

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS QUANDO INOCULADOS COM *NEISSERIA MENINGITIDIS* DOS GRUPOS "A" E "C" *

José Pascoal SIMONETTI **
Augusta K. TAKEDA **
Bruno SOERESEN ***
Orivaldo ZIQUINATTI **
Nereide B. BOSCARDIN **

RIAL-A/423

SIMONETTI, J.P.; TAKEDA, A.K.; SOERESEN, B.; ZIQUINATTI, O. & BOSCARDIN, N.B. — Avaliação da resposta imunológica em animais quando inoculados com *Neisseria meningitidis* dos grupos "A" e "C". *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 91-101, 1975/76.

RESUMO: Para o estudo do comportamento da resposta imune à *N. meningitidis* dos grupos A e C, foram feitas inoculações em quarenta coelhos e quatro carneiros, com bactérias vivas e mortas, bem como com polissacarídeos específicos dos grupos A e C com ou sem adjuvante, em diferentes doses e vias de inoculação. Foram feitas várias séries de inoculações para verificar o efeito secundário e terciário da resposta, bem como tipo de anticorpos envolvidos.

O nível de anticorpos e a permanência dos mesmos no soro foi medido através da reação de hemaglutinação passiva e da imunoelectroforese cruzada; esta última técnica foi utilizada nestes soros para detecção de antígenos polissacarídicos da *N. meningitidis*.

A análise dos resultados obtidos mostra que não existe diferença nas respostas imunes, nas concentrações variando de $5,6 \times 10^7$ a $2,4 \times 10^{10}$ bactérias por coelho. Os anticorpos, tanto hemaglutinantes como precipitantes, apareceram 5 dias após a última inoculação, permanecendo por um tempo médio de vinte e cinco dias. Não houve diferença significativa nas respostas primárias, secundária e terciária, sendo que os anticorpos precipitantes apareciam em maior concentração após inoculação de séries sucessivas.

Os polissacarídeos, quando inoculados intravenosamente, não ilicitaram resposta imune, porém eles se tornaram imunogênicos, quando administrados por via intradérmica, com o adjuvante completo de Freund.

DESCRIPTORIOS: *Neisseria meningitidis*, sorogrupos A e C; *Neisseria meningitidis*, imunogenicidade em animais.

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto Butantan, São Paulo, S.P.

INTRODUÇÃO

Em virtude do surto epidêmico de *N. meningitidis* na Grande São Paulo, houve necessidade da obtenção, em grande escala, de anti-soros específicos e potentes contra a *N. meningitidis* dos grupos A e C, para serem utilizados no diagnóstico da infecção meningocócica. Com tal objetivo foram preparados diferentes esquemas de imunização, onde se estudou a variação da dose inoculada 2, 3, 4, 5, 7, 10, bem como a concentração em bactérias por ml 2, 3, 4, 5, 6, 8. Estudou-se ainda o comportamento de diferentes animais em relação a diferentes vias de inoculação com ou sem adjuvante 11, 13, sendo observada a imunogenicidade dos antígenos e a permanência da resposta imunológica aos mesmos, quando se utilizavam doses booster 2,3,4,5,6,7,9,10, 11,13.

Também foram avaliadas as respostas imunes primária, secundária e terciária, bem como a existência ou não de fenômenos de tolerância imunológica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Bactérias íntegras

Foram usadas cepas dos grupos A e C de *N. meningitidis* isoladas do líquido cefalorraquidiano. As culturas foram obtidas em caldo de M. Hinton, submetidas a agitação constante, a 37°C, durante 16 a 18 horas e, a seguir, foram tratadas com formaldeído na concentração final de 2% e lavadas três vezes por centrifugação em solução fisiológica estéril. O sedimento obtido foi ressuspenso em solução fisiológica nas concentrações de $8,0 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^9$ bactérias por ml, de acordo com a percentagem de transmitância, mostrada na tabela 1:

Foi incluída ainda uma preparação de *N. meningitidis* viva, também submetida a lavagem por centrifugação e, logo a seguir, ressuspensa.

2. Polissacarídeos

Foram utilizados polissacarídeos de vacina antimeningocócica*, grupos A e C, e polissacarídeos extraídos de *N. meningitidis*.

