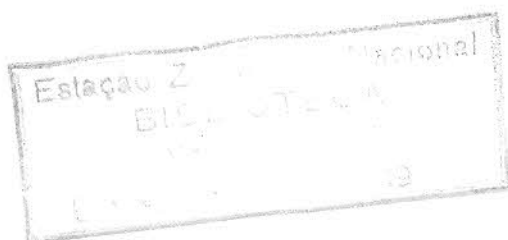


ANO XXXIV - N.º 2



BOLETIM PECUÁRIO

1966

APRECIAÇÃO DO PODER IMUNIZANTE
DO SORO DO MAL RUBRO

ESTUDO COMPARATIVO NO RATINHO
(método de Marx) E NO POMBO (método de Gerlach)

Por

JOSÉ CRISTINA AFONSO

INTRODUÇÃO

Vários métodos são preconizados para apreciar o poder imunizante do soro do mal rubro, quase todos assentes em provas biológicas, quer no pombo, quer no rato, GERLACH (1934), BRAGA (1943), KELSER (1946), FLÜCKIGER (1950). Do emprego de um ou outro método resultam diferenças no valor atribuído a um mesmo soro, isto sem entrar em conta com outros factores de variabilidade, como seja a estirpe de *E. rhusiopathiae* utilizada na contraprova, LOURENS (1934). É de esperar que, de futuro, com o emprego do soro padrão internacional do mal rubro N., estabelecido em 1964, de harmonia com o processo de apreciação proposto (WHO/BS/738.65), terminem, finalmente, os inconvenientes que derivam da diversidade do valor atribuído ao mesmo produto pelos diferentes laboratórios que tiverem de o apreciar. No serviço oficial de contraste, a apreciação do soro do mal rubro vinha sendo feita segundo o método de Gerlach (GERLACH — 1934) no pombo, e durante bastante tempo foi o único utilizado e adoptado. Havia uma certa uniformidade nos resultados de apreciação e o método satisfazia às exigências do momento. O comportamento do pombo nos ensaios mostrava-se bastante regular. Mas, a partir de dada altura, começaram a surgir anomalias dificultando a apreciação do soro. A reacção do pombo nos ensaios era anormal e a causa dessa anormalidade foi, após estudo realizado nos anos de 1950 a 1953, atribuída a parasitismo, (CRUZ e AFONSO). Os pombos para os ensaios eram adquiridos no mercado, visto o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária não possuir criação própria. O aumento do número de soros do mal rubro

submetidos oficialmente a contraste, tornou necessária a aquisição de pombos de várias zonas do País, facto que contribuiu ainda mais para as irregularidades de comportamento observadas. A irregularidade de comportamento do pombo, nos ensaios de apreciação do poder imunizante do soro de mal rubro, fora já reconhecida, KELSER (1946), FLÜCKIGER (1950). Perante este facto, e na impossibilidade de obter, para os ensaios, pombos de criação própria, em boas condições hígio-sanitárias, houve que proceder à apreciação do soro do mal rubro segundo um método que utilizasse o ratinho branco — animal de criação própria deste Laboratório Nacional. Na falta de método internacional de apreciação escolheu-se para efeito o de Marx (GERLACH — 1934), (BRAGA — 1943), que utiliza o ratinho branco de 15 gramas de peso, e que serviu de base, possivelmente, ao método internacional de apreciação do soro do mal rubro actualmente proposto e já referido.

De acordo com o método de Gerlach, os soros destinados à profilaxia do mal rubro, deviam proteger o pombo na dose de 0,25 cc. e os soros com a indicação de «curativo», na dose de 0,10 cc. Desconhecia-se, contudo, a relação de valores de apreciação entre os métodos de Gerlach e Marx. Um ensaio prévio mostrou que só os soros protectores para o pombo na dose de 0,10 cc. protegiam o ratinho na dose de 0,01 cc., condição exigida oficialmente pelas autoridades sanitárias alemãs (soro com 100 U. I. por cc.). Houve, por conseguinte, que estabelecer a correspondência do valor protector entre a dose de 0,25 cc. do método de Gerlach, no pombo, e a obtida com o método de Marx, no ratinho, a qual passaria, de futuro, a ser considerada na prática do contraste oficial dos soros do mal rubro.

