

Immunização *per os* contra o B. de Shiga

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA NATUREZA DA IMMUNIDADE

PELO

DR. EDUARDO VAZ

(ASSISTENTE DO INSTITUTO)

Numa memoria de 1908, *Shiga* ⁽¹⁾ expõe os resultados de três annos de trabalho sobre dysenteria, visando o combate aos focos endemicos que existem no Japão.

Levado pela premencia de vaccinar, procurára elle todos os meios de attenuar o poder irritante, mesmo necrosante da toxina dysenterica, impecilho sério á vaccinação sub-cutanea.

Não podendo remover o obstaculo, o pesquisador japonês torneou-o. Baseado no augmento de resistencia á intoxicação dysenterica, que conseguira conferir a coelhos, por ingestão de bacillos mortos, applicou o methodo ao homem. Foram bons os resultados. Chamou de local ou histogenica a immunidadade obtida por esse processo.

Em que se fundou esta idéa, não se sabe bem. Não era razoavel ser illação das suas experiencias, em que a prova de immunidadade constou de inoculação venosa de toxina.

Provavelmente foi reportada dos trabalhos de *Wassermann* e *Citron* ^(2 e 3), de *Loeffler* ⁽⁴⁾, em que se encadeiam bem as idéas de vaccinação *per os*, immunização local enterica, e immunidadade do intestino, a elle restricta, independente dos factores da geral.

Do estudo simultaneo desses trabalhos, muito nitida fica a idéa de que a experiencia domina a imaginação, de que a experiencia corrige hypotheses, e orienta o pesquisador.

É bem interessante de, ver-se quão diversos foram os caminhos trilhados.

Wassermann e *Citron* ⁽²⁾, levados pela idéa, imperante na época, de que immunidadade era anticorpo, tinham em mira estabelecer qual a via de introduccão de antigenio, no organismo, que maior teor em anticorpos produzisse. Verificaram que, numericamente, não havia equal repartição dos anticorpos pelos órgãos. Em superioridade sempre se mostrava aquelle que, em primeiro logar, tivesse soffrido o contacto do antigenio, em estado mais integro, em quantidade maior.

Esta verificação induzia a que se utilisasse, como via de ingresso da substancia vaccinante, aquella que mais promptamente attingisse o órgão, o ponto vulneravel do organismo, variavel, está

visto, com as afinidades, as predileções microbianas. Fortalecia-se com mais anticorpo o ponto em que o germe deveria actuar, ou por onde, habitualmente, faz a sua penetração no organismo. Era a idéa de immunização local, pelos factores da immunidade geral.

Destas cogitações, em que tão bem as idéas se associam, surgiu uma razoavel explicação para a immunidade dos portadores de *B. typhico*, pela immunização provocada ou espontanea do intestino, porta habitual de entrada de tal germe.

Depois ⁽³⁾, sequencia desses estudos, elles relatam casos em que, a despeito da falta de anticorpos no local e no sangue, foi obtida a immunidade. Dahi a affirmativa — ha uma immunidade local, do tecido, que independe da geral, exteriorizada por anticorpos.

A esta mesma idéa chegou *Loeffler*, fazendo rota diversa.

De experiencias comparativas sobre o valor das vias sub-cutanea, peritoneal e buccal, na immunização de ratos do campo contra typhi-murio, conseguiu, tão somente, por esta via, immunidade, com tratamento reiterado por germes mortos. Ausencia de agglutininas, ausencia de anticorpos bacteriolyticos. Meditando sobre os factos, pensou decorresse a immunidade de factores ainda desconhecidos, e mais ainda, que a superficie interna do canal digestivo, previamente banhada com bacillos mortos, adquirisse a propriedade de impedir a penetração do bacillo na parede intestinal (acção cellular, cellulas epitheliaes ou leucocytos).

De tal modo interpretando as suas experiencias, lançou a idéa duma nova immunidade, uma immunidade do orgão, vestibulo da infecção.

Com visão larga, deixou entrever que a dysenteria, o cholera, o typho, teriam um elemento de combate, nesta immunidade, em que muito importa, mais do que tudo, o auxilio ás forças defensivas, collocadas nos pontos avançados.

Como era differente a mira destes homens ao encetar as suas experiencias!

Naquelle tempo, embóra sustentadas pela prova de laboratorio, estas idéas não poderiam vingar, pois, a recalca-las, estava a noção de anticorpo, expressão unica de immunidade.

Aqui e acolá, com fitos differentes, foram se realizando experiencias de immunização *per os*. Dentre ellas, sobresaem as de *Kutscher* e *Meinicke* ⁽⁴⁾, em 1906, em que a ingestão de paratypho protege cobaio, em 90 % dos casos contra paratypho, em 66 % contra typhi-murio, em 0 % contra typho.

Ingestão de typhi-murio protege contra typhi-murio em 100 %, contra paratypho em 100 %, contra enteritis paratyphi em 100 %.

Ingestão de typho não protege contra typho, typhi-murio e paratypho.

Esta citação é necessaria para que esta experiencia não fique no olvido, em favor da originalidade das de *Besredka* e Mlle. *Bassèches* ⁽⁵⁾.

Sem o desejo de alongar a noticia dos estudos que põem marco importante na historia da immunidade local, ainda cabe aqui logar para referencia a *Dopter* ⁽⁶⁾, que conseguiu immunizar camondon-

gos contra a dysenteria, por via digestiva. Immunidade solida á prova infectuosa, por via subdermica.

Da objecção de *Brückner* (⁷) a uma interpretação de *Lippmann* (⁸), ha occasião para se enveredar, logicamente, para o caminho da nova concepção de immunidade, conforme as idéas de hoje.

Lippmann (⁸) conseguiu vaccinar camondongos, por ingestão de doses, progressivamente crescentes, de toxina botulinica, contra doses 10 vezes a minima mortal, pela bocca. Por via sub-cutanea nem a minima mortal; os camondongos morreram com os testemunhas. *Lippmann* diz que é possível, por uma immunidade da porta de entrada, proteger pura e seguramente o intestino contra um verdadeiro veneno bacteriano, sem que resulte uma immunidade geral.

A idéa accentua-se, e resiste ao que objecta *Brückner* (⁷), partindo da interpretação de suas proprias experiencias com B. paratypho B. Observando que os animaes, vaccinados pela bocca, resistiam á prova por via sub-cutanea concluiu que a immunidade é geral e não local, não se tratando de immunidade tissular.

Em verdade, a immunidade é geral, porque o animal resiste á prova geral. Poderia existir, então, uma immunidade especifica, adquirida, sem anticorpos? Sem duvida. O facto existia, mas a theoria não o explicava, elle não se enquadrava na immunidade geral, cuja exteriorização se faz á custa de anticorpos.

Impunha-se a explicação da nova immunidade.

Associaram-se logo as idéas de vaccinação local do órgão, de natureza local, visto ter sido o facto observado na vaccinação *per os* contra germe enterotropo. Mas, por que a organo-immunização, restricta, dá immunidade geral, comprovada por ulterior inoculação por via sub-cutanea?