TABELA 1
Concentrações dos antígenos, inoculados por via intravenosa, nos diferentes esquemas

Esquemas de imunização	Antígeno <i>N. meningitidis</i> Grupos	Número de coelhos	Concentrações		
			Bact./coelho	Bact./ml	Transmitância* %
c	A	3	$5,6 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$	98
	C	3			
a	A	3	$2,5 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	96
	C	2			
a	A	8	$6,3 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$	60
	C	8			
b	A	3**	$7,9 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$	60
	C	3**			
c	A	3	$8,3 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$	60
	C	1			
b	A	1	$2,4 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^9$	35
	C	1		$3,0 \times 10^9$	30

* As percentagens de transmitância (a 650 nm) são aproximadas.

** Um animal de cada grupo foi inoculado com suspensão de bactérias vivas.

* Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, E.U.A.

SIMONETTI, J.P.; TAKEDA, A.K.; SOERENSEN, B.; ZIQUINATTI, O. & LOSCARDIN, N.B. — Avaliação da resposta imunológica em animais quando inoculados com *Neisseria meningitidis* dos grupos "A" e "C". *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 91-101, 1975/76.

TABELA 2
Esquemas de imunização de coelhos inoculados com *N. meningitidis* dos grupos A e C

Esquemas de imunização	Inoculações em ml								
	1.ª Semana			2.ª Semana			3.ª Semana		
	1.º dia	2.º dia	3.º dia	1.º dia	2.º dia	3.º dia	1.º dia	2.º dia	3.º dia
a	0,25	0,25	0,50	0,50	0,50	1,00	1,00	1,00	2,00
b	0,25	0,50	0,50	0,50	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00
c	0,25	0,50	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00

grupos A e C, segundo a técnica de CARBONARE *et alii* 1.

3. Adjuvante

O adjuvante completo de Freund foi preparado com 85% de óleo mineral inerte — Nujol; 15% de substância tensioativa — Arlacel — e 1 mg/ml de bacilos da tuberculose (obtidos de B.C.G.).

4. Animais

Quarenta coelhos, pesando 2.500 a 3.500 g, foram inoculados com *N. meningitidis* dos grupos A e C, segundo os esquemas apresentados na tabela 2. Na tabela 1 é apresentada a concentração do antígeno utilizado.

Quatro carneiros adultos foram inoculados com *N. meningitidis* dos grupos A e C, segundo o esquema para a 1.ª série apresentada na tabela 3.

O esquema utilizado para a 2.ª série foi semelhante ao dos coelhos inoculados

com concentração de $9,0 \times 10^8$ bactérias por ml, havendo alteração na dose de 7,25 vezes maior para o antígeno do grupo A e 2,5 vezes maior para o do grupo C (tabelas 1 e 2).

O esquema utilizado para a 3.ª e 4.ª séries, tanto para o antígeno do grupo A como para o do grupo C, foi 1,8 vezes maior.

5. Métodos sorológicos

Os antígenos polissacarídicos foram detectados pela reação de imunoelctroforese cruzada (I.C.) em acetato de celulose, efetuada segundo a técnica pesquisada por PALHARES *et alii* 10.

Anticorpos específicos foram determinados pela reação de hemaglutinação passiva (H.P.), de acordo com a técnica descrita por TAKEDA *et alii* 12, como também pela imunoelctroforese cruzada.

TABELA 3
Esquemas de imunização, durante a 1.ª série de inoculações em carneiros, utilizando como antígeno *Neisseria meningitidis*, grupos A e C, mortas

Antígenos <i>N. meningitidis</i>	Concentração de Bactérias							Vias
GRUPO A	Transmitância %	55	76	80	0*	25	0**	Intravenosa e intradérmicas alternadas
	Volume ml	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	
GRUPO C	Transmitância %	35	75	80	0*	25	0**	Intravenosa
	Volume ml	0,5	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	

* 5 inoculações de papa de bactéria

** 2 inoculações de papa de bactéria

RESULTADOS

1. Avaliação da resposta imunológica dos coelhos

Através da análise das tabelas 4 e 5, pode-se verificar que:

a) Existe especificidade nas respostas dos coelhos imunizados com *N. meningitidis* dos grupos A e C.

b) Não há diferenças significativas dos níveis de anticorpos em relação à dose.

c) O polissacarídeo do grupo C não foi imunogênico, quando administrado intravenosamente.

d) Os polissacarídeos dos grupos A e C, quando inoculados com o adjuvante completo de Freund, via intradérmica, passam a ser imunogênicos.

e) A resposta imune a polissacarídeos é mais tardia e os títulos de anticorpos, mais baixos, em relação àquela obtida quando se utiliza bactéria íntegra.

f) Os anti-soros obtidos com a bactéria íntegra apresentam anticorpos precipitantes capazes de detectar até 0,03 µg/ml de polissacarídeos específicos na reação de

I.C., podendo ser utilizados no diagnóstico de doença meningocócica no líquido cefalorraquidiano.