Este estudo comparativo é o assunto desta nota.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros do mal rubro: — Os soros ensaiados eram de produção nacional e estrangeira. A maior parte dos primeiros provinha do Laboratório Nacional, principalmente aqueles soros que protegiam o pombo na dose de 0,10 cc. e o ratinho na dose de 0,01 cc. Raramente os soros destinados ao mercado, protegiam o pombo na dose de 0,10 cc., havendo-se recorrido para conseguir tal protecção a soros individuais de animais produtores dos efectivos deste Laboratório.

Estirpe de *E. rhusiopathiae*: — Nos ensaios realizados, a fim de tornar mais uniforme os resultados, foi apenas utilizada uma estirpe de *E. rhusiopathiae*, a designada sob o n.º 484 da nossa colecção. Esta estirpe vinha sendo usada nas provas de apreciação do valor do soro do mal rubro — método de Gerlach — dada a regularidade da sua acção patogénica para o pombo. O meio de cultura era o caldo glucosado a 1 ‰, pH 7,4. Nos ensaios utilizava-se uma cultura de 24 horas à temperatura de 37° C. A dose de 0,001 cc. desta cultura, em 0,50 cc, inoculada por via intramuscular no pombo, matava-o, normalmente, em 72 horas, e a de 0,0001 cc, em 0,25 cc, inoculada por via intraperitoneal no ratinho, vitimava-o, na generalidade dos casos, em 4 a 5 dias. A diluição da cultura era feita em soluto fisiológico e a inoculação logo a seguir, para evitar a acção desvitalizadora do soluto sobre *E. rhusiopathiae*, o que verifiquei em ensaios realizados nesse sentido, à semelhança do ocorrido com a *Pasteurella*, DANIELSON (cita CARTER — 1950), e *B. anthracis*, SÁ VIANA e CALDAS FERRAZ (1945).

Método de Gerlach (1934): — O pombo utilizado nos ensaios era, como se disse, adquirido no mercado. Apenas eram ensaiadas as doses de 0,25 cc. e 0,10 cc. de soro, contidas em 0,50 cc. e inoculadas por via intramuscular. Simultaneamente, os pombos eram inoculados, pela mesma via, nos músculos peitorais, lado oposto, com 0,50 cc. da cultura de 24 horas de *E. rhusiopathiae*. Nas provas utilizavam-se dois grupos de pombos inoculados, respectivamente, com as doses individuais citadas, de 0,25 cc. e 0,10 cc. Um terceiro grupo de 4 pombos — grupo testemunha — era, na mesma altura, inoculado, pela mesma via, apenas com a dose individual de 0,50 cc. da mesma cultura do *E. rhusiopathiae*. A letalidade dos pombos no grupo testemunha, verificava-se, geralmente, das 48 às 72 horas. O período de observação era de 15 dias. A dose de soro que, nestas condições, protegia pelo menos 50 % dos pombos inoculados, era considerada como dose protectora média.

Método de Marx (GERLACH — 1934): — Nele se utilizava o ratinho branco de peso médio de 15 gramas, procedente da criação do Laboratório Nacional, em boas condições higio-sanitárias. Nos ensaios referidos apenas duas doses de soro foram experimentadas — 0,025 cc. e 0,01 cc. — contidas em 0,25 cc. e inoculadas por via subcutânea. Ratinhos, em grupos de 10, eram inoculados com a dose individual do soro a estudar — 0,025 cc.

e 0,01 cc. Uma hora depois, os ratinhos eram inoculados, por via intraperitoneal, com 0,01 cc. da cultura de *E. rhusiopathiae*, de 24 horas, contida em 0,25 cc. Na mesma ocasião, cada um de 5 ratinhos — grupo testemunha — era inoculado apenas com dose idêntica da cultura e por igual via. As diluições da cultura e as do soro eram feitas em soluto fisiológico. A letalidade dos ratinhos no grupo testemunha verificava-se, geralmente, das 48 às 96 horas — praticamente às 72. — O período de observação era de 8 dias. A quantidade de soro que, nestas condições, protegia pelo menos 50% dos ratinhos inoculados, era considerado dose protectora média.

