

## MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA VACINA ANTITIFÓIDICA NO LABORATÓRIO

Helvécio BRANDÃO (1)

### RESUMO

A aplicação do método por nós preconizado para a avaliação de certos tipos de vacinas, foi utilizado para a vacina antitifóidica, como exemplo, demonstrando a aplicabilidade do método. Nenhuma comparação foi utilizada.

No tocante à metodologia do processo, verificamos que, usando uma dose-teste conhecida, no caso 1 DL50, que é muito fraca para ocasionar qualquer mortalidade no grupo imune, ou melhor, no grupo vacinado, com apenas dois grupos de animais foi possível calcular o parâmetro  $\lambda$  do primeiro termo da série de Poisson e determinar o número esperado de sobreviventes, que nos permite um controle matemático dos resultados.

### INTRODUÇÃO

O uso de vacinas como meio de imunização ativa na prevenção de doenças infecciosas é praticado largamente como método firmemente estabelecido em sua eficácia. Não obstante, produtos novos mais eficientes, são continuamente pesquisados com o intuito de aperfeiçoar os existentes ou de encontrar outros que possam ser empregados na profilaxia de infecções para as quais ainda não possuimos agentes imunizantes.

Antes de postas em uso, as vacinas são estandardizadas em sua atividade por meio de métodos biológicos adequados. Outro requisito indispensável é a correlação da capacidade imunogênica da vacina no laboratório com a sua atividade no homem.

A vacinação contra a febre tifóide, apesar de ser usada há mais de 50 anos, ainda não permitiu uma avaliação precisa do grau de proteção conferido pelas diferentes preparações usadas<sup>14</sup>. As causas incriminadas são, principalmente, falta de trabalhos de campo bem planejados usando técnicas de amostragem adequadas e um bioensaio no laboratório que corresponde com a sua atividade no homem.

Em 1954-55 foi realizada pela primeira vez uma experiência estritamente controlada num grupo da população, na Iugoslávia, com o objetivo de determinar a eficiência absoluta e relativa de duas vacinas, sob os auspícios da Organização Mundial de Saúde e do U.S.P.H.S., dirigida por grandes autoridades internacionais de vários países<sup>14</sup>.

As preparações usadas foram a vacina alcoólica, morta e conservada pelo álcool, e a vacina fenolada, morta pelo calor e conservada pelo fenol.

Depois de usadas no homem foram estudadas em diferentes laboratórios, por meio de vários testes, com o objetivo de ser encontrado um que pudesse fornecer uma previsão de sua atividade no homem. Os resultados neste sentido não foram concludentes, as respostas obtidas nos animais experimentais por diferentes modalidades de provas foram discordantes, não correspondendo aos resultados obtidos no homem<sup>7</sup>.

O bioensaio clássico usado na determinação da atividade da vacina antitifóidica é baseado em normas estabelecidas pelo N.I.H.<sup>13</sup>. Fundamenta-se na capacidade imuno-

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

gênica da vacina para o camundongo, em relação a animais não imunizados. O teste de imunização ativa consiste essencialmente no seguinte: pelo menos três grupos de 15-20 camundongos, raça Swiss, peso 15-17 g, recebem por via intraperitoneal as vacinas em avaliação, em doses gradativas. Seis dias após recebem uma dose-teste, intraperitoneal, de aproximadamente 1.000 DL50 de *S. typhosa*, estirpe V58, em 0,5 ml de mucina estéril a 5%. Os animais são observados durante 72 horas e o número de sobreviventes anotado.

Existem outras modalidades desta técnica, como a preconizada por LANDY<sup>11</sup>, que não utiliza a mucina, mas uma suspensão em solução salina como dose-teste, usando a cepa Ty2. A concentração do inóculo é ajustada fotométricamente em 10<sup>8</sup> germes (aproximadamente 20 a 30 DL50). Também a imunização passiva de camundongos com soros de coelhos vacinados pode ser usada. Os animais devem ser imunizados de acordo com esquemas fornecidos pela Organização Mundial de Saúde ou pelo W.R.A.I.R. (Walter Reed Army Institute of Research)<sup>7</sup>.

Estas provas traduzem o poder imunizante relativo de uma vacina, em função de um grupo não imunizado, pela determinação do efeito morte ou sobrevivência dos animais, o cômputo da proporção relativa de mortos ou sobreviventes, nos dois grupos sendo feito pela avaliação simultânea das duas DL50, a relação dos valores encontrados fornecendo o grau relativo da vacina.

A prova de proteção ativa pode ser feita em duas modalidades, com uma dose imunizante constante e doses-teste variáveis ou com doses imunizantes variáveis e uma dose-teste fixa. Segundo BONET-MAURY<sup>4</sup>, no primeiro caso, o poder imunizante da vacina é expresso pela relação DL50 vacinados/DL50 não vacinados. Esta relação traduz segundo este autor, o aumento numérico da resistência obtido pela vacinação, sob forma de um fator de multiplicação. Um poder imunizante 2, significa que a metade dos animais vacinados sucumbe após a inoculação de uma dose dupla daquela que produz uma mortalidade de 50% nos animais não vacinados. Este valor numérico foi denominado "índice de imunidade" por COOPER & KELLER<sup>6</sup>.