TABELA 4

Demonstração da resposta imune dos coelhos inoculados, por via intravenosa, com diferentes concentrações de *Neisseria meningitidis* dos grupos A e C

Dose Bactérias/ coelho	N.º de coelhos	Antígeno <i>N.</i> <i>meningitidis</i> Grupo	H.P. Títulos		I.C. Títulos		Período para obtenção dos títulos
			Ac A	Ac C	Ac A	Ac C	
5,6 x 10 ⁷	3 3	A	2.048	—	+	—	5 dias após a última inoculação
		C	—	1.024	—	+	
2,5 x 10 ⁸	3 2	A	2.048	—	+	—	
		C	—	1.024	—	+	
6,3 x 10 ⁹	8 8	A	4.096	—	+	—	
		C	—	1.024	—	+	
7,9 x 10 ⁹	1 1	A	4.096	—	+	—	
		C	—	4.096	—	+	
7,9 x 10 ⁹	1 1	A (viva)	2.048	—	+	—	
		C (viva)	—	4.096	—	+	
8,3 x 10 ⁹	3 1	A	4.096	—	+	—	
		C	—	4.096	—	+	
2,4 x 10 ¹⁰	1 1	A	2.048	—	+	—	
		C	—	4.096	—	+	

H.P. = Hemaglutinação passiva
I.C. = Imunoeletroforese cruzada
Ac = Anticorpos antipolissacarídeos

+ positivo
— negativo

TABELA 5
 Demonstração da resposta imune dos coelhos inoculados, por via intravenosa ou via intradérmica, com polissacarídeos dos grupos A e C

Dose em ml	N.º de Coelhos	Antígeno polissacarídico de <i>N. Meningitidis</i>	H.P. Títulos		I.C. Títulos		VIA	Período para obtenção dos títulos
			Ac A	Ac C	Ac A	Ac C		
8,75	1	Grupo A	32	—	—	—	Intradérmica com A.C.F.	60 dias
	1	Grupo C	—	256	—	—		
	1	Grupo C	—	—	—	—	Intravenosa	

H.P. = Hemaglutinação passiva

I.C. = Imunoeletroforese cruzada

Ac = Anticorpos antipolissacarídeos

A.C.F. = Adjuvante completo de Freund

— negativo

+ positivo

2. Variação da resposta imunológica dos animais

A figura 1 mostra a permanência da resposta em coelhos inoculados com *N. meningitidis* dos grupos A e C, via intravenosa, durante duas séries de inoculações. Pode-se verificar que:

a) Os anticorpos precipitantes permaneceram durante um período médio de vinte dias, tanto na 1.^a como na 2.^a séries;

b) os anticorpos hemaglutinantes atingiram um título máximo de 4096, permanecendo por dez dias; em seguida, verificou-se uma queda a partir do trigésimo dia após a última inoculação;

c) não houve variação significativa na resposta imune entre as duas séries de inoculações, como também não houve variação da resposta em relação à concentração de bactérias inoculadas por coelho, quando esta concentração variou de $6,0 \times 10^6$ a $9,0 \times 10^8$ bactérias por ml.

A variação da resposta imune à *N. meningitidis*, grupos A e C, durante um período médio de 17 dias, é demonstrada na figura 2:

a) A variação da resposta imunogênica dos coelhos que receberam 3 séries de inoculações foi significativa em relação à produção de anticorpos hemaglutinantes, sendo que um maior número de coelhos respondeu na faixa de títulos de anticorpos de 512 a 4096;

b) não se conseguiu uma elevação de títulos, tanto na 2.^a como na 3.^a séries de inoculações;

c) os anticorpos precipitantes se tornaram mais potentes e específicos, à medida que aumentava o número de séries de inoculações.

