

obrigado a apresentar a sua opinião sobre o assunto. Nós achamos que é de grande interesse a discussão da questão, e que os resultados obtidos em nossas experiências devem ser levados em consideração, porque a vacinação antitífica é uma das mais eficazes e seguras formas de proteção contra a tuberculose.

VACINAÇÃO T.A.B.

FORMAÇÃO DE AGLUTININA "O" NO HOMEM PELO EMPRÉGO DE VACINA FORMOLADA

POR

L. NOGUEIRA CARRIJO, C. D. AVILA PIRES & CELSO BRANDÃO

(Do Laboratório de Imunologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Em trabalhos anteriores foi estudado o emprégo das vias subcutânea e intradérmica para a vacinação antitífica, usando-se uma vacina T.A.B., morta pelo formol e adicionada de ácido fênico como preservativo (1 e 2). O resultado obtido foi de todo inesperado, revelando-se o produto incapaz de induzir a formação de aglutinina "O" nos indivíduos vacinados, por qualquer das vias.

Resultados semelhantes, é certo, já haviam sido obtidos anteriormente, com outros tipos de vacina, por diferentes pesquisadores (3 a 8). Entretanto, a sucessão de numerosos trabalhos veio demonstrar, de maneira exaustiva, que as vacinas antitíficas podem e devem induzir a formação de aglutinina "O" (9 a 18). Esses resultados foram ampliados pela experimentação posterior com endotoxoides e vacinas "Vi" (19 a 24).

Outros pesquisadores, que haviam inicialmente tido resultados negativos, obtiveram-nos posteriormente positivos, atribuindo aquêles a deficiências, de diversa natureza, do produto utilizado (25).

A importância do antígeno "O" para a virulência bacteriana, o seu valor como agente imunizante e a conveniência de mantê-lo o mais possivelmente integral, numa vacina antitífica, parecem estar perfeitamente estabelecidos (26 a 30). O seu papel nem mesmo foi diminuído pelos trabalhos mais recentes, de FELIX e PITTS (31 e 32), que resultaram na descoberta do antígeno "Vi", principal responsável pela virulência do bacilo tífico. Apenas foi melhor delimitado, ficando evidenciado ser de natureza essencialmente tóxica, representando a endotoxina bacteriana, aliás, fator indispensável da virulência.

Fomos, assim, levados a realizar a presente investigação, visando elucidar a causa da deficiência verificada no produto usado anteriormente (1 e 2). Considerando que os cuidados dispensados ao seu preparo garantem a presença do antígeno, em concentração suficiente, na suspensão bacteriana inicial, a sua ausência, no produto final, seria devida, provavelmente, à incidência posterior de qualquer causa alterante. Esta poderia ser:

- uma ação lesiva, desnaturante, do formol usado para matar e desintoxicar as suspensões bacterianas;
- uma ação semelhante do fenol, empregado como preservativo do produto, ou, finalmente,
- consequência do envelhecimento exagerado da vacina.

A elucidação d'estes itens constitui o objeto da presente comunicação.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos várias vacinas formoladas, obedecendo todas aos princípios gerais seguidos no preparo do produto utilizado anteriormente (1 e 2). As diferenças necessárias ao nosso experimento resumiram-se à adição ou não de preservativo (fenol a 0.25%) e ao envelhecimento maior ou menor do produto. Foram usadas as seguintes vacinas, todas conservadas a 5°C até o momento do uso:

VACINA I — Formolada, sem preservativo e de preparo recente — 3 meses;

VACINA II — Formolada, sem preservativo e envelhecida — 18 meses;

VACINA III — Formolada, fenolada e de preparo recente — 4 meses, sendo que um mês sem fenol;

VACINA IV — Formolada, fenolada e envelhecida — 19 meses, sendo seis meses sem e 13 com fenol;

VACINA V — Formolada, fenolada e envelhecida — 21 meses, sendo 14 sem e 7 com fenol;

VACINA VI — Morta e preservada pelo sublimado a 1:5.000, segundo BARTOS & BUCHBERGER (33). De preparo recente — 3 meses e usada como controle.

