

CINÉTICA DA BACTERIEMIA EXPERIMENTAL NA MEDIDA DA RESISTÊNCIA

Helvécio BRANDÃO (1)

RESUMO

Considerando que: a medida da resistência pelos testes quantais é pouco informativa, em virtude de serem medidos os efeitos extremos, como a morte e a sobrevivência; que cada microrganismo invadindo um hospedeiro tem uma oportunidade de multiplicação seguida por uma seqüência de fenômenos que resultam na morte deste; que a mortalidade depende do número total de microrganismos e que a morte ocorre quando um limiar crítico é alcançado para cada combinação germe-hospedeiro; a seguinte hipótese foi formulada: "o número de germes circulantes num determinado tempo é função inversa da resistência".

A proporção esperada de sobreviventes foi calculada usando o primeiro termo da série de Poisson.

A hipótese não pôde ser rejeitada em virtude das diferenças entre os valores esperados e observados não serem significantes ao nível de 0,05.

Relações lineares inversas foram encontradas entre os logs das médias das bacteriemias e as correspondentes percentagens de sobrevivência numa combinação germe-hospedeiro. Projetando estes valores respectivamente como X e Y , obtém-se uma curva recíproca do tipo da hipérbole. Apesar dos pontos serem poucos, a tendência recíproca foi nitidamente comprovada.

Utilizando a fórmula $Y = 1000 \cdot \frac{1}{e^{Xb}}$ obteremos uma escala de valores arbitrários, que traduziriam, por convenção, diversos graus de resistência induzidos por diferentes vacinas dentro de um critério relativo num mesmo conjunto experimental para determinações de potências.

INTRODUÇÃO

Nos processos de estandardização de vacinas, a medida da resistência ou da imunidade tem uma importância fundamental.

Os bioensaios usados na avaliação de potências de vacinas do tipo Wright consistem em provas de proteção ativa com respostas quantais. Os resultados destes testes não são geralmente satisfatórios devido ao número proibitivo de animais que seriam necessários para a sua realização, dentro dos limites de erro aceitáveis, e ao fato de não sabermos se a imunidade induzida no animal pela va-

cina e a infecção produzida para revelar este estado, seriam suficientemente representativas da infecção natural do homem, com um tipo de imunidade adequada para protegê-lo (MILES¹³).

A sua sensibilidade é limitada em virtude dos efeitos quantais medidos em face da dose-teste, a morte e a sobrevivência, serem fenômenos situados em extremos opostos.

Por estas razões, muitas vacinas bacterianas não podem ser bem especificadas, sendo caracterizadas pelo número de bactérias por

(1) Assistente-Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Univ. de São Paulo (Catedrático: Dr. José Oliveira de Almeida).

unidade de volume e pela estirpe bacteriana usada no seu preparo.

A possibilidade de uma medida quantitativa do grau de proteção conferido seria altamente desejável, assim como o uso dum prova que independa da suscetibilidade animal.

Considerando a dinâmica do processo infeccioso por certos germes dotados de capacidade invasiva, em animais não suscetíveis, verifica-se que a bacteriemia representa uma fase de fundamental importância na evolução ou na involução do processo.

De acôrdo com a resistência animal, haverá uma invasão crescente seguida da morte ou uma contenção da onda microbiana que resultará na sobrevivência, usando uma figuração simplificada para fenômenos altamente complexos.

Quando microrganismos dotados de poder invasor são inoculados num animal, cada germe tem uma oportunidade de multiplicação que pode causar a morte do hospedeiro, a mortalidade dependendo do número total de germes infectantes, ou melhor, a proporção de mortos para qualquer diluição da suspensão microbiana é a proporção do inóculo que contém um ou mais organismos do tipo capaz de crescimento no hospedeiro.

Com efeito, relações lineares entre a dose ou a concentração de microrganismos e a proporção de sobreviventes foram estabelecidas, de acôrdo com a hipótese formulada por DRUETT⁹, sôbre a invasão bacteriana. Estas relações foram confirmadas por PETO¹⁵, que apresenta uma equação para curvas de dosagem-resposta e por REID & MACLEOD¹⁶.