A explicação, trouxe-a *Besredka*. Estas experiencias foram retomadas por um feliz acaso. Em falta de camondongos não experimentados ainda com B. paratypho B., *Besredka*, tendo necessidade de experimentar o poder pathogenico de algumas amostras por via sub-cutanea, utilizou camondongos que haviam resistido á prova por ingestão, um mês antes. A immunidade de todos á prova sub-cutanea fê-lo retomar o assumpto, completá-lo, ampliá-lo, dando-lhe feição nova, trazendo o laço que deveria unir a immunidade local e a geral com e sem anticorpo.

A immunidade é geral, não pelo mecanismo da immunidade geral, mas pela immunização local.

A immunidade é geral para os seus effeitos, é local por sua origem.

Immunidade geral por immunização local.

Para *Besredka* (⁹), a immunidade local processa-se em o órgão sensível que cada animal possui a cada germe. No seu dizer: «cada virus tem seu órgão, cada órgão sua immunidade».

A immunidade local resulta da vaccinação do órgão receptivo, de modo a collocar o animal a salvo de uma infecção pelo germe contra o qual foi vaccinado. Immunizado o órgão sensível, o órgão capaz de receber e accomodar o germe, offerecendo-lhe condições de virulencia, *ipso facto* está o germe sem guarida, incapacitado de agir, obrigado a lutar contra a nova disposição das cellulas suas

preferidas, a se defender do ataque dos leucocyts, a resistir ao natural poder bactericida dos humores. Bem se compreende que da introdução do germe, por qualquer via que seja, não decorra a infecção. Ha uma immuniidade geral no seu effeito, por uma immuniidade local na sua origem, proveniente da organo-immunização.

Partiu *Besredka* da organotropia, da infecção localizada á immuniidade do órgão.

Na mesma sequencia, faremos o nosso estudo; organo-tropismo, organo-immunização, immuniidade geral por immunização local.

* * *

O B. de Shiga é enterotropo. Por qualquer via que seja inoculado, elle é pathogenico, agindo no intestino, lesando de preferencia o cecum. O intestino, neste caso particular, não é a simples porta habitual da infecção, mas é a séde do processo morbido, o órgão sensível, o órgão receptivo.

Esses conhecimentos já estão integrados em sciencia. Não obstante, para afastar qualquer duvida, suscitada por algumas experiencias constantes da literatura, repetimo-las, para, com bastante segurança, partirmos ao estudo das outras premissas.

Tomamos 3 amostras differentes de «*Bacterium dysenteriae, Shiga*», com as quaes conseguimos determinar a infecção a coelhos, tanto por via buccal, mesmo com dóse pequena, como por via venosa, peritoneal, sub-cutanea.

Mostrou-se differente a actividade das tres amostras, sendo assim necessario determinar as doses seguramente mortaes, de accordo com a via de introdução, para cada amostra, para bom julgamento das provas de poder anti-infectuoso, na verificação da immuniidade.

Pudemos nos alistar entre os que affirmam não ser o dysenterico um bacillo septicemico.

Como prova do que ficou dito, registamos alguns dos nossos protocollos.

QUADRO N. 1
EXPERIÊNCIAS COM GERME VIVO

COELHO		INOCULAÇÃO				OBSERVAÇÕES	RESULTADO		
Exp. num.	Peso	Data	Dóse	Via	Amostra		SÝMPTOMAS	Morte	NECROPSE
1	1.640	23-II-23	1 alça	sub. cut.	N.º 4 Fujimoto	24 - I - 1.ª hem = 0 25 - I - 2.ª hem = 0 Peso: 1.550	26 - II - manhã diarrhéa, par. m. post. A' tarde: tetraplegia. Peso: 1.490 grs.	26/27 - II	Lesões intestinaes dysentericas. Paralysis vesical.
2	1.910	10-IV-23	500 milhões	"	"		14 - IV - par. m. post.	16 - IV - 23	Lesões intestinaes dysentericas. Paralysis vesical.
3	1.380	2 - III - 23	1 tubo	buccal	"		5 - III - par. m. post. Peso 1.220. 6 - III - peso 1.180. 7 - III - diarrhéa. Peso 1.150	7 - III - 23 á tarde	Lesões intestinaes dysentericas.
4	1.640	8 - III - 23	"	"	"		12 - III - par. m. post. conjunctivite, peso 1250. 13 - III - diarrhéa. Peso 1.150	13 - III - 23 ás 12 h.	Lesões intestinaes dysentericas.
5	1.530	5 - V - 23	1.000 milhões	venosa	"		7 - V - Peso 1.300	8 - V - 23	Lesões intestinaes dysentericas.
6	1.455	19 - III - 24	500 milhões	"	"		20-III-24 á tarde par. m. ant. e paresia dos posteriores. 21-III-24 - paral. vesical. 22-III - tetraplegia, dyspnéa.	22 - III - 24	Lesões intestinaes dysentericas. Conteudo semi-liquido, sanguinolento em alguns pontos. Mesenterio com vasos engorgitados.
7	2.250	5 - IV - 23	1 alça	Peritoneal	"		7-IV-23 - diarrhéa. Peso 2.115.	7/8 - IV - 23	
8	1.270	12 - V - 23	1.500 milhões	sub. cut.	N.º 15 Ficker		18-V - diarrhéa. Peso 1.190 gr.	19 - V - 23	Lesões intestinaes dysentericas. Conteudo intestinal liquido.
9	1.575	16-VII-23	1 tubo	"	"		17-VII - diarrhéa.	17-VII-23	Lesões intestinaes dysentericas. Conteudo intestinal liquido.

QUADRO N. 1
EXPERIÊNCIAS COM GERME VIVO

(Continuação)

COELHO		INOCULAÇÃO				OBSERVAÇÕES	RESULTADO		
Exp. num.	Peso	Data	Dóse	Via	Amostra		SYMPTOMAS	Morte	NECROPSE
10	1.750	13-VI-23	3 tubos	buccal	"		Sem symptomas.	15 - VI - 23	Lesões intestinaes dysentericas.
11	1.270	18-VII-23	4 tubos	"	"		31-VII - paralysis.	31-VII-23	Lesões intestinaes dysentericas.
12	2.800	24-VII-23	10 tubos	"	"		Sem symptomas.	12 - IX - 23	Pequenos focos hemorrhagicos circumscriptos.
13		13 - X - 23	1/5 de cultura	sub. cut.	N.º 2 I. O. C. 1		17-X-23 - diarrhéa e tetraplegia.	17 - X - 23	Lesões intestinaes dysentericas.
14	1.770	2 - X - 23	1 tubo	buccal	"		4-X - par. m. post. diarrhéa. Peso 1.515.	5 - X - 23	Lesões intestinaes dysentericas. Coccidiose hepatica.
15	1.820	2 - X - 23	4 tubos	"	"		4-X - diarrhéa. Peso 1.635 grs. 5-X - paralysis.	6/7 - X - 23	
16	1.770	31-VIII-23	4500 milhões	venosa	"			2 - IX - 23	Lesões intestinaes dysentericas.
17	2.380	11-IX-23	"	"	"	1.ª hem. 1/2 h. depois — negativa. 2.ª hem. 1 h. depois — neg.		12 - IX	Lesões intestinaes dysentericas. Fígado e rim degen. gorda.
18	1.140	16-VII-25	1000	sub. cut.	Fujimoto		19-VII - Não foi observado. 20-VII - amanheceu tetraplegico com forte diarrhéa, par. ves.	21 - VII - 25	Lesões intestinaes dysentericas.