As vacinações foram feitas em 319 indivíduos, em sua quase totalidade detentos recolhidos à Penitenciária do Estado, onde é obrigatória a vacinação T.A.B. (*). Tratava-se de indivíduos em ótimo estado de saúde e nutrição,

(*) Agradecemos ao Prof. Flaminio Favero, Diretor da Penitenciária do Estado, todas as facilidades que nos foram concedidas.

a maioria dos quais já havia sido vacinada anteriormente, há dois anos ou mais, com vacina formolada-fenolada de outra procedência.

As técnicas utilizadas para o preparo do antígeno (alcoólico) e execução das provas de aglutinação foram as mesmas usadas anteriormente (1 e 2).

A vacinação foi feita pelas vias intradérmica e subcutânea. As doses, sempre intercaladas de uma semana, foram de 0.10 — 0.15 e 0.20 ml no primeiro caso e de 0.5 — 1.0 e 1.5 ml no segundo. A pesquisa de aglutininas foi feita no sôro obtido imediatamente antes da primeira dose e uma semana após a terceira.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A distribuição percentual do título de aglutinina "O", antes e depois da vacinação, consta do quadro da página seguinte.

A sua simples inspeção basta para dar uma idéia bem nítida da ação lesiva do fenol sobre o antígeno "O".

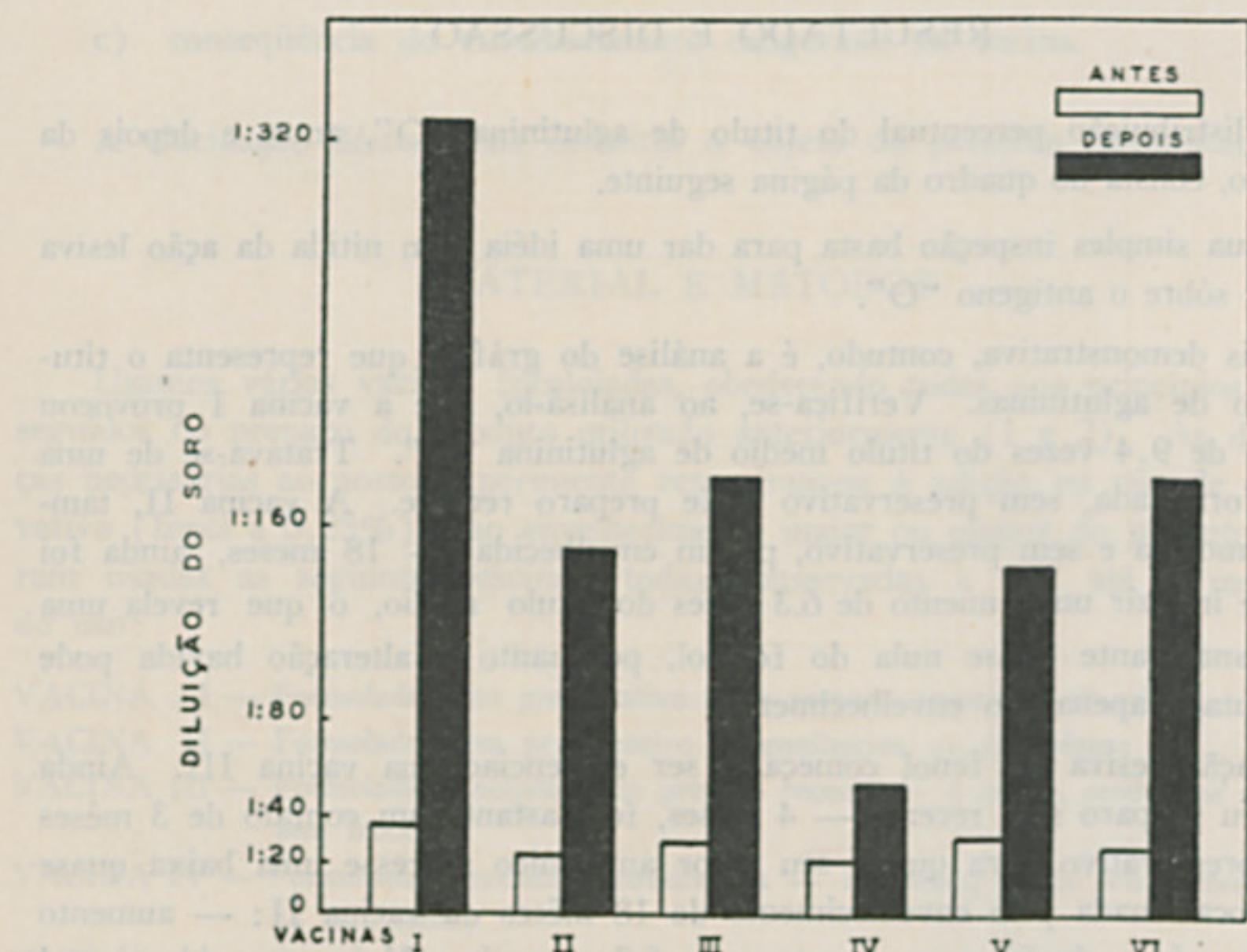
Mais demonstrativa, contudo, é a análise do gráfico que representa o título médio de aglutininas. Verifica-se, ao analisá-lo, que a vacina I provocou aumento de 9.4 vezes do título médio de aglutinina "O". Tratava-se de uma vacina formolada, sem preservativo e de preparo recente. A vacina II, também formolada e sem preservativo, porém envelhecida — 18 meses, ainda foi capaz de induzir um aumento de 6.3 vezes do título médio, o que revela uma ação desnaturante quase nula do formol, porquanto a alteração havida pode ser imputada apenas ao envelhecimento.

