

Helvécio Brandão

A Capacidade Protetora da Vacina Contra a Gripe “ASIÁTICA”



Tese Apresentada à Faculdade de Higiene e Saúde
Pública da Universidade de São Paulo para o concurso
de Professor Catedrático da II Cadeira - Microbiologia
e Imunologia Aplicadas.

1958
São Paulo

A Lucas de Assumpção

nossa gratidão e nosso respeito

Introdução

Antes de ser posta em uso público, uma nova vacina deve passar por dois estádios. O primeiro é a determinação de sua potência imunogênica, ou seja, de sua capacidade de proteção contra a doença. Isto requer diversas experiências em seres humanos, realizadas, preferentemente, em diversos lugares e por diversos pesquisadores.

Uma vez superado o primeiro estágio, é mister padronizar cada lote de vacina produzido para uso público, com o fim de conhecer sua potência em particular. Para este fim, devem ser realizados os testes de potência antigênica, geralmente mediante a titulação dos anticorpos circulantes produzidos em resposta à vacinação de animais.

Já foi demonstrado, convenientemente, que é possível preparar uma vacina capaz de proteger contra a gripe (1-7). Porém, alguns fracassos têm sido relatados (8), os quais foram unanimemente atribuídos a diferenças na estrutura antigênica das amostras de vírus da gripe contidas na vacina e das causadoras da epidemia (1-7).

A pandemia de gripe que grassou em todo o Mundo durante o ano de 1957 caracterizou-se pela presença de amostras de vírus tipo A, de estruturas antigênicas similares ou idênticas entre si,

mas que diferiam marcadamente das amostras do mesmo tipo isoladas em epidemias anteriores. Portanto, o emprêgo de uma vacina contendo as amostras clássicas não era indicado. Por outro lado, uma vacina composta de amostras isoladas durante a pandemia era de capacidade imunogênica desconhecida; tanto mais quanto o comportamento sorológico das amostras estudadas era atípico e imprevisível(9-10). Assim, por vêzes, a reação de inibição da hemaglutinação não evidenciava resposta imunitária, enquanto que a fixação de complemento dava títulos apreciáveis (9). É evidente que um teste da capacidade protetora da vacina contra a gripe "asiática" preparada no Instituto Butantan, com amostra isolada na Ásia, representava situação semelhante à do emprêgo de uma nova vacina. Por outro lado, êsse estudo daria, também, a oportunidade de uma análise comparativa da capacidade protetora de outras vacinas anti-gripais, constituindo um assunto de interêsse científico e de importância prática no campo da saúde pública.

Seleção do tema.

Tendo em conta que, como exige o seu título, a cadeira ora em concurso focaliza aplicações de conhecimentos acadêmicos a problemas de natureza prática, como são os de Saúde Pública, em lugar de escolher um tema de Microbiologia pura, aproveitamos um acontecimento de palpitante atualidade como era a epidemia de gripe "asiática" que, durante o segundo semestre de 1957 tanto preocupou não só as autoridades sanitárias de todo o mundo, como ao público mesmo. Êste último, influenciado pelas notícias dos jornais e pela lembrança da catastrófica pandemia de 1918-1919, procurou, alarma-

do, obter agentes profiláticos para se defender da ameaça que sô bre êle pairava. A falta de vacina fabricada no estrangeiro e a escassa produção nacional limitou o número de indivíduos vacina-dos a apenas alguns membros do Govêrno. Lutando com as dificulda-des conseqüentes, decidimos testar a eficiência da vacina anti-gripal produzida no Instituto Butantan da Secretaria de Saúde - dêste Estado.

Como acabamos de mencionar, o combate a epidemia de gripe "asiática" em São Paulo criava um problema cuja magnitude e ra similar ao da demonstração da eficiência de uma nova vacina - contra a doença. Esta foi a opinião unânime em outros países, on de numerosos testes da capacidade protetora de uma vacina contra a gripe "asiática" estavam sendo feitos por diversas equipes de pesquisadores, já que não era possível de afirmar "a priori" que, uma vacina preparada com amostra "asiática" seria eficiente.

Ao testar a vacina preparada no Instituto Butantan, de cidimos não realizar apenas o teste rotineiro de um lote de vaci-na mas sim fazer um estudo básico e prático ao mesmo tempo, onde, além dos testes de potência imunogênica da vacina em aprêço, rea-lizar-se-ia a análise da eficiência da mesma, mediante o reexame doutrinário de fatores que influenciam a eficiência de vacinas. Assim, revisariíamos temas tais como características gerais das/va-cinas anti-gripais, a estrutura antigênica e outras propriedades do vírus da gripe, especialmente das amostras "asiáticas" e os princípios que norteiam os testes das vacinas. Estudariíamos tam-bém a precisão dos testes considerando o mecanismo de propagação intrafamiliar de uma infecção no cálculo dos "êxitos" ou "fracas-

sos" de uma vacina.

Com as anteriores considerações, queremos ressaltar que nosso critério da natureza de uma tese acadêmica não é de que esta consista simplesmente de um trabalho de laboratório ou de campo, de objetivos específicos, restritos. Muito ao contrário, achamos que as experiências com seres humanos (vacinação e sangrias), os trabalhos de laboratório (reações sorológicas) e o trabalho de campo (inquérito epidemiológico) que realizamos para testar a vacina preparada no Instituto Butantan constituem apenas exemplos práticos para documentar uma análise teórica e prática de problema geral como é o enunciado no título da presente Tese.

Devemos acrescentar que a medida da capacidade protetora de uma vacina contra uma doença constitui um caso típico de aplicação de conhecimentos de Microbiologia e Imunologia a problemas de Saúde Pública. Com efeito, os testes de potência imunogênica e antigênica comportam uma série de trabalhos, tanto teóricos como práticos, onde são aplicados conhecimentos pertencentes aos mais diversos ramos da Microbiologia e da Imunologia, assim como a disciplinas correlatas, tais como Epidemiologia, Biologia Geral e outras ciências afins.

Objetivos.

Procedendo ao estudo aqui apresentado, visavamos os seguintes fins: a) tendo em conta o recente aparecimento das amostras "asiáticas" e a sua estrutura antigênica diferente das conhecidas, a eficiência da vacina em aprêço estava longe de estar demonstrada, porquanto foi comprovado que uma vacina contra a gri

pe deve conter amostras antigênicamente idênticas ou similares à aquela responsável pela epidemia (1-7); b) testar uma vacina de composição diferente das vacinas clássicas por conter apenas uma amostra de vírus, a qual nunca tinha sido usada antes para esse fim; c) tratava-se de vacina de fabricação nacional, portanto produto de um esforço de superação cujo êxito convinha determinar; d) nenhuma demonstração conclusiva da eficácia de uma vacina contra a gripe "asiática" tinha sido publicada, nem sequer comunicada oficialmente através de organizações internacionais de Saúde Pública, no momento em que foi planejado e iniciado o presente trabalho; e) realizar a avaliação de uma vacina contra a gripe mediante a coordenação de um teste de potência imunogênica com um teste de potência antigênica, e ainda, uma pesquisa epidemiológica para verificar se o vacinado e o seu controle adoeceram.

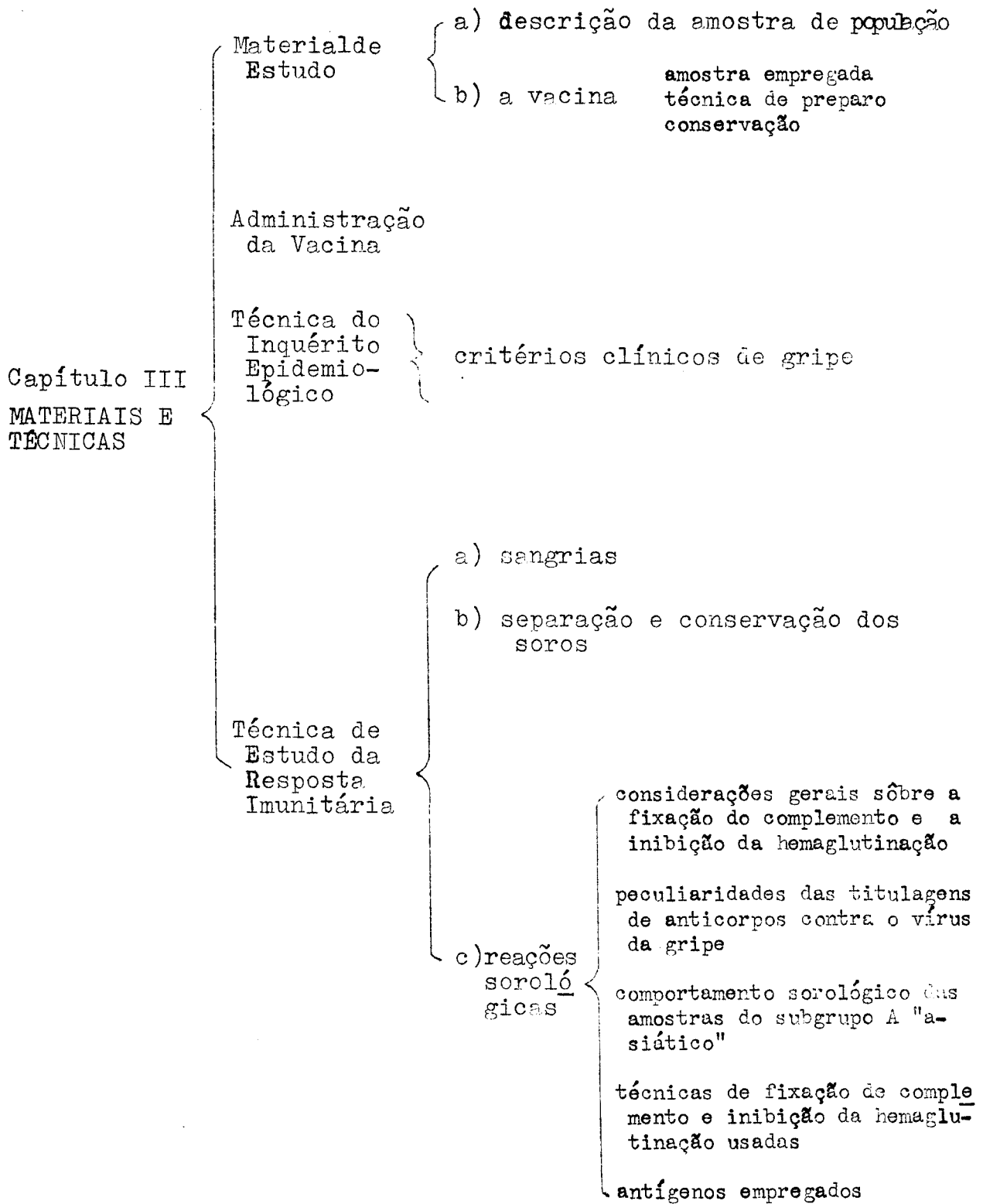
Sistematização da exposição.

O tema desta tese será apresentado em forma de capítulos, contendo o seguinte: a) fundamentos doutrinários do tema - incluindo uma reconsideração de certas características da infecção gripal e do seu agente causal, assim como de princípios gerais da Epidemiologia e testes de vacinas; b) planos das experiências e trabalhos de laboratório e de campo e discussão dos mesmos; c) descrição das experiências com seres humanos (vacinação e sangrias) e dos trabalhos de laboratório (preparo da vacina e reações sorológicas) e de campo (inquérito epidemiológico); d) apresentação dos resultados e discussão dos mesmos, formulação

das conclusões correspondentes e discussão geral do tema da tese.

A composição detalhada destes capítulos é apresentada, em continuação, ^{como} ~~pelo~~ índice do texto da Tese.

Capítulo I CONSIDERA- ÇÕES BÁSICAS	O VÍRUS DA GRIPE	Considerações gerais sôbre o vírus da gripe
		Estrutura antigênica do vírus da gripe { a) O aparecimento de va- riantes b) Propriedades das amos- tras "asiáticas"
	EPIDEMIO- LOGIA DA GRIPE	A pandemia de gripe { a) Histórico "asiática" b) Identidade da epidemia de gripe que grassou no Brasil em 1957.
		Considerações gerais sôbre a propa- gação de uma infecção no aglomera- do familiar
Capítulo II PLANO DOS TRABALHOS PRÁTICOS	PROFILA- XIA DA GRIPE	Considerações gerais sôbre a vaci- na anti-gripal
		Considerações gerais sôbre testes de vacinas
		Critérios básicos empregados no planejamento dos trabalhos práticos
		Plano dos trabalhos práticos
		Discussão do Plano



Capítulo IV RESULTADOS E DISCUSSÃO INDIVIDUAL	a) Teste de po tência imu- nogênica	1) nos adultos 2) nos adultos e crianças
	b) Teste de po tência anti gênica	1) percentagem de positivida- de da fixação de comple- mento e da inibição da he maglutinação em cada san- gria. 2) conversão de sôro negativo em sôro positivo

Capítulo V
COMENTÁRIOS GERAIS

Capítulo VI
RESUMO E CONCLUSÕES

Capítulo VII
REFERÊNCIAS

Capítulo I
CONSIDERAÇÕES BÁSICAS

O VÍRUS DA GRIPE

Considerações gerais sôbre o vírus da gripe

O vírus da gripe é constituído por partículas esféricas com diâmetro de aproximadamente 100 milésimos de micron. É provável que o tamanho varie com o tipo (11, 12). As diversas propriedades do vírus, tais como antigenicidade, infectividade, capacidade de aglutinar hemácias e fixar o complemento são inseparáveis das partículas (corpúsculos elementares) (11).

Entre outras características do vírus da gripe que merecem destaque, encontram-se a sua capacidade para apresentar o fenómeno de variação e o da interferência, assim como a toxicidade. Esta última pode ser observada na ausência de multiplicação do vírus, sendo proporcional à quantidade de vírus presente.

A interferência se manifesta tanto entre amostras do mesmo tipo (13) como de tipos diferentes (14). Assim, uma quantidade muito grande de vírus de um tipo, evita a multiplicação de vírus de outro tipo. A interferência na multiplicação de vírus de um tipo pode ser feita com vírus inativado pelas radiações ultravioleta (15).

A capacidade do vírus da gripe para apresentar variação não só é uma das suas características mais notáveis, como o coloca entre os vírus onde esta propriedade é acentuada. Isto se reflete sôbre a imunologia, epidemiologia e profilaxia específica

da gripe, como veremos mais adiante.

O fenômeno da variação evidencia-se usando como indicadores as seguintes propriedades: capacidade de aglutinar hemácias, especialmente as de galinha e de cobáia (16), a velocidade de "e_luição" do vírus das hemácias em que se encontra adsorvido (17) e a patogenicidade para os animais de laboratório (18).

A variação na estrutura antigênica pode ser observada, facilmente, no laboratório, tanto em amostras recém-isoladas como nas antigas. A inoculação seriada do pulmão de camundongo provoca freqüentemente a variação (19) que é também observada em culturas de tecidos e em inoculações de ovos embrionados (20).

Na opinião de Burnet (21), no mecanismo da variação antigênica do vírus da gripe existem dois fatos importantes. Um caracterizado pelo aparecimento, em cada variação antigênica, de um novo antígeno, sem ocorrer reversão a antígenos prévios. O outro, a "dominância" da nova variante. O processo de renovação antigênica parece ser contínuo.

Estrutura antigênica do vírus da gripe

Os estudos da estrutura antigênica dos vírus da gripe vieram aclarar alguns dos pontos obscuros que êstes vírus apresentavam em seu comportamento imunológico e epidemiológico, caracteristicamente mais variável que o da maioria dos outros vírus.

A gripe, desde a antiguidade reconhecida como entidade

clínica, era, porém, obrigatoriamente incluída no grupo, pouco de finido etiologicamente, das infecções agudas do aparelho respiratório. Só pôde emergir com a sua individualidade etiológica muito recentemente, após a descoberta dos seus agentes etiológicos, (22) o que se deu de 1933 para cá. Se bem que caracterizada clínica e epidemiologicamente no século passado e exaustivamente estudada em seu comportamento mutável, só nas últimas décadas foi possível explicar suas nuances clínicas e epidemiológicas, à luz das descobertas efetuadas em relação à estrutura antigênica de seu agente. Nenhum progresso real havia sido atingido, antes das descobertas de Shope (23), Smith, Andrews e Laidlaw (22); Francis (24); Salk e Suriano (25) e Taylor (26). Estas descobertas vieram demonstrar a existências de vários grupos imunológicos de vírus denominados tipos A, B, C e D. (10).

As amostras que pertencem a um tipo não constituem um grupo homogêneo sob o ponto de vista imunológico, pois diferem entre si de maneira acentuada, por vezes tanto, que torna difícil a sua identificação e classificação. Um exemplo são as amostras designadas "A-primo" por Salk e Suriano (25). As diferenças entre os tipos são muito mais marcadas ainda. Com efeito, uma amostra de um tipo não possui antígenos em comum com amostras de outro tipo, de tal maneira que os animais altamente imunizados contra um tipo, são completamente susceptíveis a amostras de outro tipo (27). Este fenômeno não é apenas imunológico, ou seja, manifesto apenas "in vivo", mas também é evidente nas provas de neutralização, fixação de complemento e inibição da hemaglutinação, nas quais se utilizam soros com altos títulos de anticorpos contra um tipo e

amostras de vírus-padrão de outro tipo. Tais reações são uniformemente negativas.

Êstes fenômenos imunológicos e sorológicos resultam, obviamente, de diferenças de estrutura antigênica. Por sua vez, estas diferenças parecem ser conseqüentes ao fenômeno de variação.

a) o aparecimento de variantes

Estudos das epidemias ocorridas nas duas últimas décadas revelaram o aparecimento de variantes com diferenças antigênicas acentuadas, principalmente dentro do tipo A, que foi responsável pelo maior número de surtos epidêmicos, seguido pelo tipo B. Êste fenômeno de variação antigênica tem sido verificado em investigações várias, principalmente aquelas relacionadas com os problemas de desenvolvimento de métodos de controle da doença pela imunização (28, 29).

Estudos sorológicos apontam o vírus da gripe do porco, ("swine influenza"), pertencente ao tipo A, como possível causador da pandemia de 1918-1919, o qual teria permanecido por um período máximo de 10 anos e desaparecido então (30).

Os primeiros isolamentos efetuados em 1933, revelaram uma amostra ou um conjunto de amostras com novas características antigênicas, mostrando algum parentesco com o vírus da gripe do porco, que foram responsabilizados por alguns episódios epidêmicos ocorridos durante cerca de 10 anos.

Em 1947 é isolada uma amostra do tipo A, mas que diferia marcadamente das amostras dêste tipo isoladas anteriormente,

(25). A amostra FML foi assim o protótipo de um subtipo, denominado A' ("A primo"). Amostras dêste subtipo permaneceram em cena, em todo o Mundo, por uma dezena de anos.

As variações na estrutura antigênica das amostras de vírus da gripe tornou-se, pois, um assunto de grande interêsse e tem sido cuidadosamente estudado. Vírus isolados em 1956, de várias procedências, como da Holanda, do Canadá, dos Estados Unidos, Inglaterra, Índia, etc. mostraram-se diferentes dos anteriores, porém, relacionados ao subtipo FML (A'). Estas amostras foram denominadas "Dutch 56" pelos Inglêses. Amostras antigênicamente semelhantes foram isoladas no Japão em Dezembro de 1956 e nos Estados Unidos, Europa e Ásia, de Janeiro a Março de 1957.

Como tudo fazia crêr, pela experiência acumulada, novas variantes, ou seja, novos conjuntos antigênicos surgiram; o que se efetuou em 1957 com o aparecimento, no Extremo-Oriente, das amostras FE ("Far East") ou "asiáticas", que pertenciam ao tipo A, sendo a primeira isolada de epidemia ocorrendo em Singapura e que mostrou apenas uma discreta semelhança antigênica com as outras amostras do tipo A isoladas anteriormente. Em geral, os vírus hoje denominados FE ("Far East") ou "Asian" ("asiáticos") e que foram isolados a partir de maio de 1957, mostraram-se antigênicamente tão diferentes do tipo A e do subtipo A' como era o subtipo A' do tipo A. Meyer e colaboradores(9) e Jensen (10) apresentaram os resultados de testes de inibição e hemaglutinação feitos com soros de furões convalescentes e galinhas imunizadas frente a amostras dos tipos A, B, C e D, em provas conjugadas.

b) propriedades das amostras "asiáticas"

Lavados orofaríngeanos podem ser cultivados no saco amniótico do ovo embrionado pela técnica usual. Os líquidos alantóicos colhidos revelam concentrações de 10^8 a 10^9 doses infecantes por ml. Os ovos podem ser incubados a 35°C ou 37°C . As concentrações de vírus, medidas pela hemaglutinação com glóbulos de cobaia, de galinhas ou humanos, têm se mostrado relativamente baixas. Segundo a experiência de Jensen (10) e Meyer e colaboradores (9) a amostra A/Formosa/313/57 tem revelado títulos bem mais altos. Esta é, precisamente, uma das amostras por nós empregadas como padrões no estudo da resposta imunitária à vacina.