Na interpretação dessas nossas experiencias, houve accordo com *Besredka*, quanto á prestancia do bacillo dysenterico ás experiencias de immunização enterica, com o fito de obter immunidad local.

Iniciamos, assim, os ensaios de immunização.

Mãos á obra, e, cedo, veio ensejo de verificar que a vaccina de germe morto não é destituida de toxicidade ao coelho, como concluirá *Kanai* ⁽¹⁰⁾. *Besredka* havia já referido o facto, mas de modo grosseiro: «Grandes doses matam, pequenas nada causam, a julgar pela falta de symptomas. Tal insensibilidade é, apenas, apparente, visto como ellas produzem lesões ligeiras do intestino, pequenos focos hemorrhagicos.»

Muitos dos nossos animaes succumbiam, no emtanto, a doses pequenas, mesmo fraccionadas. A questão, veja-se adeante, não estava restricta á dose, mas á resistencia maior ou menor dos animaes, e sim tambem, e principalmente, á toxicidade da amostra de germe.

Com a amostra Fujimoto, realizamos 17 experiencias de ingestão de germe morto. Succumbiram antes da prova de immunidad — 7; após a prova — 7. Apenas 3 sobreviveram á vaccinação e á prova anti-infectuosa. Morte por intoxicação — 41,17 %.

Por falta de immunidad, possivelmente alliada a certo gráo de intoxicação — 41,17 %. Sobrevivencia — 17,64 %.

Com a amostra 2 da collecção do Instituto Vital Brazil, proveniente do Instituto Oswaldo Cruz (I.O.C.1), montam a 21 os ensaios de immunização, com os seguintes resultados: 14 coelhos mortos antes da prova de immunidad, desses necropsiamos 5, verificando coccidiose hepato-intestinal em 4, a par, em 3, com lesões intestinaes dysentericas. Houve sempre quédia sensivel de peso, salvo no 5.º dos necropsiados, em que a morte se deu 24 horas após a 2.ª inoculação de dose relativamente forte, verificando-se degeneração hepatica e forte congestão do intestino delgado.

A prova de immunidad foi effectuada em 7, succumbindo um de accidente, no acto da inoculação, e outro no dia seguinte. Sobreviveram 5, sendo 3 a duas provas com prazos differentes, com a amostra homologa e com a Fujimoto.

Sommando as causas desfavoraveis, como seja o estado organico dos animaes portadores de coccidiose, verificada apenas em alguns, a dose excessiva de outro, com os casos de intoxicação pura pelo germe, temos o numero de 66 %.

Assim, esta amostra que, á primeira vista, sem estudo meditado dos protocollos das experiencias, parece muito toxica e imprestavel para a immunização sem riscos, é, no emtanto, em doses proporcionalmente maiores, menos toxica que a Fujimoto, e mais immunizante.

De 7, experimentados com doses mortaes de dysenterico, 5 adquiriram immunidad, e um succumbiu a accidente. Mesmo contando este caso como se fôra de falha, a percentagem de sobrevivencia é melhor que a do Fujimoto — 33,33 %.

A amostra I.O.C.1 é mais manejavel que a japonesa: menos toxica, mais immunizante. O estudo destas duas circumstancias parece indicar o caminho a seguir, no momento, para melhor exito da immunização de coelhos, por via buccal, contra a dysenteria.

O encontro de amostra de toxicidade baixa e poder imunizante alto é capital, para progredir mais e muito.

Com uma terceira amostra, de proveniencia allemã, enviada por *Ficker* (15 da col. I. Vital Brazil), com 7 experiencias, a conclusão não foi favoravel, pois 5 animaes succumbiram antes e 2 depois da prova anti-infectuosa.

Como que a frisar mais, insistimos na necessidade de estabelecimento de doses que vaccinem seguramente, sem o risco de intoxicarem. É ponto importante a procura de amostra em que os dois poderes se distanciem bem, pequeno o toxico, grande o imunizante.

Neste trabalho, trazemos, apenas, as experiencias mais concludentes, para o ponto, agora visado, e as experiencias novas, sem registo ainda, deixando de parte grande numero que interessa a outros pontos, não tratados aqui, e ventilados em trabalhos anteriores (11 e 12).

No quadro 2, contamos com as experiencias* em que se obteve immunidad, e algumas em que tal não se conseguiu, mas que têm importancia para o estudo da natureza da immunidad.

* Immunização com culturas em agar, de 24 hs. a 37°, e suspensas em soluto physiologico esteril, mortas 1 h. a 60°.

QUADRO N. 2

COELHO		IMUNIZAÇÃO			OBSERVAÇÕES	PROVA DE IMMUNIDADE COM GERME VIVO					RESULTADO
N.	PESO	DATA	AMOSTRA	DÓSE		DATA	AMOSTRA	VIA	DÓSE	Peso do coelho	
1	1.650 grs. 1.620 " 1.630 " 1.580 "	28-III-24 30-III-24 1-IV-24 3-IV-24	Fujimoto	1000 milhões 2000 " 3000 " 4000 "	23-IV - Poder agglutinante nullo. Poder anti-toxico (V. protocollo N. 1).	23-IV-24	Fujimoto	buccal	6000 milhões	1270 grs.	24-IV-25 - Amanheceu morto. Necropse - lesões int. dysentericas.
2	1.820 " 1.740 " 1.755 " 1.685 "	28-III-24 30-III-24 1-IV-24 3-IV-27	Fujimoto	1000 " 2000 " 3000 " 4000 "	23-IV - Poder agglutinante nullo. Poder anti-toxico muito pequeno. (V. protocollo N. 1).	23-IV-24	Fujimoto	buccal	6000 "	1155 "	24-IV - par. m. post. Á tarde tetraplegia. A' 25-IV - morte. Necropse - lesões int. dysentericas.
Test. I						10-IV-23	Fujimoto	buccal	3000 "	1820 "	15-IV-23 - morte.
3	1.750 " 1.710 " 1.760 " 1.700 "	28-III-24 30-III-24 1-IV-24 3-IV-24	Fujimoto	1000 " 2000 " 3000 " 4000 "	23-IV - Poder agglutinante nullo. Poder anti-toxico nullo (prot. 1).	23-IV-24	Fujimoto	venosa	500 "	1535 "	A 25-IV - par. m. post. A' tarde-tetraplegia, dyspnéa, par. vesical. A 26, sacrificado a chloroformio, para tentativa de insulamento do germe do intestino.
4	1.650 " 1.615 " 1.700 " 1.605 "	28-III-24 30-III-24 1-IV-24 3-IV-24	Fujimoto	1000 " 2000 " 3000 " 4000 "	23-IV - Poder agglutinante nullo e anti-toxico grande (V. protocollo 1).	23-IV-24	Fujimoto	venosa	500 "	1360 "	A 13-VI-24 - morte.
Test. II						19-III-24	Fujimoto	venosa	500 "	1455 "	20-III-24 - A' tarde - par. m. ant. e paresia dos post. 21-III-24 - tetraplegia, dyspnéa, morte.
5	1.705 " 1.640 " 1.540 " 1.485 "	14-IX-23 16-IX-23 18-IX-23 21-IX-23	I. O. C. 1	700 " 1400 " 2800 " 5600 "	16-X - Poder agglutinante nullo.	6-X-23	I. O. C. 1	buccal	4 tubos de cultura em agar inclinada. 24 hs. 37°.	1520 "	A 27-X - morte. Peso 1080 grs.
6	1.780 " 1.720 " 1.650 " 1.650 "	14-IX-23 16-IX-23 18-IX-23 21-IX-23	I. O. C. 1	2100 " 4200 " 8400 " 10500 "	4-X-23 - Poder agglutinante nullo. Peso 1.750 grs.	6-X-23	I. O. C. 1	buccal	4 tubos de cultura em agar inclinada.	1600 "	20-X - morte. Peso 1.080. Necropse - pequenos focos hemorrhagicos do intestino delgado.
Test. III						2-X-23	I. O. C. 1	buccal	1 tubo	1770 "	A 4-X-23 - diarrhéa. A 5 paralyisia. 6/7 morte.