A ação lesiva do fenol começa a ser evidenciada na vacina III. Ainda que o seu preparo seja recente — 4 meses, foi bastante um contato de 3 meses com o preservativo para que o seu valor antigênico sofresse uma baixa quase igual à ocasionada pelo envelhecimento de 18 meses da vacina II: — aumento do título médio de 6.3 vezes nesta e de 6.2 naquela. Mais se evidencia tal ação desnaturante quando o contato do preservativo com o produto é prolongado de muitos meses. Assim é que na vacina IV, em que o fenol exerceu a sua ação durante 13 meses, o título médio tornou-se apenas 2.6 vezes mais elevado, enquanto que, na vacina V, onde a sua ação se exerceu sómente 7 meses maior, o título médio aumentou de 4.5 vezes. Não deixa de ser, a seu turno, bem nítido o maior efeito lesivo ocasionado por 7 meses de contato com o feno! (vacina V) quando comparado com o devido a apenas 3 meses da ação (vacina III) dêsse preservativo.

Por outro lado, é interessante notar que o sublimado, usado para o preparo e preservação da vacina de controle (VI), denotou ser tão lesivo para o

antígeno "O" como o fenol. Realmente, datando o preparo dessa vacina de apenas 3 meses, o tempo de ação do sublimado, nesse caso, foi igual ao do fenol no caso da vacina III, sendo o aumento do título aglutinante médio — 6.7 vezes, observado em seguida à injeção da primeira, praticamente o mesmo que o resultante do emprego da última, o que revela uma acentuada inferioridade antigênica da vacina controle em relação à vacina I. Torna-se interessante salientar este fato em virtude de ser o sublimado inócuo para o antígeno "Vi" e aconselhado para o preparo desse tipo de vacinas (34).

TÍTULO MÉDIO DE AGLUTININA "O" ANTES E DEPOIS DA VACINAÇÃO COM DIFERENTES VACINAS T.A.B.