Os vírus FE ("asiáticos") podem ser inoculados intra-nasalmente em furões e camundongos. A inoculação de 10^6 doses infectantes produz a "consolidação" pulmonar característica em camundongos depois de 3 a 10 dias. Entretanto, após cinco passagens, as lesões não são mais verificadas, sendo, provavelmente, explicadas pela toxidez, como em outras amostras (31).

Os vírus "asiáticos" se multiplicam em cultura de tecido de rim de macaco (10). A microscopia eletrônica dos líquidos alantóicos tem revelado a presença de corpúsculos esféricos e filamentosos (10) similares aos das amostras clássicas. A capacidade antigênica e comportamento sorológico das amostras "asiáticas" são assinaladas em outros capítulos.

EPIDEMIOLOGIA DA GRIPE

A pandemia de gripe asiática

a) histórico

O início da pandemia de 1957, provavelmente se deu no interior da China, mais ou menos em fevereiro deste ano. Os primeiros isolamentos de vírus possivelmente foram feitos pelo Dr. Chu, em Pekin, em março do mesmo ano. Daí ela se alastrou por todo o país, chegando aos portos freqüentados por estrangeiros, em abril. Na segunda quinzena de abril, ela foi constatada em Hong-Kong e Singapura, com suas características benignas e baixa ou nula mortalidade. Nesta ocasião, o vírus foi isolado e identificado pelo Prof. J. H. Hale, da Universidade de Singapura, que por meio de reações de fixação do complemento o caracterizou como pertencente ao tipo A. Este vírus foi enviado ao Centro Mundial de Influenza, em Londres, e ao Walter Reed Army Institute of Research, Army Medical Center, em Washington, (EUA) onde foi verificado tratar-se de um novo subtipo de vírus A, não relacionado com as amostras anteriormente isoladas.

Em Hong-Kong foram atingidos, a princípio, refugiados do continente, mais tarde toda a população, não havendo óbitos. Em Singapura, cerca de 10% da população foi atingida, extendendo

-se principalmente entre os nativos; a população europeia, muito pouco afetada. Um certo número de óbitos foi ali assinalado. Em Hong-Kong e Singapura, foi observado um declínio de epidemia, em maio.

Por outro lado, no Japão, na Indonésia, em Formosa, nas Filipinas, em Borneo e na Indochina, no princípio de maio, foram observados surtos epidêmicos. No Japão ela iniciou-se em Tokyo e Kioto, estendendo-se a mais de 14 prefeituras, atingindo duramente a população, incidindo, principalmente, entre escolares, en tretanto, sob forma benigna. Em tórno de 920.000 casos foram re gistrados nas Filipinas, dos quais 2.279 faleceram em consequên- cia da moléstia. Mais tarde, a propagação da epidemia se deu pa- ra sudeste e sudoeste da Ásia, afetando o golfo da Pérsia, Iran, Aden, Yemen, Pakistan e a Índia. Em princípios de junho foram ob servados casos em Karachi, no Pakistan, a princípio entre indiví- duos chegados de Singapura.

Na Índia, a presença da epidemia foi verificada primei- ramente em Madras, com cêrca de 4.000 casos, mais tarde em Bom- bain e New-Delhi. Neste período foram assinalados casos entre passageiros e tripulantes de navios que haviam aportado em regi- ões atingidas e que prosseguiram viagem para os Estados-Unidos, Aus trália e Holanda.

Na Austrália foi assinalada a presença de pequenos sur tos, importados por pessoas que chegaram viajando de avião. Por outro lado, foi anunciada pela imprensa uma epidemia em Melbour- ne.

Nos Estados-Unidos, um navio atracou em São Francisco,

em 9 de junho, com passageiros doentes, clinicamente diagnosticados como gripe, navio este procedente das Filipinas. Na costa do Atlântico, casos foram também assinalados em navio aportado em New-Port (Rhode-Island), navio este operando somente na zona do Atlântico. Vírus isolados destes casos foram identificados no Instituto "Walter Reed" de Pesquisas do Exército, como antigênicamente semelhantes ao tipo Extremo Oriente-57 (Far East-57).

Nesta época, os especialistas já estavam convictos que a variante de vírus isolada, se tornaria prevalente e certamente iria causar uma epidemia de caráter mundial.

Reuniões de especialistas consideraram as vantagens de preparo de uma nova vacina, feita com o vírus novo, levando em consideração que as vacinas existentes elaboradas com os vírus anteriormente isolados, não apresentariam proteção contra esta nova forma. Com efeito, a pandemia se fez evidente logo em seguida, surtos foram assinalados, sucessivamente, em países do hemisfério sul, na Europa e nas Américas.

Nos Estados Unidos da América do Norte, como em toda a Europa, houve surtos esporádicos desde junho de 1957, surtos estes que se faziam cada vez mais numerosos. Segundo a Associação Médica Americana, houve de 15 a 20 milhões de casos no seu país, somente entre 15 de setembro e o começo de novembro!

Na América do Sul, o Chile foi logo atingido em todo o seu território, sendo atingidas mais de 1 milhão de pessoas, das quais, 120.000 em Valparaíso. Em Santiago, cuja população é de aproximadamente 1 milhão de habitantes, houve 750.000 casos e 1.200 óbitos. A seguir, estendeu-se a pandemia à Argentina, co-

meçando e atingindo com maior intensidade as províncias andinas, vizinhas do Chile.

Quase imediatamente, anunciaram-se surtos em território brasileiro, precisamente na fronteira com a Argentina. Em poucas semanas alastrou-se por todo o território nacional, não poupando nem as afastadas regiões da Amazônia, de tão baixa densidade demográfica. O Serviço de Saúde Pública do Estado de São Paulo registrou surtos de gripe praticamente em todos os municípios do Estado.

b) Identidade da epidemia que grassou
no Brasil em 1957

A reunião dos dirigentes dos serviços de Saúde Pública Federal e estaduais dos E.U.A. que foi celebrada em 27 e 28 de agosto de 1957 estabeleceu, entre outras medidas, considerar identificado um surto de gripe quando fôsem identificados vírus de gripe e titulados anticorpos tipo-específicos nos lavados orofaringeanos e amostras "pares" de sôro, respectivamente, de não menos de 12 casos clínicos (32). No Brasil, êste requisito foi cumprido totalmente apenas na cidade de São Paulo e parcialmente nas cidades de Rio de Janeiro e Belém (Estado do Pará). Umas poucas amostras de vírus colhidas em Santos (SP) foram isoladas e tipadas pelos Drs. Moura e Souza Lopes, da Secção de Virulogia do Instituto Adolfo Lutz; em Ribeirão Preto (SP) pelo Dr. Barrachini, do Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz; em Vitória

(Espírito Santo), pela Secção de Vírus do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; em Belo-Horizonte (Minas Gerais) pelo Prof. Noronha Peres, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Minas Gerais; no Salvador (Bahia) pelo Dr. Alice, da Fundação Gonçalo Moniz; no Rio Grande do Sul, pelo Dr. Neves da Silva, do Instituto de Pesquisas Biológicas de Porto Alegre, assim como de localidades dos estados do Amazonas e Sergipe, no Instituto Evandro Chagas do SESP em Belém (Pará).

Na cidade de Rio de Janeiro foram isoladas e tipadas 18 amostras do vírus da gripe "asiática" no Instituto de Microbiologia da Universidade Nacional do Brasil, pelo Dr. Joaquim Travassos. Na cidade de Belém (Pará), foram isoladas e tipadas umas 11 amostras no Instituto Evandro Chagas, do Serviço Especial de Saúde Pública.

Na cidade de São Paulo foram isoladas e tipadas 19 amostras, na Secção de Virulogia do Instituto Adolfo Lutz, pelos Drs. Roberto A. Moura e Oscar Souza Lopes (33). Além do mais, foram pesquisados anticorpos contra diversas amostras tanto do grupo "asiático", como de outros tipos, no sêro de mais de 3.000 casos de gripe, em diversos bairros da Capital. Conjuntamente com êstes trabalhos de laboratório, realizaram-se, também, pelo pessoal do Instituto Adolfo Lutz, diversos inquéritos epidemiológicos.

Na cidade de Santos, foram isoladas e tipadas 13 amostras de vírus, tôdas tipo A "asiático", sendo tôdas isoladas dos prêsos da cadeia daquela cidade, onde também foram titulados anticorpos fixadores de complemento e inibidores da hemaglutinação

em soros. Todos êstes estudos foram realizados pelo pessoal da Secção de Virulogia do Instituto Adolfo Lutz.

Além dos trabalhos de laboratório realizados com material originário dos mais diversos lugares do Brasil, haviam evidências epidemiológicas, corroborativas dêstes trabalhos, tais como: 1) a extraordinária contagiosidade que contrastava marcadamente com a das epidemias ocorridas no país em várias décadas anteriores; 2) a rapidez com que se propagou por todo o território nacional, aparecendo, inclusive, simultâneamente em diversas zonas; 3) a marcha da epidemia no Brasil se acomodava, no tempo e no espaço, com a marcha da pandemia de gripe "asiática" pelo mundo; 4) a baixa letalidade; 5) a abundância de quadros clínicos típicos.

Como consequência dêstes fatos e argumentos, conclue-se que a identidade da grande epidemia que grassou na cidade de São Paulo com acme na última semana de setembro e as duas primeiras de outubro de 1957 está esclarecida e fora de dúvida. Como se vê, não se fez a identificação por simples especulações, baseadas apenas em características clínicas.

Considerações gerais sôbre a propagação de uma infecção no aglomerado familiar

Os modernos conceitos do mecanismo de propagação de uma infecção numa população constituem uma das grandes conquistas da epidemiologia. Clàssicamente, e continua sendo absurdamente

frequente, quando uma epidemia ocorria numa cidade ou vila, por exemplo, calculava-se a propagação da infecção, considerando em risco toda a população do conglomerado e determinando sobre esta base, o coeficiente de ataque.

Desde que Greenwood postulou que, para certos tipos de epidemia, um certo aglomerado homogêneo como o aglomerado familiar, por exemplo, era a unidade real nos estudos epidemiológicos, sabe-se que os fatos que constituem uma epidemia são a soma dos acontecimentos nos aglomerados-unidade, os quais, aliás, podem ser de vários tipos (34). Uma vez introduzida uma infecção num aglomerado-unidade, processa-se uma verdadeira "epidemia interna", independentemente do que ocorre nos aglomerados vizinhos, ainda que possa haver inter-relação. A realidade de tal postulado tem sido provada, tanto em epidemias experimentais em animais (35, 36) como em epidemias naturais em populações humanas (37-42).

Lidwell e Sommerville (37) e mais tarde Badger e colaboradores (40) demonstraram o papel decisivo que certas ocupações dos membros de um aglomerado familiar têm na propagação de uma infecção respiratória aguda neste aglomerado. Nem todos os membros desempenham o mesmo papel. Por exemplo, a condição de escolar influencia marcadamente a incidência da infecção. O coeficiente de ataque nos escolares foi alto, aproximadamente três vezes maior que o coeficiente de ataque nos adultos que moravam em aglomerados sem crianças. Quando os adultos moravam em aglomerados com crianças, o coeficiente de ataque nestes adultos era o dobro daqueles pertencentes a aglomerados sem crianças. As crianças pré-escolares não exerciam influência sobre os adultos, ape-

sar de que êles mesmos eram altamente susceptíveis. Por outro lado, os adultos femininos sofreram 50% mais resfriados que os adultos masculinos.

Êstes achados de Lidwell e Sommerville, que foram obtidos em comunidade rural, foram confirmados plenamente por Buck (42) e Badger e colaboradores (40) em grupos de população urbana de cidades grandes. Além do mais, achados essencialmente idênticos foram obtidos para infecções tão diferentes como hepatite infecciosa (38) e varíola (43). De especial interêsse é o estudo feito por Hope Simpson (41), no caso específico da gripe, onde comprovou os achados de Lidwell e Sommerville referentes ao resfriado comum, ainda que o seu estudo não tenha sido tão completo como o destes últimos.

A sua demonstração, no caso da gripe e moléstias correlatas (37, 40, 41, 42) nos levaram a utilizar êstes conhecimentos na interpretação dos acontecimentos nos aglomerados a que pertenciam os indivíduos vacinados. Mediante esta análise minuciosa do mecanismo quase íntimo da propagação intra-familiar da gripe, vimos obter maior certeza do contágio dos indivíduos vacinados que o que se obteria mediante os planos e critérios utilizados em estudos prévios da potência imunogênica da vacina anti-gripal. Por incrível que pareça, em nenhum destes estudos prévios se tem em conta os fenômenos acabados de referir. Um exame da literatura á bastará para comprovar êste acêrto.

É óbvio que, com maior certeza da ocorrência ou não de contágio, ter-se-ia um dado decisivo para a inclusão do indivíduo vacinado entre os êxitos ou entre os fracassos da vacina. A pre-

cisão do cálculo da potência imunogênica da vacina testada ficava, assim, extraordinariamente aumentada.

PROFILAXIA DA GRIPE

Considerações gerais sobre a vacina anti-gripal

A proteção contra a gripe epidêmica fornecida por vacinas inativadas, tem sido demonstrada em numerosos estudos (1-7), enquanto que em alguns casos foi relatada pouca ou nenhuma imunogênese (8). Em 1957, no estudo das medidas para combater a ameaça de epidemia de gripe "asiática" que pairava sobre os Estados Unidos da América do Norte, o serviço de Saúde Pública desse país, assim como a Associação Médica Americana consideraram a vacina como a única arma eficaz.

O consensus de opinião sobre os fatores responsáveis pela eficiência de uma vacina anti-gripal indica que os seguintes são capitais: a) quantidade adequada de vírus; b) a estrutura antigênica do vírus contido na vacina deve ser similar ou idêntica à do vírus responsável pela epidemia. Este último fator parece ser fundamental no êxito da administração (1-7) e ao mesmo tempo constitui a máxima dificuldade no preparo de uma vacina eficiente, devido a conhecida e marcada variabilidade na estrutura antigênica dos vírus da gripe, encontrados em diversas epidemias. Com

efeito, no caso de fracasso da vacina, a análise antigênica da a mostra de vírus responsável pela epidemia mostrou nítidas diferenças com a contida na vacina. Este fenômeno é mais evidente - quando se empregam vacinas monovalentes e a amostra correspondente tem a mesma estrutura antigênica que a amostra prevalente durante a epidemia (1-7). Em todos os casos em que havia correspondência entre a estrutura antigênica da vacina e a amostra responsável pela epidemia, observou-se o êxito da vacina (1-7).

Na ocasião da pandemia de 1957, a dificuldade em obter vacinas eficientes era mais evidente, porquanto as amostras isoladas diferiam acentuadamente das anteriores, especialmente das amostras classicamente incorporadas às vacinas anti-gripais, como a "PR8" e a "Lee". Este fenômeno era observado tanto no caso da vacina, como no das reações sorológicas empregadas no diagnóstico de casos clínicos e identificação das amostras isoladas.

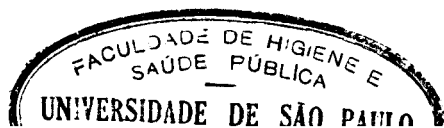
Considerações gerais sobre testes de vacinas

A avaliação da capacidade de proteção de uma vacina se faz, na prática, segundo três métodos. Um destes consiste em comparar a incidência da infecção entre os vacinados e os não vacinados. Outro método consiste em medir a resposta em anticorpos - conseqüente a vacinação. Este é, na realidade, um teste de potência antigênica. O emprêgo simultâneo do primeiro e segundo métodos constitui o terceiro método, obviamente o mais completo e eficiente. O terceiro método foi empregado no presente estudo.

O primeiro método é, obviamente, o mais lógico, porquanto este teste de potência imunogênica da vacina mede, precisamente, a proteção contra a moléstia tal como se manifesta - quando o indivíduo vacinado é infectado. Em outras palavras, trata-se de um método direto, no qual a medida é feita em função do fim precípuo da vacinação.

Entre as desvantagens do primeiro método pode-se apontar a necessidade de que o indivíduo vacinado seja contagiado. Este contágio pode tardar em realizar-se e até pode não ocorrer, inclusive durante uma epidemia. Aqui está, precisamente, o ponto fraco do método, já que resulta difícil definir a "população em risco", ou seja, quais indivíduos sofreram, na realidade, "contato efetivo" (~~"contágio"~~). Esta deficiência é de capital importância, porquanto a inclusão de indivíduos que não foram contagiados entre os casos de êxito da vacina, ou seja, entre os imunizados pela vacina, daria lugar a erros óbvios no cálculo do poder imunogênico da mesma. Esta poderia ser uma explicação dos fracassos da vacina anti-gripal observados por alguns autores (8). Outros relataram êxitos (1-7), ainda que geralmente atribuídos à estrutura antigênica das amostras empregadas na vacina (1-7).

O segundo método consiste na medição da resposta em anticorpos nos vacinados. Este método, muito mais simples e econômico que o primeiro método, se baseia no paralelismo entre a resposta em anticorpos do vacinado e a sua resistência às manifestações clínicas da infecção quando contagiado. Este paralelismo foi observado, por exemplo, no caso da vacina contra a



gripe (28) e da vacina contra a poliomielite (44). Porém, estudos minuciosos e acurados demonstraram que, infelizmente, é feito de um modo muito geral, apenas, e que existem consideráveis variações individuais na resposta em anticorpos a um estímulo antigênico. Além do mais, é provável que, no mesmo indivíduo ocorram variações, segundo estados funcionais. A experiência de Schmidt e Lennette (45) merece especial destaque. Estes pesquisadores notaram que 3 de 51 indivíduos com poliomielite paralytica e de cujas fezes foi isolado o vírus correspondente, não apresentavam resposta titulável em anticorpos e, se titulável, não era significativa. Ainda no caso da poliomielite, infecção muito estudada, sabe-se que pode haver resistência sem anticorpos circulantes, assim como haver susceptibilidade em presença de títulos relativamente altos de anticorpos (46).

O segundo método não tem emprego correto no caso das vacinas novas, cuja eficiência não está demonstrada. Neste caso, o terceiro método é o adequado. Porém, quando uma vacina tem sido testada mediante "field trials" (primeiro método), o segundo método fica para o teste dos lotes de vacina fabricados antes de serem empregados na vacinação regular ou rotineira. Assim, as provas de potência antigênica da vacina anti-pertussis, por exemplo, são realizadas em camundongos, antes de ser a mesma posta em circulação, uma vez que a sua capacidade protetora esteja fundamentalmente comprovada (47). No caso da vacina anti-gripal empregam-se testes sorológicos (dosagem do título hemaglutinante, etc.) e de proteção no camundongo, além dos testes de inocuidade que visam outros fins (ver cap. correspondente nesta Tese).