CONTINUAÇÃO DO QUADRO N. 2

COELHO		IMUNIZAÇÃO			OBSERVAÇÕES	PROVA DE IMMUNIDADE COM GERME VIVO					RESULTADO
N.	PESO	DATA	AMOSTRA	DÓSE		DATA	AMOSTRA	VIA	DÓSE	Peso do coelho	
Test. IV						2-X-23	I. O. C. 1	buccal	4 tubos	1820	4-X - par. m. post., diarrhéa. A 5-X - morte. Necropse - lesões int. dys., coccidiose.
7	1.890 grs. 1.860 > 1.820 > 1.770 >	15-XI-23 17-XI-23 20-XI-23 24-XI-23	I. O. C. 1	2000 milhões 6000 > 6000 > 6000 >	18-XII-23 - Poder agglutinante nullo. Poder anti-toxico grande. (prot. 2)	20-XII-23 18-1-24	I. O. C. 1 Fujimoto	sub cut. > >	$\frac{2}{5}$ cultura $\frac{1}{10}$ cultura		4-II-24 - morte.
8	1.640 > 1.540 > 1.640 > 1.605 >	15-XI-23 17-XI-23 20-XI-23 24-XI-23	I. O. C. 1	2000 > 6000 > 6000 > 6000 >	18-XII - Poder agglutinante nullo. Poder anti-toxico grande. (Prot. 2)	20-XII-23 18-1-24	I. O. C. 1 Fujimoto	venosa >	$\frac{2}{5}$ cultura $\frac{1}{10}$ cultura		1-II-24 - Morte. Pequenos focos hemorrhagicos intestinaes.
9	1.795 > 1.815 > 1.850 > 1.685 >	15-XI-23 17-XI-23 20-XI-23 24-XI-23	I. O. C. 1	2000 > 6000 > 6000 > 6000 >	29-XI - par. m. post. Regressão em poucos dias. Peso 1660. 18-XII - Poder agglutinante nullo. Poder anti-toxico grande (Prot. 2).	20-XII-23	I. O. C. 1	buccal	$\frac{2}{5}$ cultura	1554	Morte immediata por accidente. Asphyxia por inoculação tracheal.
Test. V						20-XII-23	I. O. C. 1	sub cut.	$\frac{2}{5}$ cultura	1300	24-XII - Morte.
Test. VI						13-X-23	I. O. C. 1	> >	$\frac{1}{5}$ cultura		17-X - diarrhéa. Tetraplegia. Morte. Lesões int. dysentericas.
Test. VII						18-I-24	Fujimoto	> >	$\frac{1}{10}$ cultura		21-I-24 - diarrhéa - esboço de paral. 22-I-24 - par. m. post. 23-I - morte.
10	1.785 > 1.780 > 1.775 > 1.800 >	4-I-24 6-I-24 8-I-29 10-I-24	I. O. C. 1	1500 > 3000 > 5000 > 10000 >		29-I-24	Fujimoto	venosa	$\frac{1}{10}$ cultura	1400	1-II-24 - Tetraplegia. Morte. Necropse - lesões intestinaes - par. vesical. Cult. bile positiva.
11	1.850 > 1.750 > 1.800 > 1.720 >	21-II-24 23-II-24 25-II-24 27-II-24	I. O. C. 1	1000 > 2000 > 4000 > 8000 >	A 18-III-24 - agglut. nullo. Poder anti-toxico algum (Protoc. 3).	18-III-24	Fujimoto		500 milhões	1400	A 12-IV-24, peso 1650 grs. bom. A 29-IV-24 bom.
Test. VIII	1.445 >					19-III-24	Fujimoto		500 milhões	1455	A 21-III-24, á tarde, par. m. ant. e paresia dos post. 22-III accentuação da paresia dos post. Peso 1330 grs. dyspnéa, morte á tarde. Lesões intestinaes dysentericas.