Considerando que cada germe inoculado num animal tem uma oportunidade λ de desenvolvimento que lhe permite proliferar e causar a morte do hospedeiro, que a mortalidade num grupo de animais depende do número total de germes infectantes e que a morte se processa quando existe um limiar crítico para cada associação germe-hospedeiro, podemos formular a hipótese: "que o número de germes circulantes num determinado tempo é função inversa da resistência". Como a determinação da resistência se faz computando-se a sobrevivência, para

provar a hipótese, teremos que estabelecer as relações entre a bacteriemia e a sobrevivência.

FINALIDADE DO TRABALHO

Realmente o propósito dêste trabalho, é o estudo das relações da bacteriemia induzida experimentalmente em animais com a sua sobrevivência e a introdução do uso da bacteriemia como medida da resistência, uma vez provada a hipótese apresentada.

RELAÇÕES ENTRE A BACTERIEMIA EXPERIMENTAL E A SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS

Para a verificação das relações entre o número de germes circulantes e a sobrevivência em animais inoculados com uma única dose, porém constituindo grupos de resistências diferentes, se encontrarmos b_1, b_2, \dots, b_k , germes circulantes após um tempo determinado, sendo os animais homogêneos em todos os sentidos, exceto nos estados de resistência, teremos s_1, s_2, \dots, s_k , número de sobreviventes.

Considerando a ação independente dos germes, a homogeneidade dos animais e a mínima probabilidade de um germe matar o hospedeiro, a proporção esperada de sobreviventes S , será de acôrdo com o primeiro termo da série de Poisson:

$$S = (1 - \lambda)^b \cong e^{-b\lambda}$$

que também pode ser expressa como:

$$\text{Ln } S = - b\lambda$$

A estimativa do parâmetro λ pode ser obtida gráficamente, sendo dada pela inclinação negativa da linha de regressão, bacteriemia-proporção de sobreviventes em projeção log-log.

PLANO DE INVESTIGAÇÕES

Para provar a hipótese formulada, a seguinte experiência foi planejada: de um grupo homogêneo de camundongos, da mesma raça, pêso (18-20 g), machos, 3 grupos foram separados ao acaso em número de 20

cada e denominados, respectivamente, A, B e C. O grupo A ficou como contrôlo, o grupo B recebeu 3 doses de uma vacina diluída a 1:100 e o grupo C 3 doses da mesma diluída a 1:10. Após 7 dias todos foram inoculados com uma dose-teste do mesmo germe, endovenosamente, proveniente de uma mesma suspensão. Após um período entre 1 e 2 horas, todos foram sangrados e diluições adequadas do sangue foram semeadas em placas de Petri, para contagens.

0,1, graduada em 0,001, retirava-se a quantidade necessária para a diluição inicial de 1:10. As placas eram incubadas durante 48 horas e as colônias contadas em contador tipo A. O. Spencer.

RESULTADOS

Os resultados obtidos são expressos no Quadro I.

QUADRO I

Grupo	Dose (log)	Animais (nº)	Sobrevivência	Prop. sobreviv. (ln)	Bacteriemia (log média)
A	9,7	20	0,05	-3,0	4,0 ± 0,4
B	9,7	20	0,30	-1,2	1,2 ± 0,2
C	9,7	20	0,80	-0,2	0,3 ± 0,1

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos da raça Swiss (18-20 g), machos.

Estirpe bacteriana: *E. coli* 055.

Contagem de bactérias pelo método convencional em placas, meio de MacConkey (Difco). O número de bactérias calculado na base do número de colônias.

Vacina: cultura de 7 dias em caldo nutriente, acrescida de germes cultivados em ágar durante 18 horas para obtenção da concentração desejada de 10^9 germes por ml. Tratada pelo formol a 0,1% durante 48 horas.

Imunização: por via peritoneal, 0,5 ml por dose.

Inoculação de prova: cultura de 6 horas, concentração de 5×10^9 por ml, inoculada nas veias da cauda.

Sangrias: feitas por punção cardíaca. Quando não era possível atingir o coração, o tórax era aberto e a sangria feita diretamente. O sangue colhido em seringa esterilizada em salina era colocado em tubinhos com citrato cristalizado nas paredes por evaporação. Com uma pipeta de precisão de

As diferenças das médias das bacteriemias entre os grupos A e B e A e C, foram significantes ao nível de 0,05.