RESULTADOS

Alguns ensaios realizados mostraram que à dose de 0,01 cc. do soro que protege o ratinho segundo o método de Marx, corresponde a de 0,01 cc. que, no de Gerlach, produzia no pombo, efeito protector idêntico. Por sua vez, os soros que protegiam o pombo na dose de 0,25 cc. conferiam apenas protecção ao ratinho com o mesmo método, na dose de 0,02 cc. e 0,03 cc. Contudo, estes soros, destinados à profilaxia do mal rubro, eram aprovados de harmonia com o método de Gerlach. Daqui se infere que da adopção de um ou outro método resultavam divergências quanto à apreciação dos soros em causa, dado que alguns deles, profiláticos, podiam ser aprovados visto protegerem o pombo na dose do 0,25 cc., segundo o preceituado por Gerlach, enquanto teriam de ser regeitados por no método de Marx, não conferirem protecção ao ratinho na dose estipulada de 0,01 cc. Para que fosse mantido o mesmo critério de apreciação em relação à dose protectora de 0,25 cc. no método de Gerlach, realizaram-se os ensaios cujos resultados, transcritos no quadro 1, mostram o grau de correspondência das doses protectoras nos dois métodos — 0,25 cc. e 0,10 cc. no pombo (Gerlach) para 0,025 cc. e 0,01 cc., no ratinho (Marx). A dose de 0,025 cc., utilizada no método de Marx, resultou da média de 0,02 e 0,03 cc. que, normalmente, protegiam o ratinho, como se verificara previamente em relação aos soros profiláticos — protecção com a dose 0,25 cc. no pombo, segundo Gerlach. Deste modo se verifica a constância entre os valores representativos dos poderes protectores no pombo e ratinho, nas condições de experiência, a

qual se processa na relação 10 × ,ou seja, discriminadamente, 0,25/0,025 cc. e 0,10/0,01 cc. Leve discordância de resultados dos dois métodos pode ser verificada quando soros, de valor protector de cerca de 50 %, são ensaiados simultâneamente. Mas esta discordância pode verificar-se nos dois sentidos em relação à dose protectora média — 50 % — nos dois métodos.

Como se disse foi a irregularidade dos resultados dos ensaios no pombo, motivada pelas infestações parasitárias, que justificou o estudo de apreciação do soro do mal rubro no ratinho. Este estudo foi bastante prolongado dada a dificuldade em conseguir lotes de pombos em condições sanitárias, que permitissem eficiente apreciação, havendo, portanto, que seleccioná-los devidamente. Para o conseguir, socorriamo-nos dos dados de observação pessoal decorrente do emprego da cultura de 24 horas da estirpe avirulenta de *E. rhusiopathiae* de Staub, a qual, inoculada na dose de

QUADRO I

APRECIÇÃO DE SOROS DO MAL RUBRO NO RATINHO (MARX) E NO POMBO (GERLACH) SIMULTANEAMENTE. ESTUDO COMPARATIVO

Número de Soros	Método de Marx			Método de Gerlach		
	Dose de soro inoculado		Testemunhas	Dose de soro inoculado		Testemunhas
	0,01 cc	0,025 cc		0,10 cc	0,25 cc	
1	3/10	0/10	5/5	3/6	2/6	4/4
2	4/10	1/10	5/5	3/6	1/6	4/4
3	3/10	1/10	5/5	2/6	1/6	4/4
4	3/10	0/10	5/5	3/6	2/6	4/4
5	4/10	2/10	5/5	3/6	2/6	4/4
6	2/10	0/10	5/5	2/6	1/6	4/4
7	7/10	2/10	5/5	5/6	2/6	4/4
8	8/10	3/10	5/5	4/6	2/6	4/4
9	8/10	5/10	5/5	5/6	3/6	4/4
10	7/10	3/10	5/5	5/6	2/6	4/4
11	8/10	4/10	5/5	5/6	3/6	4/4
12	7/10	2/10	5/5	4/6	2/6	4/4
13	10/10	7/10	5/5	6/6	5/6	4/4
14	9/10	7/10	5/5	6/6	4/6	4/4
15	8/10	6/10	5/5	5/6	4/6	4/4
16	10/10	8/10	5/5	6/6	5/6	4/4

Numerador = ratinhos mortos.

Denominador = ratinhos inoculados.

0,50 cc. matava o pombo quando este se encontrava inferiorizado por infestação parasitária intensa — origem das anomalias constatadas nas provas de contraste dos soros do mal rubro, como acima frizei. Esta observação permitiu diminuir a irregularidade resultante do emprego de pombos em condições de inferioridade porquanto se passou a utilizar nas provas somente animais de lotes devidamente verificados, quanto à sua resistência orgânica pela estirpe Staub. Para este efeito, em cada lote de pombos adquiridos, se inoculavam 4 com 0,50 cc. da cultura de 24 horas de dita estirpe Staub. Os restantes componentes só eram utilizados se, durante 15 dias, os 4 pombos inoculados se mantivessem vivos sem sinal de doença. Deste modo, repetimos, com esta prática não se obteve uma solução definitiva do problema, mas reduziram-se apreciavelmente as anomalias até então verificadas.

