

## BIOENSAIO DA VACINA ANTITIFÓIDICA ORAL

Helvécio BRANDÃO (1)

### RESUMO

O bioensaio consiste essencialmente na imunização de um grupo de camundongos por via oral, um outro semelhante ficando como controle.

Após tempo determinado, todos os animais são inoculados por via oral com uma suspensão de germes vivos, padronizada, e sangrados no coração em prazo certo para contagem de bactérias.

A diferença dos logaritmos das médias entre os dois grupos forneceria um índice de proteção, em virtude da bacteriemia ser relacionada inversamente com a resistência.

### INTRODUÇÃO

A questão da eficácia das vacinas orais contra a febre tifóide não está ainda decidida, apesar de ter sido recomendada por BESREDKA<sup>1</sup> há cerca de 40 anos. Seu uso é limitado a alguns países que a empregam de maneira empírica, sem nenhuma pesquisa prévia, feita no laboratório ou no campo.

PENSO<sup>5</sup>, em trabalho apresentado ao Simpósio Internacional de Imunologia em Opatija, manifesta-se inteiramente contrário às idéias fundamentais que constituem as bases da vacina oral de BESREDKA<sup>1</sup>, propondo que o uso destas vacinas seja suspenso, até que dados precisos de sua ação e de sua capacidade de produzir uma imunidade local sejam obtidos, assim como os de sua eficácia provada estatisticamente em experiências de campo.

Somos de opinião, que o problema não é provar ou negar as idéias de BESREDKA, mas abordar o assunto corretamente, isto é, procurando estabelecer um critério de controle da vacina no laboratório, seguido das experiências de campo, pois é possível que ela confira um estado de resistência à infecção, não de acordo com o mecanismo explicado por BESREDKA, mas por um outro qualquer.

Em nossa opinião, uma grande lacuna existe na falta de um bioensaio para determinação de sua capacidade antigênica e protetora, primeiro passo para as outras verificações.

Não existe uma vacina oral padronizada, portanto não devemos generalizar o termo. Pesquisas futuras poderão evidenciar através deste ou daquele processo um produto dotado de capacidade protetora. Uma preparação eficiente teria certamente grande importância em virtude de sua administração fácil, em programas de medicina preventiva pela Saúde Pública. O fato da via oral ser no homem a porta de entrada dos bacilos, que em alguns produzirão a febre tifóide e em outros induzirão um estado de resistência, parece-nos uma séria justificativa para investigações nesta linha.

O propósito do presente trabalho é a apresentação de um bioensaio para avaliação da vacina oral contra a febre tifóide baseado na cinética de uma bacteriemia provocada por via oral, cuja base é exatamente a mesma da dinâmica da infecção tifóidica no homem e da sua proteção.

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

(1) Assistente-docente.

Fundamenta-se em trabalho anterior do autor<sup>3</sup>, que imunizando camundongos por via oral com uma vacina por êle preparada, constituída de  $5,33 \times 10^{11}$  bactérias por ml, cêpa Ty<sup>2</sup> de *S. typhosa*, obteve um alto grau de proteção verificado pelo método de contrôle da vacina parenteral, segundo as normas do N.I.H. (*Minimum requirements for typhoid vaccina, 1942*)<sup>4</sup>.

Em várias experiências uma proteção significativa da vacina para o camundongo foi observada, das quais duas serão reproduzidas como exemplos (Quadro I).

ra que a vacina e após um tempo determinado são todos sangrados no coração para contagem de germes. A diferença das médias obtidas nos dois grupos, vacinado e contrôle, expressas em logaritmos, forneceria um índice de proteção nos moldes do descrito por SULITZEANU<sup>7</sup>, para determinação de diferenças de contagens de bactérias no baço.

*Camundongos*: raça Swiss, 18-20 g, machos, separados ao acaso.

*Vacina*: preparada com *S. typhosa*, estirpe Ty<sup>2</sup>, procedente do Instituto Butantã.

QUADRO I

Animais	Vacina (nº de doses)	Concentração (germes/ml)	Dose-teste (intraperitoneal)	Resultados (mortes/total)
Vacinados	1	$5,33 \times 10^{11}$	$2 \times 10^8$ germes/ml em mucina	4/12
"	2	$5,33 \times 10^{11}$	$2 \times 10^8$ germes/ml em mucina	0/12
"	3	$5,33 \times 10^{11}$	$2 \times 10^8$ germes/ml em mucina	0/12
Contrôles	—	—	$2 \times 10^8$ germes/ml em mucina	12/12
Vacinados	3	$5,33 \times 10^{11}$	$6 \times 10^7$ germes/ml em solução salina	0/15
Contrôles	—	—	$6 \times 10^7$ germes/ml em solução salina	8/15

Na parte superior do quadro, a mortalidade esperada era de 100%, no outro exemplo da parte inferior, 50%, nos contrôles.