A variação da resposta imunológica dos carneiros inoculados com *N. meningitidis* dos grupos A e C, durante quatro séries, é mostrada na figura 3:

a) A dose de antígenos utilizada durante a 1.^a série foi excessiva, uma vez que foi detectada a presença de antígeno no soro desses animais e, conseqüentemente, queda brusca no nível de anticorpos;

b) com a redução das doses do antígeno inoculado, obteve-se uma melhor resposta, não se detectando antígeno no sangue circulante desses animais;

c) o título obtido na segunda série permaneceu constante por um tempo maior (45 dias);

d) observa-se que as concentrações mais baixas utilizadas durante a 3.^a e 4.^a séries foram responsáveis pela menor flutuação dos títulos, com um período maior de permanência;

e) não houve grande variação nos títulos máximos obtidos nas quatro séries;

f) a permanência dos níveis de anticorpos hemaglutinantes foi maior para as três últimas séries, em uma faixa de variação no título de 2.048 a 16.384;

g) em relação a anticorpos precipitantes, conseguiu-se uma resposta melhor nas três séries subsequentes, detectando-se até $0,03 \mu\text{g/ml}$ de polissacarídeos específicos.

h) Existe uma correlação indireta entre o nível de anticorpos hemaglutinantes e precipitantes.

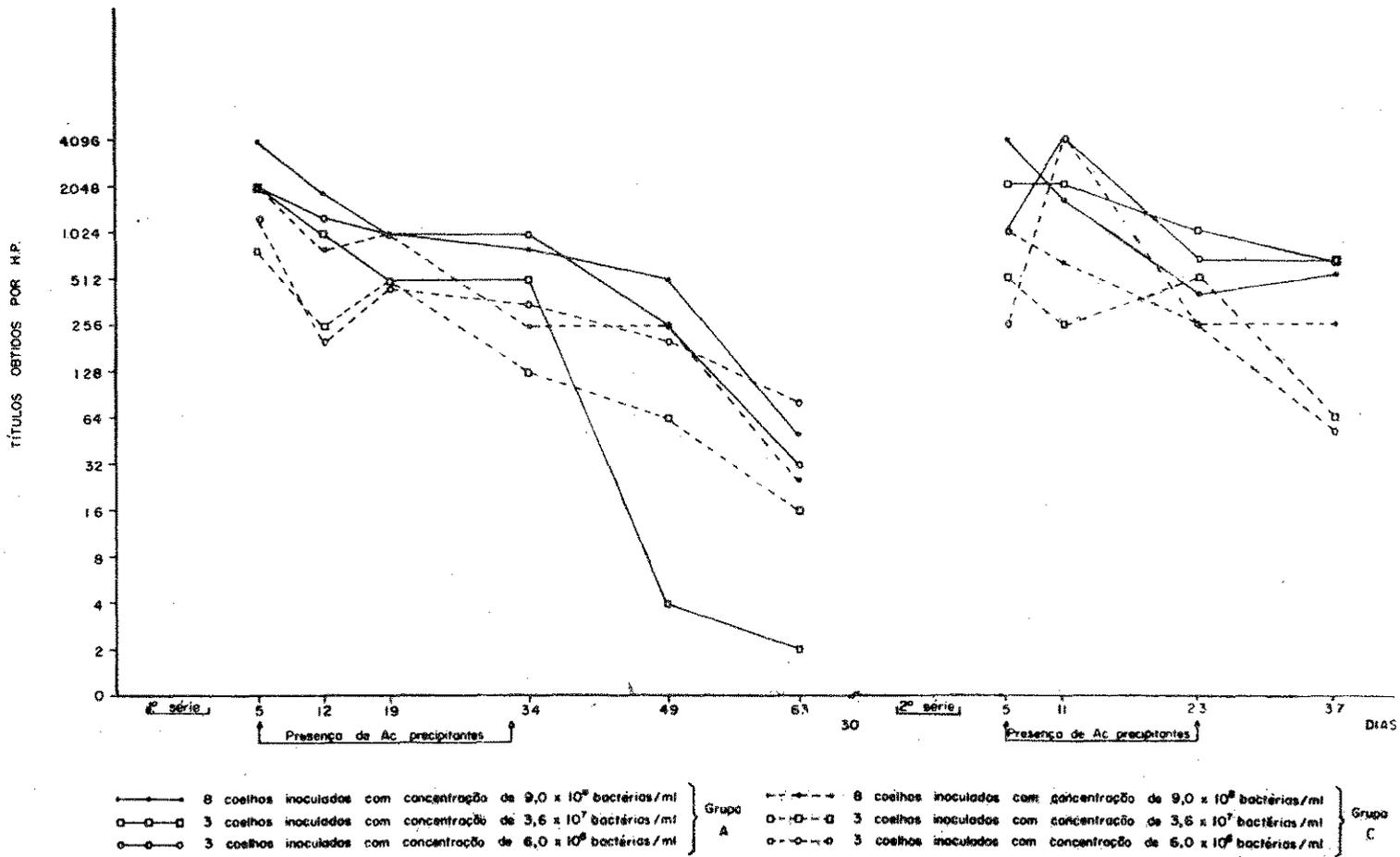


Fig.1— Permanência de títulos após a 1.^a e 2.^a séries de inoculações com suspensão de *Neisseria meningitidis* dos grupos A e C, mortos, em diferentes concentrações.