Apontam-se na literatura divergências quanto ao comportamento do ratinho branco nos ensaios de apreciação do soro do mal rubro, GERLACH (1934), FLÜCKIGER (1950) — divergências essas motivadas possivelmente, por factores que interferem na sua resistência orgânica. Desconhecia-se o comportamento do ratinho utilizado nos ensaios e que provinha das criações do Laboratório Nacional, criações estas mantidas em boas condições higio-sanitárias. Para esclarecer esta situação procedeu-se a estudo que visava, igualmente, verificar a oscilação do valor do soro em relação à cultura de prova no decurso do tempo. Os resultados obtidos — quadro II — traduzem certa uniformidade nos ensaios realizados em tempo diferente com dois soros A e B, cuja dose de protecção era, respectivamente, de 0,01 cc e 0,025 cc. Foram raros os resultados em que se verificou acentuada divergência de valor, e, na maioria deles, a protecção média era de cerca de 70 %. Na falta de soro padrão, esses resultados levam a concluir que o método agora adoptado na apreciação do valor imunizante dos soros do mal rubro, por força das circunstâncias referidas, oferece certa garantia de segurança. Alguns ensaios realizados no ratinho com soros cuja protecção era inferior a 70 % — cerca de 50 % — mostravam oscilação de valor 30 % a 70:%. Nestes casos torna-se necessário a realização de, pelo menos, 3 ensaios, com dois resultados representativos de protecção mínima de 50 %, ou então testemunhar os ensaios com soro cujo valor protector seja de cerca de 50 %.

QUADRO II

APRECIACÃO DO PODER IMUNIZANTE DOS SOROS A E B, NO TEMPO

Número de ensaios	Método de Marx		
	Dose de soro inoculada		Testemunhas
	Soro A — 0,01 cc	Soro B — 0,025 cc	
1	3/10	2/10	5/5
2	4/10	3/10	5/5
3	3/10	3/10	5/5
4	3/10	2/10	5/5
5	7/10	6/10	5/5
6	3/10	3/10	5/5
7	6/10	5/10	5/5
8	4/10	3/10	5/5
9	5/10	4/10	5/5
10	3/10	2/10	5/5

Numerador = ratinhos mortos.
Denominador = ratinhos inoculados.

DISCUSSÃO

Os métodos de apreciação do valor imunizante dos soros específicos que não assentem no emprego do soro padrão internacional, conduzem a resultados variáveis e, até certo ponto, falíveis. No caso do soro do mal rubro — soro dotado de elevado poder curativo — a variação sofrida de ensaio para ensaio, e, mesmo, de método para método, é menos acentuada que com outros produtos similares, de tal forma que, dentro de certos limites, os resultados obtidos permitem uma apreciação válida. Isso se pode deduzir, no que respeita aos soros A e B, transcritos no quadro II, embora nesses ensaios se utilizem apenas ratinhos da mesma criação e uma só estirpe de contraprova. Essa fraca divergência deve-se ao facto de pequenas doses de soro, quer no pombo, quer no ratinho, suportarem contraprovas com elevado número de doses mínimas mortais (D. M. M.). GLEDHILL (1945) verifica que dentro de grande variação de doses infectantes não há relação entre estas e o grau de protecção de soro, e VIRIDEN em 1933 (cita GLEDHILL — 1945) indica que tal relação só é apreciável quando a dose profiláctica do soro está perto da mínima e a dose infectante é muito elevada. Estes ensaios permitem, dada a dificuldade surgida nas condições

de utilização do pombo para a prova de Gerlach, apreciar o soro do mal rubro no ratinho, animal criado em dependência do Laboratório, em boas condições higio-sanitárias, e em número avultado. Com esta espécie animal e nas condições do ensaio referidas, obtinham-se resultados que não diferiam sensivelmente dos do método de Gerlach, cuja aplicação, aliás, era menos rápida e mais onerosa. A protecção conferida pelo soro a 50 % dos animais inoculados, foi considerada como dose protectora média. A relação entre as doses protectoras médias no pombo (Gerlach) e no ratinho (Marx) variam na razão 10. Assim, às doses de 0,10 cc. e 0,25 cc. no pombo, correspondem, respectivamente, no ratinho as doses de 0,01 cc. e 0,025 cc. Em face deste estudo, os soros do mal rubro destinados à profilaxia, que protegiam pelo menos 50 % dos ratinhos inoculados com 0,025 cc. eram considerados aceitáveis.

