

UTILIZAÇÃO DA RADIAÇÃO GAMA NO PROCESSAMENTO DE VACINAS
BACTERIANAS: um estudo com *Salmonella typhimurium*

EDMILSON DOS SANTOS ARAUJO

Orientador: Dr. Darcy Martins da Silva

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Grau de
Mestre em Energia Nuclear na Agricultura

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro, 1978

A Celda Regina
e Olívia Gabriela

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa Dissertação, em especial às seguintes pessoas:

- Ao Dr. Darcy Martins da Silva, pela orientação segura e amizade em todos os momentos;
- Ao Dr. Admar Cervellini, Diretor do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), pelas facilidades para execução do trabalho e pelas bolsas de estudo da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) para o Curso de Pós-Graduação;
- Ao Dr. Humberto de Campos, pela valiosa ajuda nas análises estatísticas;
- Aos Dr.^s Akihiko Ando, Antonio J. Oliveira, Avelino R. Oliveira e Frederico M. Wiendl, pela revisão dos originais e valiosas sugestões;
- Ao Eng.^o-Agr.^o Aracynio T. Araújo, Diretor da Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista, pela ajuda financeira na confecção desta Dissertação;
- Aos Colegas da Seção de Microscopia Eletrônica, pelos bons momentos passados juntos e pela ajuda quando foi necessária;

Aos Professores, funcionários, colegas e amigos do CENA, pela ajuda e incentivo;

A Sr.^{ta} Marta L. Tagliatti e Sr. J. Elias Gomes, pela prestimosa ajuda nos trabalhos experimentais;

E à minha família, pelo incentivo durante todos esses anos.

Í N D I C E

	Página
1 - RESUMO	1
2 - INTRODUÇÃO	4
3 - REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 - Efeito da Radiação Ionizante nos Antígenos..	7
3.2 - Radiossensitividade das Células Bacterianas.	9
3.3 - Vacinas Irradiadas	12
3.4 - Conceitos sobre a Eficiência de uma Vacina..	16
4 - MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 - Determinação da Dose Mínima Inativante - DMI.	21
4.1.1 - Preparo da suspensão bacteriana	21
4.1.2 - Irradiações	23
4.1.3 - Contagens dos sobreviventes e análise estatísticas	24
4.2 - Estudo Comparativo da Imunogenicidade de Células de <i>Salmonella typhimurium</i> Inativadas por Radiação Gama e Calor	25
4.2.1 - Teste de proteção em camundongos	25
4.2.1.1 - Animais	25
4.2.1.2 - Tratamentos	25
4.2.1.3 - Preparo das vacinas e vacinação	26
4.2.1.4 - Inoculação dos camundongos	28

	Página
4.2.2 - Teste de dupla difusão em agar	28
4.2.2.1 - Obtenção dos anti-soros	28
4.2.2.2 - Condução do teste de dupla difusão em agar	29
4.3 - Estudo do Efeito da Radiação Gama e do Ca- lor sobre a Morfologia Externa da Célula de <i>S. typhimurium</i> a Nível de Microscopia Eletrônica	31
5 - RESULTADOS	33
5.1 - Determinação da Dose Mínima Inativante - DMI ..	33
5.1.1 - Dados de irradiação de células de <i>S. typhimurium</i> 6.616	33
5.1.2 - Análise estatística	38
5.2 - Estudo Comparativo da Imunogenicidade de Células de <i>Salmonella typhimurium</i> Inati- vada com Radiação Gama e com Calor	41
5.2.1 - Teste de proteção em camundongos	41
5.2.1.1 - Mortalidade dos camundongos	41
5.2.1.2 - Análise estatística	43
5.2.2 - Teste de dupla difusão em agar	44
5.3 - Efeito da Radiação Gama e do Calor sobre a Morfologia Externa da Célula de <i>S. ty</i> <i>phimurium</i> a Nível de Microscopia Eletrô- nica	45

	Página
6 - DISCUSSÃO	49
7 - CONCLUSÕES	63
8 - SUMMARY	66
9 - LITERATURA CITADA	68

1 - RESUMO

As salmonelas são um grupo de bactérias responsáveis por perturbações entéricas no homem e nos animais domésticos, trazendo grandes prejuízos e causando alta mortalidade nos rebanhos brasileiros.

