainda da espécie animal, natureza e via de infecção. É pouco intenso e de fraca duração, nem sempre evitando a expressão clínica da doença, com alguns vírus — *vaccinia* e esgana; é mais intensa e duradoura, mas nem sempre total, com outros — poliomielite, febre aftosa, peste suína, Newcastle — BEVERIDGE (1963). Na poliomielite, as vacinas inactivadas tipo Salk evitam a manifestação paralítica da doença, mas são ineficazes quanto à localização intestinal, SABIN (1959); na varíola, a vacina inactivada não protege o coelho contra a infecção do vírus *vaccinia* por via intradérmica, BURNET (1960), mas sim o ratinho contra a infecção mortal do vírus da ectromélie, imunologicamente relacionado, ANDREWES e ELFORD (1947); na psitacose, a vacina inactivada protege o ratinho contra a infecção mortal, mas o vírus continua a desenvolver-se no baço onde persiste vários meses, BEDSON (1938); na Newcastle, o mesmo tipo de vacina é eficiente contra a infecção generalizada, evitando a manifestação clínica, mas não evita a sua fixação na superfície das vias respiratórias; na raiva, KRAUSE (1953), assinala também diferenças imunológicas com as vacinas inactivadas em relação à via de inoculação do vírus de contraprova. No mal rubro, a vacina inactivada tipo TRAUB (1949) protege o ratinho, obviando ao aparecimento de sintomas da doença; contudo, os bacilos do *E. rhusiopathiae* invadem a corrente sanguínea após a infecção experimental de contraprova, disseminando-se por diversos órgãos onde persistem e se multiplicam durante alguns dias; o poder protector no suíno, com idêntica vacina, é mais completo, não se verificando a mesma disseminação e persistência bacilar após a infecção experimental, SCHNEIDER, (cit. TRAUB, 1949).

Com as vacinas vivas, a imunidade é mais duradoura e completa, mas depende ainda da espécie a imunizar, agente vacinal e via de inoculação e bem assim da via de infecção.

De maneira geral varia directamente, com a capacidade invasora do agente vacinal, principalmente nos vírus, sendo um tecido ou órgão mais resistente se for atingido durante a imunização.

Fox (1943) verifica que os ratinhos e macacos recuperados após a inoculação intracerebral do vírus atenuado da febre amarela 17D ficavam mais sólidamente imunizados contra a infecção devida ao vírus virulento, pela mesma via; o ratinho inoculado com idêntica estirpe vacinal

por outras vias era irregularmente resistente pela via intracerebral com a mesma dose da estirpe virulenta. Na peste humana, a vacina não protege contra a forma pulmonar, mas impede a forma bubónica de onde deriva aquela, BALTAZARD e BRYGOO (1963).

Verificam-se ainda diferenças acentuadas na imunidade activa e passiva em doenças infecciosas em que os anticorpos constituem factor principal da resistência específica: — a imunidade passiva protege os pintos contra a infecção generalizada da Newcastle, mas não contra a localização nas vias respiratórias, enquanto a imunidade activa com vírus vivo é eficiente sobre estas, BEVERIDGE (1963).

O ratinho imunizado activamente, sobrevivente a infecção subcutânea do vírus da encefalite equina de Este, é mais resistente à inoculação do mesmo vírus por via intracerebral do que imunizado passivamente por via intraperitoneal, embora com mais elevado título de anticorpos neutralizantes na circulação sanguínea, TRAUB (1959); a resistência era ainda menor com soro específico de ratinho hiperimunizado com vírus de embrião de pinto — soro este de menor capacidade neutralizante, via intracerebral, que o do ratinho hiperimunizado com vírus cerebral da própria espécie. O mesmo se passa na raiva com a imunidade activa e passiva, MIRCHAMSY (1962).

A imunidade passiva depende assim da espécie animal imunizada, da natureza e via de infecção e, por consequência, da espécie animal dadora do soro específico, e, ainda, da hiperimunização. O mesmo se verifica na soro-neutralização, BURNET (1960).

De maneira geral, o soro antibacteriano exerce maior acção curativa que o soro antivírus. Normalmente, este último apenas actua durante a virémia primária, sendo a sua acção muito reduzida no caso de generalização, enquanto que o soro antibacteriano ainda é eficaz nesta última fase.

Divergências imunológicas, como as referidas, verificadas principalmente nos vírus com níveis idênticos de anticorpos neutralizantes na corrente sanguínea, ou até superiores, são atribuídos por diferentes investigadores a diferenças qualitativas dos anticorpos, a desigual concentração nos órgãos e tecidos, e a possível formação local — poliomielite, SABIN (1959), PAUL *et al* (1959); encefalites equinas, SCHLESINGER (1949), TRAUB (1959), BURNET (1960).