VACINA I — Formolada, sem preservativo e de preparo recente — 3 meses

VACINA II — Formolada, sem preservativo e envelhecida — 18 meses

VACINA III — Formolada, fenolada e de preparo recente. Ação do fenol — 3 meses

VACINA IV — Formolada, fenolada e envelhecida. Ação do fenol — 13 meses

VACINA V — Formolada, fenolada e envelhecida. Ação do fenol — 7 meses

VACINA VI — Sublimado. Preparo recente — 3 meses.

Os nossos resultados, além de confirmarem os de SPASSKY e DARRENFIELD, demonstrando não haver qualquer ação desnaturante do formol sobre o antígeno "O", ainda ampliam os de DENNIS e BERBERIAN (em relação ao sublimado), que constataram a superioridade imunogênica "O" das vacinas formoladas (recentes e sem preservativo), quando comparadas com várias outras (35 e 36).

*Resultado comparativo das diferentes vacinas
(Distribuição percentual do título de aglutininas "O")*

	Diluição do soro	VACINA I				VACINA II				VACINA III				VACINA IV				VACINA V				VACINA VI				
		Antes		Depois		Antes		Depois		Antes		Depois		Antes		Depois		Antes		Depois		Antes		Depois		
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
Posit./ Neg.	1:20	36	54.6	0	0.6	45	81.8	12	22.0	51	65.4	4	5.1	45	97.9	31	67.3	22	73.3	10	33.3	30	68.2	0	0.0	
"	1:40	19	28.8	3	4.5	10	18.2	5	9.0	23	29.5	17	21.8	1	2.1	5	10.8	5	16.6	7	23.3	13	29.5	4	9.0	
"	1:80	11	16.6	13	19.7	0	0.0	18	33.0	4	5.1	16	20.5	0	0.0	6	13.0	2	6.6	4	13.3	1	2.2	18	41.0	
"	1:160	0	0.0	19	28.8	0	0.0	10	18.0	0	0.0	23	29.5	0	0.0	1	2.1	1	3.3	4	13.3	0	0.0	14	31.0	
"	1:320	0	0.0	17	25.7	0	0.0	5	9.0	0	0.0	10	12.8	0	0.0	3	6.5	0	0.0	3	10.00	0	0.0	5	11.3	
"	1:640	0	0.0	9	13.6	0	0.0	5	9.0	0	0.0	8	10.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.3	0	0.0	2	4.5	
"	1:1280	0	0.0	5	75.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.3	0	0.0	1	22.2	
		66		66		55		55		78		78		46		46		30		30		44		44		

VACINA I — Formolada, sem preservativo e de preparo recente — 3 meses

VACINA II — Formolada, sem preservativo e envelhecida — 18 meses

VACINA III — Formolada, fenolada e de preparo recente. Ação do fenol — 3 meses

VACINA IV — Formolada, fenolada e envelhecida. Ação do fenol — 13 meses

VACINA V — Formolada, fenolada e envelhecida. Ação do fenol — 7 meses

VACINA VI — Sublimado. Preparo recente — 3 meses.

A ação lesiva do fenol era, de há muito, conhecida (37). Sobre as vacinas mortas pelo calor o seu poder desnaturante parece ser mais intenso (25). Isto talvez seja devido a uma ação protetora exercida pelo formol. Realmente, o emprêgo desse agente parece ocasionar um enrijecimento do corpo bacteriano, tornando-o muito resistente à ação posterior de numerosos agentes lesivos (38).

Aliás, esse enrijecimento da bactéria, dificultando a sua reabsorção pelo organismo, parece explicar a ação menos tóxica das anavacinas quando inoculadas subcutâneamente. Tal hipótese foi formulada por PFEIFER, segundo relata PATTANÉE (38). De fato, as endotoxinas das bactérias Gran-negativas, que são de natureza glúcido-lipídica não são desintoxicadas pelo formol, o que chega a constituir, segundo Boivin, um caráter distintivo das mesmas em relação às toxinas verdadeiras, cuja natureza é protéica (39).