CONTINUAÇÃO DO QUADRO N. 2

COELHO		IMUNIZAÇÃO			OBSERVAÇÕES	PROVA DE IMMUNIDADE COM GERME VIVO					RESULTADO
N.	PESO	DATA	AMOSTRA	DÓSE		DATA	AMOSTRA	VIA	DÓSE	Peso do coelho	
12	1.675 grs	16-VII-23	Ficker	5000 milhões	A 31-VII-23 indice agglutinante 1:200.	4-VIII	Fujimoto	buccal	1 tubo	1400	27-VII peso: 1525 grs. - 29-VII bom - 8-VIII - peso 1270. par. m. post. - 10-VIII - peso 1205 gr. - 11-VIII morte.
13	1.890 > 1.910 > 1.835 > 1.830 >	7-III-24 9-III-24 11-III-24 13-III-24	Ficker	2000 > 4000 > 6000 > 8000 >	A 2-IV-24, poder anti-toxico nullo.	2-IV-24	Fujimoto	venosa	500 milhões	1475	3-IV-24 - morte. Necrops: lesões intestinaes dysentericas. Degenerescencia hepatica.
14	1.200 > 1.050 > 990 >	14-V-25 16-V-25 18-V-25	Fujimoto	2000 > 4000 > 6000 >	19-V - Peso 940. 20-V - Peso 860.						21/22-V - Morte.
15	920 > 800 > 660 >	14-V-25 16-V-25 18-V-25	Fujimoto	2000 > 4000 > 6000 >	19-V - Peso 630.						20-V-25 as 12 horas morte. Lesões intestinaes dysenterica.
16	1.200 > 1.050 > 990 >	14-V-25 16-V-25 18-V-25	Fujimoto	2000 > 4000 > 6000 >	19-V - Peso 850. 20-V - Peso 910.						1-VI-25 - Morte.
17	980 > 900 > 840 >	14-V-25 16-V-25 18-V-25	Fujimoto	2000 > 4000 > 6000 >	19-V - Peso 760. 20-V - Peso 780.						29/30-V - Morte. Degenerescencia hepatica. Coccidiose.
18	1.160 > 1.050 > 1.020 >	14-V-25 16-V-25 18-V-25	Fujimoto	2000 > 4000 > 6000 >	19-V - Peso 860. 20-V - Peso 900.	7-VI-25	Fujimoto	buccal	1/2 tubo	1055	7-VII-25 - Morte.
19	1.300 > 1.050 > 1.000 >	14-V-25 16-V-25 18-V-25	Fujimoto	2000 > 4000 > 6000 >	19-V - Peso 1000. 20-V - Peso 1000. 7-VI-25 sangria exploradora. Poder neutralizador (V. protoc. 4). A 15-VIII nova sangria - P. neutralizador (V. prot. 5)	7-VI-25 15-VII-25	Fujimoto >	buccal sub cut.	1/2 tubo cult. 1000 milhões	1050 1140	
Test. IX						28-IV-25	Fujimoto	buccal	1/2 tubo	1500	30/31-V - Lesões int. dysentericas.
Test. X						15-VII-25	Fujimoto	sub cut.	1000 milhões	1030	19-VII - Não foi observado. 20-VII - amanheceu tetraplegico, com forte diarrhéa e paralyisia vesical. Morte. Necrops: lesões int. dysentericas.

No estudo particularizado de cada experiência do quadro precedente, vamos tirar os fundamentos de conclusões do nosso trabalho experimental.

A experiência n. 1 nos ensina que a imunização *per os*, com cultura morta da amostra Fujimoto, não é sem inconveniente para o coelho, mesmo com doses pequenas, intervalladas de 48 horas, a julgar pela queda de peso. Em 26 dias, cahiu de 1.650 grs. a 1.270. Nesse tempo não continha o seu sangue propriedades agglutinantes e anti-tóxicas, (exp. n. 3 do protocollo n. 1). Experimentado com dose segura mortal (test. I do mesmo quadro) da amostra homologa, por via buccal, succumbiu em menos de 24 horas, com lesões intestinaes dysentericas. Morte por infecção dysenterica no curso de intoxicação da mesma natureza. Nem augmento da resistencia local enterica, nem immuidade geral, coincidindo com falta de anticorpos (agglutininas e anti-toxinas).

A experiência n. 2, realizada em condições identicas ás da n. 1, falla de intoxicação pela perda de 715 grs., mostra ausencia de poder agglutinante e algum poder neutralizador da toxina dysenterica (retardamento da morte do coelho 4 do prot. n. 1). Resistiu 48 hs. á prova anti-infectuosa, por via buccal, analoga á do n. 1. Com 24 hs., installou-se paralyisia dos membros posteriores, que rapidamente attingiu os quatro membros. Á necropse, lesões intestinaes dysentericas. Falta de resistencia do intestino, via de introdução do germe vivo. Falta de immuidade geral, coincidindo com a propriedade do sôro, quando misturado a toxina, de retardar, apenas, a morte.

A experiência n. 3 não revela, como as precedentes, queda sensivel de peso. Com 26 dias, poderes agglutinante e anti-toxico nulos (exp. 2 do prot. 1). Prova de immuidade por via venosa, com amostra homologa á da vacinação (Fujimoto), em dose segura mortal (test. II — quadro 2.). Com 48 hs., phenomenos de intoxicação nervosa: paralyisia dos membros posteriores, mais tarde tetraplegia, dyspnêa, paralyisia vesical. No dia seguinte, sacrificado para tentativa de insulamento do germe do intestino. Ainda neste caso a coincidencia já referida.

A experiência 4, nas mesmas condições que a antecedente, concorda quanto á inexistencia de agglutininas. No emtanto, o sôro do coelho possui poder de neutralizar *in vitro* toxina dysenterica (exp. n. 1 do prot. n. 1). Existencia de anti-toxina; consecução de immuidade contra inoculação de dose mortal da amostra Fujimoto, por via venosa. Emquanto que o testemunha (II do quadro 2), mais pesado, dentro de 24 hs. apresentou paralyisia dos membros anteriores, paresia dos posteriores, e, em 48 hs., tetraplegico, dyspneico, succumbiu, o coelho entero-vaccinado sobreviveu 51 dias, sem nenhum symptoma da syndrome.

A experiência n. 5 pertence a outra serie de imunização, agora com a amostra 2 da collecção do I. Vital Brazil, com a indicação original de Instituto Oswaldo Cruz n. 1 (I.O.C.1). Com 22 dias perda pequena de peso, poder agglutinante nullo. O neutralizador não foi feito por falta de coelhos. Com 4 tubos de germe vivo (am.I.O.C.1), *per os*, sobrevivencia de 21 dias, sem symptoma, ao

passo que o testemunha, mais pesado (test. III q. 2), com 1 tubo, 48 hs. após teve diarrhéa, 72 hs. — paralyisia, e morte na noite do 4.º para o 5.º dia. O testemunha de 4 tubos, 300 grs. mais pesado (test. IV, q. 2), em dois dias paralytico e diarrheico, succumbiu ao 3.º, com lesões intestinaes dysentericas. Immunidade comprovada.

Na *experiencia n. 6* as doses vaccinantes são duas vezes mais fortes que na anterior. O animal supportou bem, sem mostras de sensibilidade, perda quasi nenhuma de peso. Com 20 dias, poder agglutinante nullo. Não se procurou o anti-toxico (falta de coelhos). A prova de immunidade foi identica á do n. 5. Sobrevivencia, sem symptomas, por 14 dias. Tanto este como o 5 perderam muito peso a contar da data da inoculação, prova da lucta contra tão formidavel (4 tubos de cultura viva) dose de germe activo, toxico. A necropse demonstrou, aqui e acolá, pequenos focos circumscriptos de hemorrhagia, sem outra lesão. Immunidade. Morte por intoxicação massica.

As *experiencias 7 e 8* nos fornecem prova de immunidade solida, com ausencia de agglutininas e presença de poder anti-toxico (prot. 2), 38 dias do inicio da immunização, 24 do termino. A prova de immunidade foi por via sub-cutanea para o 7 e venosa para o 8, com a amostra homologa (I.O.C.1) em dose segura mortal (tests. V e VI, quadro 2).