Para a determinação do parâmetro λ , o gráfico (Fig. 1) nos mostra a inclinação da linha de regressão log bacteriemia-ln proporção de sobreviventes, que é $\lambda = -0,8$.

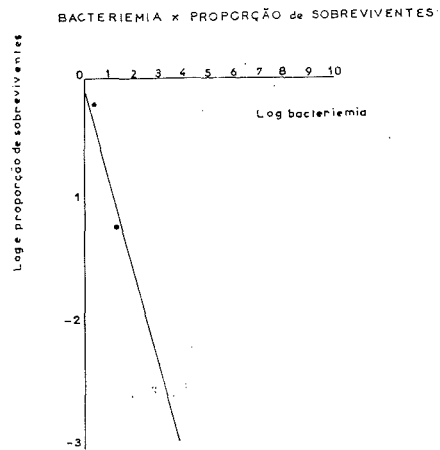


Fig. 1

No Quadro II podemos verificar a proporção de sobreviventes calculada através dos valores da bacteriemia e a proporção observada experimentalmente.

QUADRO II

Proporção de sobreviventes

Grupo	Calculada	Observada
A	$e^{-\lambda b} = 0,04$	0,05
B	$e^{-\lambda b} = 0,38$	0,30
C	$e^{-\lambda b} = 0,79$	0,80

A hipótese não pôde ser rejeitada em virtude das diferenças entre os valores calculados e os observados não serem significantes ao nível de 0,05.

Sendo $S = e^{-\lambda b}$ ou $S = \frac{1}{e^{\lambda b}}$, se projetarmos os dados, obteremos uma curva recíproca do tipo da hipérbole, tendo por assíntotas os eixos X e Y .

Se chamarmos de Y a resistência e substituirmos S por Y , obteremos valores arbitrários relativos correspondentes aos graus de resistência encontrados.

Então teremos:

$$Y = \frac{1}{e^{\lambda b}}$$

sendo

Y = resistência

e = base dos logaritmos naturais

b = bacteriemia em log comum

λ = inclinação ou coeficiente angular da linha de regressão log bacteriemia-ln percentagem de sobreviventes, que é a probabilidade de um germe matar o hospedeiro.

No gráfico (Fig. 2) podemos apreciar através da curva recíproca as relações inversas entre a resistência, traduzida pela sobrevivência e a bacteriemia.

Com poucos pontos, não foi feito o ajustamento dos mesmos à linha, mas as rela-

ções comprovadas, mostram nitidamente a sua tendência recíproca.

BACTERIEMIA x SOBREVIVÊNCIA

$$S = e^{-b\lambda}$$

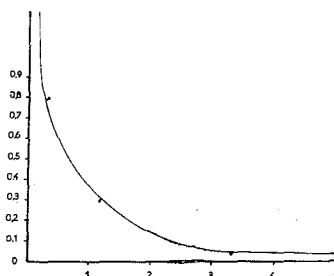


Fig. 2

Para uma concepção teórica do conjunto, considerando os fenômenos inversos que ocorrem pela indução de uma bacteriemia, podemos figurar em caráter recíproco a bacteriemia, a organotropia, a sobrevivência e a mortalidade.

Êstes fenômenos poderão ser representados nos dois ramos de uma hipérbole, sendo num os valores das sobrevivências como Y e os das bacteriemias como X , no outro valores negativos da organotropia como X e da mortalidade como Y , figurando assim as 4 grandezas em seu caráter recíproco (Fig. 3), uma vez que $e^x \cdot e^{-x} = 1$.

Para a expressão numérica dos valores correspondentes a diferentes graus de resistência é necessário o estabelecimento de uma unidade de referência em termos do seu efeito biológico, no caso, a capacidade de redução da bacteriemia, que seria característica de uma determinada combinação germe-hospedeiro. Ora, a experiência tem demonstrado a variabilidade destas unidades, mesmo em circunstâncias que poderíamos chamar de estáveis em relação às nossas. Por outro lado, em contraste com esta precariedade no estabelecimento de medidas precisas em termos absolutos, o mesmo não acontece quando bases comparativas são usadas na determinação de potências relativas (BURN, FINNEY & GOODWIN⁵).