Realmente, usando a via peritoneal para inoculação, em experiências não publicadas, não logramos observar qualquer diminuição da toxidez de uma anavacina tífica, quando comparada à de uma vacina morta pelo calor, proveniente da mesma partida e contendo o mesmo número de germes por ml. A dose mínima mortal foi a mesma ainda depois de 30 dias de desintoxicação a 37°C, tanto para o camundongo como para a cobaia. Tal resultado confirma a sugestão de que a aparente desintoxicação das anavacinas esteja apenas ligada a uma maior dificuldade de reabsorção pelo organismo, quando dada subcutâneamente. O enrijecimento da bactéria se processa rapidamente, em poucos minutos, dispensando a prolongada desintoxicação a 37°C, de várias semanas, comumente usada, o que favorece um rápido preparo, em benefício de uma estocagem menos prolongada. Aliás, ALIVISATOS, quem primeiro usou a anavacina tífica em larga escala, prolongava a desintoxicação apenas por 6 horas, neutralizando em seguida o excesso de formol (40).

Finalmente, deve ser salientado o fato de terem sido usadas, concomitantemente, as vias subcutâneas e intradérmica (41), para todas as vacinas experimentadas neste trabalho.

Nenhuma diferença significativa foi verificada no comportamento das mesmas, do ponto de vista da produção de aglutinina "O" para a *E. typhosa*.

SUMÁRIO

1. O título de aglutinina "O" para o bacilo tífico foi determinado no sôro de 319 detentos da Penitenciária do Estado, antes e depois de vacinados.
2. A vacinação foi feita com seis diferentes vacinas T.A.B., tendo sido usadas as vias subcutânea e intradérmica para todas elas.
3. As vacinas, todas conservadas a 5°C até o momento do uso, foram as seguintes:

- a) Duas vacinas formoladas, sendo uma de preparo recente e a outra envelhecida de 18 meses.
 - b) Três vacinas formoladas e fenoladas, que permaneceram sob a ação do fenol, respectivamente, 3, 7 e 13 meses.
 - c) A sexta vacina, morta e preservada pelo $HgCl_2$, usada como controle.
4. Os resultados obtidos indicam que o formol não exerce qualquer ação lesiva sobre o antígeno "O" do bacilo tífico, pelo menos quanto à sua capacidade de induzir, nos indivíduos vacinados, a produção de aglutininas.
5. A ação desnaturante, levada ao envelhecimento, é muito pequena nas vacinas formoladas não adicionadas do preservativo.
6. O fenol, geralmente empregado como preservativo, é altamente lesivo para o antígeno "O" do bacilo tífico.
7. O sublimado exerce ação tão fortemente lesiva como o fenol.
8. O comportamento das vias subcutânea e intradérmica, quanto à produção de aglutininas, foi idêntico.

ABSTRACT

1. The titer of *E. typhosa* "O" agglutinins has been determined on sera secured from 319 inmates of the state prison, before and after vaccination.
2. Subcutaneous and intradermal vaccination has been carried out with six different T.A.B. vaccines.
3. The vaccines, kept at 5°C until just before use, were the following:
 - a) two formol "killed" vaccines, one of recent preparation and the other aged for 18 months.
 - b) three formol "killed" and phenol "preserved" vaccines aged respectively 3, 7 and 13 months.
 - c) one $HgCl_2$ "killed" and "preserved", used as control
4. The results seem to indicate that the formol does not denatures the *E. typhosa* "O" antigen, at least to the extend so as to interfere with "O" agglutinins production in the vaccinated individuals.
5. Only slight denaturation occurs on aging by formol "killed" vaccines without "preservative".
6. Phenol, generally employed as a "preservative" has a pronounced denaturing action on *E. typhosa* "O" antigen.
7. The action of $HgCl_2$ may be compared with that of phenol.