Decorridos 28 dias, nova prova, pelas mesmas vias, com Fujimoto, em dose mortal. O 7 sobreviveu 15 dias, sem symptomas; o 8 durante 13 dias á inoculação venosa, sem symptomas, enquanto o testemunha (VIII q. 2), com a mesma dose, por via sub-cutanea, em 3 dias se apresentou com diarrhéa e esboço de paralyisia, para com quatro dias completar a syndrome com a classica paralyisia dos membros posteriores. No 5.º dia, morte. Estas duas experiencias chamam a attenção para a solidez da immunidade á amostra homologa, a heterologa, mais activa. Note-se, em concordancia com poder neutralizador do soro.

A *experiencia 9* obedeceu ao mesmo plano das duas ultimas. Passavam 5 dias da ultima inoculação, quando o animal se apresentou com paralyisia dos membros posteriores. Houve regressão rapida, em poucos dias. No dia que os outros foram sangrados, para procura dos anticorpos, elle tambem. Ausencia de agglutinina, presença de poder neutralizador *in vitro*. Dois dias após, no acto da inoculação de prova, que deveria ser por via buccal, o animal morreu de accidente. Asphyxia por introduccão da canula na trachéa. Optima experiencia perdida.

O *coelho n. 10*, immunizado com I.O.C.1, não resistiu á prova com Fujimoto por via venosa. Em 4 dias tetraplegia, morte. Lesões intestinaes, paralyisia vesical. Cultura da bile-positiva.

Na *experiencia 11*, com a mesma amostra, em doses menores, o coelho perdeu de peso 450 grs., em 26 dias. Quanto aos anticorpos — ausencia de agglutininas, presença de algum poder anti-toxico (veja-se o protocollo 3). Immunidade solida a dose mortal, pela veia, de Fujimoto (test. VIII q. 2). Decorridos 25 dias da prova, o peso subiu a 250 grs. Depois de 42 dias deixou de ser observado. Nesta experiencia, onde a coincidencia que vimos notando não é

tão flagrante, seria possível admittir com *Besredka* um papel ao órgão electivo do germe, sem, no emtanto, prová-lo.

As experiências 12 e 13 foram realizadas com a amostra Ficker (n. 15 da col. I. Vital Brazil). Na 12, uma unica inoculação fez com que 15 dias depois o indice agglutinante fosse de 1:200. Por falta de animaes, não foi feita a pesquisa do poder anti-toxico. Prova de immuidade, 19 dias depois, com 1 tubo de Fujimoto, pela bocca (test. III). Passados 4 dias, paralyisia dos membros posteriores. Com 7 dias, morte. Nesse prazo, perda de 200 grs. de peso. A immunização foi defficiente. A prova foi muito severa, pois $1\frac{1}{2}$ tubo, verificação posterior, mata em 2 dias (test. IX), com lesões intestinaes dysentericas. Na n. 13, foram as doses fraccionadas. Não havia poder anti-toxico. Não havia immuidade. Morte em 24 hs. Lesões intestinaes dysentericas.

As ultimas experiencias deste quadro n. 2 foram effectuadas em Butantan, com a amostra Fujimoto, com coelhos muito pequenos. O 14, o 15, o 16 e o 17 não resistiram á immunização. O 18 sobreviveu á inoculação de $1\frac{1}{2}$ tubo de cultura *per os*, da amostra homologa (test. IX). Sem symptomas, morte passado um mês. O 19 foi sangrado a 7 de junho. Poder agglutinante — não. Poder neutralizador — sim (prot. n. 4). Immuidade — sim. Passados 28 dias da prova, nova sangria exploradora (15-VII-25). Poder agglutinante — não. Poder neutralizador — sim (prot. 5). Immuidade — sim (prova — dose mortal de Fujimoto sob a pelle (test. X).

Poder neutralizador do sôro dos coelhos vaccinados *per os*

Protocollo N. 1 (referente ás exps. 1, 2, 3 e 4 do Quadro N. 2).

COELHO		INOCULAÇÃO VENOSA		SYMPTOMAS	RESULTADO
N.	Peso	Data	Dóse		
1	1.580	24-IV-24	0,2 tox. + 0,2 sôro do coelho 4 (1 h. 37°, em mistura).	nenhum	Sobrevivencia
2	1.630	»	0,2 tox. + 0,2 sôro do coelho 3 (1 h. 37°, em mistura).	26-IV - paretico	+ 26/27-IV
3	1.580	»	0,2 tox. + 0,2 sôro do coelho 1 (1 h. 37°, em mistura).	27-IV - diarrhéa	+ 27-IV-24
4	1.710	»	0,2 tox. + 0,2 sôro do coelho 2 (1 h. 37°, em mistura).	27-IV - paretico 28-IV - diarrhéa	+ 1-V-24
5 Test.	1.790	»	0,2 de toxina = 1 d. m.m.	27-IV - tetraplegia, paralyisia geral.	+ 27-IV

Protocollo N. 2 (referente ás exps. 8, 9, e 10 do Quadro N. 2).

Experiencia a 18-XII-23 — Os coelhos inoculados com a mistura de sôro (1 cc.) e toxina (0,1), incubada 1 h. a 37°, sobreviveram todos. O testemunha succumbiu a 21-XII-24. Na data dessa experiencia, a actividade da toxina era a de 0,1 como minima mortal. Se augmentamos a dose de sôro, foi por ser mais vantajoso ao fito

da experiencia. Com mais razão seria excluída a participação de anticorpos na genesis da immundade, se os coelhos succumbissem. Se os animaes sobrevivessem, como de facto sobreviveram, nenhuma duvida ficaria sobre o excesso de anticorpos circulantes, a garantir, consoante Ehrlich, a immundade. A duvida persistiu pela falta de symptomas do testemunha, que succumbiu. A experiencia, no emtanto, não ficou invalidada, pelo conhecimento de que a dóse empregada correspondia, mesmo, á minima mortal, por provas frequentes de julgamento do valôr do sôro de cavallos immunizados contra dysenteria.

Protocollo N. 3 (referente á exp. 12 do Quadro N. 2).

COELHO		INOCULAÇÃO VENOSA		SYMPTOMAS	RESULTADO
N.	Peso	Data	Dóse		
1	1610	18-III-24	0,2 tox. + 0,2 sôro coelho N. 12 do Quadro 2. Mistura 1 h., 37°.	23-III - paresia muito ligeira dos membros anteriores. 24-III - bom.	Sobreviveu
2	1620	18-III-24	0,2 tox. + 0,2 sôro coelho N. 12 do Quadro 2. Incubação da mistura 1 h. a 37°.	23-III - ligeira paresia dos membros ants. 24-III - pela manhã - paresia accentuada; á tarde - tetraplegia.	+ 24/25-III
3 Test. I	1780	15-III-24	0,2 de toxina = 1 d.m.m.	18-III - paralytico, pela manhã.	+ 18-III-24
4 Test. II	1760	15-III-24	0,2 t. + 0,2 sôro do cav. 133.	17-III - paralytico, pela manhã.	+ 17/18-III-24

Testemunhavam a actividade da toxina, na dóse empregada, as experiencias effectuadas 3 dias antes, para julgamento do valor do sôro anti-dysenterico do cavallo 133, em curso de immunização. O sôro não dosou, pondo claro o poder da toxina.