Capítulo II
PLANO DOS TRABALHOS PRÁTICOS

Critérios básicos empregados no planejamento
dos trabalhos práticos

Tendo em conta os princípios gerais de Epidemiologia e de testes de vacinas, assim como as características da gripe e do seu agente causal, a que acabamos de nos referir, podemos apresentar as seguintes premissas que serviram de base para o delineamento das experiências e trabalhos e, ainda, para a análise dos resultados consequentes:

- a) A gripe é considerada, unânimemente, como doença transmitida por contato de pessoa a pessoa;
- b) A gripe "asiática" foi extremamente contagiosa;
- c) no aglomerado familiar, a "misturação" dos diversos membros é das mais homogêneas (48);
- d) o aglomerado familiar representa probabilidade, das maiores, para o contágio por contato pessoal (39);
- e) como a gripe "asiática" foi extremamente contagiosa e como o aglomerado familiar representa probabilidade das maiores para o contágio, podia se considerar que, quando a gripe foi introduzida no aglomerado familiar a que pertencia o indivíduo vacinado, êste e o seu contrôlo estiveram em risco de serem infectados;
- f) quando o indivíduo vacinado era um adulto que morava com a sua família, um contrôlo adequado seria outro membro adulto da sua família, de idade similar e sem vacinar. O cônjuge do vacinado preenchia êstes requisitos, ainda que fôs-

se preferível outro adulto do mesmo sexo e com as mesmas relações físicas com as crianças. Este último é difícil de encontrar no aglomerado familiar;

g) um inquérito epidemiológico nos aglomerados aos quais pertenciam os indivíduos vacinados, forneceria dados a respeito da propagação da gripe dentro de cada aglomerado. Assim, se o vacinado e o cônjuge não vacinado não padeceram a doença, a contagem do vacinado entre os êxitos da vacina poderia representar erro, pois se este indivíduo não padeceu a doença, apesar de seus contactos com crianças infectadas, por exemplo, tão pouco o cônjuge não vacinado o fez;

h) a normalidade ou anormalidade do padrão de distribuição ("distribution pattern") da gripe no aglomerado familiar indicaria a inclusão ou exclusão do aglomerado nos cálculos do "êxito" ou "fracasso" da vacina;

i) como enfermeiras do Hospital das Clínicas constituíam parte importante da amostra dos vacinados, o prédio da Escola de Enfermagem seria considerado como uma grande casa habitada por numerosa família. Com efeito, os refeitórios, salas de visitas e de aulas, sanitários, etc., são compartilhados de uma maneira idêntica ao que acontece nos aglomerados familiares ordinários. Como cada enfermeira mora em um quarto, seus contrôles seriam outras enfermeiras, habitantes de quartos vizinhos e não vacinadas, naturalmente. Desta maneira, obteve-se um contrôle, o melhor possível, dentro das circunstâncias.

Plano dos trabalhos práticos

Sumariamente, as experiências e os trabalhos constantes da presente tese, consistiram dos seguintes elementos:

1) 131 adultos, funcionários da Saúde Pública, foram vacinados em 4-9-57, com uma vacina preparada no Instituto Butantan com a amostra A/Japan/305/57. Um ml ("cc") foi injetado subcutâneamente, o que equivale a 200 unidades hemaglutinantes ("CCA").

2) 21 dias depois, 19 daqueles indivíduos foram revacinados com a mesma quantidade e pela mesma via.

3) sangue foi colhido de todos os vacinados no dia da vacinação. Vinte e um dias depois, foi colhido sangue de 101 destes voluntários. Vinte e um dias depois desta segunda sangria, foram sangrados de novo os 19 indivíduos que foram revacinados.

4) foram feitas as reações de fixação de complemento e inibição da hemaglutinação em cada um dos soros colhidos, usando-se as amostras A/Formosa/313/57 e A/Japan/305/57 como padrões.

5) um inquérito epidemiológico foi realizado nos aglomerados de populações a que pertenciam os vacinados para determinar o padrão de distribuição ("distribution pattern") da gripe.

6) após o agrupamento dos dados em forma conveniente, foi determinada: a) a incidência da gripe nos vacinados e

nos seus contrôles e o correspondente cálculo da potência imunogênica da vacina; b) foi feito um paralelo entre a incidência da gripe e os títulos de anticorpos circulantes.

Discussão do plano

As circunstâncias prevalentes no início dos trabalhos, determinaram a constituição de uma amostra de indivíduos que não era a ideal, porém, permitiu tirar conclusões de interesse prático.

Tínhamos a necessidade de grande cooperação por parte dos indivíduos a serem vacinados e sangrados. Tal grau de cooperação, especialmente em ambiente de incredulidade como o que prevalecia antes da epidemia, só pode se obter de adultos com um preparo cultural e técnico apropriado, como é o de profissionais da Saúde Pública: médicos, enfermeiras, visitadoras sanitárias e funcionários da Faculdade de Higiene ou ligados a esta Faculdade pela natureza do seu serviço. Isto limitou, naturalmente, o tamanho da amostra (número de indivíduos) e determinou um caráter "selecionado" da mesma. Com efeito, os componentes eram adultos com uma profissão definida, que estava ligada intimamente ao controle da epidemia. As limitações derivadas do caráter selecionado e do número de indivíduos não eram "atuantes" ("operative"), na realidade, pelas razões seguintes: a) não havia imunidade naturalmente adquirida de grupos etários ou profissionais de qualquer espécie. Com efeito, a duração da

imunidade na gripe é, unânimemente, considerada muito curta - nunca sendo duradoura. Além do mais, as amostras "asiáticas" eram de recentíssimo aparecimento e devido a sua peculiar estrutura antigênica não podia existir imunidade prévia contra a gripe "asiática" nos grupos de população utilizados nas experiências. Assim, desaparece a objecção de amostra selecionada, pois não importava, como acabamos de vêr, que os vacinados fôsem a dultos pertencentes a um determinado grupo profissional; b) a escassíssima produção de vacina e a urgente necessidade da mesma para proteção do pessoal do Governo limitavam extraordinariamente o número de pessoas a vacinar nas presentes experiências. Ora, o tamanho da amostra, limitado por estas razões, - tão pouco constitue objecção, dado que o trabalho em aprêço era, na realidade, um teste de apenas um lote de vacina. Portanto, o tamanho da amostra (número de indivíduos) era suficiente; apenas que por tratar-se de um estudo acadêmico, realizou-se o teste com o rigôr, minuciosidade e amplitude de um trabalho de alta envergadura, que visasse um objetivo geral, como a demonstração da existência de um agente profilático eficiente contra uma infecção. De fato, mencionamos no preâmbulo que os trabalhos apresentados nesta tese, constituíam apenas exemplos práticos para ilustrar a análise de tema geral.

Outra limitação aparente dos dados obtidos no presente estudo e ainda do seu delineamento, consiste no fato de que a amostra contrôlle não foi extraída do mesmo grupo profissional que a amostra a ser vacinada. Entre outras razões, isto conteceu porque dentro do tal grupo extraímos o máximo possível.

de voluntários para as vacinações e sangrias, sendo que este número ainda não era grande. Por esta razão, não pudemos extrair uma amostra controle do mesmo grupo profissional. Por outro lado, por incrível que pareça, à primeira vista, a amostra controle ideal não devia ser extraída do mesmo grupo!!! Com efeito, um controle mais correto se obteria na pessoa do cônjuge do vacinado, pois acabamos de assinalar que as probabilidades de adquirir o contágio no aglomerado familiar são praticamente as mesmas para ambos. Isto não ocorreria no caso de o controle ser outro membro do mesmo grupo profissional, pois as probabilidades de contágio são muito menores no local de trabalho que no aglomerado familiar. Por exemplo, se no aglomerado do vacinado ocorreu a gripe, no aglomerado do colega de profissão, não vacinado, podia não ter ocorrido. Assim, enquanto o vacinado estaria em risco de adquirir a infecção, o seu controle não estaria em risco. Isto, naturalmente, viciaria os cálculos. Daqui a nossa idéia de escolher comomo controle um membro do mesmo aglomerado familiar, que tivesse o mesmo risco que o vacinado. Obviamente, assim se aumentaria a precisão dos cálculos da eficiência da vacina, como já assinalamos.

A falta de recursos materiais e técnicos que sofremos no início dos trabalhos, também determinou limitações no delineamento do estudo. Parte destas limitações desaparecera com o decorrer do tempo, porém, quando a epidemia e, portanto, a oportunidade correspondente, já tinha passado. Assim, o momento em que foi possível obter a vacina para nossas experiências foi fator determinante de limitações, já que o momento do início

das experiências resultou ser bem próximo do acme da epidemia.

Devemos ressaltar que, no momento em que foram iniciados os trabalhos constantes desta Tese, não existiam trabalhos publicados sobre uma vacina contra a gripe "asiática", pelo menos, no conhecimento do autor. Haviam apenas informes confidenciais do "Communicable Disease Center" do Serviço de Saúde Pública dos E.U.A. que testes em pequena escala estavam sendo feitos, sem que se apresentassem, naturalmente, detalhes dos mesmos. Posteriormente, quando esta Tese foi entregue para publicação, tinham aparecido alguns trabalhos sobre a matéria(49,-52).

Em alguns testes de vacinas, como o já clássico da vacina Salk contra a poliomielite realizado em 1954, empregou-se um grupo controle que recebeu a injeção de material sem atividade nenhuma ("placebo"). Porém, isto não constitui limitação da significância do teste, pelas seguintes razões: a) no caso do teste da vacina Salk, nunca tinha sido empregada uma vacina contra a poliomielite em seres humanos. No caso da gripe, já tinha sido demonstrado convincentemente através de numerosos trabalhos que era possível obter proteção contra esta infecção, mediante vacinas preparadas com vírus inativado (1-7); b) o uso do "placebo" foi, na opinião dos planejadores da experiência de 1954, um aprimoramento do delineamento. Esta opinião não foi compartilhada por numerosos pesquisadores, que fizeram severas críticas ao emprego de um grupo controle inoculado com "placebo" (53); c) um dos argumentos a favor do "placebo" tinha sido que, entre os controles não inoculados, havia nume-

rosos indivíduos que tinham se recusado a participar da experiência. Pesquisas epidemiológicas indicaram que êstes indivíduos eram mais resistentes à poliomielite que os que cooperaram. O emprêgo daqueles como controle introduziria, portanto, um "bias"; d) no presente trabalho, os contrôles entraram inadvertidamente na experiência, porquanto não foram vacinados e se tratava de convivas dos vacinados. A possibilidade de "bias", principal argumento a favor do "placebo", não existia portanto, no presente trabalho.

Os vacinados recebiam proteção contra a gripe em troca da sua cooperação. Por outro lado, grande probabilidade de recusas seriam esperadas se um grupo recebendo o "placebo" fosse organizado.

A resposta em anticorpos à vacina foi estudada sangrando os vacinados em diversas datas, como já mencionamos. A primeira sangria, realizada antes da vacinação, servia de controle. Os títulos dos soros obtidos na segunda sangria, quando comparados com os títulos da primeira, forneciam uma medida da resposta à vacina.

Um segundo controle, consistindo de titulagens feitas em datas correspondentes, mas em soros de indivíduos não vacinados era, evidentemente, um aprimoramento do delineamento. Porém, as dificuldades derivadas dos limitados recursos disponíveis, especialmente a escassez marcada de voluntários pertencentes ao mesmo tipo de população (grupo profissional), não permitiram realizar tão interessante estudo. Além do mais, o objetivo principal era o teste de potência imunogênica e não o tes

te de potência antigênica. Este último era, obviamente, de significância muito mais restrita que o primeiro teste, sendo, na realidade, um complemento do primeiro. Ainda deve-se ressaltar que, como a epidemia era causada por amostras antigênicamente diferentes das anteriores e de recente aparecimento, não se podia esperar a presença de anticorpos contra as tais amostras no sôro dos indivíduos não vacinados, antes de a epidemia atingir São Paulo.

Capítulo III
MATERIAIS E TÉCNICAS

Material de estudo

a) descrição da amostra de população

A amostra de população utilizada em nossas experiências é constituída de indivíduos adultos, de ambos os sexos, as sim distribuídos:

Quanto ao número, 75 do sexo masculino e 56 do se xo feminino.

Quanto à idade, estavam dentro duma zona etária en tre 18 e 70 anos, tendo por média 33,7 anos.

Entre as raças representadas, houve grande predomi n ância da raça branca, entretanto um pequeno número de repre s entantes de outras raças, também fêz parte.

Quanto à profissão, todos trabalham em misteres de Saúde Pública e Enfermagem. Foram professores, médicos, educa do res sanitários, técnicos de laboratório, enfermeiras e funcio n ários diversos, todos pertencentes, seja à Faculdade de Higie n e, seja à Escola de Enfermagem.

b) a vacina

A vacina usada foi recebida da Secção de Vírus do Ins ti tuto Butantan, preparada pelo Dr. A. Vallejo Freire, do qual

recebemos a seguinte informação:

Amostra empregada.-

A/Japan/305/57, recebida da Organização Mundial de Saúde.

Técnica de preparo da vacina.-

Inoculados os ovos embrionados na cavidade alantóide pela técnica usual, os líquidos alantóicos eram colhidos e aqueles apresentando um título hemaglutinante de não menos de 1/80, eram passados pela Supercentrífuga (Sharples), a 50.000 r.p.m., com um rendimento de 700-1.000 ml por hora. O resíduo que ficava no cilindro-rotor era extraído por agitação com pérolas e solução tampão, obtendo-se normalmente um concentrado com títulos de 1/1.280 até 1/5.120.

Este concentrado era conservado em geladeira durante 7 dias, acrescentado de formol a 2/1.000 e feitas as provas de esterilidade preliminares. Depois era diluído com solução tampão-fosfato para obtenção de um título final da vacina de 1/200 a 1/400.

A vacina final ficava sempre com menos de 0,25/1.000 de formol e com 1/10.000 de mertiolato. A distribuição era feita com seringas automáticas de válvulas de mercúrio, em frascos de 3ml (3 doses), fechados com rolhas de borracha e tampas de alumínio.

Antes da distribuição para uso, era submetida aos seguintes controles:

Ausência de vírus vivo: duas técnicas eram usadas.

a) Inoculação em camundongos: 10 animais eram inoculados por via intranasal com 0,5 ml. Observação durante 10 dias e necropsia para verificação de ausência de lesões pulmonares, ("consolidação").

b) Inoculação em ovo: 8 ovos eram inoculados com cada uma das diluições seguintes: 1/1000, 1/100, 1/10 e vacina pura, colheita depois de dois dias, dosagem dos líquidos obtidos e nova inoculação nas mesmas condições. Dois dias depois, nova dosagem do líquido colhido, pela hemaglutinação.

Identidade

Era feita pela prova de inibição específica da hemaglutinação, usando-se sêro padrão diluído a 1:32.

Dosagem das unidades "CCA" ("chicken cell agglutination").

Prova de aglutinação em diferentes diluições, perante uma concentração de hemácias a 1,5%.

Prova de inocuidade

Feita pela inoculação de 3 ml em 3 cobaias de 300 g, por via subcutânea e 3 camundongos de 20 g, com 0,5 ml, pela mesma via, observados durante 10 dias.

Prova de esterilidade

Semeaduras foram feitas nos seguintes meios:

Meio de Sabouraud, em temperatura ambiente; meios de tioglicolato, agar-simples, caldo glicosado e Tarozzi a 37°C e a temperatura ambiente.

Número de provas

Esterilidade: antes e depois da distribuição. Inocuidade: após a distribuição. Ausência de vírus vivo: antes da

distribuição. Dosagem das unidades "CCA": antes e após a distribuição. Identidade: só com **as sementes** e algumas parti-das.

Sementes preparadas no Instituto Butan-

tan e usadas para o preparo de vacinas contra a gripe

As seguintes amostras foram recebidas e usadas em diferentes lotes de vacina:

Japan P₂C 11-7 proveniente do Inst. Adolfo Lutz (Dr. R. A. Moura)

A/Japan/305/57 proveniente da Organização Mundial de Saúde.

A/Japan/305/57 E, F, M₃ E8 prov. da Org. Mundial de Saúde.

A/Formosa/313/57 da mesma procedência.

Destas, a A/Japan/305/57 foi isada na partida que nos foi fornecida para nossos testes, como já mencionamos.

Conservação da vacina

As vacinas, imediatamente após o preparo, eram mantididas em geladeira no Instituto Butantan. Para as experiências - foram conservadas na Faculdade de Higiene da mesma maneira, até o momento do uso.

Administração da vacina

A vacina foi administrada subcutâneamente, no braço, na quantidade de 1 ml contendo 200 unidades "CCA" (unidades he maglutinantes). No dia 4 de setembro de 1957, foram vacinados 131 indivíduos. No dia 25 do mesmo mês, isto é, 21 dias depois, foram revacinados com a mesma quantidade e pela mesma via, 19 daqueles voluntários.

Técnica do inquérito epidemiológico

A técnica usada foi, basicamente, a da "entrevista - pessoal", colhendo os dados de um informante pertencente ao aglomerado familiar onde um membro foi vacinado. Geralmente, o informante era o próprio indivíduo vacinado.

Os quesitos que constituíram o inquérito foram derivados de recentes estudos de epidemiologia de moléstias respiratórias agudas em geral (40, 42) e de resfriado comum, em particular (37). O brilhante estudo de Lidwell e Sommerville(37) forneceu a orientação básica, porquanto esta equipe, constituída por um epidemiologista e e um estatístico, fêz a análise ~~mais~~ aprofundada do mecanismo de transmissão de uma moléstia respiratória aguda, que pode ser encontrada na literatura. Estes autores, como mencionamos anteriormente, demonstraram o papel da escola primária como fonte de "introdutores" do resfriado co-

mum nos aglomerados familiares, assim como evidenciaram que a transmissão da doença se efetuava no aglomerado familiar praticamente com independência do que ocorria em aglomerados vizinhos. Além do mais, demonstraram o papel decisivo que certos tipos de ocupação têm na transmissão intra-familiar do resfriado comum. Este fenômeno parece ocorrer também na gripe, segundo Hope-Simpson (41).

O questionário do inquérito consistiu de dados referentes ao indivíduo, como idade, raça, sexo, ocupação, assim como de dados sobre a composição do aglomerado familiar. Esta composição exerce influência decisiva na propagação duma infecção no aglomerado familiar, (37, 38), como acabamos de mencionar. Assim, se inqueria o número de componentes e quantos destes eram pré-escolares, quantos escolares e quantos adultos; assim como quantos indivíduos em cada uma destas categorias padeceram a gripe.

A diferença do caso de Lidwell e Sommerville (37), não nos interessava o "coeficiente de introdução" da infecção no aglomerado familiar e sim o "padrão da distribuição" desta, ou seja, quês membros de cada categoria epidemiológica padeceram a infecção. Assim, podia se conhecer se a propagação da infecção gripal foi normal e se atingiu o vacinado e os seus contrôles. O primeiro resultado desta análise era a determinação da inclusão ou exclusão desse aglomerado nos cálculos, ou, o que é o mesmo, do vacinado e os seus contrôles desse aglomerado. Uma vantagem adicional deste critério era obter informação sobre a validade de cálculos prévios da potência imunogênica de outras

vacinas contra a gripe, ou, em geral, contra qualquer infecção.

Critérios clínicos de gripe

O método de avaliação, mediante a comparação da incidência da gripe nos vacinados e não vacinados, supõe a identificação ou diagnóstico desta moléstia. Na maioria dos estudos sobre avaliação de vacinas contra a gripe (1-7) empregaram-se critérios clínicos. Em raros casos atingiu-se um nível maior de precisão que o proporcionado por estes critérios. Em poucos trabalhos empregaram-se critérios etiológicos (diagnóstico de certeza) tais como titulação de anticorpos específicos (54). Philip e colaboradores (55) aperfeiçoaram ainda o diagnóstico etiológico, realizando o isolamento, identificação e tipagem das amostras de vírus da gripe presentes na orofaringe dos indivíduos com manifestações clínicas.

No presente trabalho, não dispúnhamos de facilidades para isolamento do vírus. Porém, o nível de precisão de diagnóstico atingido foi comparável ao máximo até agora empregado pelas seguintes razões: a) nos estudos publicados, aproveitaram-se pequenas epidemias para a avaliação. Ora, a etiologia de tais epidemias é de difícil identificação, mormente por métodos clínicos, porquanto outros vírus, os adenovírus, por exemplo, ou bactérias como estreptococos poderiam ser responsáveis. b) no presente caso, tratava-se de uma grande epidemia que ob-

viamente fazia parte de uma pandemia. Esta última apresentava características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais extremamente típicas, comprovadas através de numerosos trabalhos tanto nacionais como estrangeiros; c) a resposta imunitária (anticorpos circulantes) de várias centenas de casos clínicos típicos, moradores em diversos bairros da cidade de São Paulo, assim como alguns isolamentos de vírus, eram conclusivos neste respeito (56); d) as relações de tempo e lugar das epidemias "intra-familiares" ocorridas nos aglomerados a que pertenciam os vacinados com a epidemia geral na cidade de São Paulo.

A etiologia desta epidemia ficou convenientemente demonstrada pelas razões expostas no Capítulo I. Além do mais, a epidemia foi, na cidade de São Paulo, de muito curta duração, o seu acme bem delimitado e a contagiosidade elevadíssima característica da gripe "asiática".