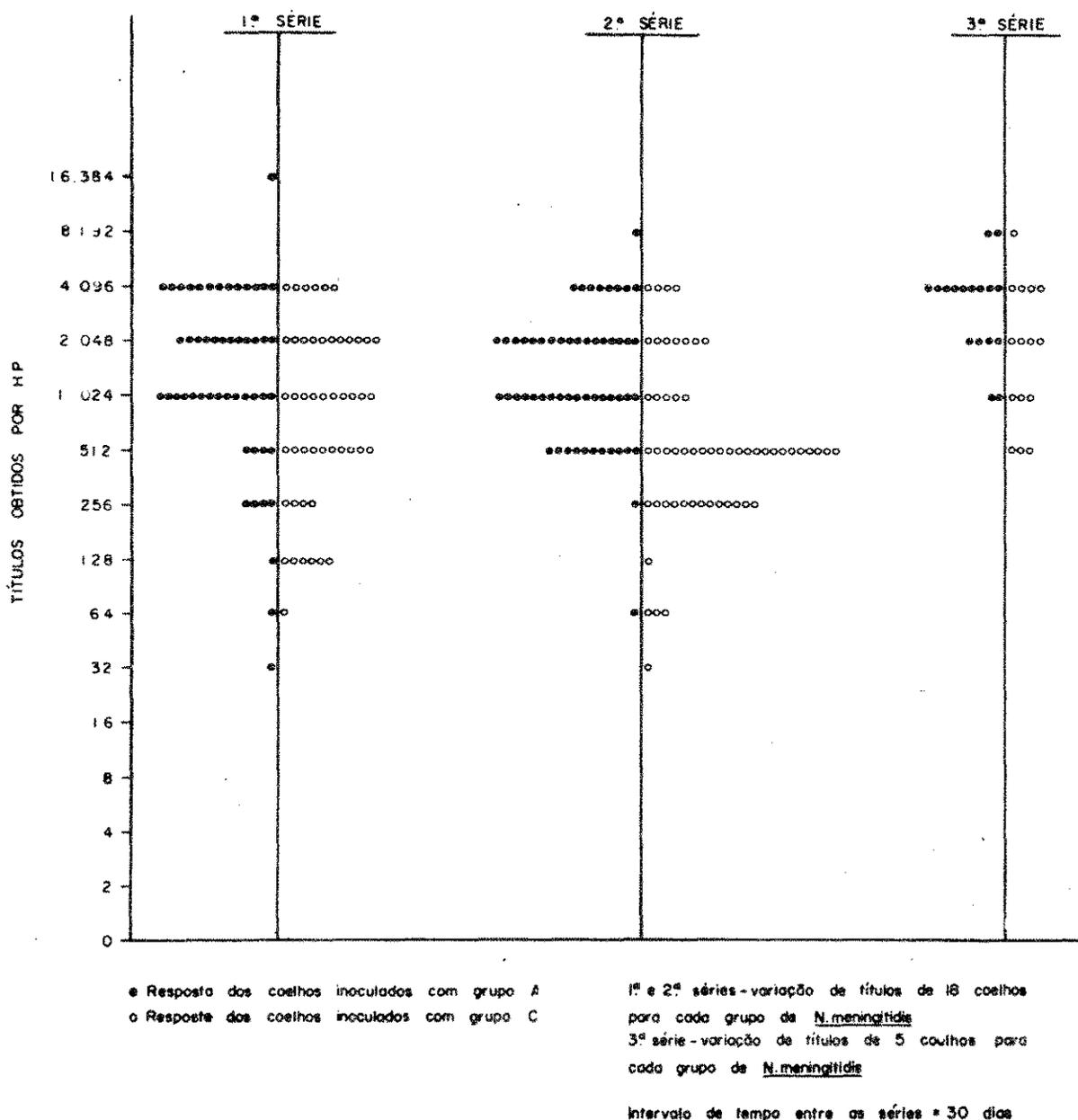


Fig. 2 — Variação de resposta à *Neisseria Meningitidis* dos grupos A e C durante um período médio de 17 dias após a última inoculação com diferentes concentrações.