Protocollo N. 4 (referente á exp. 20 do Quadro N. 2)

COELHO		INOCULAÇÃO VENOSA		SYMPTOMAS	RESULTADO
N.	Peso	Data	Dóse		
1	—	7-VI-25	0,2 sôro + 0,5 toxina (mistura 1 h., 37°).	10-VI - paralysis mem-bros posts.	+ 11-VI-25
2	—	7-VI-25	0,2 sôro + 0,5 toxina (mistura 1 h., 37°).	Nenhum	Sobreviveu
3	—	7-VI-25	0,4 sôro + 0,5 toxina (mistura 1 h., 37°).	Nenhum	Sobreviveu
4	—	7-VI-25	0,4 sôro + 0,5 toxina (mistura 1 h., 37°).	Nenhum	Sobreviveu
5 Test. I	—	6-VI-25	0,5 de toxina, sendo 0,4 a dóse minima mortal.	8-VI-25 - par. m. post.	+ 9-VI-25
6 Test. II	—	6-VI-25	0,5 de toxina.	8-VI-25 - par. m. post.	+ 9-VI-25

NOTA — No momento da inoculação do coelho n. 2, a agulha sahiu da veia, indo, assim, parte da mistura, por via sub-cutanea. Então, propositalmente, repartimos para o n. 3, a inoculação, parte venosa, parte sub-dermica.

Protocollo N. 5 (referente á 2.^a sangria do coelho 20 do Quadro N. 2.)

COELHO		INOCULAÇÃO VENOSA		SYMPTOMAS	RESULTADO
N.	Peso	Data	Dóse		
1 Test. I	1050	16-VII-25	0,4 tox = 1 d.m.m.	18-VII - Par. m. posts. diarrhéa. 19-VII - Não foi observado.	+ 19/20-VII
2	970 gr.	16-VII-25	0,2 sôro + 0,4 tox. (1 h. 37°)	Nenhum	Sobrevivencia 25-VII - 25 (continuava bom)
3	970	16-VII-25	0,4 sôro + 0,4 tox. (1 h. 37°)	18-VII - Diarrhéa - 19-VII - Não foi observado. 20-VII - Bom.	Sobrevivencia 25-VII-25 (continuava bom)

Não se póde affirmar que a immunização *per os* confira immunidade local, dada a coincidência referida.

A affirmativa de *Besredka*, de que ella se processava independente de anticorpo, é illação duma experiencia mal interpretada. Excluia a natureza geral da immunidade, por ausencia de agglutininas e de poder anti-infectuoso. Immunizou coelho. Tomou 1 cc. do sôro deste animal. Injectou em camondongo. Inocula dóse mortal de germe nos dois animaes. O coelho sobrevive, o camondongo morre. Póde indicar a morte deste camondongo que não havia anticorpos no sôro do coelho? Absolutamente, não. É possível que 1 cc. deste sôro não contenha a quantidade necessaria de anticorpos para impedir a infecção.

É licito concluir-se por esta prova, que o vaccinado resistiu á infecção sem ser por interferencia de anticorpos? Não. É possível que os anticorpos, contidos em toda a massa sanguinea, sejam em numero capaz de impedir a infecção, que os existentes em 1 cc. não conseguem.

Assim sendo, a ausencia de poder anti-infectuoso não implica na inexistencia de anticorpos, no sôro do coelho vaccinado.

Este sôro age mais como anti-toxico do que como anti-microbiano, e, a determinação do seu teor em anti-toxina, como meio de julgamento do seu valor, é mais segura pelo estabelecimento do seu poder neutralizador *in vitro* (incubação da mistura de sôro e toxina), do seu poder curativo, *in vivo* (toxina depois sôro), do que o seu poder anti-infectuoso, por possível acção directa sobre o germe, por neutralização da quantidade indeterminada de toxina que delle sahir.

Não se póde estabelecer relação entre os tres poderes do sôro: neutralizador, curativo, anti-infectuoso. A escolher, para julgamento não só da existencia, mas do titulo de anti-toxina no sôro dos animaes vaccinados, as provas dos poderes neutralizador e curativo são preferiveis.

A mais simples, a do poder neutralizador, em que fica de lado a possível causa de erro do gráo de avidéz da toxina pelos tecidos, existente na prova de poder curativo, ainda é delicada.

Se, por exemplo, 0,2 de sôro neutralizarem 3 d.m.m. de toxina, 0,4 não neutralizam 6, e 0,1 póde neutralizar 2.

Quanto mais se augmentar, proporcionalmente, sôro e toxina, menos evidente se torna o poder neutralizador, até que se mostra nullo. Abaixando-se, occorre o facto inverso.

É preciso fixar a dóse de sôro que neutraliza 1 d.m.m. de toxina.

A determinação do numero de dóses minimas mortaes neutralizadas informa da riqueza do sôro em anti-toxina. A determinação da dóse menor de sôro que neutraliza uma minima mortal nos dá noticia desse poder. É comprehensivel que com o mesmo sôro e a mesma toxina, os resultados variem, a ponto de um negar a existencia de anti-toxina (0,4 de sôro + 6 d.m.m. de toxina), e outro revelá-la (0,1 de sôro + 2 d.m.m. de toxina).

Se, aqui, a prova é delicada, quanto mais com o poder anti-infectuoso, em que se ignora a quantidade e a actividade da toxina, produzida pelos germes inoculados.

Não foi, pois, de admirar que tambem *Combiesco*, *Magheru* e *Calalb* ⁽¹³⁾ verificassem a existencia de anti-toxina, no sôro dos seus animaes entero-vaccinados.

Pelas experiencias, com germe vivo (quadro 1), nos capacitámos: a) da actividade de três amostras differentes de B. de Shiga; b) da sua acção electiva sobre o intestino, independendo da via de inoculação; c) da sua falta de desenvolvimento no sangue, por hemoculturas procedidas 1/2 e 1 h. após a inoculação venosa, por hemocultura 24 e 48 hs. após inoculação sub-cutanea, por culturas de sangue do coração, nas necropses dos animaes inoculados por differentes vias (todas as exps. em que é feita referencia á necropse); d) da sua acção segura, por inoculação digestiva.

Com esses dados partimos em busca da immuidade localizada ao órgão receptivo, por immunização directa, local, enterica, *per os*.

Das experiencias de immunização (germe morto) chegámos ás

CONCLUSÕES

1 — Consegue-se immunizar coelhos por via buccal com B. de Shiga, morto.

2 — Muitos animaes succumbem no decurso da vaccinação, ou no periodo intercallar de vaccinação e prova de immuidade.

3 — A julgar pela quédia sensivel de peso, manifestações dysentericas em alguns, lesões em outros, a morte se dá por intoxicção.

4 — A gravidade desta intoxicção depende do estado organico do animal (a coccidiose hepato-intestinal sendo um dos factores de menor resistencia); depende das dóses de germe morto; depende das amostras, havendo grandes differenças de toxicidade entre uma e outra.