Êstes testes têm sofrido severas críticas de diversos autores, como FELIX<sup>8</sup>, que aponta as principais fontes de erro que podem falsear os resultados, como o uso da mucina, que êle considera desastroso, a vacinação e a dose-teste ambas injetadas por via peritoneal, que êle contra-indica.

Outros pesquisadores têm estudado as causas de variação destas provas, como BATSON<sup>1, 2, 3</sup>, que teve oportunidade de analisar minuciosamente tôdas as variáveis.

Outros ainda têm sugerido medidas para torná-los mais precisos e reprodutíveis, como LUIPPOLD<sup>12</sup> e LANDY<sup>11</sup>.

Segundo BATSON<sup>3</sup>, um dos obstáculos ao desenvolvimento de vacinas com um poder protetor melhor, é a falta de um bioensaio sensível, capaz de fornecer respostas uniformes.

Sugestiva e atual é a opinião de GREENBERG<sup>10</sup>, que diz: "nenhum teste pode ser aceito sem reservas até o presente, em nossa opinião. Pesquisas em outras linhas devem ser desenvolvidas para obtenção de um teste de potência da vacina tifóidica".

Valiosas também são as opiniões dos componentes da grande experiência de campo.

Nesse sentido, importantes conclusões foram obtidas em relação aos testes de laboratório, de que as provas usadas presentemente não podem ser correlacionadas com a proteção obtida no homem. Os relatores dos trabalhos da Comissão afirmam não considerarem nenhuma vantagem nos testes, exceto como teste de identidade e para indicar alguma atividade da vacina. Manifestam o desejo de que o trabalho de campo pioneiro em que tomaram parte seja o primeiro de uma série, que culmine com o estabelecimento de uma correlação entre a eficácia da vacina no homem, com um teste de laboratório adequado.

EDSALL<sup>7</sup>, em trabalho já mencionado, focaliza bem o problema, mostrando as razões de ceticismo pelos testes convencionais, citando casos de febre tifóide no Exército, em tropas vacinadas com preparações que haviam exibido excelente potência nas provas em camundongos.

Um dos inconvenientes mais importantes que vemos nestes testes é o fato de ser o

camundongo um animal naturalmente resistente à *S. typhosa*.

PROPÓSITO DO PRESENTE TRABALHO

O propósito do presente trabalho é a aplicação das bases de um teste que não exige a determinação da mortalidade ou sobrevivência como índice do poder protetor da vacina e não depende da suscetibilidade dos animais ao agente.

Baseia-se na cinética do curso de uma bacteriemia provocada, conforme trabalho anterior do autor (BRANDÃO<sup>5</sup>).

Este teste, em vez de medir efeitos extremos como a morte ou a sobrevivência, introduz uma medida num fenômeno de importância fundamental e decisiva na evolução do processo infeccioso, a bacteriemia, possibilitando o estabelecimento de valores numéricos arbitrários que traduziriam diferentes graus de resistência em caráter relativo dentro das condições de um mesmo experimento.

MATERIAL E MÉTODOS

*Camundongos* — Raça Swiss, pêso 18-20 g, machos, separados ao acaso em 2 grupos de 12.

*Vacina* — Preparada segundo a técnica original de FELIX<sup>8</sup>, com a concentração de  $2 \times 10^9$  germes por ml, padronizada de acordo com as normas do N.I.H. e liofilizada, cêpa Ty2.

*Método de vacinação* — 0,5 ml da diluição a 1:10, intraperitonealmente, em 2 doses, com intervalo de 7 dias.

*Dose-teste* — Foi usada a DL50, que foi determinada na concentração de  $5 \times 10^7$ , pela regressão linear log-dose  $\times$  probitos (FINNEY<sup>9</sup>).

*Sangrias* — Feitas por técnica descrita anteriormente, diretamente do coração.

*Contagens* — Feitas pelo método convencional em placas, o número de germes correspondendo ao número de colônias, as contagens feitas em contador tipo A. O. Spencer.

*Meios de cultura* — Ágar nutriente e Mac Conkey (Difco).

RESULTADOS

QUADRO I

Grupo	Dose (log)	Nº de animais	Bacteriemia (log da média)
Contrôle	7,7	12	4,3 $\pm$ 0,6
Imune	7,7	12	0,1 $\pm$ 0,8

Conforme trabalho nosso anterior (BRANDÃO<sup>5</sup>), relações lineares inversas ocorrem entre a bacteriemia e a sobrevivência em certas combinações germe-hospedeiro, mostrando a reciprocidade existente entre estas grandezas. A percentagem de sobrevivência a uma determinada dose é diretamente proporcional à resistência.