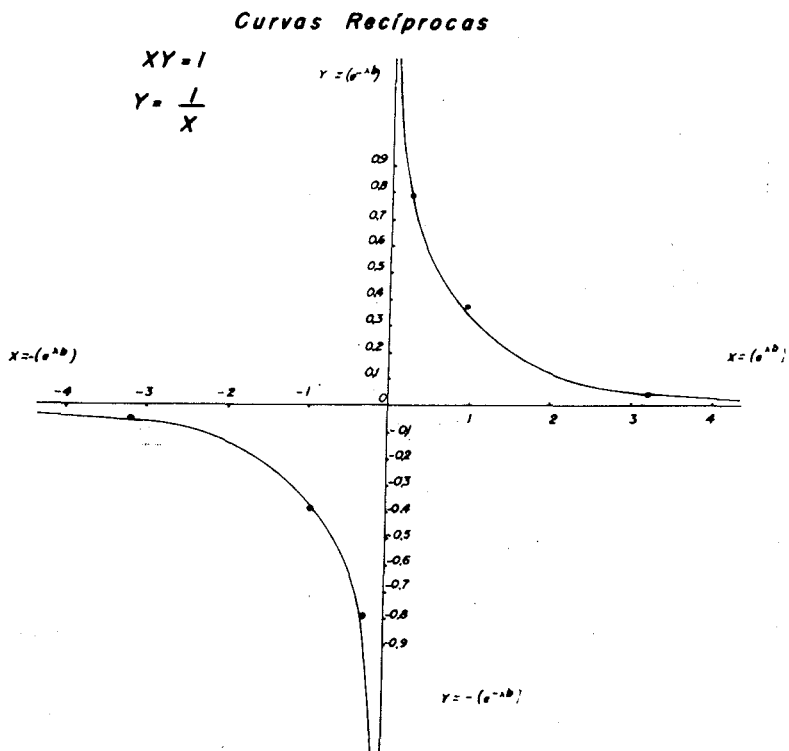


Fig. 3

A percentagem 50% de sobrevivência de um grupo de animais em face de uma dose-teste, exprime realmente a resistência dos mesmos àquele inóculo; sendo a bacteriemia relacionada linearmente com a sobrevivência, o valor da bacteriemia correspondente aos animais controles, seria o valor arbitrário de Y tomado como padrão para cada conjunto experimental, na falta de uma vacina estandardizada como referência. No caso da existência desta, a comparação seria feita com o valor médio obtido dos animais por ela protegidos.

Em virtude das relações obtidas, podemos utilizar para maior espaço entre os valores, a fórmula $Y = 1000 \cdot \frac{1}{e^{\lambda b}}$, para obtenção de valores arbitrários, que traduziriam por convenção, graus de resistência diferentes, induzidos por diferentes vacinas, em caráter relativo dentro dum conjunto experimental.

Nossas experiências forneceram os seguintes valores relativos:

Grupo A: $Y = 1000 \cdot \frac{1}{e^{\lambda b}} = 40.$

Grupo B: $Y = 1000 \cdot \frac{1}{e^{\lambda b}} = 380.$

Grupo C: $Y = 1000 \cdot \frac{1}{e^{\lambda b}} = 790.$

O grupo C apresenta um valor numérico 19 vezes maior e o B 9 vezes, que o grupo controle.

DISCUSSÃO

A idéia central deste trabalho é a introdução da medida da bacteriemia como avaliação quantitativa da resistência, considerando os inconvenientes das medidas extremas, como a morte e a sobrevivência. Ele é ainda bastante limitado para generalizações. Por razões superiores à nossa vontade não foi possível a sua realização dentro

de um planejamento mais amplo cuja análise permitisse conclusões mais generalizadas.

Relações lineares entre os valores da bacteriemia e as percentagens de sobrevivência foram encontradas para uma determinada associação germe-animal experimental, num conjunto que julgamos limitado de observações.

Fazendo uma revisão da literatura, encontramos trabalhos que focalizam a diminuição de bactérias no sangue e nos órgãos, relacionando o fenômeno com a resistência^{1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 18}.

Não obstante, em nenhum dêles, foi utilizado o fenômeno como medida de resistência.