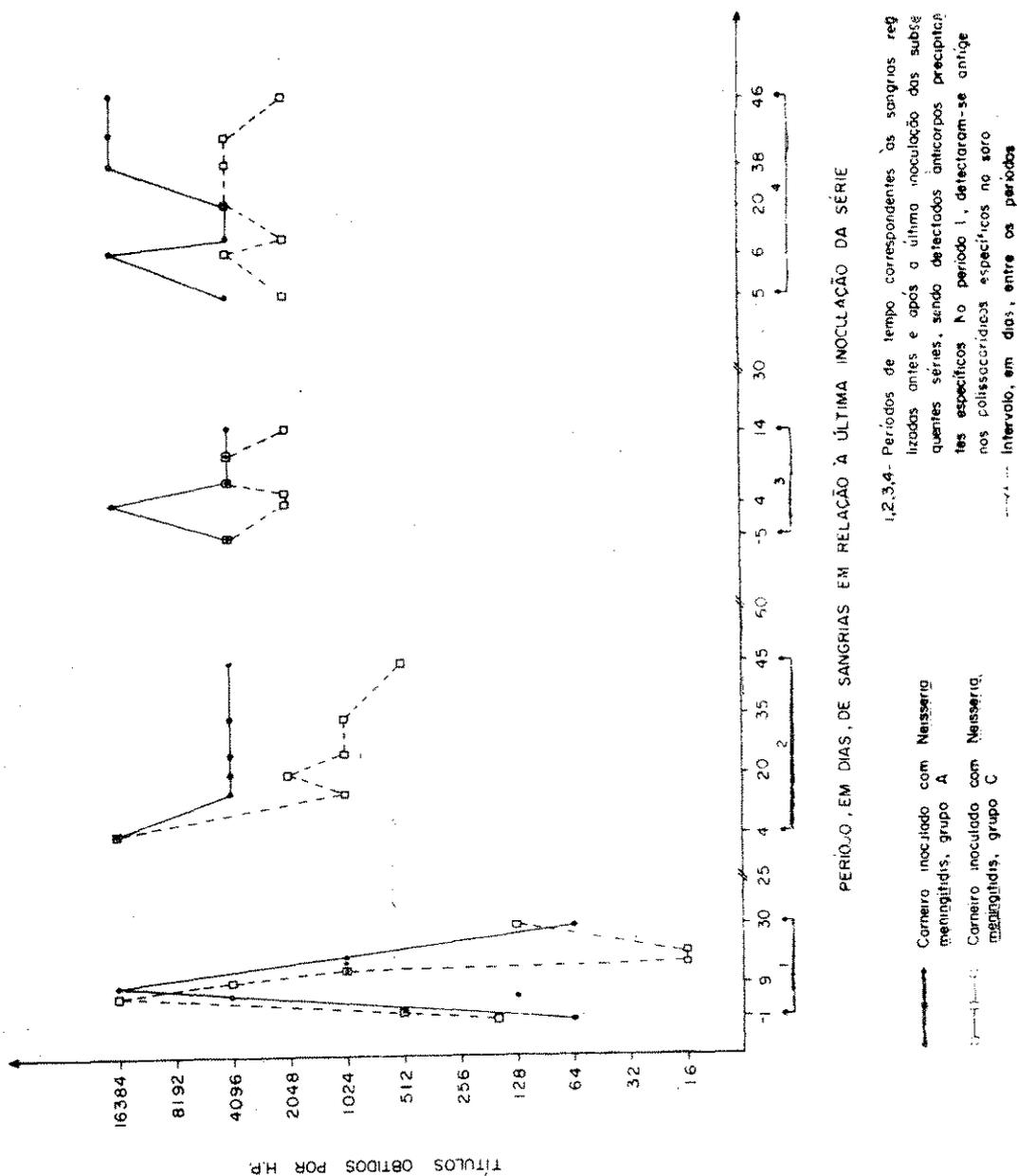


Fig. 3 — Avaliação da resposta imunológica dos dois carneiros inoculados com *Neisseria meningitidis* dos grupos A e C, durante 4 séries de inoculações com diferentes concentrações.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A necessidade da obtenção de grande quantidade de anti-soros potentes e específicos, para ser utilizada no diagnóstico de infecção meningocócica, levou-nos ao estudo do melhor esquema de imunização, onde fosse possível determinar o tempo de aparecimento de títulos máximos, como também o período de permanência desses títulos e, ainda, a concentração ideal de antígeno inoculado, o qual poderia, em dose elevada, levar a uma toxicidade ou a uma parálise imunológica.

A ausência de produção de anticorpos específicos a antígenos polissacarídicos purificados quando inoculados por via intravenosa, mostra a importância da utilização do adjuvante completo de Freund, utilizando a via intradérmica.

A resposta ao antígeno polissacarídico não purificado, ou seja, associado à bactéria na sua forma de origem de acordo com dados apresentados, leva-nos à hipótese da existência de componentes da constituição bacteriana, que viriam a atuar como adjuvantes. Com base nisso, podemos afirmar que antígeno, adjuvante e via de inoculação são interdependentes, dentro de um esquema de imunização.

Em várias séries de inoculações em coelhos e carneiros, observou-se que os títulos máximos obtidos eram sugestivos de uma ausência de resposta secundária, ou que as inoculações subseqüentes utilizadas com o intuito de *booster* tinham como efeito a elevação da produção de anticorpos até um determinado título máximo que foi igual para todas as séries de inoculação.

O comportamento dos carneiros (fig. 3) destaca em primeiro plano a discrepante resposta obtida após a 1.^a série de inoculações em relação às subseqüentes séries,

uma vez que os títulos de anticorpos inicialmente obtidos tiveram variações acentuadas, alcançando um título máximo com pequeno período de permanência e uma rápida queda subseqüente. Tendo-se detectado antígeno no soro desses animais, provavelmente inoculado em dose elevada, os anticorpos produzidos teriam sido neutralizados por esses antígenos, impedindo a detecção *in vitro*, dada a formação e metabolização deste complexo antígeno-anticorpo. Também não foi verificada resposta secundária, uma vez que as doses de *booster* funcionaram apenas para a elevação de títulos até um máximo constante para todas as séries de inoculações.