Após êstes antecedentes, podemos nos referir especificamente ao tema do presente epígrafe. Considerou-se que um indivíduo era um caso de gripe, quando na ausência de antecedentes sugestivos de outra etiologia, apresentava um síndrome, de curta duração, constituído por: febre, calafrios, dores de cabeça, dores generalizadas, prostração e sobretudo um síndrome agudo do aparelho respiratório superior, que às vezes continuava-se com manifestações bronco-pneumônicas. Êste síndrome consistia de coriza, tosse, angina e congestão ocular. Além do mais, êste síndrome ocorria freqüentemente em vários membros do mesmo aglomerado, assim como de aglomerados vizinhos, durante o período do acme da epidemia identificada através de traba

lhos de laboratório realizados no Instituto Adolfo Lutz (56).

Como já mencionamos, existem numerosas infecções e síndromes respiratórios agudos, capazes de simular a gripe. Os adenovírus (vírus RI, APC ou ARD), por exemplo, podem causar quadros respiratórios agudos febris (57). Além do mais, a sintomatologia da gripe pode ser simulada por grande número de infecções, quer no início destas, quer na totalidade do quadro clínico. Assim, os pródromos da varíola, varicela, etc., podem ser idênticos a uma gripe típica. O quadro clínico da poliomielite, infecções pelo vírus ECHO e Coxsackie, etc. pode ser idêntico ao da gripe.

A gripe é uma infecção causada especificamente por um vírus (58). Porém, nenhuma das suas manifestações clínicas é patognomônica. Isto é certo em sentido geral e se aplica especialmente aos casos isolados ou esporádicos, em cujos casos o isolamento, identificação e tipagem do vírus, assim como a titulação de anticorpos, certificam o diagnóstico.

No caso de epidemia, especialmente quando numa localidade aparece grande número de casos clinicamente típicos em um período relativamente curto, o diagnóstico clínico adquire valor quase conclusivo, porquanto as probabilidades de erro são muito poucas, neste caso. Além do mais, nos estudos epidemiológicos tem que se admitir, forçosamente, a possibilidade de existirem erros inerentes à técnica. A comprovação individual de cada caso é praticamente impossível. Por outro lado, o fato de que nos estudos epidemiológicos manipulam-se quantidades de casos e não simples casos individuais, fazem com que o erro se

"dilua", de tal maneira que as conclusões finais apresentem uma margem de erro relativamente pequena e comparável a de outros estudos biológicos.

A probabilidade de erro é a mesma para os dois grupos: vacinado e não vacinado.

Técnicas de estudo da resposta imunitária

a) sangrias

Foram retirados 20 ml de sangue, nas veias da dobra do cotovelo de 131 voluntários, no mesmo dia da vacinação, ou seja, a 4 de setembro de 1957. Uma segunda sangria foi feita em 101 dos voluntários vacinados, a 25 de setembro, ou seja, 21 dias após a primeira. Em 15 de outubro, ou seja, 21 dias após a segunda sangria, foi feita uma terceira em 19 dos voluntários. Estes tinham sido revacinados justamente após a segunda sangria.

b) preparo e conservação dos soros

Os sangues coletados eram mantidos à temperatura ambiente até à tarde, quando ficavam guardados na geladeira até o dia seguinte. Eram então centrifugados e os soros colocados, imediatamente, no congelador, a mais ou menos -20°C e aí mantidos até o dia das provas.

c) Reações sorológicas

Considerações gerais sobre a fixação de complemento e a inibição da hemaglutinação.

A reação de fixação de complemento com o vírus da gripe pode ser causada por dois antígenos diferentes. Um destes está ligado intimamente ao corpúsculo elementar, ou seja, à partícula de vírus, sendo inseparável do mesmo. Este antígeno proporciona fixações de complemento de alta especificidade, onde, ultrapassando-se a especificidade de tipo, atinge-se a especificidade de amostra. Este fenômeno permite minuciosas análises de estrutura antigênica similares às obtidas nas reações de neutralização e inibição da hemaglutinação.

Mediante métodos físico-químicos é possível separar das partículas de vírus da gripe, um antígeno, também fixador de complemento (59) e que apresenta as características dos antígenos solúveis de outros vírus. Este antígeno, muito menor em tamanho que a partícula de vírus, é diferente em muitos aspectos do antígeno referido anteriormente, que não é separável da partícula de vírus. A especificidade do antígeno solúvel vai apenas até o tipo, não permitindo a diferenciação entre as amostras, pois não evidencia pequenas diferenças na estrutura antigênica.

Segundo Wiener e colaboradores (60) parece que o antígeno solúvel representa apenas fragmentos ou produtos da desintegração da partícula do vírus. Do anterior, infere-se que

os resultados da fixação de complemento são comparáveis com os da neutralização e a inibição da hemaglutinação, quando o antígeno empregado fôr o inseparável da partícula de vírus, mas não quando fôr o antígeno solúvel (61).

Hirst (62) e simultâneamente, McClelland e Hare (63) descobriram o fenômeno de aglutinação de hemácias pelo vírus da gripe. Posteriormente, foram se adicionando novos vírus à lista dos que possuem esta propriedade. Hirst (64) também descobriu que a hemaglutinação era um fenômeno quantitativo e descreveu uma técnica para dosar a quantidade de vírus da gripe, porquanto existia proporcionalidade entre o fenômeno e o número de partículas de vírus, pelo menos, em determinadas condições.

Hirst (65) assim descreveu sinteticamente o processo: o primeiro estágio da aglutinação de hemácias consiste na adsorção do vírus pelas hemácias; o segundo é a aglutinação propriamente dita, ou seja, a formação de agregados de hemácias e o terceiro estágio é a "eluição", ou seja, a separação do vírus das hemácias.

A hemaglutinação se manifesta com hemácias de grande número de espécies animais. Porém, as de galinha são as mais úteis e, portanto, as mais utilizadas nas reações. Entre as hemácias de mamíferos, as mais empregadas são as humanas e as de cobaia (66).

A aglutinação de hemácias pelo vírus da gripe pode ser inibida quando o vírus é misturado com sôro imune e a mistura é posta em presença de hemácias. O título obtido nesta i

nibição é comparável ao título do anticorpo neutralizante do sôro imune. Isto constitui o fundamento de utilíssima técnica sorológica. Deve-se assinalar que os anticorpos neutralizantes e os inibidores da hemaglutinação não são idênticos.

A hemaglutinação causada pelo vírus da gripe, pode também - ser inibida por sôro normal e por sôro imune contra outros vírus, porém, a títulos relativamente baixos (64). A substância responsável por esta inibição não é, porém, um anticorpo. Trata-se ao parecer de uma muco-proteína (67) presente em diversos líquidos e tecidos orgânicos e que recebe o nome de "inibidor inespecífico" (68-71).

Peculiaridades das titulagens de anticorpos contra o vírus da gripe.

Os resultados das reações sorológicas e, conseqüentemente, a sua interpretação, caracterizam-se por diversas peculiaridades que complicam extraordinariamente não só a prova em si, como a interpretação dos seus resultados. Assim, êstes resultados vão depender não só da estrutura antigênica da amostra de vírus causadora da infecção em estudo, como da estrutura antigênica da amostra empregada como padrão na reação. Os títulos obtidos, no mesmo sôro, com uma amostra padrão, podem diferir marcadamente daqueles obtidos com outra amostra. Êste fenômeno pode chegar a mascarar completamente uma resposta, na realidade muito marcada (72). Daí ser aconselhável o emprêgo

de duas ou mais amostras, independentemente, nas provas sorológicas. Além do mais, o melhor é utilizar amostras recentemente isoladas, preferivelmente amostras obtidas durante a própria epidemia em estudo. Do contrário, obter-se-iam falsos resultados negativos. No presente estudo, tivemos bem em conta estes fatos, como se pode vêr na descrição dos padrões utilizados.

Comportamento sorológico das amostras do subgrupo A "asiático"

Muitos dos vírus "asiáticos" têm se mostrado sensíveis aos inibidores inespecíficos encontrados nos soros, dificultando, assim, a interpretação dos resultados das provas de inibição da hemaglutinação. O tratamento dos mesmos com tripsina, periodatos ou extrato de vibrião colérico não tem removido os inibidores (10). Porém, duas amostras, A/Japan/305/57 e A/Formosa/313/57, não têm mostrado este inconveniente (9, 10). Estas duas amostras foram, precisamente, as empregadas como padrões no presente estudo.

Os testes sorológicos realizados com os vírus "asiáticos" têm demonstrado, em convalescentes, títulos baixos de anticorpos (10). Isto seria devido ao fato de se tratar de uma resposta imunitária em face de um novo antígeno ou a um comportamento especial em relação aos testes de inibição da hemaglutinação.

Em alguns casos, onde não se evidenciou a presença de anticorpos pela prova de inibição da hemaglutinação, estes fo-

ram revelados pela prova de fixação de complemento usando a mesma amostra (10). Conseqüentemente, impõe-se a necessidade de ambas as provas serem usadas. Assim é feito no presente trabalho, ao se estudar a antigenicidade da vacina testada.

Técnicas de fixação do complemento e inibição da hemaglutinação usadas.

Para as provas de fixação do complemento e de inibição da hemaglutinação foram utilizadas as técnicas recomendadas pela American Public Health Association para diagnóstico sorológico da gripe. (73).

Antígenos empregados.

Amostra A/Formosa/313/57. Esta amostra foi isolada em Taiwan (ilha de Formosa) por pesquisadores do Taiwan Serum Vaccine Laboratory e remetido ao "Walter Reed Army Institute of Research - Army Medical Center, Washington D.C. (E.U.A.)

Amostra A/Japan/305/57. Foi isolada de um militar americano em Zama, Japão, pelos Drs. Grossberg e Gresser, que utilizaram ovos embrionados para êsse fim.

Recebemos o material empregado como antígeno do Dr. A. Vallejo Freire, da Secção de Vírus do Instituto Butantan, o qual, pela sua vez, recebeu maior quantidade do mesmo material através da Organização Mundial de Saúde.

As amostras que empregamos como antígenos nas rea-

ções sorológicas não são sensíveis aos inibidores inespecíficos (9, 10). Ambas também diferem das outras amostras "asiáticas", em que produzem elevados títulos hemaglutinantes na inoculação na cavidade alantóide do ovo embrionado (10). De acôrdo com Meyer e colaboradores (9) e Jensen (10) "estas duas amostras de vem ser utilizadas em trabalhos de diagnóstico".

Capítulo IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO INDIVIDUAL

O teste de potência imunogênica

Considerações gerais.

O teste da capacidade protetora de uma vacina baseia-se, como mencionamos anteriormente, na comparação da incidência das manifestações clínicas nos vacinados e nos não vacinados. A magnitude desta diferença mede a potência imunogênica da vacina testada.

Nas tentativas para encontrar uma possível diferença no comportamento dos vacinados e dos seus contrôles, apelamos a diversos artifícios no agrupamento dos dados m subdividindo-os ou adicionando-os segundo certas características. Estas características seriam, naturalmente, aquelas que, de acôrdio com os conhecimentos existentes sôbre a vacinação contra a gripe ou segundo a Lógica Inferencial, poderiam influenciar o fenômeno em estudo.

Assim, nas Tabelas 5 até 12, realiza-se a comparação da incidência da gripe nos vacinados e nos seus contrôles. Enquanto na Tabela 5, por exemplo, apresentam-se dados "em bruto", ou seja, sem discriminação, já, na Tabela 6 os contrôles são todos pertencentes a uma mesma categoria epidemiológica: adultos, à qual também pertencem os vacinados. Elimina-se, assim, a possível interferência do fator "ocupação", que proporciona um risco de contrair a infecção dife-

rente nos adultos, nos escolares e nos pré-escolares (37,38, 40).

Cuidados especiais na técnica de comparação das incidências foram utilizados. Podemos ressaltar a inclusão nos dados, de apenas os indivíduos com reação de fixação de complemento ou de inibição da hemaglutinação negativas, ou melhor, com ambas negativas. Desta maneira, nos preveníamos contra falsos "êxitos" da vacina que seriam devidos, na realidade, a resistência provocada por infecção anterior à vacinação.

Outro cuidado consistiu em utilizar duas amostras "Asiáticas" como antígenos nas reações sorológicas, permitindo, assim, evidenciar casos em que existia negatividade, das reações com um dos antígenos e positividade com o outro. O uso de um antígeno único, poderia acarretar a inclusão de falsos "êxitos" da vacina nos dados, porquanto a infecção prévia poderia não ser evidenciada pela amostra empregada como antígeno.

Critérios de "êxito" ou "falha" da vacina em aprêço.

Considerar só como "falhas" os casos ocorridos 14 ou mais dias. Outros consideram só 10 dias. Porém, no presente caso a vacina continha apenas duzentas unidades CCA enquanto que nos mencionados trabalhos empregavam-se concen

trações de vírus de 400 ou 500 unidades CCA. Ora, está demonstrado que a resposta em anticorpos pode ser até negativa ou muito fraca com quantidades de vírus menores, daí a recomendação da Comissão de Gripe do Exército Americano, vacinas com 400 ou 500 unidades CCA, com o fim de obter suficiente antigenicidade. Fica justificado, portanto, a elaboração das Tabelas 7, 8, 11 e 12 em que se incluíram como "falhas" da vacina apenas os vacinados que tiveram gripe 14 ou mais dias após a vacinação.

TABELA 1

Indivíduos incluídos no estudo	Número
T o t a l	351
Vacinados	94
Não vacinados (Contrôle)	257
Adultos *	191
Escolares **	32
Pré-escolares ***	34

* - pessoas de 15 ou mais anos

** - pessoas de 7 a 14 anos

*** - pessoas de 0 a 6 anos

TABELA 2

Distribuição dos indivíduos vacinados segundo a idade e a cor

Grupos de idade (anos)	C ô r			Total
	Branca	Preta	Amarela	
10 - 19	3*	-	-	3
20 - 29	23	4	4	31
30 - 39	28	5	-	33
40 - 49	21	-	-	21
50 - 59	4	-	-	4
60 - 69	1	-	-	1
70 +	1	-	-	1
Total	81	9	4	94

* Um com 18 e dois com 19 anos.

TABELA 3

Casos de gripe, distribuídos conforme tempo decorrido em dias entre a vacinação e a ocorrência dos primeiros sintomas.

Tempo decorrido entre a vacinação e a ocorrência dos primeiros sintomas	Número de casos de gripe
1 dias	
2 "	
3 "	
4 "	
5 "	
6 "	
7 "	3
8 "	
9 "	
10 "	1
11 "	
12 "	
13 "	
2 semanas	3
3 "	1
4 "	1
5 "	
6 "	
7 "	
8 "	
9 "	
10 "	
11 "	
12 "	2

TABELA 4

Número de casos de gripe ocorridos no grupo de vacinados, distribuídos conforme o tempo decorrido (em semanas) entre a vacinação e a ocorrência dos primeiros sintomas.

Nº de semanas decorridas entre a vacinação e a ocorrência dos primeiros sintomas	Número de casos de gripe
- 2 semanas	4
2 - 4 semanas	5
+ 4 semanas	2
Total	11

Na Tabela 1 apresentamos dados gerais, explícitos "per se". Na maioria dos cálculos foram eliminados diversos vacinados e os seus correspondentes contrôles (conviventes, não vacinados) dos quais não foi possível obter dados durante o inquérito epidemiológico. Com efeito, nesta data, vários dos vacinados tinham viajado ou estavam ausentes, em férias. Também foram eliminados outros, por não terem controle familiar, já que se tratava de pessoas que moravam sòzinhas. Os dados constantes das tabelas correspondem a indivíduos que tinham, pelo menos, um convivente adulto.

Seguindo tendências recentes, agruparemos os indivíduos, segundo três categorias, devido aos papéis definidos que têm na propagação de uma infecção no aglomerado familiar os indivíduos pertencentes a essas categorias. Assim, os escolares costumam ser os principais introdutores da infecção no aglomerado familiar, enquanto que as maiores vítimas do contágio intra-familiar costumam ser os pré-escolares (37, 38 e 40). Os estudantes de ensino secundário comportam-se como os adultos.

Como os limites de idade escolar são, no Brasil - ligeiramente diferentes dos da Europa e dos E. U. A., tivemos em conta êste fato ao fazer a definição de "adultos", "escolares" e "pré-escolares", que aparece no final da Tabela 1.

A Tabela 2 é, como a de nº 1, de caráter descritti

vo, pois fornece informações sôbre a composição do grupo de população empregado nas experiências.

Como pode ser observado, há predominância de indivíduos brancos (86,1% do total) e de adultos pertencentes aos grupos etários de 20 até 49 anos (90,4% do total). Convém ressaltar que no grupo etário inferior (10-19 anos) a penas havia 3 indivíduos, sendo 2 de 19 e outro de 18 anos.

Na Tabela 3 apresentamos a relação entre a data da ocorrência de gripe e a data da vacinação.

Na Tabela 4, apresentamos em forma resumida os mesmos dados da Tabela 3.

Empregando os critérios utilizados em estudos similares realizados nos E. U. A., (50, 74) 8 dos 11 casos de gripe ocorridos entre os vacinados devem ser contados como "falhas" da vacina, porquanto ocorreram 10 ou mais dias após a vacinação. Com efeito, 3 casos ocorreram no sétimo dia após a vacinação, pelo que não devem ser considerados como "falhas" da vacina testada.

Infelizmente, não foi possível precisar a data da ocorrência da gripe entre os contrôles, devido à natural imprecisão dos dados obtidos na data do inquérito, realizado, após a epidemia. Os vacinados, pela sua maior educação re-

TABELA 5

Incidência da gripe no grupo controle (adultos e crianças) e no grupo de vacinados, e que apresentaram, antes da vacinação, resultados negativos nas provas de F.C. e I.H. com antígeno "Formosa" *

	Vacinados		Controle (Adultos e crianças)	
	número de casos	%	número de casos	%
Gripavam	11	18,6**	55	21,7**
Não gripavam	48	81,4	199	78,3
Total	59	100,0	254	100,0

* Apenas um indivíduo deixou de ser incluído nesta tabela, por apresentar, antes da vacinação, títulos de 1/3 e 1/256 respectivamente nas provas de F.C. e I.H., com antígeno "Formosa". Todos os outros apresentaram resultados negativos antes da vacinação.

** A diferença entre 18,6 e 21,7 não é estatisticamente significativa, ao nível de 5%.

TABELA 6

Incidência da gripe no grupo controle, formado exclusivamente pelos adultos, e no grupo de vacinados que apresentavam, antes da vacinação, resultados negativos nas provas de F.C. e I.H. com antígeno "Formosa"

	Vacinados		Contrôle (Adultos)	
	número de casos	%	número de casos	%
Griparam	11	18,6*	38	20,1*
Não griparam	48	81,4	151	79,9
Total	59	100,0	189	100,0

% percentagem que apresentou gripe

* A diferença entre 18,6 e 20,1 não é estatisticamente significativa, ao nível de 5%.

TABELA 7

Incidência da gripe no grupo controle e observada 14 dias a pós a vacinação e que apresentavam, antes da vacinação, resultados negativos nas provas de F.C. e I.H. com antígeno

"Formosa"

	Vacinação		Controle (Adultos e crianças)	
	número de casos	%	número de casos	%
Gripavam	7	12,7*	51	21,7*
Não gripavam	48	87,3	184	78,3
Total	55	100,0	235	100,0

% percentagem que apresentou gripe

* A diferença entre 12,7 e 21,7 não é estatisticamente significante, ao nível de 5%.

sultante da sua profissão, e pelo fato de terem consciência dos objetivos da vacinação, foram naturalmente muito cuidadosos em registrar a data da ocorrência da gripe em relação à data da vacinação.

Por outro lado, na pior das hipóteses, ainda que todos os controles que padeceram gripe, apresentassem o início dos sintomas na data correspondente a 10 dias ou mais após a vacinação^{dos} indivíduos inoculados, a diferença entre o coeficiente de ataque nos vacinados e nos controles não se torna significativa.

A Tabela 5 mostra a incidência da gripe nos vacinados e nos controles, sendo que ficou eliminado dos cálculos um dos vacinados, por apresentar, antes da vacinação, um título alto na inibição da hemaglutinação, com o antígeno "Formosa" (A/Formosa/313/57). Os dados apresentam-se tanto como número dos que tiveram ou não tiveram gripe em ambos os grupos, como em percentagens do total.

Enquanto que, os vacinados são todos adultos, como mencionamos anteriormente, os controles estão constituídos nesta Tabela, por adultos e crianças que pertenciam aos mesmos aglomerados que os vacinados.

Um teste estatístico de significância mostrou que os dados apresentados nesta Tabela não mostram diferença significativa, (ao nível de 5%) entre os números de vacinados e controles que tiveram gripe.

Posteriormente, analisaremos estes achados.

