

EMPREGO DA UNIDADE D₀ (MORTALIDADE ZERO) EM TITULAÇÕES DE VÍRUS

Helvécio BRANDÃO (1)

RESUMO

As características das unidades usadas em bioensaios foram revistas em comparação com uma nova unidade proposta por BAUER.

Titulações de vírus da influenza, estirpe PR8, foram comparadas pelos métodos mais comumente usados em dados tirados ao acaso de várias determinações, quanto à exequibilidade do método.

Usando-se um número grande de animais, em que a distribuição das tolerâncias seja simétrica, todos os métodos se mostraram satisfatórios, podendo-se assinalar o excesso de computações que o método de probitos exige em face de sua alta precisão.

Quando, porém, um número menor de animais foi usado e as distribuições de tolerâncias eram assimétricas, a DL₅₀ não pôde ser determinada pelos métodos mais simples, o que não aconteceu com a D₀, que pôde ser avaliada com a mesma simplicidade.

Além disso, com um número reduzidíssimo de animais e apenas uma dose, foi possível a sua determinação, desde que o coeficiente de regressão fôsse conhecido.

Tratando-se de um método fundado em bases matemáticas sólidas, sua superioridade nos pareceu bastante evidente, quanto à sua utilização e exequibilidade.

INTRODUÇÃO

A primeira unidade usada em medidas da toxicidade, em estimativas de potência ou em determinações da virulência de suspensões de microrganismos, foi a chamada "dose mínima mortal" (DMM). Segundo FINNEY⁷, esta unidade nunca foi claramente compreendida, como sendo a menor dose suficiente para matar pelo menos um animal ou para matar todos.

TREVAN¹³, analisando determinações de toxicidade, verificou e indicou sérios inconvenientes e dificuldades na sua obtenção.

Quando vários grupos de animais são inoculados com uma série de doses de valores decrescentes, os resultados são irregulares, alguns animais podendo sobreviver com altas doses e outros perecendo por doses baixas. Quando o número de animais é suficiente-

mente grande, estas irregularidades desaparecem.

Muito importante entre as verificações de TREVAN¹³, foi a determinação do grande intervalo que separava a maior dose que não matava nenhum animal e a maior que matava todos. Ele verificou uma seqüência de doses que não tinham nenhum efeito sobre os animais, a maior destas sendo a dose máxima tolerada, constatando por outro lado uma outra série de doses que matavam todos os animais, a menor das quais era a dose mínima mortal (BURN⁵).

Estes fatos mostram a falta de precisão em determinações da dose mínima mortal.

Quando se administra uma injeção contínua de uma substância a um animal, a dose mínima mortal pode ser estabelecida para

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo — Departamento de Microbiologia e Imunologia (Prof. J. de Oliveira Almeida).

(1) Assistente-Docente de Microbiologia e Imunologia.

êle. Entretanto quando a toxicidade é determinada por uma única injeção, a sua verificação é impossível, constatando-se apenas a morte ou a sobrevivência do mesmo.

TREVAN propôs, para testes desta natureza, a avaliação da dose que matasse 50% dos animais, que êle denominou DL_{50} , estabelecendo que o percentual de mortalidade fôsse observado num grupo de 30 animais pelo menos. Êle descreveu a curva que relacionava a dose com a percentagem de mortalidade, como característica para uma combinação droga-animal experimental.

Se a distribuição fôr simétrica para as tolerâncias, a dose mediana 50% coincidirá com a média da distribuição.

A significação da curva dosagem-resposta pode ser bem compreendida pelo trabalho de BEHRENS⁵, que estudou a variação da sensibilidade dos animais, determinando precisamente a dose letal para cada um. Se a relação log dose-resposta é mensurável obtém-se uma linha reta. Quando a resposta é o percentual de animais que apresentam o efeito, a relação é uma linha sigmóide.

A fim de obter uma relação linear neste caso, GADDUM⁸ propõe converter a resposta percentual no desvio da curva normal de frequência, ao qual a percentagem seja equivalente, usando-se o desvio normal equivalente.

Para evitar os sinais negativos, BLISS^{3,4} sugeriu adicionar 5 ao DNE que recebe o nome de probito (probability unit).