Essas discrepâncias são ainda atribuídas à imunidade celular nas vacinas vivas, em que a hipersensibilidade — tipo alérgico — desempenha papel de relevo, como é apontado por BURNET (1960), BEVERIDGE (1963), SUTER e RAMSEIER (1964). Nos vírus, certas divergências entre níveis de anticorpos neutralizantes e infecção estariam também relacionadas com a capacidade infecciosa do ácido ribonucleico vírico, não neutralizado pelos anticorpos, HERRIOT (1961).

Como se pode deduzir da matéria exposta, os anticorpos, embora de primordial importância na recuperação e resistência nas doenças infecciosas desta natureza, não constituiriam factor único no mecanismo da imunidade específica.

Pensa-se, contudo, que as diferenças imunológicas referidas e outras de idêntica natureza se filiam, em grande parte, se não principalmente, nas variações antigénicas nas populações microbianas no decurso da infecção.

De facto, a composição genética destas populações varia com o ambiente, tendo sido já referidas diferenças antigénicas *in vivo* e *in vitro* com expressão imunológica — 3.9. Mas o organismo animal, pela sua complexa estrutura multicelular e variedade de órgãos e tecidos, determina na realidade para os microrganismos, principalmente para os vírus, diferentes ambientes no decurso da infecção; daqui, variações antigénicas de superfície nas populações microbianas *in vivo*, das quais depende a acção imunológica e, por conseguinte, a imunidade específica.

A extensão das variações das populações microbianas no organismo será função do agente infeccioso e sua capacidade invasora, e aumentará naquele cuja infecciosidade se processa através da corrente sanguínea, com invasão secundária na doença generalizada, conforme FENNER (1948, 1949), em relação às viroses, e ORSKOV *et al* (1928), ORSKOV e MOLTKE (1928), ORSKOV e LASSEN (1930), quanto às infecções bacterianas.

Contudo, neste tipo de infecção generalizada observa-se maior uniformidade imunológica nos agentes infecciosos e mais sólida e duradoura imunidade.

A virulência resultará, assim, da capacidade das populações microbianas em invadirem os diferentes órgãos e tecidos interessados na infecção natural. Mas na dinâmica de invasão — quer na doença natural, quer

na experimental — principalmente nas viroses, há etapas, cada uma envolvendo diferentes tipos de células que podem não ser atingidas, o que dependerá não só do grau de virulência do microrganismo invasor — vírus atenuados vacinais — mas também do organismo animal invadido, daqui resultando ainda, conseqüentemente, a criação de imunidade específica. Assim, esta é condicionada pela dinâmica das populações microbianas na infecção e atinge o mais elevado grau a quando da recuperação na doença natural. A infecção pode, deste modo, ser detida em qualquer ponto, na sua seqüência, sob a acção da imunidade específica.

As divergências imunológicas referidas podem filiar-se, conseqüentemente, na natureza dinâmica da infecção/imunidade específica, resultante de variações antigénicas nas populações microbianas *in vivo*.

Não têm sido assinaladas variações antigénicas microbianas com expressão imunológica na seqüência de invasão *in vivo*, mas prevê-se a sua existência em vista da natureza dinâmica da infecção/imunidade específica, conseqüência da complexa estrutura multicelular orgânica, já apontada. As infecções generalizadas de maior período de incubação, sem variações antigénicas nas populações microbianas na dinâmica de invasão, seriam detidas sob a acção da imunidade específica que se estabelece a partir dos primeiros dias. Por outro lado, a imunização com diferentes antigénios do mesmo microrganismo — *B. anthracis*, *S. typhi* — na mesma espécie animal também não seria viável sem variação antigénica no decurso da infecção. A modificação de microrganismos virulentos, principalmente vírus, por adaptação *in vivo* a determinados tecidos do organismo susceptível, como é o caso do vírus fixo Pasteur na raiva, ou a avirulência resultante da inoculação por via diferente da natural, são igualmente expressão de variações fenotípicas nas populações microbianas, na infecção.

A imunidade passiva mostra também variações antigénicas na dinâmica da infecção natural ou experimental; o seu mais elevado grau é obtido com soro homólogo proveniente de animal hiperimunizado, por diferentes vias, com estirpes virulentas.

A existência de antigénios relevantes nas bactérias patogénicas *in vivo*, dificilmente mantidos *in vitro*, é admitida por SMITH (1960),

ROLWEY e JENKIN (1962), KAPLAN e MEYESERIAN (1962), JENKIN (1963 b).