Na Tabela 6 apresentam-se dados, essencialmente os da Tabela 5, apenas os contrôles são todos adultos, também conviventes dos vacinados. Evidentemente, êste grupo de contrôle é mais perfeito do que o apresentado na Tabela 5, por quanto os vacinados e os seus contrôles pertencem à mesma "categoria" ou "classe" epidemiológica; pelo que o "risco", ou probabilidade de contágio é praticamente o mesmo em ambos os grupos experimentais. Apesar d^este refinamento dos da dos, o teste estatístico não mostra, tão pouco, diferença significativa da incidência da gripe entre os vacinados e contrôles ao nível de 5%.

Posteriormente, analisaremos êstes achados, conjuntamente com outros correlatos.

Na Tabela 7 compara-se a incidência da gripe nos vacinados (adultos) e nos contrôles (adultos e crianças); - sendo que só são incluídos nos dados, os casos de gripe que ocorreram 14 ou mais dias após a data da vacinação do grupo de teste. Também são incluídos nos dados apenas os indivídu os com os resultados negativos às reações de fixação de complemento e inibição da hemaglutinação, com a amostra "Formosa", na data da vacinação (4 de setembro).

O tratamento estatístico mostra que, a diferença entre a percentagem dos vacinados que tiveram gripe (12,7%) e a percentagem dos contrôles que também tiveram gripe - (20,7%), não é significativa ao nível de 5%.

O teste foi unilateral.

TABELA 8

Incidência da gripe no grupo controle, formado exclusivamente por adultos e observada 14 dias após a vacinação e que apresentavam, antes da vacinação, resultados negativos nas provas de F.C. e I.H. com antígeno "Formosa"

	Vacinadô		Controle (Adultos)	
	número de casos	%	número de casos	%
Griparam	7	12,7*	36	20,7*
Não griparam	48	87,3	138	79,3
Total	55	100,0	174	100,0

* A diferença entre 12,7 e 20,7 não é estatisticamente significativa, ao nível de 5%.

TABELA 9

Incidência da gripe no grupo controle e no grupo de vacinados, que apresentavam, antes da vacinação, resultados negativos nas provas de F.C. e I.H., com antígeno "Formosa".

	Vacinações		Controle (Adultos e crianças)	
	número de casos	%	número de casos	%
Griparam	8	19,5*	43	18,8*
Não griparam	33	80,5	186	81,2
Total	41	100,0	229	100,0

* A diferença entre 18,8 e 19,5 não é estatisticamente significativa, ao nível de 5%

TABELA 10

Incidência da gripe no grupo controle, formado exclusivamente pelos adultos, e no grupo de vacinados que apresentavam, antes da vacinação, resultados negativos nas provas de H.C. antígeno "Japan"

	Vacinados		Controle (Adultos)	
	número de casos	%	número de casos	%
Griparam	8	19,5*	24	18,9*
Não griparam	33	80,5	103	81,1
Total	41	100,0	127	100,0

* A diferença entre 19,5 e 18,9 não é estatisticamente significativa, ao nível de 5%.

Na Tabela 8 apresentamos os mesmos dados da Tabela 7, apenas o grupo controle é constituído só de adultos.

A diferença na incidência da gripe entre as percentagens dos vacinados e dos controles, não é estatisticamente significativa ao nível de 5%.

A Tabela 9 apresenta dados que só se diferenciam dos dados da Tabela 7, em que na Tabela 9 se incluem adultos e crianças que tiveram gripe em qualquer data após a data da vacinação. Dos dados da Tabela 8, apenas se diferencia em que, nesta última, os controles são todos adultos, enquanto na Tabela 9 são adultos e crianças.

Na Tabela 9, a diferença entre as percentagens de vacinados e controles com gripe, tão pouco é significativa, ao nível de 5%.

Os dados da Tabela 10 reúnem as especificações dos dados da Tabela 6, diferenciando-se apenas em que a amostra padrão empregada foi a A/Japan/305/57 e não a A/Formosa/313/57, como na Tabela 6. Também nos dados da Tabela 10 só foi considerado o resultado da reação de fixação de complemento, porquanto não havia antígeno suficiente para a reação de inibição da hemaglutinação.

O teste estatístico da diferença entre as percentagens dos vacinados e controles que tiveram gripe, mostra que esta diferença não é significativa, ao nível de 5%.

Os dados da Tabela 11 diferem dos da Tabela 8, em que a amostra empregada como padrão nos testes sorológicos, foi a A/Japan/305/57 e não a A/Formosa/313/57, como no caso da Tabela 8. Pela falta de antígeno, não foi feita a reação de inibição da hemaglutinação. Os dados da Tabela 11 diferem daqueles da Tabela 10, em que nesta última os controles incluem ^{só} adultos ~~e crianças~~ e não ~~só~~ ^{e crianças} adultos, como na Tabela ~~10~~ ¹¹.

O teste estatístico da diferença entre as porcentagens de gripe nos vacinados e controles não é significativa ao nível de 5%.

Os dados da Tabela 12 são idênticos aos da Tabela 8, exceto que o antígeno A/Japan/305/57 e somente a fixação de complemento foram usados na obtenção dos dados.

O teste estatístico da diferença entre as porcentagens de gripe, nos vacinados e controles, não é significativa, ao nível de 5%.

TABELA 11

Incidência da gripe no grupo controle e observada 14 dias a pós a vacinação, no grupo de vacinados que apresentavam, an tes da vacinação, resultados negativos na prova de F.C. com antígeno "Japan"

	Vacinados		Contrôle (adultos e crianças)	
	número de casos	%	número de casos	%
Griparam	6	15,4*	43	18,5*
Não griparam	33	84,6	190	81,5
Total	39	100,0	233	100,0

* A diferença entre 15,4 e 18,5 não é estatisticamente significante, ao nível de 5%.

TABELA 12

Incidência da gripe no grupo controle, formado exclusivamente por adultos, e observada 14 dias após a vacinação no grupo de vacinados que moravam com, pelo menos um convivente e que apresentavam, antes da vacinação, resultados negativos nas provas de F.C. com antígeno "Japan".

	Vacinados		Controle (Adultos)	
	número de casos	%	número de casos	%
Griparam	6	15,4	24	20,0*
Não griparam	33	84,6	96	80,0
Total	39	100,0	120	100,0

* A diferença entre 15,4 e 20,0 não é estatisticamente significativa, ao nível de 5%.

GRÁFICO I

Incidência da gripe nos vacinados e nos controles, com sorologia negativa (amostra "Formosa")

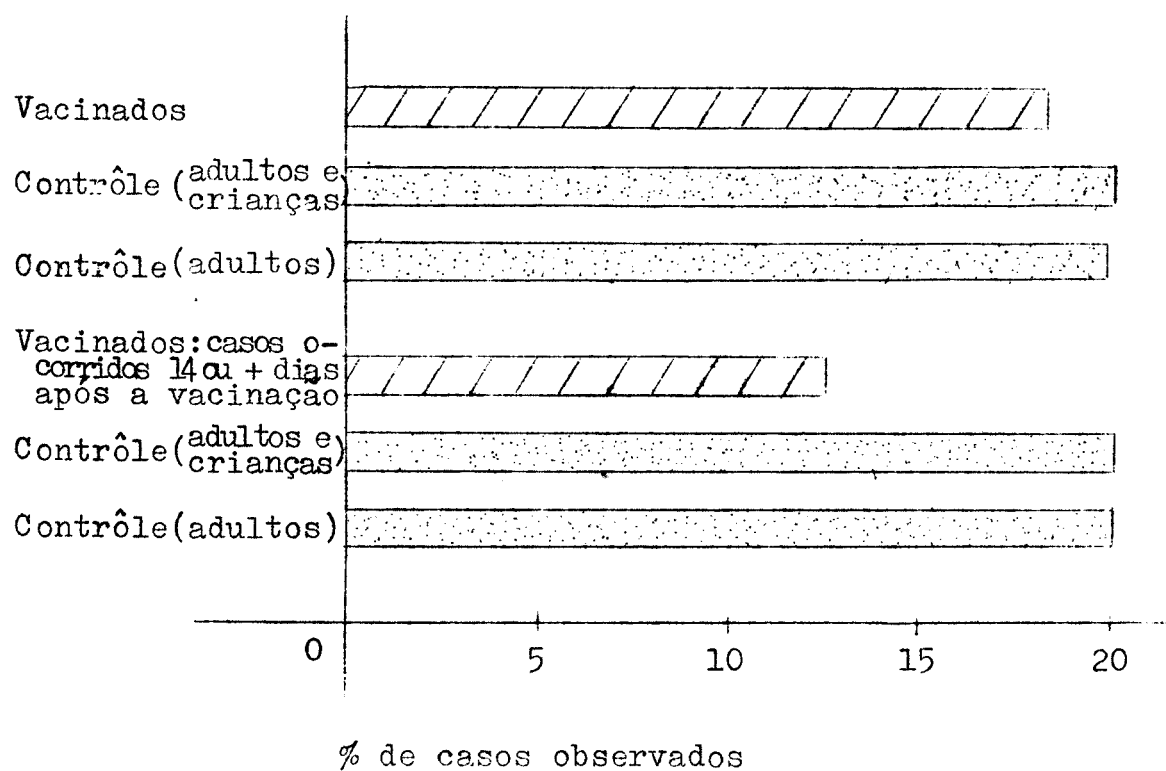
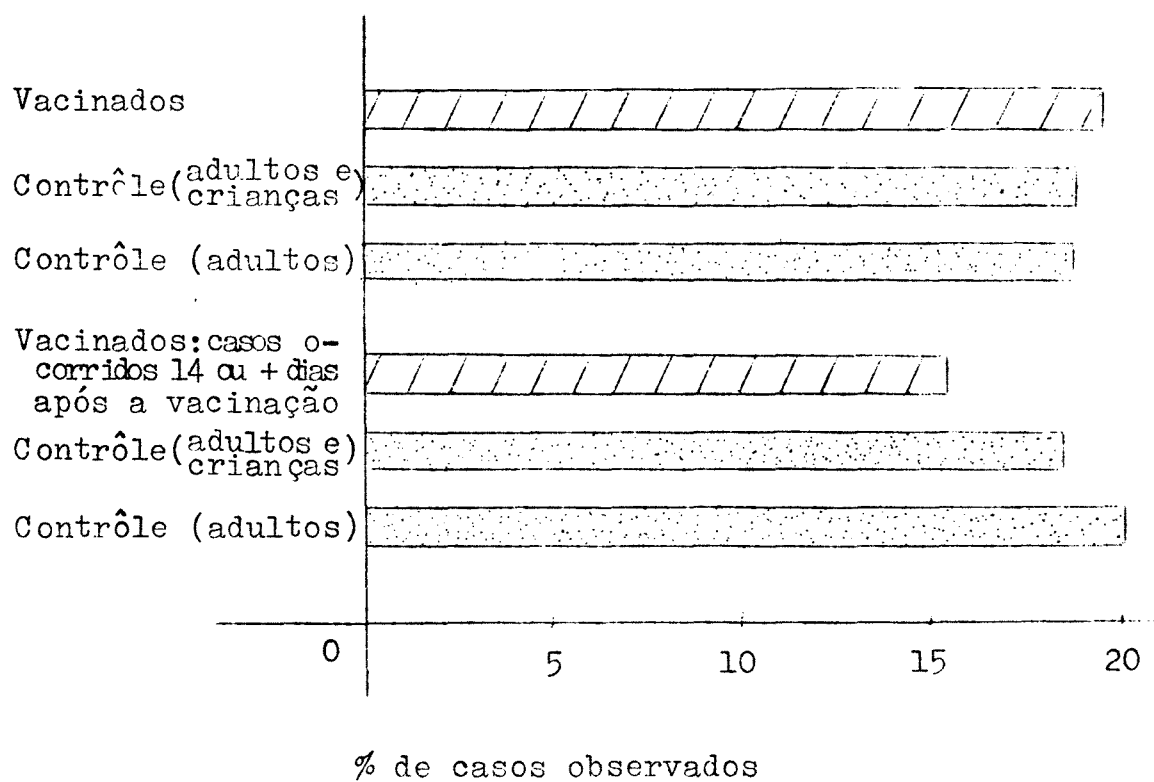


GRÁFICO II

Incidência da gripe nos vacinados e nos controles, com sorologia prévia negativa (amostra "Japan")



O teste de potência antigênica

O teste de potência antigênica consistiu na titulação de anticorpos em soros obtidos de sangues colhidos em três datas diferentes, escolhidas de antemão. A primeira sangria foi feita nos 131 indivíduos que iam ser vacinados, momentos antes da vacinação, ou seja, a 4 de setembro de 1957. A segunda sangria só pôde ser realizada em 101 dos vacinados 21 dias depois. Dezenove destes 101 indivíduos foram revacinados momentos após esta segunda sangria e 21 dias depois sangrados de novo.

A primeira sangria, realizada antes da epidemia de gripe "asiática" e antes da vacinação, serviu de controle - ("base line") para a avaliação do aumento de título que era de se esperar, na suposição de que a vacina em aprêço era antigênica. A segunda sangria, feita 21 dias após a vacinação, devia mostrar nítida resposta em anticorpos à vacinação, pois estes costumam aparecer no sangue circulante, antes de transcorrerem três semanas. A terceira sangria, realizada 21 dias após a segunda e, portanto, 42 dias após a primeira sangria e vacinação, serviria para evidenciar a resposta à revacinação.

Quanto ao título de anticorpo que deveria ser considerado como "significativo" (de infecção) decidimos seguir critérios gerais, fixando o título 1 para 8 como o mínimo

significativo; o título 1 para 4 é geralmente considerado como positivo mas não significativo, porquanto pode ser inespecífico.

TABELA 13

Percentagem de positividade em cada sangria

FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO

Sangria	Total de soros	Soros positivos		Total de soros
		amostra "Formosa"	amostra "Japan"	
antes da vacinação	131	0.7%*	15.2%	131
2 dias após a vacinação	101	5.9%	42.5%	101
21 dias após a revacinação	19	47.3%	47.3%	19

* % percentagem do total que deu resultado positivo significativo (título 1/8 ou maior)

INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO

Sangria	Total de soros	Soros positivos		Total de soros
		amostra "Formosa"	amostra "Japan"	
antes da vacinação	101	4.9%*	2.7%*	36
21 dias após a vacinação	101	19.8%	20.5%	68
21 dias após a revacinação	19	52.6%	68.4%	19

* percentagem do total que deu resultado positivo significativo (título 1/8 ou maior)

Na Tabela 13 comparam-se as percentagens de soros positivos em cada sangria, discriminando a reação sorològica e o antígeno usado. A percentagem do total constituída por soros positivos evidencia a resposta à vacinação de uma maneira clara e convincente, sendo esta maneira de apresentar dados sorològicos a mais moderna e eficiente (75). Apresentam-se os números correspondentes ao total de soros de cada sangria, para avaliar a significância da percentagem de positividade; pois como é óbvio, esta percentagem teria pouco valor conclusivo quando fôr obtida de pequeno número de soros. A positividade de um soro significa, neste caso, título positivo "significativo" (1/8 ou mais).

Como se pode vêr na Tabela em aprêço, nem todos os soros de uma sangria foram testados com ambas as amostras - devido à pequena quantidade disponível do antígeno "Japan". Com o intuito de facilitar a comparação da resposta imunitária à vacinação avaliada com dois antígenos diferentes, ambos correspondentes a amostras "asiáticas", colocaram-se as percentagens respectivas em colunas contíguas. Por outro lado, para facilitar a comparação da resposta em anticorpos de um e outro tipo, colocaram-se na mesma Tabela os resultados obtidos nas reações de fixação de complemento e inibição da hemaglutinação.

Nas tabelas subseqüentes, faremos o comentário individual de freqüência de positividade em cada sangria, por estar nelas mais evidente êste fenômeno. Na Tabela 13, limi

tar-nos-emos a comentar a evolução da curva de positividade durante o período em estudo (42 dias após a vacinação).

O primeiro fato a ressaltar é a diferença na percentagem de positividade entre as diversas sangrias; diferença esta evidente em ambas as reações, assim como com ambos os antígenos.

A diferença se traduz por um incremento, com o tempo, da positividade, fenômeno êste também evidente em ambas as reações e em ambos os antígenos. O conjunto dêstes fatos dá valor conclusivo à interpretação de que a vacina possuía "antigenicidade", porquanto os fatos assinalados evidenciam produção de anticorpos no intervalo entre uma e outra sangria, sendo a primeira o contrôlo, por não terem sido vacinados ainda os doadores do sangue.

Tomando como base a sangria-contrôlo, evidencia-se em ambos os anticorpos e para os antígenos, um aumento na percentagem de soros positivos aos 21 dias da vacinação. Posteriormente, 21 dias após esta segunda sangria, pratica-se uma terceira colheita de sangue naqueles indivíduos que, imediatamente após a segunda sangria, receberam novo estímulo antigênico, pois foram revacinados com a mesma dose de vacina. Isto equivaleu a um "refôrço" ("rappell", "booster dose"), sendo que foi administrado um pouco prematuramente. Porém, a premência do tempo, pois a epidemia de gripe "asiática" estava iniciando o seu acme nesse momento, e a curta duração dêsse acme devido à elevadíssima contagiosidade da gripe "a

siática" determinaram a realização da revacinação naquela - data. Se realizada posteriormente, o efeito sôbre produção de anticorpos teria sido mais marcado ainda. De qualquer maneira, o efeito da revacinação está nítidamente demonstrado nos dados constantes da tabela em aprêço. Convém assinalar, que com a amostra "Formosa" o incremento na positividade - consecutivo à revacinação, está evidente tanto na fixação de complemento, como na inibição da homaglutinação, enquanto que com a amostra "Japan" está evidente a inibição da homaglutinação mas não na reação de fixação de complemento. Não é perceptível a causa dêste fenômeno; porém, parece que o correu uma "saturação" ou seja, que na sangria prévia, a revacinação atingiu precocemente o máximo de percentagem de positividade que num período de 6 semanas (o total da observação) podia atingir-se. A causa desta "precocidade" em atingir o máximo em reações positivas, pode ser devida ao fato de que nada menos de 15,2% de soros positivos existia no contrôle, ou seja, antes da vacinação. Sabido é que a resposta em anticorpos nos indivíduos com o sistema produtor de anticorpos sensibilizado por estímulo (infecção ou vacinação) prévio é muito mais intenso e mais rápido que no indivíduo sem contáto prévio com o antígeno (76).

Na Tabela 14, apresentamos a distribuição dos indivíduos segundo os títulos obtidos nos seus soros, quando testados pela reação de fixação de complemento, usando a amostra "Formosa" como antígeno.

Os doadores de sangues testados haviam sido todos vacinados 21 dias antes. Nesta data de vacinação, tinham sido sangrados, como já mencionamos, momentos antes da vacinação. Nesta primeira sangria não apresentaram anticorpos contra a amostra "Formosa".

Como pode ser visto na Tabela em apêço, 65,2% dos vacinados não tinham desenvolvido anticorpos, 21 dias após a vacinação!! Outra observação interessante é que apenas 6,7% dos vacinados mostrou títulos significativos! Nos comentários gerais sôbre o teste de potência antigênica analisaremos, em detalhe, êstes achados.

Resta, pois, assinalar que 28,1% apresentou título de 1:4. Êste resultado positivo, porém, "não significativo", como já mencionamos. Dada a sua relativa magnitude, sugere que, na realidade, êste título de 1:4, indica resposta porém pequena e dentro de limites não significativos, porque título semelhante pode ser inespecífico (77).

TABELA 14

Resultado das provas de Fixação de Complemento efetuadas com antígeno "Formosa", nos sangues colhidos 21 dias após a vacinação *

Resultado após a vacinação (título)	Número de soros	%
0	58	65,2
1/2	-	-
1/4	25	28,1
1/8	2	2,2
1/16	4	4,5
Total	89	100,0

* Deixou de ser incluído nesta tabela apenas um indivíduo, por apresentar, antes da vacinação, título positivo. Todos os outros apresentavam resultados negativos antes da vacinação.

TABELA 15

Resultados das provas de Fixação de Complemento efetuadas com antígeno "Formosa", nos sangues colhidos 21 dias após a revacinação *

Resultados após a revacinação (título)	Número de soros	%
0	3	15,8
1/2	-	-
1/4	7	36,8
1/8	8	42,1
1/16	1	5,3
Total	19	100,0

* Todos os indivíduos incluídos na presente tabela, apresentaram resultados negativos antes da vacinação.