Dos tratamentos para as doenças infecciosas existente até o momento, a vacinação constitui-se no mais eficiente e menos dispendioso. Existem vários processos para se obter vacinas contra bactérias. O uso da radiação ionizante vem se tornando numa boa alternativa para melhoria da eficiência das vacinas não só contra bactérias, mas contra quaisquer parasitos.

Porém muitos fatores interferem na utilização da radiação ionizante para inativar os patógenos causadores de doenças. Para a obtenção de vacinas irradiadas com a máxima eficiência, esses fatores devem ser otimizados.

Na presente Dissertação, foi proposto um método para obtenção de uma dose mínima inativante (DMI) de radiação que permite obter o ponto em que há uma "morte mitótica" para todas as células de uma suspensão bacteriana com o mínimo de dano para as estruturas antigênicas. O método proposto se baseia na mudança da unidade experimental convencionalmente usada na irradiação de bactérias que é cada célula bacteriana, para um número fixo de células bacterianas contidas num determinado volume.

Foi utilizada como modelo a *Salmonella typhimurium* 6.616 e a radiação gama proveniente do ^{60}Co . O método em questão mostrou-se simplificado, eficiente e exige menos trabalho, tempo e material que os métodos usuais, além de permitir a obtenção de um valor definido para a DMI. O valor da DMI encontrado pelo teste binomial para a *S. typhimurium* 6.616 foi 0,55 MR.

Também foi estudada através de testes serológicos e de proteção em camundongos a imunogenicidade das vacinas irradiadas comparando-se com vacinas preparadas pelo aquecimento. Os resultados indicaram que irradiando uma suspensão bacteriana com a DMI, obtém-se uma vacina tão eficiente quanto à melhor vacina obtida pelo aquecimento. Verificou-se também que tanto

o aquecimento como a irradiação de bactérias em meio aquoso mo
dificaram sua estrutura antigênica.

No microscópio eletrônico observou-se uma relação en
tre o dano causado pelos tratamentos na morfologia da célula
bacteriana e a proteção da respectiva vacina observada pelo
teste de proteção em camundongos.

2 - INTRODUÇÃO

As salmonelas são bacilos gram-negativos, que caracteristicamente não fermentam lactose e são patogênicos para o homem ou animais. São bacilos não esporulados e seu tamanho varia entre $0,4 - 0,6 \times 1,0 - 3,0 \mu$. A maioria das espécies, e dentre elas a *Salmonella typhimurium*, é móvel, com flagelos peritríquios. As diferentes espécies estão intimamente relacionados, sob o aspecto antigênico.

Nos animais domésticos, as salmonelas estão principalmente associadas às doenças da criação, como no caso do paratifo, doença infecciosa que aparece geralmente a partir da segunda semana de vida, caracterizando-se por diarréias e septicemia. É a diarréia mais frequente em nosso país, causando grandes prejuízos aos criadores. A taxa de mortalidade nessa

doença é da ordem de 50% . Os bezerros que se recuperam tem crescimento e engorda anormais, tornando a sua exploração anti-econômica.

A manutenção do rebanho em perfeitas condições de saúde pelo tratamento com quimioterápicos, exige um alto custo, tornando muito caro o produto final, ou seja, a carne. O mais interessante seria fazer com que o organismo animal aprenda a se defender contra os agentes patogênicos, imunizando-os por meio de uma vacinação prévia.

Ao vacinar o animal, isto é, ao se introduzir microrganismos patogênicos, é necessário que estes não se multipliquem, nem desenvolvam sintomas patológicos (doenças), mas apenas estimulem uma reação imunológica específica, protegendo o organismo a ser defendido.

Do ponto de vista da eficiência, muitas das vacinas bacterianas utilizadas não correspondem ao esperado. Porém com o advento das técnicas nucleares e o nascimento da radiobiologia iniciaram-se pesquisas no sentido de se utilizar radiações ionizantes para inativar microrganismos, visando a obtenção de agentes imunizantes mais eficientes: as chamadas "vacinas irradiadas".