TOMASZ (1966), no *Pneumococcus*, regista a influência do DNA do meio ambiente no fenotipo bacteriano. No carbúnculo hemático, NORDBERG (1951), assinala diferenças fenotípicas de natureza antigénica nas populações de *B. anthracis* no decurso da invasão; o bacilo não é capsulado na bacteriemia primária, mostrando-se capsulado na secundária — generalização e doença. Estes antígenos estariam relacionados com a acção patogénica.

Nos vírus, as variações fenotípicas são mais acentuadas dada a sua maior dependência do meio ambiente — a célula. *In vivo* e *in vitro* cada tipo celular constituirá para o vírus um ambiente diferente de crescimento. Assim, verifica-se maior homogeneidade nas populações de vírus provenientes de estirpes celulares ou de culturas primárias monocelulares; as provenientes de organismos multicelulares são bastante heterogêneas, consequência do crescimento em diferentes tipos de células como é o caso do vírus da Newcastle, segundo DURAND e EISENSTARK (1962), e do vírus atenuado da encefalite equina Venezuelana no ratinho, durante a imunização, HEARN (1961).

Assinalam-se igualmente *in vitro* diferenças nas populações de vírus provenientes de culturas primárias de diferentes células da mesma espécie animal. ROIZMAN *et al* (1958 a, b) referem também divergências nas populações de vírus da poliomielite procedentes de diferentes estirpes celulares humanas. DRAKE e LAY (1962) mostram a influência do ambiente celular no fenotipo do vírus da Newcastle. E as populações de vírus, mesmo de culturas monocelulares *in vitro*, são heterogêneas antigénicamente — poliomielite, TUMILOWICZ e HUMMELER (1964).

E, na maior parte das populações víricas, verificam-se divergências imunológicas, atribuídas a diferentes susceptibilidade à inactivação pelo soro imune: Cocksakie — CHOPPIN e EGGERS (1962); Echo — KARZON *et al* (1959), BARRON e KARZON (1962); Gripe — CHOPPIN e TAMM (1959, 1964); Mixomatose e *Vaccinia* — BURNET (1960).

A fracção de vírus que permanece não neutralizada na dinâmica do soro-neutralização — BURNET *et al* (1937), BURNET e LUSH (1939),

DULBECCO *et al* (1956), RUBIN e FRANKLIN (1957), MANDEL (1956), FAZEKAS de ST. GROTH e REID (1958), FAZEKAS de ST. GROTH *et al* (1958) — parece igualmente representar a variação fenotípica de natureza antigénica nas populações de vírus, na infecção. Seria consequência de natureza dinâmica da infecção/acção imunológica e dependente, por conseguinte, das populações de vírus, dos anticorpos e do ambiente de crescimento.

São também expressão das variações antigénicas na dinâmica da invasão microbiana as diferenças imunológicas verificadas nas populações de anticorpos na infecção: poliomielite — ROIZMAN *et al* (1958 a, b), WENNER (1962); febre aftosa — SKINNER (1953).

Verificam-se, desta maneira, variações fenotípicas nas populações microbianas na infecção, mais evidentes nos vírus, de maior capacidade invasora *in vivo*. É no período de incubação, a fase mais obscura e silenciosa da infecção, principalmente nos vírus, que as variações devem atingir a sua máxima extensão.

As variações de natureza antigénica condicionam a imunidade específica e podem justificar as divergências imunológicas verificadas, e atrás referidas.

3.11 — ACÇÃO PARADOXAL DOS ANTICORPOS NA IMUNIDADE ESPECÍFICA — IMMUNOLOGICAL ENHANCEMENT

3.11.1 — NA INFECÇÃO

Nos ensaios de apreciação do poder imunizante de soros e vacinas nota-se, por vezes, um fenómeno paradoxal que implica, em lugar de imunidade, uma acção favorável dos anticorpos na infecção. Este facto verifica-se apenas com soros e vacinas desprovidos de poder imunizante. Neste caso, a morte dos soro-imunizados e vacinados é antecipada, embora ligeiramente, em comparação às testemunhas. Este fenómeno é mais acentuado em relação com a dose mínima mortal, observando-se nestes casos, por vezes, maior letalidade no grupo imunizado que no grupo testemunha.

Nos ensaios de imunidade cruzada, imunização activa e passiva, agora realizados, notava-se fenómeno idêntico, principalmente com as estirpes de *B. anthracis* I-FD e II-LS. Estas estirpes mostravam ainda certo grau de relação imunológica com a estirpe virulenta, embora se comportassem como de diferente tipo — 3.2.1.2 — Quadros 5 e 6.