Em qualquer método biológico de resposta quantitativa ou em percentual, seu valor depende da razão de aumento do efeito em relação ao aumento da dose. Quanto menor a razão entre a DL_{100} e a DL_0 , mais preciso será o resultado. Isto pode ser expresso também como quanto menor for $1/b$ maior a precisão.

Disto resulta que sômente as curvas com declives fortes são merecedoras de confiança.

É preciso assinalar que estas características aplicam-se principalmente às dosagens da toxicidade, que foram estudadas especialmente por TREVAN e não às de infectividade, que derivam de um mecanismo inteiramente diferente. Nelas as partículas infectantes,

dotadas de capacidade de reprodução, atuam de maneira a reduzir o declive da curva dosagem-resposta, que traz em consequência uma diminuição da precisão das estimativas da DL_{50} .

As curvas de dosagem-resposta em titulações de infectividade são sempre relativamente achatadas, mesmo que "animais com resistências uniformes" fôssem usados.

A inclinação da curva quase nunca excede 2, pela análise probítica. Estas titulações nunca podem ter a mesma precisão das determinações farmacológicas, cujas curvas apresentam inclinações entre 5 e 20 (GADDUM⁸).

Em farmacologia quando uma dose igual ou maior que a chamada "dose efetiva individual" é administrada, a resposta é sempre obtida. Por outro lado, de acôrdo com MEYNELL¹¹, há evidência experimental que demonstra que as partículas infectantes agem independentemente depois da inoculação, o que não condiz com a hipótese da dose efetiva individual.

Em consequência, tanto para animais suscetíveis como para os parcialmente sensíveis, a curva dosagem-resposta será derivada do primeiro termo da série de Poisson, quando uma resposta quantal é esperada.

A dose mediana 50% é usada com relativa segurança em farmacologia, o que não acontece com as titulações de infectividade, principalmente em virologia.

Segundo BAUER², a dose 50% é um artigo de fé em virologia. Êle a considera sem precisão, de natureza artificial e com desvantagens práticas. Êle ainda afirma que a informação obtida é limitada pela natureza da resposta medida, ocorrência ou não de um efeito, geralmente a morte e que qualquer método quantitativo que tenha uma base tão limitada sofre de uma falta de precisão inerente, que não pode ser remediada.

Uma importante verificação foi apresentada por GARD⁹, que a recíproca do tempo de incubação em animais infectados com certos vírus, apresentava uma regressão linear com o log da diluição do vírus e que

esta relação podia ser usada como meio de titulação de vírus.

BAUER² demonstrou que em camundongos infectados com certos vírus havia uma relação linear entre a recíproca do tempo de sobrevivência e o log da diluição dos vírus inoculados e que a regularidade desta relação foi tal que era possível usá-la como base de um teste de atividade quimioterápica. Em trabalhos ulteriores as propriedades da curva dosagem-resposta foram estudadas exaustivamente. Assim foi verificado que a curva não aproxima o eixo das abscissas assintoticamente, mas fornece uma interceptção inquestionável. Neste ponto a ordenada é zero.

Considerando que todos os animais sobrevivam indefinidamente e o ponto representa a D_0 , ponto de mortalidade zero. Êste não deve ser confundido com DL_0 da curva sigmóide que é indeterminado devido à aproximação assintótica da curva.

A DL_{50} torna-se indeterminada, desde que um número indefinido de ordenadas pode ser consistente com uma sobrevivência de 50% uma vez que o tempo de sobrevivência é considerado.

O título em D_0 é obtido através do coeficiente de regressão b e pelo ponto de interceptção c obtido pelo método dos quadrados mínimos e é $-b^{-1}.c$.

O título de uma preparação de vírus de concentração desconhecida pode ser calculado com o auxílio de uma curva dosagem-resposta prévia, desde que o coeficiente de regressão permaneça constante.

Segundo BAUER², a morte de um único animal ocorrendo em tempo t depois da infecção, t^{-1} , define um ponto na curva dosagem-resposta, o conteúdo de vírus sendo dado por $t^{-1}.b^{-1}$. O tempo de sobrevivência de um único animal é, portanto, uma estimativa do título. O título pode ser obtido com uma única diluição sem conhecimento prévio de um ponto de titulação esperado e o insucesso muitas vezes encontrado nas determinações de DL_{50} resultante do emprêgo de uma série de diluições inapropriada nunca pode ocorrer. O título médio é obtido

pela média das recíprocas do tempo de sobrevivência.