Como o uso da radiação gama em dosagem adequada espera-se obter uma célula microbiana incapaz de se multiplicar, mantendo suas estruturas antigênicas com alterações mínimas.

O princípio adotado neste trabalho para se conseguir o menor dano às estruturas antigênicas das células bacterianas, foi o de encontrar uma dose mínima inativante (DMI) de radiação gama, que impeça a multiplicação do microrganismo.

Considerando-se as possíveis vantagens das vacinas irradiadas, procurou-se alcançar os seguintes objetivos neste trabalho:

- 1 - Obter um método simplificado para determinação da dose mínima inativante (DMI) de radiação gama em *Salmonella typhimurium* 6.616, método este que sirva de modelo para determinação da DMI para outras espécies bacterianas.
- 2 - Estudar através dos testes serológicos e de proteção em camundongos, a imunogenicidade de células bacterianas submetidas à radiação gama e ao calor.
- 3 - Estudar a nível de microscopia eletrônica as modificações externas nas células, submetidas aos dois tratamentos, relacionando-as com a imunogenicidade.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Efeito da Radiação Ionizante nos Antígenos

Desde que se tornou possível a utilização das radiações ionizantes na radiobiologia, muitos pesquisadores se preocuparam em conhecer o efeito dessas radiações sobre as propriedades biológicas das moléculas. SKALKA e ANTONI (1970) estudaram a radiosensitividade de proteínas e concluíram que as radiações ionizantes causam um decréscimo e até perda das atividades biológicas, tais como as funções enzimáticas, hormonal, tóxicas e imunológica. Verificaram também que as propriedades antigênicas são mais radioresistentes que as outras funções biológicas das proteínas.

Num estudo com albumina de soro bovino ROSSETTINI *et alii* (1975) demonstraram que em dosagens de radiação gama acima de 2,0 Mrad, as moléculas modificam sua especificidade imunológica. Também as propriedades de absorção de ultra-violeta são alteradas e se observam algumas modificações com respeito ao conteúdo de aminoácidos em comparação com moléculas não irradiadas.

Quanto às toxinas bacterianas, PREVITE *et alii* (1967) estudaram o efeito da radiação gama na detoxificação dos determinantes letais de lipopolissacarídeos de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* em solução aquosa e também daquelas presentes em células de *Salmonella typhimurium*. Neste trabalho, ficou evidenciada a existência de dois ou mais determinantes letais e antigênicos, e que o efeito da radiação é diferencial na toxicidade, antigenicidade e pirogenicidade. Indicando que provavelmente as atividades letais, antigênicas e pirogênicas, estão em sítios funcionais separados.

Estudando a radiosensitividade da toxina de *Clostridium botulinum*, SKULBERG (1970) concluiu que são necessárias doses mais altas que as doses necessárias para esterilizar esporos de *Clostridium botulinum* (4,5 Mrad).

Também em estudos relativos à detoxificação pela radiação ionizante de toxinas bacterianas e dos venenos ofídicos SALAFRANCA (1970) verificou uma diminuição na toxicidade das toxinas e em especial dos venenos. Quando inoculados em cava-

los, essas toxinas e venenos aumentaram o título dos imunossoros.

Uma revisão completa de trabalhos russos sobre o assunto foi feita por HOPMAN (1962). Na revisão, o autor relata resultados indicando que as radiações ionizantes provocam alterações insignificantes nas propriedades antigênicas, imunogênicas ou tóxicas dos organismos entéricos. Cita que os antígenos de organismos inativados com radiação gama, são menos tóxicos que aqueles de vacinas formolizadas. Mostra ainda que as vacinas irradiadas retêm maior imunogenicidade do que vacinas formolizadas ou aquecidas, mesmo após quatro meses de armazenamento. No caso de antígenos de rickettsia, mostrou que a radiação não afeta a integridade dos antígenos Vi. A irradiação de *Rickettsia prowazeki* e *Rickettsia quintana* com doses de 5,0 MR em ampolas seladas, resultou na inativação dentro de 2 a 4 dias, não deformando ou dissolvendo as rickettsias. O potencial antigênico das preparações era preservado, sem aumentar a atividade complementar, e com reações insignificantes após inoculação em cobaias. As ampolas fechadas se mantiveram estéreis sem o uso de preservativos.