5 — Para o encontro de amostra pouco toxica e muito immunizante devem se voltar ás experiencias.

6 — Conseguimos immunizar animaes, com uma amostra menos toxica que outra, contra essa outra, mais activa e mais toxica, bem como contra as duas, em provas separadas.

7 — Temos obtido immunidadade solida, com as amostras I.O.C.1 e Fujimoto, contra prova infectuosa por via venosa, sub-cutanea ou buccal.

8 — Sempre que ha immunidadade, ha poder anti-toxico do sôro, com ausencia de poder agglutinante.

9 — Quando não ha poder anti-toxico não ha immunidadade, nem mesmo contra a prova por via buccal. Não ha um augmento de resistencia local intestinal capaz de impedir a infecção. Nem immunidadade local nem geral.

10 — A immunização por via buccal contra a dysenteria é um processo de immunização geral.

Immunisation *per os* contre le bacille de Shiga

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ

PAR LE

DR. EDUARDO VAZ

SOMMAIRE

Après avoir rappelé les différents travaux publiés antérieurement sur l'immunité locale, l'A. expose la théorie moderne de *Besredka*: immunité générale par ses effets, mais d'origine locale due à l'immunisation de l'organe sensible.

Pour étudier le mécanisme intime de l'immunité locale, l'A. expose ensuite le résultat de ses recherches avec le B. de Shiga. Le choix de l'échantillon de B. de Shiga est très important et il est avant tout nécessaire d'établir les d.m.m. par différentes voies, buccale, souscutanée et endoveineuse avec les germes vivants; certains échantillons sont très toxiques et peu immunisants; il faut rechercher un type de faible pouvoir toxique et de pouvoir antigénique élevé.

Ayant rencontré un échantillon remplissant ces conditions, l'A. réalisa de nombreuses expériences d'immunisation par voie buccale chez le lapin: chaque animal recevait 3 ou 4 doses croissantes de germes morts, à 2 ou 3 jours d'intervalle; après un délai minimum de 2 semaines, la preuve d'immunité était faite par voie buccale, endoveineuse ou souscutanée avec des germes vivants soit du même échantillon, soit d'origine différente.

Chaque fois que cela fût possible, l'A. rechercha également le pouvoir neutralisant *in vitro*, ainsi que le pouvoir agglutinant du serum des animaux immunisés.

De ces expériences l'A. tire les conclusions suivantes:

1.º — On peut immuniser des lapins par voie buccale avec le B. de Shiga mort.

2.º — De nombreux animaux meurent pendant la vaccination, ou dans l'intervalle entre la vaccination et la preuve d'immunité.

3.º — À en juger par la perte sensible de poids, des manifestations dysentériques chez quelques uns, des lésions chez d'autres, la mort se produit par intoxication.

4.º — La gravité de cette intoxication dépend — a) de l'état organique de l'animal (la coccidiose hépato intestinale étant un des

facteurs de diminution de la résistance); *b*) des doses de germes morts; *c*) des échantillons de germes, de grandes différences existant entre chaque échantillon.

5.^o — Seules des séries d'expériences permettent de trouver un échantillon peu toxique et de pouvoir immunisant élevé.

6.^o — Il a été possible d'immuniser des animaux avec un échantillon moins toxique et actif qu'un autre contre ce dernier, ou contre les deux (preuves d'immunité séparées).

7.^o — Avec 2 échantillons (I.O.C.1 e Fujimoto), il a été obtenu une immunité solide contre l'épreuve d'infection par voie veineuse, souscutanée ou buccale.

8.^o — Toutes les fois qu'il y a immunité, il y a pouvoir anti-toxique du serum, mais absence de pouvoir agglutinant.

9.^o — Quand'il n'y a pas de pouvoir anti-toxique, il n'y a pas d'immunité, même pas contre la preuve par voie buccale; il n'y a pas d'augmentation de la résistance locale intestinale, capable d'empêcher l'infection, il n'y a ni immunité locale, ni immunité générale.

10.^o — L'immunisation par voie buccale contre la dysentérie est une méthode d'immunisation générale.

Trabalhos citados

- 1 — *Shiga* — «Ueber die aktive Immunisierung *per os*» Saikingaku-Zassi, 1908, N.^o 38 Apud Cent. f. Bakt., 1909, 1 Abt., Bd. 42, N.^o 1/3, S. 419.
- 2 — *Wassermann und Citron* — «Ueber die Bildungastätten der Typhusimmunkörper» — Ein Beitrag zur Frage der lokalen Immunität der Gewebe. Zeit. f. Hyg., 1905, Bd. 50, S. 331.
- 3 — *Wassermann und Citron* — «Die lokale Immunität der Gewebe und ihre praktische Wichtigkeit» — Deut. Med. Woch., 1905, N.^o 15. Apud Hyg. Rund., 1906, N.^o 1, S. 193.
- 4 — *Loeffler* — «Ueber Immunisierung *per os*» — Gedenkschrift für Rudolph V. Leuthold Bd. 1, S. 247. Apud Hyg. Rund. 1906, N.^o 1, S. 193.
- 5 — *Dopter* — «Vaccination anti-dysentérique expérimentale par les voies digestives». Compt. Rend. Soc. Biol., 16. V. 1908. *Dopter in* «Les dysentéries».
- 6 — *Besredka* — «De l'immunité locale (suite et fin)» Bull. Inst. Past. 1924, t. 22, p. 265.
- 7 — *Bruckner* — «Ueber orale Immunisierung Versuche» Zeit. f. Im., Bd. 8, S. 439 — Apud Cent. f. Bakt., 1911, Bd. 49, S. 550.

- 8 — *Lippmann (H)* — «Ueber lokale Immunisierung der Eingangspforten Infektionen» — *Med. Klin.*, 1910, N.º 38, S. 1477, Apud *Cent. f. Bakt.*, 1911, Bd. 49, S. 549.
- 9 — *Besredka* — «Immunité générale par immunisation locale». *Bul. Inst. Past.*, 1922, t. 20, Ns. 12 e 13, pp. 475 e 513.
- 10 — *Kanai* — «Dysentery immunisation in rabbits by the oral and subcutaneous methods». *Brit. Med. Journ. Exp. Path.*, 1921, 2, p. 256. Apud *Cent. f. Bakt.* 1923, Bd. 74, n. 19/20, S. 459.
- 11 — *Vaz (E.)* — «Dysenteria e imunização anti-dysenterica por via buccal». *Arch. Inst. Vital Brazil*, 1924, t. 2, fasc. 2, p. 191.
- 12 — *Vaz (E.)* — «Immunidade local». Rio — *Typ. Rev. Trib.*, 1924.
- 13 — *Combiesco — Magheru et Calalb* — «Vaccination préventive contre la dysentérie par voie digestive, chez le lapin». *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1923, 88, n.º 12, p. 904.

Trabalho recebido para publicação em 25. VII. 1925.