Com a observação da permanência de títulos de anticorpos após a 2.^a, 3.^a e 4.^a séries de inoculações, onde foram utilizadas concentrações menores de antígenos, podem-se estabelecer esquemas quase que ideais para uma boa imunização, se bem que não definitivos, uma vez que o animal foi pré-imunizado (1.^a série).

Os anticorpos do tipo precipitante também apareceram em concentrações maiores, de acordo com a progressão das séries, levando-nos a concluir que o aparecimento dos mesmos depende de um número maior de estímulos ou de selecionamento de células imunocompetentes, com maior especificidade.

Os anti-soros obtidos para a *N. meningitidis* do grupo A eram todos específicos, enquanto que o mesmo não ocorreu com a *N. meningitidis* do grupo C. Este fato poderia ser explicado se levarmos em conta serem as *N. meningitidis* dos grupos A e C portadoras de um determinante antigênico comum o qual, no grupo A, não seria imunodominante, ou estaria antigenicamente mascarado. Esta reação cruzada pôde ser facilmente contornada absorvendo-se os soros com polissacarídeos ou bactérias de grupos específicos.

RIAL-A/423

SIMONETTI, J.P.; TAKEDA, A.K.; SOERESSEN, B.; ZIQUINATTI, O. & BOSCARDIN, N.B. — Evaluation of the immune response of animals inoculated with serogroups A and C *Neisseria meningitidis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 91-101, 1975/76.

SUMMARY: In order to study the immune response to serogroups A and C *N. meningitidis* the author inoculated 40 rabbits and 4 sheeps with live and dead bacteria as well as with specific A and C polysaccharides, with and without adjuvants in different doses and by different inoculation vias. Several series of inoculation were carried out in order to verify the *booster* response. The level of the antibodies and their permanence in the serum was measured through passive haemagglutination and counter-immunoelectrophoresis. The same technic was used to detect the polysaccharide antigens of *N. meningitidis* in these sera.