Na Tabela 15 é apresentada a distribuição dos indivíduos (casos) segundo os títulos obtidos nos seus soros, quando testados pela reação de fixação de complemento, usando a amostra "Formosa" como antígeno. Os doadores de sangue tinham sido vacinados com a vacina em teste, 42 dias antes e revacinados com o mesmo material, 21 dias antes da sangria em aprêço. Apenas 19 indivíduos, dos 131 vacinados a 4 de setembro de 1957 foram revacinados. Como todos êsses 19 indivíduos não apresentavam anticorpos tituláveis antes da vacinação, todos os soros positivos a títulos de 1/8 ou maiores corresponderiam a "conversões". Porém, tinha sido feita uma sangria 21 dias após a vacinação, ou seja, momentos antes da revacinação e 21 dias antes da sangria em aprêço. Das 9 "conversões" após a revacinação, uma só tinha já ocorrido antes da revacinação, como o testemunhava a sangria prévia a esta revacinação e que foi 21 dias posterior à vacinação.

Como pode ser visto na Tabela 15, apenas 15,8% dos soros obtidos 21 dias após a revacinação eram negativos, o que contrasta com os resultados da sangria feita 21 dias após a vacinação (Tabela 13). Nesta última sangria nada menos que 65,2% eram negativos.

Também em acentuado contraste com os dados apresentados na Tabela anterior(14), a percentagem dos soros com títulos positivos "significativos" foi de 47,4% após a revacinação contra apenas 6,7% após a vacinação. A percentagem (36,8%), dos soros positivos, mas não significativos era importante.

Na Tabela 16 comparam-se os resultados da reação de fixação de complemento (antígeno "Formosa") em sangues colhidos do mesmo indivíduo antes da vacinação e 21 dias após a vacinação.

Como a primeira colheita de sangue se deu antes da vacinação, em indivíduos que não tinham tido contáto com a gripe "asiática", é evidente que a comparação desta amostra de sangue com outra obtida após a vacinação, se caracterizava pelo fenômeno da "conversão". Bodian e Paffenbarger (78) denominaram conversores ("converters") aos indivíduos com sorologia negativa no início de uma epidemia de poliomielite e que no decorrer desta apresentavam títulos significativos. Por analogia, aplicamos êste termo à passagem de negativo na sangria anterior à vacinação, a positivos na sangria feita após a vacinação.

Nos comentários sôbre a Tabela 14 referimo-nos à alta percentagem de soros negativos 21 dias após a vacinação assim como a baixa percentagem de soros com título significativo nesta segunda sangria. Achados semelhantes deverão ser observados na Tabela 16, a qual está, em parte, constituída pelos dados da Tabela 14, apenas que apresentados de outra maneira e adicionados de outros dados. Todos, menos 4, dos soros colhidos antes da vacinação, eram negativos, pelo menos, com a amostra "Formosa"; três dos positivos não eram significativos e o restante era significativo. Portanto, to dos menos um dos soros da segunda sangria com título 1/8 ou

TABELA 16

Resultados das provas de Fixação de Complemento efetuadas com antígeno "Formosa" em sangues colhidos antes e 21 dias após a vacinação

		Título						Total	
Depois	Antes	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	nº de indiv.	%
	0	58	-	13	9	4	2	86	95,6
	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/4	1	-	1	-	1	-	3	3,3
	1/8	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	1	-	1	1,1
	1/32	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	nº indiv.	59	-	14	9	6	2	90	100,0
	%	65,5	-	15,6	10,0	6,7	2,2	100,0	

No lugar de encontro das colunas verticais e horizontais, encontra-se o número de soros (ou indivíduos) com os resultados correspondentes.

maior, significam "conversões", ou, o que é o mesmo, houve 16 indivíduos que tinham produzido anticorpos em títulos significativos como resposta à vacinação, aos 21 dias desta última. Um indivíduo, com título significativo (1/16) antes da vacinação, não apresentou elevação nenhuma após a vacinação. Dos 3 soros com título não significativo (1/4) antes da vacinação, dois permaneceram com o mesmo título após a vacinação e um deles apresentou elevação para 1/16 (significativo).

É interessante assinalar que os indivíduos com anticorpos circulantes tituláveis antes da vacinação, deviam ter respondido rápida e intensamente à vacinação (76) pelo menos o indivíduo com título prévio de 1/16, que é francamente significativo. Isto não aconteceu, porém. No caso dos soros com título prévio de 1/4, podia-se supor que este título era inespecífico, mas não no caso do soro com título 1/16.

Na Tabela 17, apresentamos a comparação dos resultados da fixação de complemento, obtidos nos soros da primeira e segunda sangrias, usando como antígeno a amostra "Japan".

Esta Tabela é especialmente interessante para o estudo da passagem dos soros de negativos a positivos, ou seja, o fenômeno de "conversão", ao qual nos referimos nos comentários sobre a Tabela 16. Com efeito, enquanto apenas 1, dos 90 soros era positivo antes da vacinação, usando a amostra "Formosa" como antígeno, 10 dos 100 soros eram positivos com a amostra "Japan". Temos, assim, uma oportunidade especial para estudar o fenômeno da "conversão" (78).

Em 33 soros houve "conversão", o que dá uma percentagem de 33%. A conversão com a amostra "Formosa" como antígeno foi de 17,8% (Tabela 15).

Interessante notar que, antes da vacinação, nenhum dos soros apresentava título não significativo ($1/4$); porém, após a vacinação, 16 soros passaram de negativos a positivos $1/4$. Isto constitui mais uma evidência de que pelo menos em parte, nos soros com título $1/4$ esta positividade seja, na realidade, específica.

Dos 17 soros com título $1/4$ antes da vacinação, 5 não aumentaram de título, e os 12 restantes sofreram "conversão", ou seja, aumentaram o seu título para o nível da significância.

Todos os 10 soros com títulos significativos an-

TABELA 17

Resultados das provas de Fixação de Complemento efetuadas com antígenos "Japan", nos sangues colhidos 21 dias após a vacinação

		Título						Total
Depois		0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Total Nº (%)
Antes								
	0	36	-	16	12	6	3	73
	1/2	-	-	-	-	-	-	-
	1/4	-	-	5	8	1	3	17
	1/8	-	-	-	2	4	1	7
	1/16	-	-	-	-	2	-	2
	1/32	-	-	-	-	-	1	1
To- tal	Nº (%)	36	-	21	22	13	8	100,0

tes da vacinação, se mantiveram neste nível com manutenção do título (5 soros) e os 5 restantes aumentaram o seu título.

É do máximo interesse notar que apenas 1 dos 10 soros com título significativo antes da vacinação apresentou aumento significativo. Este aumento, como é sabido, consiste em 4 ou mais títulos (79) sendo considerado universalmente como índice certo de infecção, ainda na ausência de isolamento do vírus correspondente.

Em contraste com o comportamento dos soros positivos significativos antes da vacinação, onde, como acabamos de mencionar, um só entre dez apresentou "aumento significativo" do título; entre os 73 negativos na primeira sangria, 21 apresentaram "aumento significativo"

Em outras palavras, os maiores aumentos de título foram observados entre os negativos, antes da vacinação!!! Este fenômeno é difícil de explicar, porquanto é fenômeno geral de Imunologia, que o indivíduo com infecção ou vacinação prévia, responde a um estímulo antigênico específico com a produção de muito maior quantidade de anticorpos e mais rapidamente que os casos de primo-infecção.(76).

Na Tabela 18, apresentamos dados similares aos da Tabela 15, porém, com a diferença de que na reação foi usado o antígeno "Japan". Três soros foram eliminados dos cálculos: um, por ter se mostrado anticomplementar e dois por serem positivos significativos na sangria-contrôle.

A percentagem de soros negativos após a revacinação (37,5%) é bem maior que a percentagem obtida com a amostra "Formosa". Isto contrasta com outros achados que mostram, em geral, maior número de soros positivos quando testados pela amostra "Japan". Porém, os "números pequenos" ("small numbers") emprestam valor à significância possível desta comparação. Com esta reserva em mente, não se encontram, em geral, diferenças notáveis entre os dados obtidos usando a amostra "Japan" como antígeno e os obtidos com a amostra "Formosa". Convém ressaltar que as diferenças entre os resultados obtidos com estes dois antígenos são manifestas e claras na primeira e segunda sangrias (ver a Tabela 17) mas não são tão aparentes nos soros de terceira sangria. Este fenômeno deve ser ocasionado, provavelmente, pela "saturação" a que nos referimos nos comentários sobre a Tabela 13.

Com as reservas devidas ao "pequeno número" de indivíduos, podemos nos referir ao fenômeno de "conversão" já definido. Quarenta e dois dias após a vacinação e 21 dias após a revacinação, nada menos do que 43,7% dos soros em apêço, 19 em total, mostravam a "conversão" de negativos na sangria-contrôle a positivos significativos. Isto contrasta

TABELA 18

Resultados das provas de Fixação de Complemento efetuadas com antígeno "Japan" nos sangues colhidos 21 dias após a revacinação *

Resultados após a revacinação (título)	Número de soros	%
0	6	37,5
1/2	-	-
1/4	3	18,8
1/8	4	25,0
1/16	1	6,2
1/32	2	12,5
Total	16	100,0

* Todos os resultados antes da vacinação foram negativos, excetando-se os resultados correspondentes a 2 indivíduos que apresentaram títulos 1/8 na prova de F.C., com antígeno "Japan", e que deixaram de ser incluídos nesta tabela. Esses indivíduos após a vacinação apresentaram títulos de 1/16. Um sôro foi anticomplementar.

TABELA 19

Resultados das provas de inibição da hemaglutinação, efetuadas com antígeno "Japan" nos sangues colhidos 21 dias após a vacinação *

Resultados após a vacinação (título)	Número de soros	%
0	41	60.3
1/2	-	-
1/4	13	19.1
1/8	9	13.2
1/16	5	7.4
Total	68	100,0

* Todos os resultados antes da vacinação foram negativos, excetuando um indivíduo que apresentava título de 1/4 na prova de I.H., com antígeno "Japan", e que deixou de ser incluído nesta tabela. Após a vacinação, o resultado permaneceu o mesmo.

com uma percentagem de "conversão" de apenas 10% na sangria feita 21 dias após a vacinação. Evidencia-se, com êstes dados, o efeito do estímulo antigênico da revacinação, assim como a intensidade dêste "refôrço" ("rappell")

Na Tabela 19 apresentamos os resultados das provas de inibição da hemaglutinação efetuadas nos sangues colhidos 21 dias após a vacinação, utilizando a amostra "Japan" como antígeno. Incluem-se nestes dados, apenas os soros de doadores cuja sangria-contrôle, realizada antes da vacinação, foi negativa.

Convém assinalar o elevado número (60,3%) de soros negativos aos 21 dias após a vacinação. Êste número é, porém, algo inferior ao obtido mediante a reação de fixação de complemento (73%) usando a mesma amostra como antígeno. Nenhum soro com título positivo atingiu o nível de 1/32, ou maior, evidenciando pouca reação à vacina.

Referindo-nos de novo à "conversão" de negativo em positivo significativo, vemos que aos 21 dias após a vacinação, só 20,6% dos soros testados mostraram a "conversão" ou, o que é o mesmo, a reação à vacina.

Na Tabela 20 apresentamos os resultados das provas de inibição da hemaglutinação realizadas nos sangues colhidos 21 dias após a revacinação e, portanto, 42 dias após a vacinação. O antígeno empregado foi a amostra "Japan".

Esta Tabela foi organizada como a anterior (19) sómente os sangues colhidos após a revacinação foram os testados. A Tabela 19, como mencionamos anteriormente, refere-se aos sangues colhidos após a vacinação. Porém, não são estritamente comparáveis, porquanto apenas 3 dos 19 soros tinham contrôle. Em outras palavras, pela escassez de antígeno, só foram testados, pela reação de inibição da hemaglutinação, todos os soros da terceira sangria, 68 dos 101 soros da segunda e apenas 36 dos soros da primeira sangria. Entre êstes últimos 36 soros, encontram-se três obtidos de indivíduos que foram vacinados e revacinados. Daqui, nossa assertiva de que só 3 dos 19 soros referidos na Tabela 20 tinham contrôle (negativos na primeira sangria).

Com as reservas devidas à limitação dos dados acabada de mencionar e ao "pequeno número" ("small number") de soros referidos na Tabela 20, percebe-se um fenômeno idêntico ao observado com a reação de fixação de complemento, tanto com a amostra "Formosa" como com a "Japan": a percentagem de soros negativos é bem menor na sangria feita após a revacinação que na realizada após a vacinação. Por outro lado, a percentagem de soros positivos significativos (tit.1/8 ou maior) é, na Tabela 20 (soros após a revacinação) bem maior que na Tabela 19 (soros após a vacinação).

TABELA 20

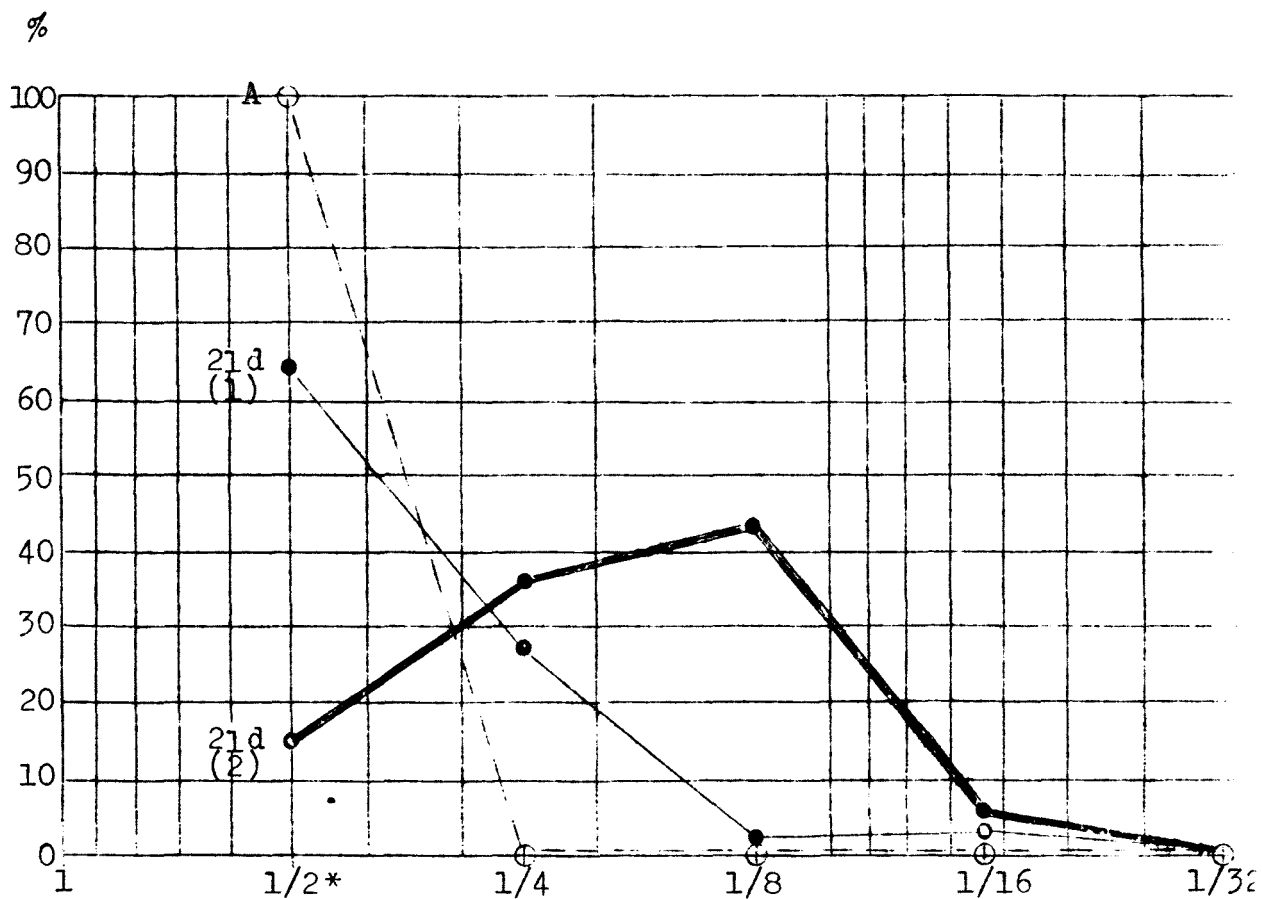
Resultados das provas de inibição da hemaglutinação efetuadas com antígeno "Japan", nos sangues colhidos após a revacinação

Resultados após a revacinação (título)	Número de soros	%
0	4	21,1
1/2	-	-
1/4	2	10,5
1/8	4	21,1
1/16	9	47,3
Total	19	100,0

GRÁFICO III

Resultado das provas de Fixação de Complemento (antígeno "For
mosa")

Distribuição percentual dos indivíduos vacinados
Conforme os resultados antes (A), 21 dias após a vaci-
nação (21 d) e 21 dias após a revacinação (21 d)
(1) (2)

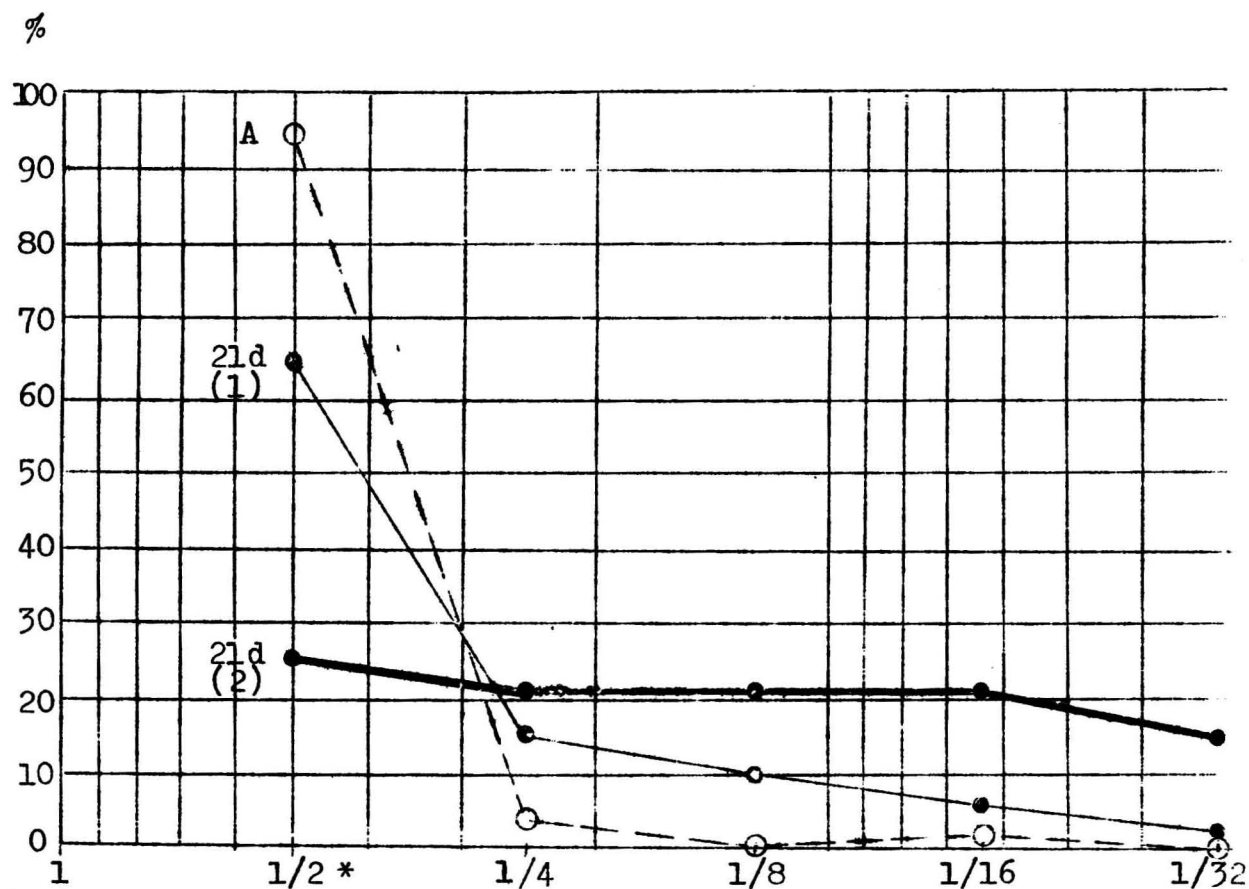


* include também os negativos

GRÁFICO IV

Resultado das provas de Inibição da Hemaglutinação (antígeno "Formosa")