In vitro, sob a acção do soro imune, notava-se ocorrência similar com as mesmas estirpes e, ainda, com outras, principalmente com aquelas que normalmente se desenvolviam em cadeia e em condições de cultura mais deficientes. Nestas circunstâncias, podia verificar-se acção favorável dos anticorpos, especialmente em relação à primeira fase de crescimento.

Esta acção pode também observar-se *in vitro* com soros específicos de elevado poder imunizante e estirpes do mesmo tipo imunológico, desde que a concentração do soro no meio de cultura seja de molde a não exercer acção imunológica na fase logarítmica. Estes mesmos soros absorvidos com determinadas suspensões bacterianas da estirpe tipo ou de outra com esta relacionada, podem igualmente actuar *in vitro* por maneira idêntica. *In vivo*, é possível observar-se a mesma actuação com estes soros absorvidos, diluídos ou em doses inferiores às da protecção média.

Esta acção *in vitro* variava com a estirpe, o tempo de incubação da cultura de sementeira e o meio de crescimento, e era tanto mais evidente quanto maior fosse a fase latente das culturas.

Com outros soros específicos, sem valor imunizante e sem acção imunológica, mas de elevado poder aglutinante, não se verificava o mesmo fenómeno, quer *in vivo*, quer *in vitro*.

Pensa-se que tal acção, tanto *in vitro*, como *in vivo*, resulte de leve alteração da permeabilidade da célula bacteriana consequente da reacção antígeno/anticorpo, operada em certa extensão da sua superfície e dando lugar a mais fáceis trocas nutritivas no início do crescimento, isto é, na fase latente. Daqui decorrerá, a par de mais rápido desenvolvimento da estirpe, a morte antecipada em relação ao grupo testemunha, *in vivo*, e crescimento mais precoce quando comparado ao das culturas sem soro específico, *in vitro*.

Certos aspectos da fase negativa de imunidade antibacteriana WILSON e MILES (1955 b) — parecem enquadrar-se neste tipo de acção dos anticorpos.

Os anticorpos podem favorecer a sobrevivência dos tecidos transplantados que, normalmente, seriam rejeitados — *immunological enhancement*, KALISS (1958). Este fenómeno, verificado na transplantação de tecido normal e tumoral — HASEK *et al* (1961), GORER (1961), STETSON (1963) — parece também resultar do tipo de acção dos anticorpos acima referido e merece ser conhecido pela importância prática que tem.

É mais limitado e menos evidente o *immunological enhancement* na transplantação de tecidos normais que na de tumores, facto este possivelmente devido a diferenças de capacidade de crescimento — HASEK *et al* (1961).

É, por conseguinte, em relação aos tumores que o *immunological enhancement* tem sido mais largamente analisado, principalmente depois da observação de KALISS e KANDUTSCH (1956).

Depende da natureza dos tumores a acção dos anticorpos: imunidade, *enhancement*, e imunidade ou *enhancement* — HASEK *et al* (1961), GORER (1961), WISSLER (1962), STETSON (1963), KLEIN (1966). Neste último caso varia com a dose do soro imune; com grandes doses verifica-se, de maneira geral, imunidade, com pequenas *enhancement*. Com determinados soros hiperimunes a dose produtora do *enhancement* chega a ser inferior a $100 \times$ a dose inibidora — GORER (1961). A diferença na reacção do tumor à acção do soro imune parece filiar-se nas propriedades do tecido normal de origem — HASEK *et al* (1961).

O *enhancement* pode ainda obter-se depois do tumor estar implantado, quando se está já a desenvolver a imunidade de transplantação HASEK *et al* (1961).

A acção dos anticorpos — *enhancement* e imunidade — é condicionada também pela via de inoculação; normalmente, o *enhancement*, com pequenas doses de soro, verifica-se em local onde o tumor se desenvolve com facilidade. Parece depender igualmente da constituição genética do hospedeiro. Com determinados tipos de tumores a inibição inicial pode ser seguida de *enhancement* — GORER (1961). O mesmo pode ocorrer

depois de repetidas homotransplantações tumorais — KALISS e BRYANT (1958).

Imunidade e *enhancement* são susceptíveis igualmente de ser observadas na transplantação tumoral quando se administram passivamente células imunes e soro — GORER (1961), MÖLLER (1963).