RESUMO

O A., dada a dificuldade de obter pombos em boas condições higio-sanitárias para o controlo do soro do mal rubro pelo método de Gerlach, fez o estudo de apreciação do referido soro no ratinho, segundo o método de Marx. Estuda, através de ensaios comparativos, a relação das doses médias de protecção (50 %) entre os dois métodos, tendo verificado que às doses de 0,10 cc. e 0,25 cc. no pombo (Gerlach) correspondiam no ratinho (Marx) as de 0,01 cc. e 0,025 cc., respectivamente. A relação é, portanto, de cerca de $10 \times$. Verificou certa uniformidade nos ensaios realizados com um dado soro, no decurso de certo período de tempo. Este estudo comparativo provou que um mesmo soro pode, com igual rigor, ser apreciado, indiferentemente, pelos métodos de Gerlach e de Marx e, portanto, que este último pode ser empregado no contraste oficial dos soros do mal rubro, em igualdade de circunstâncias com aquele.

RÉSUMÉ

L'auteur, vue la difficulté d'obtenir des pigeons en bonnes conditions hygio-sanitaires pour le contrôle du sérum du rouget par la méthode de Gerlach, a fait l'étude de l'appréciation du sérum susdit chez le souris,

d'après la méthode de Marx. Il étudie, au moyen d'essais comparatifs, le rapport des doses moyennes de protection (50 %) entre les deux méthodes, ayant vérifié que les doses de 0,10 cc et de 0,25 cc chez le pigeon (Gerlach) correspondaient chez le souris (Marx) à 0,01 cc et 0,025 cc, respectivement. Le rapport est donc d'environ 10x. Il a vérifié aussi quelque uniformité dans les essais réalisés avec un sérum donné, dans le suite d'un certain délai. Cet étude comparatif a prouvé qu'un même sérum peut, avec une pareille rigueur, être apprécié, indifféremment, par les méthodes de Gerlach et de Marx et, donc, que cette dernière peut être employée dans dans le contrôle officiel des sérums du rouget, en égalité de circonstances avec celle-là, c'est à dire la méthode de Gerlach.

SUMMARY

The A., taking in consideration the difficulty in obtaining pigeons in good hygio-sanitary conditions for the control of swine erysipelas serum by the Gerlach method, carried out the study of the immunizing power of the above mentioned serum in mice, according to the Marx method. He studied by comparative assays, the relation of medium protection doses (50 %) between the two methods, finding that to doses of 0,10 cc and 0,25 cc in the pigeon (Gerlach) corresponded, in the mouse (Marx) to 0,01 cc and 0,025 cc respectively. The relation is thus roughly 10x. He found a certain uniformity in assays carried out with a certain serum, in a certain period of time. This comparative study proved that the same serum can, with the same certainty, be tested indifferently by the methods of Gerlach and that of Marx and so, that this last can be used in the official testing of swine erysipelas serum the same as that of Gerlach.

BIBLIOGRAFIA

- A. ALVES DA CRUZ e J. CRISTINA AFONSO — *Apreciação do poder imunizante do soro do mal rubro no pombo e o parasitismo.*
- A. BRAGA (1943) — *Soros, vacinas, alérgenos e Imunígenos* — Tomo IV, pág. 123.
- A. W. GLEDHILL (1945) — *J. Comp. Path.*, vol. 55, pág. 93.
- FLUCKIGER (1950) — *Bull. Off. Inter. Epiz.* Tomo 33, n.º 5-6, pág. 273.
- G. R. CARTER (1950) — *Am. J. Vet. Res.* vol. 11, n.º 40, pág. 252.
- H. GERLACH (1934) — *Bull. Off. Inter. Epiz.*, Tomo 8, n.º 1, pág. 156.
- H. SÁ VIANA CONTE e C. CALDAS FERRAZ (1945) — *Repositório de Trabalhos de Laboratório Central de Patologia Veterinária* — Vol. 6, fasc. 1, pág. 119.
- L. F. D. E. LOURENS (1934) — *Bull. Off. Inter. Epiz.*, tomo 8, n.º 1, pág. 192.
- RAYMOND A. KELSER e HARRY W. SCHOENING (1946) — *Manual de Bacteriologia Veterinária* (tradução de Francisco J. Castégon Calderón) 4.ª Edição, pág. 658.
- WHO/BS/728 — 65 — *Etalon International de sérum anti-rouget du porc N.*