O tempo de sobrevivência e sua recíproca, de acôrdo com BAUER, são contínuos no sentido matemático, em que podem assumir um número infinitamente grande de valores, enquanto uma resposta quantal, não contínua, em vez de fornecer uma resposta linear, vai apresentar a muito menos conveniente curva sigmóide, com uma informação limitada.

Propósito do presente trabalho

O propósito do presente trabalho é a utilização da unidade D_0 de acôrdo com o método preconizado por BAUER, em titulações do vírus da influenza, em comparação com os métodos mais utilizados para a determinação da DL_{50} .

Tratando-se de unidades diferentes não pode haver uma comparação de valores obtidos. Dosagens tiradas ao acaso servirão para mostrar a exequibilidade dos métodos.

MATERIAIS E METODOS

Vírus: estirpe PR8 de vírus da influenza, recebido do Centro Mundial de Influenza, Mill-Hill, London.

Mantidos por passagens em ovos embrionados de acôrdo com a técnica usual, os líquidos alantóicos após centrifugação para remover detritos, congelados e conservados a -70°C .

Título hemaglutinante: O título é expresso em log na base 2.

Diluições (log₂):

0 +	8 +
1 +	9 +
2 +	10 +
3 +	11 +
4 +	12 +
5 +	13 +
6 +	14 (cont.)
7 +	

Título: 1:4.096.

Camundongos — Suíços, 14-16 g, machos, 4-6 semanas de idade.

RESULTADOS

QUADRO I

Titulação de vírus da influenza (PR8) em unidades D_0 (via endovenosa)

Log ₂ da dose	Mortalidade por dias										Média da recíproca do tempo de sobrevivência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	16	2	—	—	—	—	—	—	—	—	0,94
-1	12	6	—	—	—	—	—	—	—	—	0,83
-2	6	7	1	1	1	—	—	—	—	—	0,57
-3	1	3	1	2	—	1	1	—	—	—	0,20
-4	—	—	1	1	2	2	—	—	—	—	0,07
-5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
-6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
											2,61

Tomando-se as médias das recíprocas do tempo de sobrevivência para cada diluição e projetando em ordenadas, tendo como abscissas os log das diluições, obtém-se uma curva cujo coeficiente de regressão é:

$b = -0,24$ e o intercepto, na ordenada,

$c = 0,99$ (Fig. 1).

O cálculo da linha pelo método dos quadrados mínimos nos fornece:

$$b = -0,24$$

$$c = 0,99$$

$$D_0 = -b^{-1} \cdot c = -4,12$$

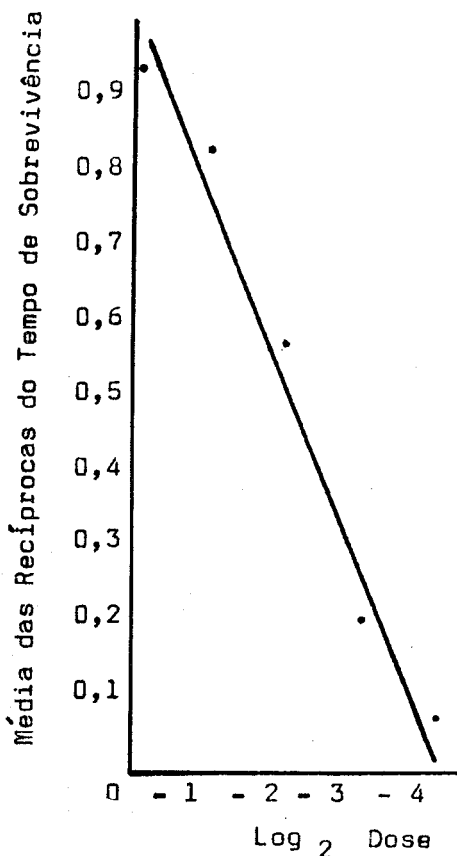


Fig. 1 — Curva dosagem-resposta.