Distribuição percentual dos indivíduos vacinados conforme os resultados antes (A), 21 dias após a vacinação (21 d) e 21 dias após a revacinação (21 d)

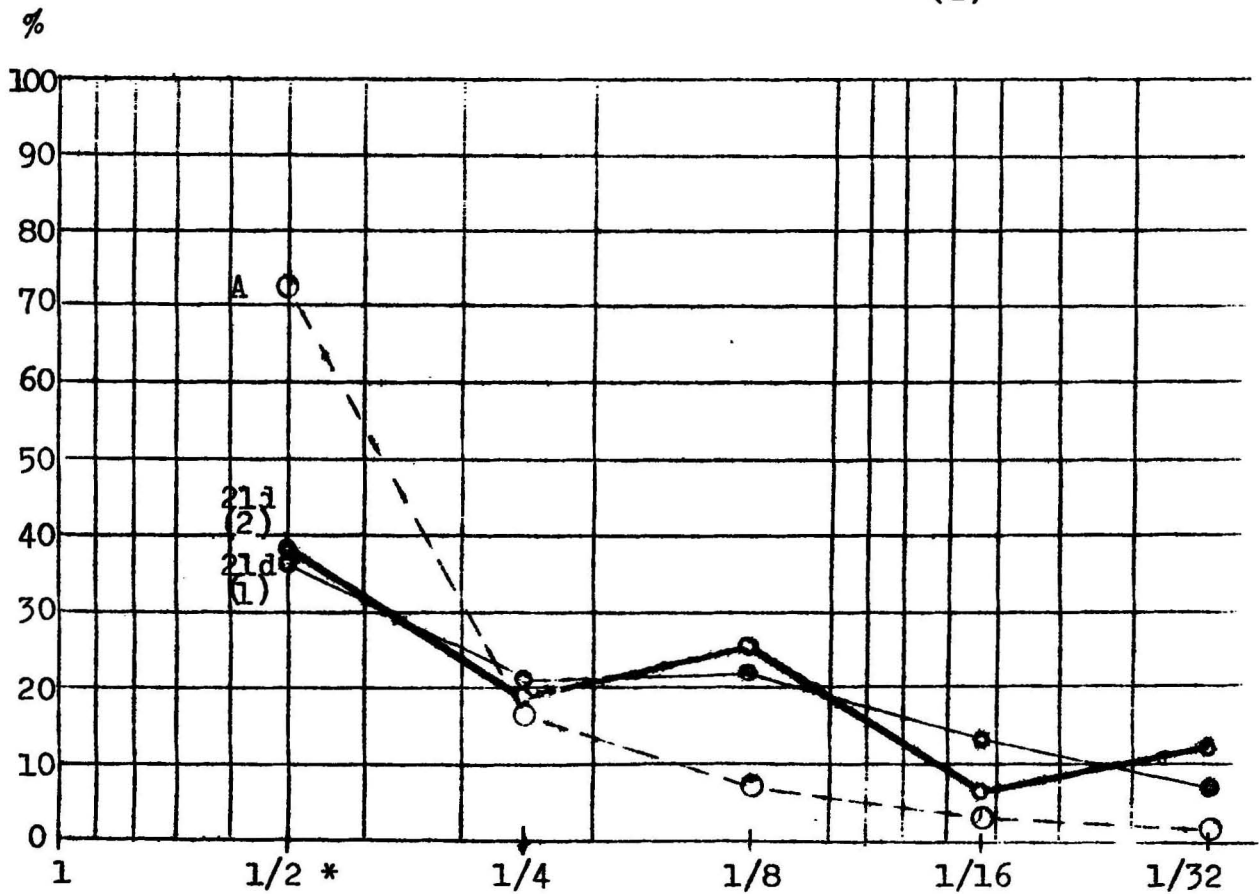


* Inclue também os negativos

GRÁFICO V

Resultado das provas de Fixação de Complemento (antígeno "Japan")

Distribuição percentual dos indivíduos vacinados, conforme os resultados antes (A), 21 dias após a vacinação (21 d) (I) e 21 dias após a revacinação (21 d) (2)

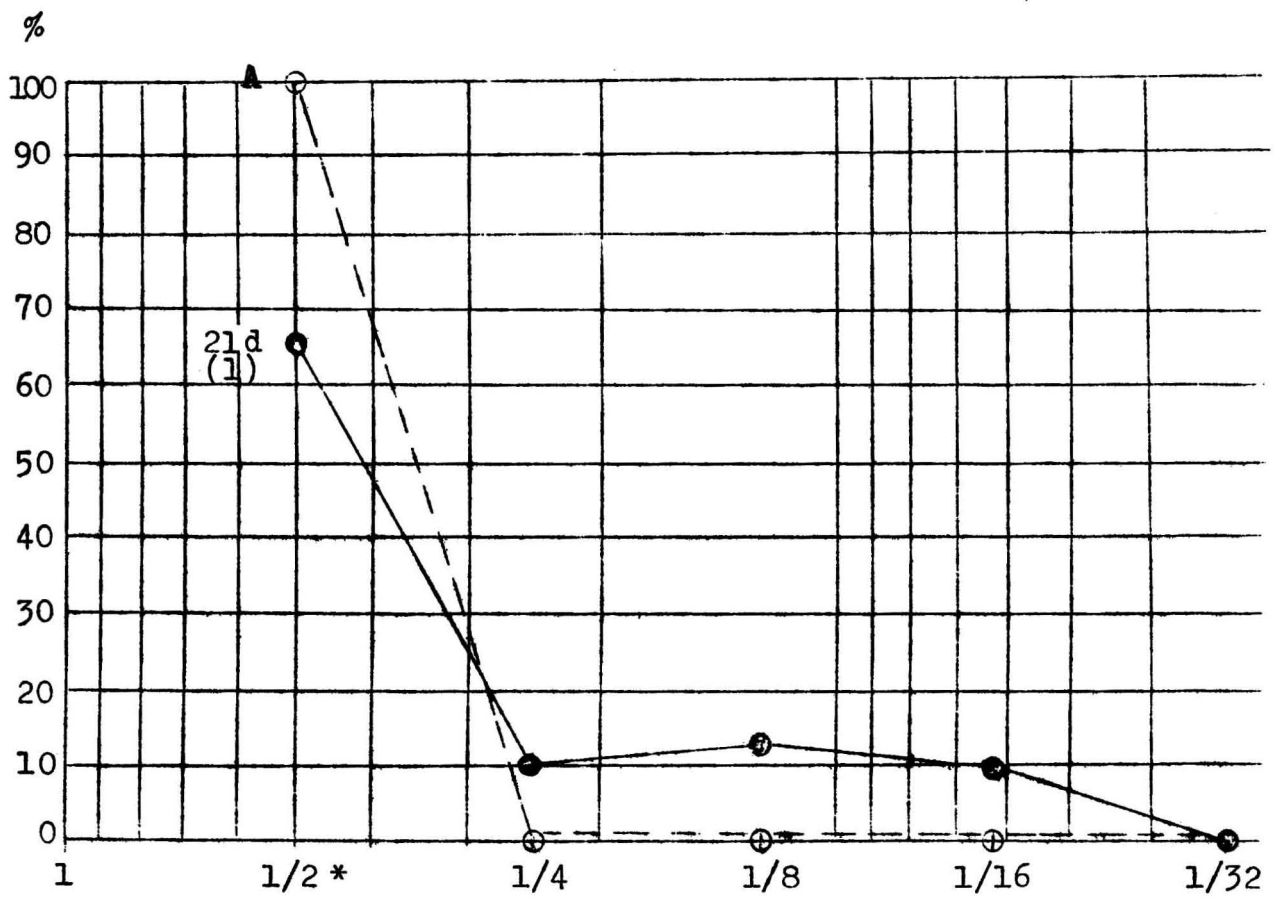


* Inclue também os negativos

GRÁFICO VI

Resultados das provas de Inibição de Hemaglutinação (antíge
no "Japan")

Distribuição percentual dos indivíduos vacinados, conforme
os resultados antes (A) e 21 dias após a vacinação (21d
(I))



* Inclue também os negativos

Capítulo V
COMENTÁRIOS GERAIS

A data do início da gripe em relação à data da vacinação.

O período de tempo transcorrido entre a vacinação e a aparição dos primeiros sintomas da moléstia nos indivíduos vacinados que tiveram gripe, constitue, evidentemente, dado da máxima importância para a avaliação da significância dos dados relativos ao poder protetor da vacina ora testada. Com efeito, é fato conhecido geralmente, que uma vacina precisa de um período de tempo, variável segundo diversos fatores, para efetuar a imunização.

Um dos pontos de discórdia nas intermináveis discussões sobre a efetividade da vacina anti-rábica é, precisamente, a magnitude do período posterior à vacinação que deve fixar-se para classificar um caso de êxito ou de fracasso da vacina pasteuriana (80). Em relação à gripe, Culver, Nitz e Lennette, pesquisadores do Serviço de Saúde Pública do Estado da Califórnia (U.S.A.) acentuam que "é geralmente a ceito que o estado de resistência contra a gripe é obtido dentro de um período de dez dias" (51). Estes pesquisadores eliminaram dos seus cálculos do poder protetor de uma vacina monovalente contra a gripe "asiática", todos os indivíduos vacinados, nos quais a gripe se iniciou antes de 10 dias após a vacinação. Os mesmos critérios foram usados em estudos sobre vacinas contra a gripe "asiática" realizados por Meiklejohn, Kempe, Thalman e Lennette (74), assim como pela

Comissão de Gripe do Exército Americano, da qual fazem parte especialistas de renome tais como Francis, Salk, Davenport, Magill, Hilleman, Lennette, Jensen, etc. (50).

Incidência da gripe nos vacinados e contrôles

Apesar de todos os cuidados na técnica de comparação da incidência da gripe nos vacinados e nos contrôles, as diferenças na incidência em cada um desses grupos era, por simples inspecção, muito pequena. Os testes estatísticos mostraram que nem sequer ao nível de 5% existia significância. E este é o nível mais grosseiro de significância nestes testes!

Interpretação do teste de potência imunogênica.

Tendo em vista as diversas modalidades de fazer a comparação da incidência da gripe em cada grupo, conclue-se que o teste de potência imunogênica da vacina em aprêço não demonstrou poder protetor contra a gripe "asiática" que grassou em São Paulo em 1957. Neste particular, convém ressaltar que Bell e colaboradores (52), em acurado estudo, testaram duas vacinas monovalentes, elaboradas com amostra "asiática" e que continham, praticamente a mesma concentração de vírus da testada por nós, pois titularam, respectivamente, 250 e

275 "CCA". A incidência da gripe provocada artificialmente, por inoculação intranasal, por êstes pesquisadores, mostrou diferença estatisticamente significativa, pelo que, concluíram pela existência de poder protetor nas duas vacinas.

Possíveis limitações à interpretação anterior do teste de potência imunogênica

1) A vacina anti-gripal precisaria ser administrada um mês ou mais antes da epidemia, para ser efetiva. Esta é a o pinião de alguns autôres; porém, a maioria das autoridades na matéria consideram apenas 10 dias como adequado (50,51).

2) As amostras "asiáticas" que prevaleceram em São Paulo diferiam antigênicamente das amostras "Formosa" e "Japan". Isto não encontra apoio nas milhares de reações sorológicas e nos estudos de estrutura antigênica das amostras isoladas que foram realizados no Instituto Adolfo Lutz (81). Devemos ressaltar aqui, que a identidade dos agentes etiológicos en volvidos na epidemia em aprêço ficou convenientemente escla recida.

3) Inclusive em pesquisas do mais alto nível realizadas com abundantes recursos, diversos lotes da mesma vacina podem mostrar intensas variações na sua capacidade protetora, como se demonstrou nos estudos sôbre a vacina anti-pertussis realizados pelo Medical Research Council da Inglaterra(47). Cockburn (47) refere que diversos testes da vacina contra a

coqueluche foram feitos na Inglaterra por pesquisadores de renome, sem lograr demonstração de potência imunogênica, até que finalmente se demonstrou que diversas partidas dessa vacina, preparadas em instituições de renome, diferiam grandemente na sua potência imunogênica, sendo esta nula em algumas das partidas. Além do mais, Cockburn (47) ressalta que não se pode obter uma resposta satisfatória para estas diferenças em potência!! Como solução ao impasse criado pelos fracassos dos "field trials" da vacina anti-pertussis, decidiu-se não fazer o teste de potência imunogênica, sem, antes, padronizar, no laboratório, o lote empregado (47). Esta padronização foi feita testando aquela vacina em animais (camundongos); pois como se demonstrou oportunamente, existia uma certa correlação entre a potência imunogênica avaliada em animais e a capacidade de proteção do ser humano contra a coqueluche.

Causas prováveis da falta de poder protetor mostrada pela vacina testada

Segundo conclusões da "American Medical Association", entre o dia 15 de setembro e os primeiros dias de novembro de 1957 (período correspondente ao acme da epidemia em São Paulo) houve, nos Estados Unidos da América do Norte, entre 15 e 20 milhões de casos de gripe!!!, provavelmente na

sua maioria de gripe "asiática". Ora, os relatórios sobre testes de vacina contra a gripe "asiática" realizados nos E. U. A. e por nós examinados (49, 50, 51, 52), correspondem a testes efetuados quando estavam ocorrendo pequenos surtos em diversos lugares do território americano desde o mês de Junho de 1957. Só posteriormente, na época em que ocorreu o acme da gripe "asiática" em São Paulo, foi que a infecção atingiu, nos E.U.A., elevadíssima contagiosidade, a qual foi observada por poucas semanas, causando aquêle enorme número de casos.

É claro, portanto, que os testes realizados por pesquisadores americanos, não foram submetidos às condições desfavoráveis da assombrosa contagiosidade da gripe pandêmica, nitidamente diferente da contagiosidade observada durante os surtos epidêmicos ordinários. Junte-se a êste fato, a recomendação enfática da Comissão de Gripe do Exército Americano (50) de que deviam as vacinas contra a gripe "asiática" conter não menos de 500 unidades hemaglutinantes (unidades "CCA"). No entanto, a vacina preparada no Instituto Butantan continha apenas 200 unidades, tal como recomendara a Organização Mundial de Saúde; pois nessa data não se conhecia a mencionada conclusão da Comissão de Gripe do Exército Americano!!

Concedemos o máximo de significância a esta deficiência involuntária da vacina por nós testada, porquanto as conclusões da Comissão são baseadas em experiências coorde-

nadas realizadas pelas autoridades máximas na matéria (Salk, Francis, Lennette, etc.); durante muitos anos, em grande número de seres humanos, em animais e nas melhores condições.

Outros argumentos a favor desta Tese, são os seguintes: a) Boger e Liu (49) vacinaram voluntários com vacinas contendo uma amostra "asiática", usando duas doses: uma de 50 unidades "CCA" e outra de 500 unidades. A resposta em anticorpos foi muito sugestiva: 22 dos 28 indivíduos vacinados com 500 unidades responderam com títulos significativos enquanto que apenas 8 de 22 pessoas vacinadas com 50 unidades mostraram anticorpos tituláveis e ainda o nível dos títulos era menor que no grupo anterior; b) os diversos estudos sobre resposta imunitária às variantes do vírus da gripe mostraram que, no caso de infecções por novas variantes, tais como as "asiáticas", aquela seria pobre. Daí a Comissão de Gripe do Exército Americano (50) recomendar o emprego de vacinas contendo como mínimo 500 unidades "CCA".

Em resumo: pode-se atribuir a carência de poder protetor da vacina testada à insuficiente quantidade de vírus contida na mesma e ao fato de o teste ter sido realizado nas condições adversas da extraordinária contagiosidade da gripe pandêmica. Neste particular, convém lembrar que, em epidemias de varíola, por exemplo, caracterizadas pela sua benignidade, são poupados os vacinados, enquanto que, nas epidemias severas, os vacinados são também vitimados pela doença, mesmo no caso de haver transcorrido períodos curtos -

desde a vacinação.

Positividade dos soros nas diversas sangrias

Testes estatísticos dos dados apresentados nas Tabelas 14 a 20, mostraram uma diferença significativa, ao nível de 5%, entre a percentagem de indivíduos que apresentaram resultados positivos antes e depois do estímulo antigênico (vacinação).

Em comentários prévios nos referimos ao fato que a vacina por nós testada continha, involuntariamente, quantidades do vírus (antígeno) bem inferior àquela considerada como estímulo adequado (50). Com efeito, a resposta a variantes do vírus de estrutura antigênica diferente das encontradas em épocas anteriores, tinha, forçosamente, que ser pobre. Para avaliar nossos achados no teste de potência antigênica, convém compará-los com os obtidos por outros investigadores que também usaram vacinas contendo amostras "asiáticas". Com efeito, o comportamento antigênico destas amostras era bem peculiar (9, 10). Não convinha comparar com estudos prévios feitos com outras amostras, porquanto os estudos sobre a antigenicidade das amostras "asiáticas" são suficientemente acurados e mostram técnicas aprimoradas.

Em primeiro lugar, consideraremos o estudo de Boger e Liu (49). Eles observaram que apenas 2 semanas após a

vacinação com 550 unidades "CCA", 81% dos indivíduos apresentavam títulos positivos na inibição da hemaglutinação, e 4 semanas depois, atingiam o nível de 91% de positividade. Em nosso estudo, com nenhuma das amostras empregadas como antígeno, assim como em nenhuma das duas reações sorológicas obtivemos estas percentagens de positividade, nem 3 semanas após a vacinação, nem 6 semanas depois, apesar de que durante este último período tinham sido revacinados. Sabido é, que este "refôrço" (revacinação), constitui um estímulo potentíssimo. Além do mais, em indivíduos vacinados por Boger e Liu com apenas 50 unidades de "CCA", obtiveram, às duas semanas após a vacinação, 30% de positividade. Em nosso estudo, feito com vacina contendo 200 unidades "CCA", observamos uma percentagem ligeiramente inferior, três semanas após a vacinação, usando como antígeno a amostra "Formosa" e tanto na fixação de complemento como na inibição da hemaglutinação Bell e colaboradores (52), pesquisadores do Serviço de Saúde Pública dos E.U.A., utilizaram como critério de antigenicidade a observação de percentagens de positividade que não foram observadas em nosso estudo em condições quase idênticas. Assim, Bell e colaboradores acharam que as vacinas por eles testadas eram eficientes, sob o ponto de vista de antigenicidade, porquanto 70% dos vacinados mostraram títulos positivos (significativos) na reação de fixação de complemento e 44% mostraram positividade significativa na reação de inibição da hemaglutinação. Convém ressaltar que Bell e co-

laboradores sangraram os vacinados em tempos praticamente i dênticos aos nossos, ou seja, antes da vacinação e 17 a 20 dias após esta última. Usaram como antígeno a mesma amostra "Japan" por nós usada e realizaram, também como nós, reações de fixação de complemento e de inibição da hemaglutinação. Além do mais, as vacinas por êles testadas continham praticamente o mesmo número de unidades "CCA", tendo sido testadas pelo fabricante e retestadas nos laboratórios do Serviço de Saúde Pública Americano. Neste último lugar, titularam as duas vacinas testadas por Bell e colaboradores, 250 e 275 unidades "CCA", respectivamente.

Apenas 1 dos 131 casos obtidos em 4 de setembro - antes da vacinação - foi positivo contra a amostra "Formosa" na reação de fixação do complemento. Portanto, pode-se inferir que provavelmente as percentagens relativamente elevadas de soros com título 1:4 (positivo mas não significativo) fôssem na realidade significativos. Este título evidenciaria, assim, uma resposta pouco intensa, que não atingia o nível da significância (1:8). Com efeito, se nos soros em aprêço, o título 1:4 fôsse devido, pelo menos em parte, a fatôres i nespecíficos, a sangria contrôle realizada antes da vacinação mostraria um número apreciável de soros com êsse título. Isto não aconteceu em nenhum dos 131 soros testados com a a mostra "Formosa", com exceção de apenas um que foi positivo em título significativo e, portanto, devido a infecção prévia.

É provável que sangrias posteriores revelassem "conversões" de soros "positivos não significativos" em "positivos significativos".

Com efeito, estudos acuradíssimos e minuciosos realizados por Lennette e Schmidt (45) em casos confirmados - clínica e laboratorialmente como de poliomielite, demonstraram a existência de indivíduos com respostas demoradas a infecção.