3.2 - Radiossensitividade das Células Bacterianas

Muitos fatores afetam a radiossensitividade das bactérias. Segundo LEA (1956) a presença ou não de agentes pro-

tetores podem modificar completamente a curva de sobrevivência de bactérias expostas às radiações ionizantes. LICCIARDELLO (1964) demonstrou que a taxa de destruição de *Salmonella typhimurium* pela "energia ionizante" era significativamente aumentada quando era aplicada simultaneamente à "energia térmica". A aplicação simultânea era mais eficiente que a aplicação consecutiva.

Além desses fatores, há uma grande variação quanto à radiosensitividade entre os diversos grupos, espécies e formas de microrganismos, o que é notado pela grande variação nas doses de esterilização. Estas variam desde de 200 KR para leveduras, conforme HOPMAN (1962) até 4,5 Mrad para esporos de *Clostridium botulinum*, observado por SKULBERG (1969). Para bactérias na forma não esporulada, uma das espécies mais resistentes é descrita por YOSHINAKA *et alii* (1973), a *Antrobacter radiotolerans* cuja dose esterilizante é ao redor de 1,0 Mrad.

TUMANIAN *et alii* (1958) indicam serem necessários de 0,40 a 0,60 MR para inativação de enterobactérias, e PREVITE (1968) concluiu após exaustiva investigação que uma dose de 1,0 MR é cerca do dobro da dose necessária para reduzir a zero o número de células vivas após irradiação de uma suspensão salina de *Salmonella typhimurium*.

GIBSON (1975) descreve em linhas gerais a metodologia usual para determinação da curva de sobrevivência de células bacterianas submetidas à irradiação. Ressalta que havendo somente uma "morte mitótica" das bactérias, considera-se morta

a célula que se divide não mais de cinco vezes. O autor relata também os fatores que afetam os resultados: tipo de célula, tipo de radiação, taxa de dose, grau de oxigenação das células e a adição de protetores químicos da radiação.

Segundo BIER (1965) o tratamento matemático e estatístico dado às curvas de mortalidade das bactérias é decorrente de uma "distribuição normal" das resistências individuais das células bacterianas. Quando se projeta num gráfico a percentagem de células mortas pelo logaritmo da dose, obtém-se a curva normal integrada ou curva sigmoide. O autor ressalta que não é possível a determinação exata da dose correspondente a 100% de mortalidade, devido ao caracter assintótico da curva nessa região, sendo preferível determinar-se a dose correspondente a 50% de mortalidade, extrapolando-se para 100% de mortalidade.

Pela Teoria de Alvo de LEA (1956) uma célula bacteriana é inativada por uma ionização primária ou um pequeno número de eventos de ionizações. A célula bacteriana constitui um só alvo ("target"), sendo necessário somente um toque ("hit") para inativá-lo. A curva de sobrevivência segundo essa teoria é uma exponencial simples, cuja fórmula matemática é:

$$S = e^{-pR} \quad ,$$

onde, S é fração de sobrevivência (número de células sobreviventes / número inicial de células) e pR é a probabilidade de uma célula bacteriana ser morta por uma dose R de radiação.

3.3 - Vacinas Irradiadas

Os estudos dos efeitos das radiações nos antígenos e nas células visam principalmente sua aplicação na obtenção de vacinas irradiadas. Espera-se que vacinas preparadas com o emprego de radiação na inativação dos agentes patogênicos venha superar a eficiência das vacinas preparadas por outros processos. Espera-se também que o uso da radiação venha viabilizar vacinas que até agora não foram possíveis de se obter pelos processos tradicionais.