QUADRO II

Titulação de vírus da influenza (PR8) em unidades DL_{50} (método de Reed-Muench)

Log ₂ da dose	Dados observados		Dados acumulados		Mortalidade (%)
	Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes	
-5	—	18	—	41	—
-4	6	12	6	23	20
-3	9	9	15	11	58
-2	16	2	31	2	94
-1	18	—	49	—	100
0	18	—	67	—	100

A distância proporcional encontrada foi equívale à diluição de 1:9,2. de 0,21, fornecendo o resultado $2^{-3,21}$, que

QUADRO III

Titulação pelo método de Kärber

Diluições do vírus (log ₁₀)	Animais (nº)	Mortos (nº)	Mortalidade proporcional
-0,0	18	18	1,00
-0,3	18	18	1,00
-0,6	18	16	0,89
-0,9	18	9	0,50
-1,2	18	6	0,33
-1,5	18	0	0,00

$\text{Log } DL_{50} = D - [\Delta (S - 0,5)] = -0,96$ O antilog corresponde à diluição 1:9,1.

QUADRO IV

Cálculo da DL_{50} pelo método dos probitos

Dose (log ₂)				Probita empírico	Probita esperado	Peso nw	Probita corrigido y	nwx	nwy
x	n	r	p						
0	18	18	100	—	—	—	—	—	—
-1	18	18	100	—	—	—	—	—	—
-2	18	16	89	6,23	6,06	7,29	6,24	14,58	45,48
-3	18	9	50	5,00	5,21	11,28	5,00	33,84	56,40
-4	18	6	33	4,56	4,56	10,45	4,63	41,80	48,38
-5	18	0	0	—	—	—	—	—	—
-6	18	0	0	—	—	—	—	—	—
						29,02		90,22	150,26

$\bar{X} = 3,10$

$\bar{Y} = 5,17$

Uma linha provisional, traçada "a olho", 3,25, que corresponde à diluição 1:9,5, fornece uma estimativa da DL_{50} que é log

Cálculo da linha:

$$S_{xx} = Snwx^2 - \frac{(Snwx)^2}{Snw} = 297,88 - 280,48 = 17,40$$

$$S_{xy} = Snwxy - \frac{(Snwx)(Snwy)}{Snw} = 453,71 - 467,14 = -0,1343$$

$$b = S_{xy}/S_{xx} = -0,00773$$

$$Y = y + b(x - \bar{x})$$

$$Y = 5,17 + (-0,007)(x - 3,10)$$

Os valores encontrados, foram os seguintes pontos calculados é uma reta, que fornece em probitos 5,6; 5,1; 4,6, que são bastante o valor de 3,2 para a DL_{50} , cujo antilog aproxima- aproximados. A linha traçada através dos responde à diluição 1:9,2.

QUADRO V

Titulação de vírus da influenza por via peritoneal

Log ₂ da dose de vírus	Mortalidade por dias										Média da recíproca do tempo de sobrevivência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	3	2	—	—	—	1	—	—	—	—	0,69
-1	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	0,10
-2	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	0,05
-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
-4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Os resultados encontrados foram os seguintes:

$$b = -0,30$$

$$c = 0,60$$

$$D_0 = -b^{-1} \cdot c = -1,99$$

Com um número relativamente pequeno de animais, 6 por dose, foi possível a determinação da D_0 sem nenhuma dificuldade.

QUADRO VI

Titulação pelo método de Reed-Muench (mesmos dados)

Log ₂ da dose de vírus	Dados observados		Dados acumulados		Mortalidade(%)
	Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes	
-4	—	6	—	20	—
-3	—	6	—	14	—
-2	2	4	2	8	20
-1	2	4	4	4	50
0	6	—	10	—	100

Este método requer para uso conveniente, que as diluições sejam espaçadas em escala logarítmica, que aproximadamente o mesmo número de animais seja usado em cada diluição e que a DL_{50} fique no centro da escala de diluições que sejam capazes de produzir mortalidades de 0 a 100%.

Verifica-se que os dados acima não apresentam a simetria requerida pelo método. Não fôra o achado acidental da DL_{50} para o antilog de -1 , com estes dados não seria possível a sua obtenção, de acôrdo com os requisitos do método.