Nestas experiências em que os animais foram vacinados por via oral e receberam a dose-teste por via peritoneal, a proteção conferida pela vacina parece ser de natureza geral.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O bioensaio da vacina oral baseia-se em técnica preconizada por BRANDÃO<sup>2</sup>, para avaliação da vacina parenteral, com algumas modificações.

Consiste essencialmente no seguinte: dois grupos de camundongos separados ao acaso, vão constituir o grupo vacinado e o grupo contrôle. O primeiro recebe por via oral a vacina por meio de uma sonda fina e flexível de nylon; após 7 dias, ambos os grupos recebem por via oral uma dose-teste de germes vivos, introduzidos da mesma maneiri-

Crescimento em caldo peptonado durante 48 horas, mais crescimento em ágar nutriente de 18 horas, tratada pelo álcool na proporção de 75% durante 48 horas, centrifugada e ressuspensa em solução salina, com uma concentração de  $5,33 \times 10^{11}$  por ml.

*Imunização*: administrada por via oral por meio de uma sonda fina e flexível de nylon, sob anestesia pelo éter, durante 3 dias consecutivos, os animais em jejum.

*Dose-teste*: feita por via oral exatamente nas mesmas condições da vacina, usando suspensão viva da cêpa Ty<sup>2</sup> de 6 horas de crescimento, na concentração de  $6 \times 10^9$  germes por ml, 7 dias após a vacinação.

*Sangrias*: feitas por punção cardíaca para contagens pelo método convencional em placas, enumeração das colônias em contador tipo A. O. Spencer, considerando-se como número de bactérias o número de colônias. As sangrias eram feitas 1 hora após a dose-teste.

*Índice de proteção:* consiste na diferença das médias das contagens expressas em logaritmos entre o grupo controle e o vacinado.

$$I.P. = \frac{\sum \log X_c}{N} / \frac{\sum \log X_v}{N}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Partindo da hipótese que as diferenças obtidas seriam devidas às flutuações do acaso, os seguintes resultados (Quadro II) foram analisados.

QUADRO II

Grupos	Animais (nº)	Vacina (germes/ml)	Dose-teste (germes/ml)	Bacteriemia (log média)
Vacinados .....	10	5,33 × 10 <sup>11</sup>	6 × 10 <sup>9</sup>	1,67 ± 0,9
Contrôles .....	10	—	6 × 10 <sup>9</sup>	2,84 ± 0,6

$$I.P. = \frac{2,84}{1,67} = 1,17$$

$$E.P._{i.p.} = \sqrt{\frac{DP_c^2}{N} + \frac{DP_v^2}{N}} = \sqrt{\frac{0,76}{N} + \frac{1,67}{N}} = 0,494$$

$$R.C. = \frac{\bar{X}_c - \bar{X}_v}{E.P.} = \frac{1,17}{0,494} = 2,3$$

A diferença entre as médias foi duas vezes maior que seu erro padrão, sendo significativa ao nível de 0,05, a hipótese devendo ser rejeitada.

A bacteriemia sendo inversamente relacionada com a resistência (BRANDÃO<sup>3</sup>), o índice encontrado apresenta um valor concreto, mostrando um efeito favorável desta vacina no camundongo.

Experiências ulteriores em termos quantitativos e em bases comparativas com a vacina parenteral são necessárias.

SUMMARY

*Bioassay for the evaluation of oral typhoid vaccine.*

It consists essentially in the vaccination by oral route of a group of mice, another alike remaining as control.

All animals are challenged by oral route with a standardized living suspension of typhoid bacillus, after a certain time and bled from the heart in due time for bacterial groups.

The difference between mean log counts

in both groups gives a protective index, since bacteriemia is inversely related to resistance.

REFERENCIAS

1. BESREDKA, A. — Immunisation locale. Paris, Masson, 1925.
2. BRANDÃO, H. — Cinética da bacteriemia experimental na medida da resistência. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 4:152-158, 1962.
3. BRANDÃO, H. — Vacinação antitífóidica oral em camundongos e coelhos. Belo Horizonte, 1955. Tese Fac. O.F. Univ. Minas Gerais.
4. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH — Minimum requirements for typhoid vaccine. Bethesda (Md), 1942.
5. PENSO, G. — Considerations on the typhoid enterovaccines. Internat. Symp. Immunol., Opatija (Iugoslávia), 1959.
6. SILER, J. F. *et al.* — Immunisation to typhoid fever. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1942.
7. SULITZEANU, D. — Passive protection experiments with *Brucella* antisera. J. Hyg. 53: 133-142, 1955.

Recebido para publicação em 16 abril 1962.