A diversa acção imunológica dos anticorpos — imunidade e *enhancement* — parecia depender de diferentes antigénios. Contudo, estudos mais recentes levam a admitir a identidade dos antigénios, da qual resulta esta diferente acção imunológica na transplantação: ambos os fenómenos podem ser produzidos com as mesmas preparações antigénicas, dependentes apenas da dose, via de administração, intervalo de tempo entre a inoculação e a verificação da reacção imunológica — HASEK *et al* (1961), GORER (1961), WISSLER (1962), STETSON (1963), KLEIN (1966). E, em certas condições, era possível originar imunidade de transplantação com pequenas doses de antigénio liofilizado, e *enhancement* com grandes doses — KALISS (1952).

São diversas as interpretações que sugere o estranho e complexo fenómeno imunológico — *immunological enhancement*, KALISS (1958, 1962). Pensa-se que resulte duma modificação das células do tumor pelo anticorpo favorecendo a transplantação — KALISS (1958). Sabe-se, desde há muito, que o anticorpo pode estimular mitoses — GORER (1942); e KALISS encontra, neste facto, novo apoio para a sua hipótese de acção directa sobre a célula tumoral. FELDMAN e GLOBERSON (1960), na sequência do mesmo pensamento, consideram que os anticorpos estimulam a produção de antigénios em excesso nas células expostas, modificando-as.

Mas poderia pensar-se também que maior quantidade de antigénio influenciaria a resposta imunológica; KALISS, embora perfilhando a mesma ideia de modificação directa do tumor pelo anticorpo, passa a admitir a hipótese de certo efeito sobre a resposta do hospedeiro.

Contudo, a ideia da alteração celular pela acção directa do anticorpo parecia ser incapaz de explicar o *enhancement* em relação à transplantação do tecido normal; GORER (1956), SNELL (1956), BILLINGHAM *et al* (1956), SNELL *et al* (1960), GORER (1961) admitem, então, que os anticorpos devem interferir com a resposta imune da célula do hospedeiro. Tem, mais, sido assinalada a acção inibidora da resposta

imune pelo anticorpo administrado passivamente — UHR e BAUMANN (1961), NEIDERS *et al* (1962). Assim, os anticorpos, insuficientes para inibir as células tumorais, podiam interferir com a resposta imune da célula do hospedeiro, bloqueando a reduzida quantidade de antígeno produzido e impedindo, por conseguinte, a formação de anticorpo, com consequente *enhancement* na sobrevivência do tumor. O *enhancement* seria, deste modo, precedido por curto período de inibição do crescimento do tumor transplantado, facto este observado, de maneira geral, nestas condições — STETSON (1963).

O excesso de antígeno celular poderá conduzir igualmente a situação análoga ou, à paralisia imunológica — HASEK *et al* (1961), WISSLER (1962).

Mas nem sempre o *enhancement* parece ter o seu fundamento na interferência da resposta imune, dada a reduzida quantidade de soro hiperimune que o pode originar — GORER (1961). Pensa-se, então, na existência de anticorpos bloqueantes capazes de se ligarem à célula tumoral, sem que daí resulte acção nociva e que evite a subsequente ligação do anticorpo citotóxico, fixador do complemento. Assim, sob a acção da resposta imune do hospedeiro, haveria sobrevivência do tumor transplantado e *enhancement* em vez de imunidade — GORER (1961), BRENT e MEDAWAR (1961), BOYSE *et al* (1962 a, b, c).

O anticorpo pode ainda impedir a inibição do crescimento do tumor pelas células imunes — BATCHELOR e SILVERMAN (1962), MÖLLER (1963), MÖLLER (1965).

Sabe-se muito acerca de *immunological enhancement*, mas continua-se a ignorar como células e soro imune podem, umas vezes, actuar sinèrgicamente e, outras, antagònicamente, o que leva GORER (1961) a admitir ainda a possibilidade dum efeito qualitativo do soro no tipo da resposta imune. E, ainda hoje, subsistem dúvidas sobre se são idênticos ou divergem os anticorpos do *enhancement* e imunidade a quando da transplantação e transformação maligna.