QUADRO VII

Titulação pelo método de Kärber (mesmos dados)

Log ₂ da dose de vírus	Mortos	Sobreviventes	Mortalidade proporcional
0	6	—	1,00
-1	2	4	0,33
-2	2	4	0,33
-3	—	6	—
-4	—	6	—
			1,66

$$\log_2 DL_{50} = D - [\Delta (S - 0,5)] = -1,16$$

A determinação da DL_{50} foi possível apesar dos dados escassos, porém não apresenta a segurança necessária, uma vez que os dados

não apresentam as características que o método exige, que são as mesmas do precedente.

QUADRO VIII

Titulação em unidades D_0 por inoculação intranasal do vírus PR8 — Dose única: 25.000 DL_{50} 10 camundongos

Log dose (log ₁₀)	Mortalidade em dias										Recíproca do tempo de sobrevivência (média)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
4,4	—	—	2	6	2	—	—	—	—	—	1,05

A média das recíprocas dos tempos de sobrevivência dividida pelo coeficiente de regressão obtido previamente em determinações pela via intranasal, $-0,80$, fornece o log da diluição correspondente 1,3, cujo antilog é 20, portanto 20 unidades é o valor da D_0 .

Com estes dados é absolutamente impossível a determinação da DL_{50} , por qualquer método.

SUMMARY

Use of unit D_0 (zero mortality) in virus titrations.

A brief review of the main characteristics of the units used in bioassay was presented in regard to the new one proposed by Bauer, named D_0 (zero mortality).

Several data from influenza virus titrations performed in our department, were taken at random to show the different features of the methods most commonly used in LD_{50} titrations and the D_0 .

We have chosen the Kärber method, for being the simplest; Reed-Muench, the most used, probits for its superior theoretical foundations and the D_0 .

It was found that when the tolerance distribution of doses is symmetrical, no difficulties were found, calling attention to the laborious computations of the probit method, which required a calculating machine. The other methods were performed using slide-rules.

On the other hand, when a limited number of animals were used and the tolerance distribution of doses was assymmetrical, the data were not suited for the LD_{50} calculation by the simple methods and when results were possible they could not be considered reliable, in view of their characteristics not satisfying the requirements of the methods, the D_0 being calculated with no difficulty at all.

When a very limited number of animals and single-dose was used, in which the titration of the LD_{50} was quite impossible, still the D_0 was found, with no difficulty, provided the regression coefficient was known previously.

Based on solid mathematical grounds and requiring so simple methods for computation, the D_0 certainly should occupy the special position it deserves in virological titrations.

REFERÊNCIAS

1. BAUER, D. J. — The chemotherapeutic activity of compounds of copper, rhodium and certain other metals in mice infected with neurovaccinia and Ectromelia viruses. Brit. J. exper. Pathol. 39:480-489, 1958.
2. BAUER, D. J. — Some applications of a single-dilution method of titrating neurotropic viruses in zero mortality (D_0) units. Brit. J. exper. Pathol. 41:130-139, 1960.
3. BLISS, C. I. — The method of probits. Science 79:38-39, 1934.
4. BLISS, C. I. — The method of probits: a correction. Science 79:409-410, 1934.
5. BURN, J. H.; FINNEY, D. J. & GOODWIN, L. G. — Biological standardization. 2nd ed. London, Oxford Univ. press, 1950.
6. FINNEY, D. J. — Probit analysis. London, Cambridge Univ. press, 1947.
7. FINNEY, D. J. — Statistical method in biological assay. London, Charles Griffin, 1952.
8. GADDUN, J. H. — Methods of biological assay depending on a quantal response. Med. Res. Council spec. Rep. Ser. n° 183, 1933.
9. GARD, S. — Encephalomyelitis of mice: method for measurement of virus activity. J. exper. Med. 72:69-77, 1940.
10. KÄRBER, G. — Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. exper. Pathol. & Pharmakol. 162:480-483, 1931.
11. MEYNELL, G. G. — Inherently low precision of infectivity titrations using a quantal response. Biometrics 13:149, 1957.
12. REED, L. J. & MUENCH, H. — Simple method of estimating 50 per cent endpoints. Amer. J. Hyg. 27:493-497, 1938.
13. TREVAN, J. W. — Error of determination of toxicity. Proc. Roy. Soc., ser. B. 101: 483-514, 1927.

Recebido para publicação em 5 julho 1962.