8. No difference in the effectiveness of agglutinin production could be observed by either route: subcutaneous or intradermally.

BIBLIOGRAFIA

1. Leme, J. S. M. & Carrijo, L. N. (1943). Vacinação T.A.B. I. Formação de aglutininas no homem resultante do emprego de vacina formolada. *Mem. Inst. Butantan*, 17, 111-115.
2. Leme, J. S. M. & Carrijo, L. N. (1943). Vacinação T.A.B. 2. Vacina formolada pela via intradermica. *Mem. Inst. Butantan*, 17, 1117-119.
3. Felix, A. (1924). The qualitative receptor analysis in its application to typhoid fever. *J. Immunol.*, 9, 115-192.
4. Felix, A. (1929). On the non-specific stimulation of agglutinins, with especial reference to the enteric fevers and typhus fever. *J. Hyg., Camb.*, 28, 418-448.
5. Felix, A. (1930). The qualitative serum diagnosis of enteric fevers. *Lancet*, 1, 505-507.
6. Stuart, G. & Krikorian, K. S. (1928). Serological diagnosis of the enterica by the method of qualitative receptor analysis. *J. Hyg., Camb.*, 28, 105-126.
7. Pijper, A. (1930). Serological diagnosis of the enterica. *J. Hyg., Camb.*, 29, 380-393.
8. Pijper, A. & Dan, H. (1930). Typhoid agglutination after oral immunization. *Brit. J. exper. Path.*, 11, 112-117.
9. Gardner, A. D. (1929). The small-flaking or "O" agglutination of permanent standardised "O" suspensions of *B. typhosus* by the serums of normal, inoculated and infected persons. *J. Hyg., Camb.*, 28, 376-393.
10. Gardner, A. D. (1930). The case against the Widal test. *Lancet*, 1, 427.
11. Mudd, S. (1932). The agglutinin response to typhoid-paratyphoid vaccination. *J. Immunol.*, 23, 81-90.
12. Wyllie, J. (1932). Experiences with small-flaking or granular agglutination in normal, inoculated and enteric fever cases. *J. Hyg., Camb.*, 32, 375-384.
13. Horgan, E. S. (1932). Qualitative or quantitative methods in serological diagnosis of enteric infections? *J. Hyg., Camb.*, 32, 523-528.
14. Dennis, E. W. & Berberian, D. A. (1934). A study of the production of somatic and flagellar agglutinins in response to anti-typhoid-paratyphoid inoculation. *Amer. J. Hyg.*, 20, 469-481.
15. Dulaney, A. D., Wikle, W. T., Stewart, R. L., Rayfield, J. D., Walker, Jr., J. K. & Preacher, A. B. (1933). H and O agglutination following typhoid vaccination and in an unselected group of individuals. *J. Immunol.*, 24, 229-233.
16. Dulaney, A. D. & Wikle, W. T. (1933). H and O agglutination in typhoid fever, other febrile diseases, and in vaccination. *J. Immunol.*, 24, 235-246.
17. Smith, J. (1932). Serological diagnosis of typhoid and paratyphoid fevers. *J. Hyg., Camb.*, 32, 143-155.
18. Giglioli, G. (1933). Agglutinins found in the serum of subjects inoculated with typhoid-paratyphoid vaccine. *J. Hyg., Camb.*, 33, 387-395.