Devido às dificuldades existentes em se obter imunização contra vermes pelos processos usuais, as vacinas irradiadas contra os parasitos dos animais tem sido exaustivamente estudadas. Grande número de trabalhos foi publicado nos últimos anos sobre vacinas irradiadas, abrangendo vários gêneros e espécies de parasitos. Dentre eles destacam-se os de HEYDORN (1974) ; SINGH e GILL (1975) ; PARTODIHARDJO *et alii* (1976) ; SOKOLIC *et alii* (1976) e WRIGHT (1976) sobre a imunogenicidade de oocitos de diversas espécies de *Eimeria* ; os de EDDS *et alii* (1973) ; RAMACHADRAN (1975) ; SUBRAHMANYAN e CHAUDHURI (1975); MULLIGAN (1976) ; SINGH (1977) e SINHA *et alii* (1977), com larvas de diversas espécies de *Filaria* ; os de DUXBURY e SADUN (1975) e FREGENE (1975) com diversas espécies de *Trupanosoma* ; os de KRAMER (1975) e BEAUDOIN *et alii* (1976) com *Plasmodium berghei* ; o de STEVES *et alii* (1974) com *Ancylostoma caninum* ; o de ARMOUR e DARGIE (1974) com *Fasciola* ; o de HUSSEIN e BUSHARA (1976) com *Schistosoma bovis* e o de ONISHI (1975) com *Me*

tastrongylus apri.

Contra vírus, tem sido preparadas vacinas pela exposição de suspensões aos vários tipos de radiações. BIER (1965) já cita o caso da vacina anti-rábica, que atualmente é preparada por inativação do vírus da hidrofobia pela exposição à luz ultravioleta. Segundo este autor, a radiação ultravioleta não destrói o poder imunizante do vírus. Quanto à radiação gama POLLEY (1961) afirma ser possível usá-la no preparo de antígenos infectivos para diagnósticos, pois possibilita destruir a infectividade retendo a atividade de fixar complemento dos mesmos. O efeito de radiação na inativação do vírus da doença de Newcastle foi estudada por DiGIOIA *et alii* (1969) que determinaram a influência da temperatura na radiosensitividade de sua infectividade e das suas propriedades de hemaglutinação. Também REITMAN *et alii* (1970) afirmam ser possível destruir seletivamente a infectividade de vírus de animais e bacteriófagos, expondo-os aos raios- γ e aos raios-X, deixando intacta a antigenicidade dos mesmos.

Esses e outros estudos como os de JORDAN e KEMPLE (1956); KAPLAN (1960) e POLLEY (1962) levaram ao desenvolvimento de vacinas irradiadas contra vírus, com eficiência muito boa em comparação às vacinas preparadas por outros processos. Dentre os numerosos trabalhos realizados comparando a imunogenicidade de vacinas irradiadas contra o vírus causador da influenza, destacam-se os trabalhos de HORSFALL e WALKER (1950); POLLEY (1961.a) e POLLEY (1962), e os de REITMAN e TRIBLE

(1967) ; BERGE *et alii* (1968) ; REITMAN (1969) e REITMAN *et alii* (1970) com o vírus causador da encefalite equina.

Muitos trabalhos hã foram realizados utilizando-se diversos gêneros e espécies de bactérias patogênicas aos animais domésticos e ao homem. Um dos primeiros trabalhos sobre o assunto foi feito por CARPENTER *et alii* (1959), onde estudaram a imunogenicidade de vacinas contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Brucella suis*, preparadas por radiação gama. No caso de *Mycobacterium tuberculosis* obteve-se uma vacina cuja proteção contra inoculação do micrôbio virulento vivo, era semelhante àquela dada pela vacina convencional BCG. BEUTEL (1963) em experimentos com camundongos não observou diferenças imunogênicas entre *Brucella abortus* "Strain 19" e *Listeria monocytogenes* quando inativadas por raios-X ou pelo formol, porém a tolerância às vacinas irradiadas foi maior.

Estudos de imunização em camundongos com *Pasteurella tularensis* irradiada foram feitos por GORDON *et alii* (1964) que observaram um aumento de até 50% no tempo médio de sobrevivência dos animais imunizados quando comparado com o controle.

NISHIHARA *et alii* (1964) expuseram células virulentas liofilizadas de *Brucella melitensis* aos raios gama do ^{60}Co e estas mostraram maior atividade imunogênica contra inoculação em camundongos com uma dose letal de um "strain" homólogo do que aquela dada por vacinas preparadas por calor ou tratamento químico. Com a *Brucella abortus* "strain 19", BABINI e LUBOZ (1966) compararam as propriedades imunizantes das preparações inativadas pela radiação gama ou pelo formol não encontrando di

ferenças significativas.