Nenhuma das interpretações até agora formuladas acerca do *enhancement* se pode considerar satisfatória e, presentemente, não há uma teoria convincente e explicativa deste fenómeno imunológico da maior importância prática na transplantação. As circunstâncias em que se processa

levam a admitir que se enquadra no mesmo tipo de actuação favorável dos anticorpos observada *in vivo* e *in vitro* em relação às bactérias, como acima foi referido. Assim, o facto de a actuação imunológica dos anticorpos — imunidade e *enhancement* — depender da natureza do tumor e da constituição genética do hospedeiro, ainda que devida fundamentalmente à maior ou menor facilidade com que os anticorpos circulantes atingem as células tumorais — AMOS (1955), BOYSE *et al* (1962 a, b, c), MANCINI *et al* (1962) — deverá também filiar-se na capacidade de crescimento no hospedeiro e, por conseguinte, nas variações antigénicas resultantes da dinâmica das populações celulares. Com determinados tipos de tumores a acção imunológica é condicionada pela dose de soro — *enhancement* com pequenas doses e imunidade com doses maiores. Depende ela igualmente da vida de inoculação das células tumorais e do soro, devido à maior ou menor rapidez de absorção deste, da qual resulta diferente concentração actuando sobre a célula; dependerá, ainda, de variações antigénicas nas populações celulares. O *enhancement* é mais evidente com neoplasias de rápido crescimento, das quais é provável que resulte maior variação fenotípica das respectivas populações.

Facto análogo se passa com células imunes e soro na transplantação de tumores. Assim, tal como em relação às bactérias, a imunidade e *enhancement* parecem na realidade decorrer da reacção antigénio/anticorpo, qualitativa/quantitativa, em diferente extensão na superfície da célula e depender das variações antigénicas na dinâmica das populações. Da maior extensão de bloqueio imunológico da superfície celular resulta imunidade; da menor, *enhancement*.

O *immunological enhancement* será, assim, a consequência da maior actividade mitótica resultante de mais fáceis trocas nutritivas proporcionadas por leve alteração da permeabilidade celular. Dimanará, desta forma, da actuação directa dos anticorpos sobre a célula, dependente da variação antigénica nas populações em crescimento, não só pelo bloqueio do anticorpo como, ainda, pela sua intervenção na resposta imunológica do hospedeiro. A célula reage em excesso à acção dos anticorpos nestas condições, originando maior crescimento, consequentemente, maior variação antigénica nas populações celulares; daqui, acção imunológica em menor extensão — *enhancement* — para o qual contribuirá simultânea-

mente o excesso de antigénio, por interferir com a resposta imune do hospedeiro.

A acção directa sobre a célula ocorre também *in vitro* — MÖLLER e MÖLLER (1962), MÖLLER (1965) — tal como se verifica em relação às bactérias com a acção imunológica.

O *enhancement* representa, pois, um ciclo vicioso de natureza imunológica de que poderá resultar acção favorável na transplantação do tecido normal, facto da maior importância em medicina; por outro lado, é de admitir que seja o mais trágico problema biológico em relação ao cancro.

A evolução no sentido de transformação maligna será assim consequência do *immunological enhancement*; a regressão provirá da imunidade.

É neste conceito dinâmico que se deverá encarar a imunidade de transplantação e a luta imunológica contra o cancro.

3.12 — ACÇÃO IMUNOLÓGICA ANTIBACTERIANA E IMUNIDADE ESPECÍFICA

Conhecida a acção imunológica antibacteriana, *in vitro*, há que esclarecer como, *in vivo*, ela conduz à imunidade específica.

Segundo penso, é o crescimento em cadeia, sob a acção imunológica dos anticorpos que, *in vivo*, determina a imunidade específica.

De facto, a cadeia e o aumento de volume de cada elemento celular considerado isoladamente correspondem a crescimento em condições desfavoráveis e verificam-se *in vitro* nas mais variadas circunstâncias. Entre estas podem destacar-se a variação acentuada do pH, da temperatura, da tensão superficial e da pressão hidrostática, bem como a deficiência ou o excesso de proteínas, vitaminas ou de iões metálicos, factores esses que, principalmente, influenciam as bactérias Gram-positivas que divergem na sua estrutura e processo de divisão celular das Gram-negativas — BISSET (1948 b, 1953), ITERSON (1965), COLE (1965).

O crescimento nas condições referidas é mais lento, o microrganismo divide-se sem que se opere a cisão celular e os elementos bacterianos mos-

tram ainda apreciável aumento de volume. À medida, porém, que melhoram as condições do ambiente e estas se aproximam do óptimo, reduz-se a extensão da cadeia e diminui a grandeza de cada elemento celular.

Estas ocorrências são facilmente verificadas *in vitro* com estirpes de *B. anthracis* e de *Streptococcus*, quando o crescimento se processa em meios deficientes em proteínas; então a simples adição de soro normal ao meio de cultura origina o encurtamento da grandeza da cadeia. *In vivo*, no sangue e órgãos de animais vitimados em consequência da infecção por estas estirpes, apenas se observam elementos isolados ou, quando muito, cadeias com 2 ou 3 células bacterianas.