Os resultados obtidos nos permitem admitir que a contagem de germes oferece as seguintes vantagens: 1) em vez de medir efeitos extremos, mede um fenômeno central em caráter quantitativo; 2) não depende da suscetibilidade do animal ao agente; 3) a importância do fenômeno medido na evolução do processo infeccioso é de natureza fundamental; 4) a sua medida permite uma escala de valores convencionais, que traduziriam os diversos graus de resistência.

SUMMARY

Kinetics of experimental bacteremia in resistance measurement.

Bioassays based on quantal responses for the evaluation of resistance or immunity conferred by vaccination are not quite informative due to the inconvenient criterion of computing extreme effects as survival and death.

Considering that each microorganism invading a host has a chance of multiplying followed by a sequence of events which result in death, that mortality depends on the total number of organisms and that death occurs when a critical level is reached for each agent-host association, the following hypothesis was formulated: "the number of circulating organisms in a given time is an inverse function of resistance", for certain agent-host combinations.

The hypothesis could not be rejected due to the differences between the expected and observed values were not significant at the 0.05 level, expected values calculated through the bacteremia ones, using the first term of Poisson series.

Not rejecting the hypothesis, we come to the central idea of this work, which is the consideration of the possibility of measuring bacteremia as a quantitative estimation of the degree of resistance induced by different vaccines.

By means of the relationship found, arbitrary values are calculated which may furnish a relative expression of different degrees of protection afforded by several vaccines within a same trial.

REFERÊNCIAS

1. BENNETT jr., I. L. & BEESON, P. B. — Bacteremia: a consideration of some experimental and clinical aspects. Yale J. Biol. & Med. 26:241-262, 1953-54.
2. BULL, C. G. — Immunity factors in pneumococcus infection in the dog. J. exper. Med. 24:7-24, 1916.
3. BULL, C. G. — The mechanism of the curative action of antipneumococcus serum. J. exper. Med. 22:457-465, 1915.
4. BULL, C. G. — A method for estimating the bacteria in the circulating blood in rabbits. J. exper. Med. 20:237-248, 1914.
5. BURN, J. H.; FINNEY, D. J. & GOODWIN, L. G. — Biological standardization. London, Oxford University press, 1950.
6. CANNON, P. R.; SULLIVAN, F. L. & NECKERMANN, E. F. — Conditions influencing the disappearance of living bacteria from the blood stream. J. exper. Med. 55: 121-137, 1932.
7. DEREK, H. — The behaviour of a mutant strain of *Salmonella typhimurium* in experimental mouse typhoid. J. Hyg., Cambridge 55:322-333, 1957.
8. DEREK, H. — Resistance to reinfection in experimental mouse typhoid. J. Hyg., Cambridge 55:334-343, 1957.
9. DRUETT, H. A. — Bacterial invasion. Nature, London 170:288, 1952.
10. FINNEY, D. J. — Statistical method in biological assay. London, Charles Griffin, 1952.

11. HOLLINGSWORTH, J. W. & BEESON, P. B. — Experimental bacteremia in normal and irradiated rats. *Yale J. Biol. & Med.* 28:56-62, 1955-56.
12. KERBY, G. P.; HOLLAND, B. C. & MARTIN, S. P. — The quantitative estimation of the removal of bacteria from the blood by the various organs of the immunized animal. *J. Immunol.* 64:123-129, 1950.
13. MILES, A. A. — Biological standards and the measurement of therapeutic activity. *Brit. med. Bull.* 7:283-291, 1950-51.
14. MITSUHASHI, D.; HASHIMOTO, H. & KAWAKAMI, M. — Anti-lethal resistance of mice immunized with live vaccine against infection with *Salmonella enteritidis*. *Japan. J. exper. Med.* 30:375-384, 1960.
15. PETO, S. — A dose-response equation for the invasion of micro-organisms. *Biometrics* 9:320-335, 1953.
16. REID, D. B. W. & MACLEOD, R. R. E. — The relation between dose and mortality for *Salmonella Dublin*. *J. Hyg., Cambridge* 52:18-23, 1954.
17. SMITH, C. A. B. — *Biomathematics*. New York, Hafner, 1954.
18. WRIGHT, H. D. — Experimental pneumococcal septicaemia and antipneumococcal immunity. *J. Pathol. & Bacteriol.* 30:185-252, 1927.

Recebido para publicação em 15 março 1962.