ARKHIPOV *et alii* (1969) prepararam vacinas contra cólera aviária utilizando raios gama, obtendo imunização eficiente de frangos contra inoculação da *P. multocida* viva, com apenas uma dose injetada. Em coelhos SUGIMAN (1976) detectou maior título de aglutinação para *P. multocida* irradiada com raios gama do que para a vacina preparada com formol. Este autor encontrou também que a persistência da imunidade dada pela vacina irradiada foi de cerca de quatro meses.

ARKHIPOV *et alii* (1969.a) prepararam vacinas formolizadas e irradiadas com 0,7 a 1,2 Mrad de raios gama do ^{60}Co contra *Salmonella pullorum* (tipo - S). Os autores obtiveram soros com títulos aglutinantes maiores nas vacinas irradiadas, do que os dados por vacina formolizada, quando injetadas em coelhos. Eles concluíram não ser possível diferenciar as duas vacinas quanto à eficiência, mas enfatizaram a necessidade de mais estudos sobre vacinas irradiadas contra salmonelas. PREVITE (1968) estudou os efeitos de altas doses de radiação gama (1,0, 5,0 e 20,0 Mrad) sobre a toxicidade, pirogenicidade e imunogenicidade de células de *S. typhimurium* e sua endotoxina. A imunogenicidade de células tratadas com 1,0 Mrad usualmente excedeu àquela de preparações não tratadas, quando submetidas ao teste de proteção em camundongos. Porém, com o aumento da dose de radiação havia um grande decréscimo na imunogenicidade, mas não chegou a uma abolição total. Segundo este autor, os dados indicam um valor potencial do uso da radiação como meio de produção de vaci-

nas contra *Salmonella* . Também usando o teste de proteção em camundongos, MALAFIEJ *et alii* (1974) estudaram duas vacinas contra febre tifóide quanto as suas eficácias — uma preparada pela inativação com calor e outra tratada com radiação gama. Neste estudo, os autores concluíram que a vacina preparada pela inativação térmica mostra maior proteção que a vacina preparada com radiação inativante. Trabalhando com injeções de células de *Salmonella typhimurium* irradiadas com 0,3 a 0,5 Mrad de raios gama em camundongos, GOVEKAR e LEWIS (1975) relataram maior eficiência desses tratamentos que as vacinas formolizadas de uso comercial.

3.4 - Conceitos sobre a Eficiência de uma Vacina

Desde de fins do século XVIII, quando JENNER (1798) introduziu a vacinação contra a varíola humana ("small-pox"), por meio do vírus da varíola bovina ("cow-pox") que é um vírus naturalmente atenuado ; e posteriormente quando PASTEUR (1882) conseguiu produzir imunidade pela injeção de microrganismos artificialmente atenuados (carbúnculo, raiva, cólera aviária), desenvolveram-se uma grande variedade de processos para obtenção de vacinas. Assim, SALMON e THEOBALD SMITH (1886) mostram ser possível obter-se imunidade mediante a injeção de germes mortos, fato logo confirmado por uma série de pesquisadores.

Existe uma certa controvérsia sobre a eficiência da imunização dada por injeção de bactérias mortas, principalmen-

te do grupo das salmonelas. Visando elucidar esse assunto, KAWAKAMI et alii (1966) compararam a eficiência de vacinas vivas e de materiais extraídos de *Salmonella enteritidis* (dos quais foi purificada a toxina L, termolábil), de natureza fosfolipoprotéica. Os animais imunizados com essa toxina L e os imunizados com vacinas vivas de uma cepa virulenta, foram protegidos igualmente contra 10 LD₅₀ de uma cepa virulenta viva. Entretanto, nenhuma aglutinina pode ser detectada no soro de animais que receberam extrato contendo a toxina L. Na opinião dos autores, o fato de alguns processos de inativação da bactéria, produzirem vacinas mortas com alguma eficiência, sugere ser possível manter pequena quantidade da substância antigênica protetora, destruindo ou retirando das células somente substâncias tóxicas e de pouca eficiência imunizante. Imunização por esse tipo de vacina segundo estes autores, pode ser bem sucedida, usando-se grandes quantidades de células bacterianas.