Trata-se, por conseguinte, de crescimento das populações em condições desfavoráveis e não de qualquer dissociação de natureza genética como é o caso da forma R, cujo desenvolvimento igualmente se processa em cadeia — BISSET (1948 a).

O crescimento em cadeia, quer das bactérias Gram-positivas, quer das Gram-negativas, sob acção imunológica dos anticorpos, filiar-se-ia assim nas condições ambientes, embora de natureza específica, uma vez que fora da acção daqueles — por absorção com excesso de antigénio, por continuação do crescimento, ou ainda por subculturas em meios sem soro específico — se normaliza o desenvolvimento, reduzindo-se quer a extensão da cadeia, quer a grandeza do respectivo elemento celular.

De facto — repete-se — essas condições ambientes modificam não só a morfologia como ainda a própria composição das populações bacterianas e, implicitamente, a sua dinâmica.

A alteração da dinâmica das populações bacterianas sob a acção imunológica dos anticorpos *in vivo* conduz à imunidade específica, uma vez que a bactéria se comporta nestas condições como a avirulenta, perde a capacidade invasora, vindo a infecção a ser dominada; nestas circunstâncias a acção dos anticorpos torna ainda mais vulnerável a bactéria às defesas orgânicas.

Tem-se procurado verificar se os anticorpos na ausência do complemento diminuíam a actividade metabólica, interferindo no crescimento bacteriano. SEVAG e MILLER (1948), HARRIS (1948) observaram, a este respeito, que a bactéria sensibilizada pelos anticorpos não diminuía o consumo do oxigénio. Contudo, deve-se acentuar que acção dos anticorpos de-

pende, como se verificou, da extensão da reacção com os antígenos na superfície bacteriana.

HAHN e COLE (1962), analisando estatisticamente a *lon-chain reaction* em relação ao *Streptococcus* do grupo A sob a acção do soro tipo específico, não verificam diferenças significativas de crescimento quando do emprego comparativo do soro normal, apenas neste caso diferindo no número e extensão das cadeias; em verdade, o quantitativo de elementos bacterianos era aproximado nos dois casos. Mas este facto não se verifica em todas as circunstâncias, variando com o tipo de cultura, fase de crescimento e duração desta.

Subculturas na fase logarítmica, com reduzido inóculo em relação ao volume do meio, mostram, na mesma fase, maior crescimento populacional quando em presença do soro normal. Em culturas contínuas as diferenças de crescimento são, conseqüentemente, mais significativas, o mesmo se dando *in vivo* com as estirpes patogénicas, uma vez que o organismo constitui ambiente menos restrito e oferece condições óptimas para o desenvolvimento.

O crescimento em cadeia, decorrente das mais variadas circunstâncias desfavoráveis, entre elas a de natureza imunológica, é, na realidade, mais lento que nas condições óptimas, facto ainda evidenciado, como também se referiu, pela maior grandeza dos elementos celulares bacterianos.

A acção imunológica é, sem dúvida, o mais importante factor do crescimento em cadeia e, implicitamente, da imunidade específica.

Diverge, contudo, a maneira como se tem procurado explicar o mecanismo que conduz à formação da cadeia sob a acção dos anticorpos quando do crescimento em presença do soro tipo específico. Assim, PFAUNDLER (1898), desde logo, em relação às enterobactérias, a considerou como aglutinação polar — *fadenbildung* — ideia que perdurou na explicação do fenómeno.

Mais tarde, EKSTEDT e STOLLERMAN (1960 a), no que concerne o *Streptococcus* do grupo A, rejeitam a ideia da aglutinação polar e admitem a hipótese de que a *long-chain* é resultante da inibição específica imunológica de sistema enzimático que normalmente ocasiona a cisão dos elementos formados após a divisão. Baseiam-se aqueles investigadores, ao

admitir esta hipótese, no facto de tal reacção e a fragmentação da cadeia apenas se verificaram no período de crescimento, normalizando-se a extensão da cadeia por absorção dos anticorpos no meio de cultura com anti-génio em excesso ou pelo simples prosseguimento do desenvolvimento; alicerçam mais a sua opinião no facto da formação da cadeia e sua redução poderem ser alteradas por modificação do pH, temperatura ou por adição de certas substâncias actuando desfavoravelmente nos sistemas enzimáticos, por conseguinte, no crescimento.