19. Grasset, E. (1939). La vaccination anti-typhoïdique par l'endo-anatoxine typhique. *Pr. méd.*, 47, 1653-1656.
20. Grasset, E. & Lewin, W. (1936). Vaccination antityphique par injection unique d'endo-anatoxine typhique de haut pouvoir antigénique. Etude sérologique comparée avec le mode de vaccination par injections multiples de ce même antigène. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 123, 682-686.
21. Grasset, E. & Lewin, W. (1936). The production and persistence of H and O agglutinins and complement-fixing bodies in persons inoculated with typhoid endotoxoid vaccine. *Brit. J. exper. Path.*, 17, 179-186.
22. Leon, A. P., Escarza, F. & Rabasa, E. (1941). Inmunización activa artificial contra las fiebres tifoidea y paratifoideas A y B, con una sola dosis de vacuna T.A.B. precipitada con alumbre; estudios de la respuesta inmunológica. *Rev. d. Inst. salub. y enferm. trop.*, 2, 161-186.
23. Prado, G. E. (1942). Métodos experimentales de valoración de la imunidad inducida por la vacunación antitifoidea. *Rev. chilena de hig. y med. prev.*, 5, 189-216.
24. Felix, A., Rainsford, S. G. & Stokes, E. J. (1941). Antibody response and systemic reactions after inoculation of new type of T.A.B.C. vaccine. *Brit. med. J.*, 1, 435-440.
25. Stuart, G. & Krikorian, K. S. (1934). Agglutinin response to recent anti-enteric vaccination. *Lancet*, 2, 644-645.
26. Topley, W. W. C. & Wilson, G. S. (1938). *The principles of bacteriology and immunity*, 2nd ed. 1645 pp. Baltimore, William Wood.
27. Arkwright, J. A. (1927). The value of different kinds of antigen in prophylactic "enteric" vaccines. *J. Path. Bact.*, 30, 345-364.
28. Schütze, H. (1930). The importance of somatic antigen in the production of aertrycke and Gaertner immunity in mice. *Brit. J. exper. Path.*, 11, 34-42.
29. Greenwood, M., Topley, W. W. C. & Wilson, J. (1931). Contributions to the experimental study of epidemiology. The effect of vaccination on herd mortality. *J. Hyg., Cambr.*, 31, 257-289.
30. Greenwood, M., Topley, W. W. C. & Wilson, J. (1931). Contributions to the experimental study of epidemiology. Further observations on the effect of vaccination on herd mortality. *J. Hyg., Cambr.*, 31, 484-492.
31. Felix, A. & Pitt, R. M. (1934). Virulence of *B. typhosus* and resistance to "O" antibody. *J. Path. Bact.*, 38, 409-420.
32. Felix, A. & Pitt, R. M. (1934). A new antigen of *B. typhosus*. *Lancet*, 2, 186-191.
33. Bartos, D. & Buchgraber, J. (1938). Mit Sublimat hergestellte Typhusvakzine. *Zbl. Bakt.*, 1, 141, 355-359.
34. Bhatnagar, S. S., Speechly, C. G. J. & Singh, M. (1938). "Vi" variant of *Salmonella typhi* and its application to serology of typhoid fever. *J. Hyg., Cambr.*, 38, 663-672.
35. Spassky, N. N. & Danenfeld, L. A. (1936). Étude expérimentale des propriétés antigéniques de l'anavaccin antityphique. *Ann. Inst. Pasteur*, 56, 76-86.
36. Dennis, E. W. & Berberian, D. A. (1934). A study of the production of somatic and flagellar agglutinins in response to antityphoid-paratyphoid inoculation. *Amer. J. Hyg.*, 20, 469-481.

37. McCoy, G. W. & Bengtson, I. A. (1920). Deterioration of typhoid vaccine. *Nat. Inst. Health Bull.*, 122, 7.
38. Patanè, C. (1931). Observations sur l'action désintoxicant du formol sur le bacille du typhus. *Boll. d. Soc. ital. di microbiol.*, 3, 678-686.
39. Boivin, A. (1938). Les antigènes somatiques et flagellaires des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, 61, 426-478.
40. Alivisatos, G. P. (1925). Ueber einen mit Formol bereiteten Typhusimpfstoff. *Zbl. Bakt.*, 1, 95, 20-30.
41. Tuft, L. (1940). Further studies of the intracutaneous method of typhoid vaccination. *Amer. J. med. Sci.*, 199, 84-90.

(Recebido para publicação em dezembro de 1944).