Assim, aqueles pesquisadores não obtiveram resposta significativa em anticorpos fixadores do complemento em alguns indivíduos, enquanto em outros só obtiveram títulos significativos vários meses após uma infecção confirmada pelo isolamento de vírus, dados clínicos e epidemiológicos indubitáveis. Este fenômeno de demora na aparição de anticorpos no sangue tem sido verificado repetidas vezes em casos de varíola e de vacinia generalizada, estudados por virulogistas do Instituto Adolfo Lutz (82).

Capítulo VI
RESUMO E CONCLUSÕES

1) Realizamos um teste de potência imunogênica e um teste de potência antigênica de uma vacina contra a gripe "asiática" de produção nacional. A análise dos dados obtidos foi feita conjuntamente com revisão dos conhecimentos atuais sobre o vírus da gripe, a epidemiologia desta infecção e os princípios gerais da vacinação e teste de vacinas. As experiências em seres humanos e trabalhos de laboratório de que consistiram os testes referidos, serviram de exemplo para a aplicação e discussão de conhecimentos gerais sobre a matéria

2) A 4 de setembro de 1957 vacinávamos 131 voluntários, adultos, de profissão relacionada com a saúde pública, com vacina monovalente contendo 200 unidades hemaglutinantes ("CCA unit") por mililitro de amostra "asiática" do vírus da gripe. Injetamos 1 ml por via subcutânea e momentos antes da vacinação foram sangrados todos os voluntários para ter um controle da produção de anticorpos. Três semanas depois, apenas 101 daqueles voluntários foram sangrados de novo e 19 destes, revacinados com a mesma dose e pela mesma via. Três semanas mais tarde, estes 19 indivíduos revacinados eram de novo sangrados.

3) Na última semana de setembro e nas duas primeiras semanas de outubro de 1957, ocorria o acme da epidemia de gripe "asiática" na cidade de São Paulo. Posteriormente, realizamos um inquérito epidemiológico para determinar a in

cidência de gripe nos vacinados e nos seus contrôles. Estes últimos eram os conviventes dos vacinados nos aglomerados familiares a que estes últimos pertenciam.

4) Realizamos o cálculo da incidência da gripe no grupo dos vacinados e nos contrôles, mediante diversos tipos de agrupamento de dados, visando evidenciar possíveis influências de certas características dos indivíduos sobre a incidência da gripe. Assim, consideramos como contrôles, os adultos conviventes dos vacinados, enquanto que em outras análises, considerávamos tanto adultos como crianças não vacinados. Foram eliminados dos cálculos os indivíduos que apresentavam títulos significativos de anticorpos antes da vacinação.

5) Nos soros colhidos, nas diversas sangrias, realizamos as reações de fixação de complemento e de inibição da hemaglutinação, usando como antígeno tanto a amostra "A/Formosa/313/57" como a "A/Japan/305/57".

6) A análise estatística da diferença de incidência de gripe entre os vacinados e os não vacinados mostrou não ser significativa ao nível de 5%.

7) A análise estatística dos resultados das reações sorológicas mostrou diferença significativa, ao nível de 5%, entre a percentagem de indivíduos que apresentaram resultados positivos antes e depois da vacinação, tanto em ambas as reações sorológicas, como em ambas as amostras usadas como antígeno.

8) A comparação dos nossos resultados com achados realizados em estudos similares feitos nos E. U. A., nos levam às seguintes conclusões:

a - A vacina testada não manifestou poder protetor.

b - A vacina testada mostrou muito pouco poder antigênico.

9) As conclusões e achados anteriores são analisadas apresentando diversos argumentos favoráveis, assim como suas possíveis limitações.

Capítulo VII
REFERÊNCIAS

- 1) - Francis Jr., T.

Development of the 1943 vaccination study of
Commission on Influenza

Am. J. Hyg. 42:1-11 (July) 1945

- 2) - Richard, E.R., Thigpen M.P., and Crowley J. H.

Vaccination against influenza at University
of Minnesota.

Am.J.Hyg. 42:12-20 (July) 1945

- 3) - Hale, W.M., and McKee A.P.

Value of influenza vaccination when done at
beginning of epidemic.

Am.J.Hyg. 42:21-27 (July) 1945

- 4) - Hirst, G.K., Plummer, N., and Friedewald, W.F.

Human immunity following vaccination with
formalinized influenza virus.

Am. J. Hyg. 42:45-56 (July) 1945

- 5) - Salk, J.E., Menke, W.J. and Francis Jr., T.

Clinical, epidemiological and immunological
evaluation of vaccination against epidemic
influenza.

Am.J.Hyg. 42:57-93 (July) 1945

- 6) - Maggil, T.P., Plummer, N., Smillie, W.G. and Sugg, J.Y.

Evaluation of vaccination against influenza.

Am.J.Hyg. 42:94-105 (July) 1945

- 7) - Francis Jr.,T.

The protective effect of vaccination against
epidemic influenza B

J.A.M.A. 131:275-278 (May 25) 1946

- 8) - Schreiber,H.

Observations and report of an influenza
epidemic aboard a military sea transport.

J.A.M.A. 165:1683-1686 (Novb.30) 1957

- 9) - Meyer,H.M., Hilleman,M.R., Miese,M.L., Crawford,I.P.,
and Bankhead,A.S.

New antigenic variant in Far East influenza
epidemic,1957.

Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 609-616 (July)
1957.

- 10) - Jensen,K.E.

New set of type A influenza viruses

J.A.M.A. 164:2025-2029 (Aug. 31) 1957

- 11) - Friedewald,W.F., and Pickels,E.G.

Centrifugation and ultrafiltration studies
on allantoic fluid preparations of influenza
virus.

J. Exp. Med., 79: 301-319 (1944).

- 12) - Sharp,D.G., Taylor,A.R., McLean,I.W., Jr., Beard,D.,
J.W., Feller,A.E., and Dingle, J.H.

Insolation and characterization of influenza
virus B (Lee strain)

J.Immunol., 48: 129-153 (1944)

- 13) - Andrewes, C.H.

Interference by one virus with the growth of another in tissue-culture.

Brit. J. Exp. Path., 23: 214-220 (1942).

- 14) - Ziegler, J.E., Jr., and Horsfall, F.L., Jr.

Interference between the influenza viruses.

I. The effect of active virus upon the multiplication of influenza viruses in the chick embryo.

J. Exp. Med., 79: 361-377 (1944).

- 15) - Ziegler, J.E., Jr., Levin, G.I., and Horsfall, F.L., Jr.

Interference between the influenza viruses.

II. The effect of virus rendered noninfective by ultraviolet radiation upon the multiplication of influenza viruses in the chick embryo.

J. Exp. Med., 79: 379-400 (1944).

- 16) - Burnet, F.M., Stone, J.D., Isaacs, A., and Edney, M.

The genetic character of O-D change in influenza A.

Brit. J. Exp. Path., 30: 419-425 (1949)

- 17) - Björkman, S.E., and Horsfall, F.L.

The production of persistent alteration in influenza virus by lanthanum or ultraviolet irradiation.

J. Exp. Med., 88: 445-461 (1948)

- 18) - Andrewes, C.H., Laidlaw, P.P., and Smith, W.

The susceptibility of mice to the viruses of human and swine influenza.

Lancet, 2: 859-862 (1934)

- 19) - Hirst, G.K.

Studies on the mechanism of adaptation of influenza virus to mice.

J. Exp. Med., 86: 357-366 (1947)

- 20) - Francis, T., Jr.,

Apparent serological variation within a strain of influenza virus.

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 65: 143-147 (1947).

- 21) - Burnet, F.M.

Principles of Animal Virology

Academic Press Inc., New York (1955), pag. 381.

- 22) - Smith, W., Andrewes, C.H., and Laidlaw, P.P.

A virus obtained from influenza patients.

Lancet ii: 66 -68 (July, 8) 1933

23) - Shope, R.E.

Swine influenza; filtration experiments and
etiology.

J. Exp. Med. 54: 373-385 (Sept.) 1931

24) - Francis, Jr., T.

A new type of virus from epidemic influenza.
Science, 92: 405-408 (1940)

25) - Salk, J.E., and Suriano, P.C.

Importance of antigenic composition of
influenza virus vaccine in protecting against
the natural disease.

Am. J. Pub. Health 39: 345-355 (1949)

26) - Taylor, R.M.

Studies on survival of influenza virus
between epidemics and antigenic variants of
the virus.

Am. J. Pub. Health 39: 171-178 (1949)

27) - Horsfall, F.L.

Influenza; em: Rivers "Viral and Rickettsial
Infections of Man", 2nd. edition.

J. B. Lippincott Co., New York, pág. 399
(1952)

- 28) - Meiklejohn, G., Kempe, C.H., Thalman, W.G., and Lennette, E.H.

Evaluation of monovalent influenza vaccines.

II. Observations during an influenza A-prime epidemic.

Am. J. Hyg., 55: 12-21 (1952)

- 29) - Hennessy, A.V., Minuse, E., Davenport, F.M., and Francis Jr., T.

An experience with vaccination against influenza B in 1952 by use of monovalent vaccine.

Am. J. Hyg., 58:165 - (1953)

- 30) - Shope, R.E.

Incidence of neutralizing antibodies for swine influenza viruses in sera of human beings of different ages.

J. Exp. Med., 63: 669-684 (May) 1936

- 31) - Sugg, J.Y.

Influenza virus pneumonia of mice that is nontransferable by serial passage.

J. Bact., 57: 399-403 (April) 1949

- 32) - Editorial

J.A.M.A. 165: 166-167 (Sept. 14) 1957

- 33) - Moura, R.A., e Souza Lopes, O.S.: comunicação pessoal.

- 34) - Hope-Simpson, R.E.

Discussão do trabalho de N.T.J. Bailey

J.Roy. Statist. Soc., series B (Methodological)

17: 62 (1955)

- 35) - Greenwood, M., Bradford Hill, A., Topley, W.W.C., and
Wilson, J.

Experimental epidemiology.

Medical Research Council, Special Report

Series nº 209 (1936)

- 36) - Webster, L.T.

Experimental Epidemiology

Medicine, 25: 77-109 (Febr.) 1946

- 37) - Lidwell, O.M., and Sommerville, T.

Observations on the incidence and distribution of the common cold in a rural community, during 1948 and 1949.

J.Hyg. 49: 365-381 (Dec.) 1951

- 38) - Ipsen, J., Donovan, W.R., and James, G.

Sociologic factors in the spread of epidemic hepatitis in a rural school district.

J. Hyg., 50: 457-470 (Dec.) 1952

- 39) - Hope Simpson, R.E.

Infectiousness of communicable diseases
in household (measles, chickenpox and
mumps).

Lancet, ii: 549-554 (Sept. 20) 1952

- 40) - Badger, G.F., Dingle, J.H., Feller, A.E., Hodges, R.G.,
Jordan, W.S., and Rammelkamp, C.H.

A study of illness in a group of Cleveland
families. II - incidence of the common
respiratory diseases.

Am.J.Hyg., 58: 31-40 (July) 1953

- 41) - Hope Simpson, R.E., and Sutherland, I.

Does Influenza spread within the household?

Lancet i: 721-726 (April 3) 1954

- 42) - Buck, C.

Acute upper respiratory infections in families

Am.J.Hyg. 63: 1-12 (Jan.) 1956

- 43) - Angulo, J.J.: comunicação pessoal.

- 44) - Salk, J.E.

Antigenic potency of poliomyelitis vaccine;
influence on degree and duration of vaccine
effect.

J.A.M.A., 162: 1451-1459 (Dec. 15) 1956

- 45) - Lennette, E.H., and Schmidt, N.J.

Studies on the development and persistence
of complement-fixing and neutralizing
antibodies in human poliomyelitis.

Am.J.Hyg. 65:210-238 (1957).

- 46) - Bodian, D.

Sites of immune barriers in poliomyelitis
em: The Dynamics of Virus and Rickettsial
Infections; International Symposium; The
Blakiston Co., Inc., New York, pp. 245-258
(1954).

- 47) - Cockburn, W.C.

Field trials in the evaluation of vaccines.
Am. J. Publ. Health 47:819-825 (July) 1957.

- 48) - Bailey, N.T.J.

Some problems in the statistical analysis
of epidemic data

J. Roy. Statist. Soc., series B

(Methodological)

17:35-68 (1955)

- 49) - Boger, W.P. and Liu, O.C.

Subcutaneous and intradermal vaccination
with Asian influenza vaccine.

J.A.M.A. 165: 1687-1689 (Novb. 30) 1957

- 50) - Commission on Influenza of the Armed Forces
Epidemiological Board
Vaccination against Asian Influenza; basis
for recommendations and a preliminary report
of efficacy.
J.A.M.A. 165:2055-2058 (Dec.21) 1957.
- 51) - Culver, J.O., Nitz, R.E., and Lennette, E.H.
The protective effect of monovalent
Asian-strain vaccine against Asian Influenza.
J.A.M.A. 165: 2174-2177 (Dec.8) 1957
- 52) - Bell, J.A., Ward, T.G., Kanikian, A.Z., Shelokov, A.,
Reichelderfer, and Hubner, R.J.
Artificially induced Asian influenza in
vaccinated and unvaccinated volunteers.
J.A.M.A., 165:1366-1373, (Nov.) 1957.
- 53) - Francis Jr., T.
Symposium on Controlled Vaccine Field Trials:
Poliomyelitis
Am. J. Pub. Health, 47: 283-287 (March) 1957.
- 54) - Meiklejohn, G., Weiss, D.L., Shragg, R.I., and Lennette,
E.H.
Evaluation of monovalent influenza vaccines.
I. Observations on antibody response
Am. J. Hyg. 55: 1-11 (1952)

- 55) - Philip,R.N., Bell,J.A., Davis,D.J., Beem,M.O., and
Beigelman,P.M.

Epidemiological studies in influenza in
familial and general population groups
I.- Preliminary report on studies with
adjuvant vaccines.

Am. J. Pub. Health, 44: 34-42 (Jan.) 1954

- 56) - Moura,R.A.

comunicação pessoal

- 57) - Dascomb,H.E., and Hilleman,M.R.

Clinical and laboratory studies in patients
with respiratory disease caused by
adenoviruses (RJ-APC-ARD agents)

Am. J. Med., 21:161-174 (Augs) 1956

- 58) - Horsfall,F.L.

Influenza; em: Rivers "Viral and Rickettsial
Infections of Man", 2nd. edition.

J. P. Lippincott Co., New York, pág. 392
(1952)

- 59) - Hoyle,L. and Fairbrother,R.W.

Antigenic structure of influenza viruses;
the preparation of elementary body
suspensions and the nature of the complementu
-fixing antigen.

J. Hig. 37: 512-520 (1937)

- 60) - Wiener, M., Henle, W., and Henle, G.

Studies on the complement fixation antigens
of influenza viruses Types A and B.

J. Exp. Med., 83: 259-279 (1946)

- 61) - Horsfall, F.L.

Influenza; em: Rivers "Viral and Rickettsial
infections of Man", 2nd. edition.

J.B.Lippincott Co., New York, pág. 406 (1952)

- 62) - Hirst, G.K.

The agglutination of red cells by allantoic
fluid of chick embryos infected with
influenza virus.

Science. 94: 22-23 (1941)

- 63) - McClelland, L., and Hare, R.

Adsorption of influenza virus by red cells
and a new "in vitro" method of measuring
antibodies for influenza virus.

Canad. J. Pub. Health, 32: 530-538 (oct.)
1941.

- 64) - Hirst, G.K.

The quantitative determination of influenza
virus and antibodies by means of red cell
agglutination.

J. Exp. Med., 75: 49-64 (1942)

65) - Hirst, G.K.

Adsorption of influenza hemagglutinins and virus by red blood cells.

J. Exp. Med., 76: 195-209 (1942).

66) - Clark, E. and Nagler, F.P.O.

Hemagglutination by viruses. The range of susceptible cells with special reference to agglutination by vaccinia virus.

Australian J. Exp. Biol. and Med. Sci. 21: 103-106 (1943)

67) - Hirst, G.K.

The nature of the virus receptor of red cells. I. Evidence on the chemical nature of the virus receptors of red cells and of the existence of a closely analogous substance in normal serum.

J. Exp. Med. 87: 301-314 (1948)

68) - Burnet, F.M., and Beveridge, W.I.B.

Studies on the Hirst haemagglutination reaction with influenza and Newcastle disease viruses. IV. The action of human tears on influenza virus.

Australian J. Exp. Biol. and Med. Sci. 23: 186-189 (1945)

- 69) - Friedewald, W.F., Miller, E.S., and Whathey, L.R.
The nature of non-specific inhibition of
virus hemagglutination.
J. Exp. Med., 86: 65-75 (1947)
- 70) - Svedmyr, A.
Studies on a factor in normal allantoic
fluid inhibiting influenza virus
hemagglutination.
Ark. Kemi, Mineral, och Geol. 24B, n° 1
(1947)
- 71) - Tamm, I., and Horsfall, F.L., Jr.
A mucoprotein derived from human urine which
reacts with influenza, mumps, and Newcastle
disease viruses.
J. Exp. Med., 95: 71-97.
- 72) - Magill, T.P., and Sugg, J.Y.
The significance of antigenic differences
among strains of the "A group" of influenza
viruses.
J. Exp. Med., 80: 1-7 (1944)
- 73) - Jensen, K.E.
Influenza: em: Diagnostic Procedures for
Virus and Rickettsial Diseases.
Publication Office. American Public Health
Association. New York City. pp. 241-262
(1956).

- 74) - Meiklejohn, G., Kempe, C.H., Thalman, W.G., and Lennette, E.H.

Effectiveness of polyvalent influenza

A - vaccine during an influenza

A - prime epidemic.

Amer. J. Hyg. 59: 241-248 (May) 1954

- 75) - Turner, T.B., Hollander, D.H., Buckley, S., Kokko, U.P., and Windsor, C.P.

Age incidence and seasonal development of neutralizing antibodies to Lansing poliomyelitis virus.

Amer. J. Hyg. 52: 323-347 (1950)

- 76) - Downie, A.W., and McCarthy, K.

Pathogenesis of variola. Em: International Symposium "The Dynamics of Virus and Rickettsial Infections".

New York, The Blakiston Co., Inc., 1954
pp. 194-215.

- 77) - McCarthy, K., and Downie, A.W.

The serum antibody response in alastrim.

Lancet, i: 257 (Febr. 7) 1953

- 78) - Bodian, D., and Paffenbarger, R.S.

Poliomyelitis infection in households.

Frequency of viremia and specific antibody response.

Am. J. Hyg. 60: 83-98 (Nov. 1) 1954.

- 79) - Sabin,A.B., Horsfall,F.L., Meyer,K.F., Scott,T.F.M.,
and Snyder,J.C.

Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections. Em: Rivers "Viral and Rickettsial Infections of Man". 2nd. edition.

J.B.Lippincott Co.(1952) Philadelphia.
pp. 172-189

- 80) - Balthazard,M., and Ghodssi,M.

Prevention of human rabies; treatment of
persons bitten by rabid wolves in Iran.
Bull. World Health Organ.

10: 797-803 (nov. 5) 1954

- 81) - Souza Lopes, O.: comunicação pessoal.

- 82) - Angulo,J.J.: comunicação pessoal.

Í N D I C E

	pág.
INTRODUÇÃO	5
Seleção de Tema	6
Objetivos	8
Sistematização da exposição	9
CAPÍTULO I	
CONSIDERAÇÕES BÁSICAS	15
O vírus da Gripe	17
Epidemiologia da gripe	23
Profilaxia da gripe	31
CAPÍTULO II	
PLANO DOS TRABALHOS PRÁTICOS	35
Critérios básicos empregados no planejamento dos trabalhos práticos	37
Plano dos trabalhos práticos	39
Discussão do plano	40
CAPÍTULO III	
MATERIAIS E TÉCNICAS	47
Material de estudo	49
Administração da vacina	53
Técnica do inquérito epidemiológico	53
Técnica de estudo da resposta imunitária	58
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS E DISCUSSÃO INDIVIDUAL	65
O teste de potência imunogênica	67
O teste de potência antigênica	105
CAPÍTULO V	
COMENTÁRIOS GERAIS	145
A data de incidência da gripe, em relação à data da vacinação	147
Incidência da gripe nos vacinados e controles	148

Interpretação do teste de potência imunogênica	148
Possíveis limitações à interpretação anterior do teste de potência imunogênica	149
Causas prováveis da falta de poder protetor mostrada pela vacina testada	150
Positividade dos soros nas diversas sangrias	153
CAPÍTULO VI	
RESUMO E CONCLUSÕES	157
CAPÍTULO VII	
REFERÊNCIAS	163