HAHN e COLE (1962), analisando a reacção em causa, também no *Streptococcus* do grupo A em crescimento sob a acção do soro tipo específico, pareciam não aceitar igualmente a ideia da aglutinação polar na explicação do fenómeno, embora a retomem mais tarde como hipótese mais plausível, HAHN e COLE (1963). Baseiam a sua presunção actual em estudos realizados com anti-soros conjugados com a fluoresceína — imuno-fluorescência — dos quais inferem que a cadeia é resultante da união dos anticorpos bivalentes a zonas adjacentes da parede celular mantendo ligadas as células formadas à medida que o crescimento se processe.

Pela absorção dos anticorpos com excesso de antigénio ou em virtude da continuação do crescimento, uma vez completada a divisão, são fraccionados, pelas forças físicas nos sistemas, as ligações dos elementos celulares, normalizando-se assim, a extensão da cadeia. O facto de não se observar a *long-chain* na presença de anticorpos univalentes, embora se desse igualmente a cobertura de certas zonas antigénicas da superfície, constitui o principal argumento daqueles investigadores para fundamentar a opinião expressa sobre a aglutinação polar no mecanismo da formação da cadeia. Esta, em última análise, resultaria daquela aglutinação determinada pelos anticorpos bivalentes.

Mas os estudos agora realizados e relatados parecem incompatíveis quer com a hipótese da aglutinação polar originada pela bivalência do anticorpo — HAHN e COLE (1963) —, quer com a da inibição específica de sistema enzimático — EKSTEDT e STOLLERMAN (1960 a) — quando se pretende explicar o crescimento em cadeia sob a acção dos anticorpos *in vitro*. De facto, dada a natureza dinâmica da acção imunológica, resultante da reacção antigénio/anticorpo, qualitativa/quantitativa, em extensão na superfície bacteriana, não é possível conceber-se que a aglutinação polar

ou a inibição específica de sistema enzimático sejam os responsáveis pela formação das cadeias ou pela extensão destas.

A acção imunológica dos anticorpos depende da área antigénica atingida na superfície bacteriana, verificando-se: *immunological enhancement* — em que os anticorpos favorecendo o crescimento reduzem consequentemente a extensão da cadeia —; a cadeia, como consequência de mais ampla área atingida na reacção; e, finalmente, a simples aglutinação. Além disso, a hipótese da cadeia derivar da aglutinação polar por anticorpos bivalentes, visto não ser verificada sob a acção dos univalentes, não é de aceitar, dado que os anticorpos alterados na sua estrutura podem deixar de exercer acção imunológica antibacteriana *in vitro* e *in vivo*; e, na realidade, é aos bivalentes que em geral se atribui a imunidade específica.

Acresce ainda que a cadeia se verifica, como se disse, noutras circunstâncias sem a intervenção específica dos anticorpos, principalmente em condições desfavoráveis.

A cadeia surge assim como consequência de crescimento nessas circunstâncias precárias, apenas criadas, neste caso, imunologicamente, pelos anticorpos. Aliás, sabe-se que estes alteram as estruturas bacterianas, por vezes com espessamento — TOMCSIK (1956), OSLER (1961), FELDMAN (1964). Das alterações, principalmente a da parede celular, resultam perturbações da permeabilidade que se reflectem no crescimento, dando origem ao *unbalanced growth* — crescimento desequilibrado — SHOCKMAN 1965).

O crescimento e a divisão celular não ocorrem regularmente, sendo assim retardados e originando, possível e consequentemente, o espessamento da parede celular, de onde a maior dificuldade na cisão após a divisão.

A cadeia encontra deste modo explicação nas condições ambientes, mesmo quando resultante da acção específica dos anticorpos, como no caso presente.

A imunidade humoral desempenha, em verdade, papel preponderante na resistência específica quando da infecção de carácter agudo por agentes bacterianos de rápido crescimento, sem capacidade de sobrevivência e de multiplicação intracelular.

Neste caso, alterada a dinâmica das populações bacterianas no organismo em consequência do crescimento em cadeia sob a acção imunoló-

gica dos anticorpos circulantes, a infecção é dominada pelos elementos celulares de defesa.

Em relação aos agentes bacterianos determinantes de infecção de evolução menos aguda, e em que a imunidade celular representa o principal factor da resistência específica, os anticorpos exercem, da mesma forma, acção imunológica — crescimento em cadeia — criando-lhes condições desfavoráveis. As infecções desta natureza resultam, portanto, da capacidade de vida intracelular dos agentes infecciosos que lhes respeitam; daí, ser fundamental à resistência específica a imunidade celular, consequentemente adquirida.

O que se passa com as bactérias ocorrerá igualmente com os vírus, parasitas e células, apenas com a diferença que resulta dos respectivos mecanismos vitais.