The analysis of the results obtained indicated that there is no difference in the immune responses at concentrations varying from $5,6 \times 10^7$ to $2,4 \times 10^{10}$ bacteria per rabbit. Both haemagglutinating and precipitating antibodies appeared five days after the last inoculation and remained for an average period of twenty five days. There was no significant differences between primary, secondary and tertiary responses yet the precipitating antibodies appeared in heavier concentrations after inoculation of the successive series. When inoculated intravenously the polysaccharides did not induce immune response but they became immunogenic when injected intradermically with complete Freund adjuvant.

DESCRIPTORS: *Neisseria meningitidis*, serogroups A and C; *Neisseria meningitidis*, immunogenicity in animals.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARBONARE, S.B.; TAKEDA, A.K.; JORDÃO, F.B.M. & TAUNAY, A.E. — Especificidade imunológica dos polissacarídeos extraídos de diferentes grupos de *Neisseria meningitidis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 119-25, 1974.
2. COHEN, R.L. & ARTENSTEIN, M.S. — Hemagglutination inhibition for serogrouping of *Neisseria meningitidis*. *Appl. Microbiol.*, 23: 289-92, 1972.
3. CONRATH, T.B. — *Handbook of microtiter procedures*. Cambridge, Mass., Rynatech, 1972.
4. DEVINE, L.F.; RHODE III, S.L. & HAGERMAN, C.R. — Relationship of serogroups of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.*, 5: 48-54, 1972.
5. EVANS, J.R.; ARTENSTEIN, M.S. & HUNTER, D.H. — Prevalence of meningococcal serogroups and description of three new groups. *Am. J. Epidemiol.*, 87: 643-6, 1968.
6. GRIFFISS, J.M.; BANNATYNE, R.M.; ARTENSTEIN, M.S. & ANGLIN, C.S. — Recurrent meningococcal infection with an antigenically identical strain. *J. Am. med. Ass.*, 229: 68-70, 1974.
7. JENNINGS, H.J.; MARTIN, A.; KENNY, C.P. & DIENA, B.B. — Cross - protective antigens of *Neisseria meningitidis* obtained from silateral group Y. *Infect. Immun.*, 5: 547-51, 1972.
8. KASPER, D.L.; WINKELHAKE, J.L.; ZOLLINGER, W.D.; BRANDT, B.L. & ARTENSTEIN, M.S. — Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* 07:K1 (L); NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J. Immun.*, 110: 262-8, 1973.

SIMONETTI, J.P.; TAKEDA, A.K.; SOERENSEN, B.; ZIQUINATTI, O. & BOSCARDIN, N.B. — Avaliação da resposta imunológica em animais quando inoculados com *Neisseria meningitidis* dos grupos "A" e "C". *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 91-101, 1975/76.

9. KASPER, D.L. & WYLE, F.A. — Bactericidal antibody assay using ¹⁴C-labeled *Neisseria meningitidis*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 139: 1175-80, 1972.
10. PALHARES, M.; GELLI, D.S.; ALMEIDA, M.C.R.; MELLES, C.E.A.; TAKEDA, A.K. & TAUNAY, A.E. — Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do Grupo C no líquido cefalorraquidiano por imunoelektroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 85-9, 1973.
11. PRIBNOW, J.F.; BESEMER, D.J.; HALL, J.M. & VEDROS, N.A. — Demonstration of delayed hypersensitivity to *Neisseria meningitidis*. *Can J. Microbiol.*, 19: 1473-9, 1973.
12. TAKEDA, A.K.; TAUNAY, A.E.; SCALABRINI, L.G.P. & CASTRO, I.O. — Anticorpos antipolissacarídeo C de *Neisseria meningitidis*: detecção através de hemaglutinação passiva em soros de pacientes e de vacinados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 127-33, 1974.
13. WYLE, F.A.; ARTENSTEIN, M.S.; BRANDT, B.L.; TRAMONT, E.C.; KASPER, D.L.; ALTIERI, P.L.; BERMAN, S.L. & LOWENTHAL, J.P. — Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. *J. infect. Dis.*, 126: 514-22, 1972.

Recebido para publicação em 2 de outubro de 1975.