A proporção esperada de sobreviventes, de acordo com o primeiro termo da série de Poisson, é:

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

S = percentagem de sobreviventes

b = log da bacteriemia

e = base dos logaritmos naturais

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

Tendo sido usada a DL50 como dose-teste, que por experiência prévia não mata os imunes, o parâmetro  $\lambda$  pode ser estimado no caso, em virtude da linha de regressão passar pela origem (Fig. 1), cujo valor é  $\lambda = -0,16$ .

Sendo assim, temos, como se vê no Quadro II:

QUADRO II

Proporção de sobreviventes

Grupo	Calculada	Por definição
Contrôle	$e^{-\lambda b} = 0,503$	0,500
Imune	$e^{-\lambda b} = 0,984$	1,000

As diferenças não são significantes ao nível de 0,05.

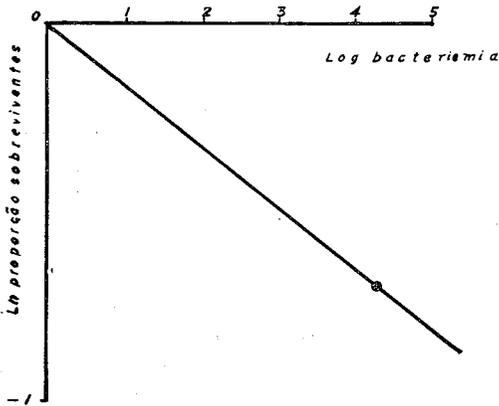


Fig. 1 — Linha de regressão log bacteriemia-ln proporção de sobreviventes.

Chamando de  $Y$  a resistência, podemos obter pela fórmula  $Y = 1000 \cdot e^{-\lambda b}$ , valores arbitrários, relacionados com a sobrevivência, que traduziriam resistências relativas num mesmo experimento.

No caso temos:

Grupo controle .....  $Y = 1000 \cdot e^{-\lambda b} = 503$

Grupo imune .....  $Y = 1000 \cdot e^{-\lambda b} = 934$

#### SUMMARY

#### *Method for laboratory evaluation of anti-typhoid vaccine.*

In a previous work we have demonstrated the possibility of using the measurement of bacteraemia as a criterion for the evaluation of resistance or immunity conferred by vaccines, based on our hypothesis that "the number of circulating organisms in a given time is an inverse function of resistance" which means "survival is an inverse function of bacteraemia", for certain agent-host combinations.

The expected proportion of surviving was calculated using the first term of Poisson series. The hypothesis could not be rejected since the differences between the calculated and expected values by definition were not significant at the 0.05 level.

In this paper the applicability of the method was demonstrated for another agent-host combination. It was used as challenge 1 LD50 which does not kill the vaccinated at all.

Using only two groups of animals, control and vaccinated, it was possible to calculate the parameter  $\lambda$  since the line passes through the origin and so obtaining the calculated values, which work as a check of the method.

#### REFERÊNCIAS

- BATSON, H. C. — The relative significance of graded immunizing and challenge doses in measuring the potency of vaccines. J. exper. Med. 90:233-253, 1949.
- BATSON, H. C. — Statistical methods in immunology. J. Immunol. 66:737-756, 1951.
- BATSON, H. C. — Statistics in experimental immunology. Ann. New York Ac. Sc. 52: 862-876, 1950.
- BONET-MAURY, P.; JUDE, A. & SERVANT, P. — La mesure statistique de la virulence et de l'immunité. Rev. Immunol. & Thérap. antimicr. 18:21-49, 1954.
- BRANDÃO, H. — Cinética da bacteriemia experimental na medida da resistência. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 4:152-158, 1962.
- COOPER, M. L. & KELLER, H. M. — Studies in dysentery vaccination. III. Immunity in mice injected with vaccines of Shigella. J. Immunol. 58:361-368, 1948.
- EDSALL, G.; CARLSON, M. C.; FORMAL, S. B. & BENENSON, A. S. — Laboratory tests of typhoid vaccines used in a controlled field study. Bull. World Health Org. 20: 1017, 1959.
- FELIX, A. — The preparation, testing and standardization of typhoid vaccine. J. Hyg. 49:268-287, 1951.
- FINNEY, D. J. — Probit analysis. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1947.
- GREENBERG, L. — On the control of typhoid vaccines. Proc. internat. Symp. Immunol., Opatija, 1959.
- LANDY, M. — Enhancement of the immunocapacity of typhoid vaccine by retention of the Vi antigen. Amer. J. Hyg. 58: 148-164, 1953.
- LUIPPOLD, G. F. — A proposed typhoid immunogenic unit for evaluation of anti-typhoid immunizing substances. Amer. J. publ. Health 35:153-158, 1945.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH — Minimum requirements: typhoid vaccine. 2nd. rev. Bethesda (Md.), 1953.
- YUGOSLAV TYPHOID COMMISSION — Field and laboratory studies with typhoid vaccines. Bull. World Health Org. 16:897, 1957.

Recebido para publicação em 15 março 1962.