Neste trabalho, os autores acima mencionados postularam a existência de um fator antigênico (protetor) nas células vivas, que é destruído, principalmente pelo calor, ao ser processada a vacina morta, em contraposição, uma segunda hipótese é que as células cultivadas "in vitro" não possuem este fator que dá a imunização efetiva. Nesta hipótese, este fator antigênico só estaria presente quando houvesse uma interação entre o patógeno e o hospedeiro.

Tentando obter informações sobre esta segunda hipótese OSAWA et alii (1967) programaram um experimento no qual uti

lizaram canamicina para controlar o número de células bacterianas a doses sub-letais e também utilizando minúsculas câmaras de difusão inseridas na cavidade abdominal de camundongos, contendo grandes quantidades de *Salmonella enteritidis* virulentas. Desse modo os autores puderam observar que havia uma relação direta entre o número de células bacterianas controladas pela canamicina e o grau de imunidade contra infecções letais. Por outro lado, verificaram que mesmo com alto número de bactérias virulentas vivas nas câmaras de difusão implantadas nos camundongos, não foi obtida uma imunização efetiva. Com esses resultados, os autores sugeriram que a imunização com vacinas pode ser obtida somente através de um parasitismo intracelular de células bacterianas vivas, provavelmente nos fagócitos mononucleares.

Apesar de HOBSON (1957) ; MITSUHASHI *et alii* (1958) ; USHIBA *et alii* (1959) ; KAWAKAMI *et alii* (1966) e OSAWA *et alii* (1967) negarem a eficiência das vacinas mortas, o mecanismo pelo qual se obtém imunidade efetiva contra infecções de enterobactérias está merecendo estudos mais profundos.

KENNY e HERZBERG (1967) detectaram rápida produção de anticorpos bactericidas tanto em animais injetados com pequenas quantidades de células de *Salmonella typhimurium* vivas como em animais injetados com grandes doses de células mortas pelo calor. Os resultados desses autores indicam que os anticorpos bactericidas reagem a altos títulos seis dias após a injeção e dão consideráveis proteção contra 100 LD₅₀ de inoculação com uma

bactéria virulenta. Testes de especificidade indicaram também que não havia diferença entre a vacina morta pelo calor e a vacina viva.

Outros trabalhos como os de BARON e FORMAL (1960) ; EDEBO e HOLME (1965) ; JENKIN e ROWLEY (1965) ; PITMAN e BOHNER (1966) e REGAMEY *et alii* (1967) trazem resultados que também vêm reforçar a teoria de que é possível através de vacinas mortas, obter-se imunidade contra infecções letais de enterobactérias.

Do que se sabe hoje sobre a proteção a ser dada por uma vacina contra uma determinada doença, pode-se afirmar que a "vacina ideal" seria aquela que contém os agentes imunizantes antigenicamente idênticos aos do organismo causador da doença, mas incapazes de produzirem tal doença.

Estudos imunológicos e metabólicos feitos por LEA (1956) ; CARPENTER *et alii* (1959) ; AHN *et alii* (1962) e NISHIARA *et alii* (1964), indicam que microrganismos submetidos a doses inativantes de irradiação podem ainda respirar e reter a mesma estrutura antigênica dos agentes infecciosos vivos. São incapazes de causarem doença progressiva, visto que há apenas uma "morte mitótica", permanecendo o microrganismo numa "vida interfásica". Isto permite considerar que as vacinas irradiadas atendem aos requisitos necessários para obtenção de proteção anti-letal, pois estando vivas, as células interagirão com o hospedeiro. As vacinas irradiadas possuem estabilidade, facilidade de estocagem e transporte, não estão sujeitas a mu-

mutações e apresentam menores diferenças antigênicas em relação aos patógenos produtores da doença do que as vacinas vivas.

Os trabalhos realizados por POLLEY (1962) ; GORDON *et alii* (1964) ; NISHIARA *et alii* (1964) ; PREVITE (1968) e REITMAN *et alii* (1970) com vacinas irradiadas de vírus e bactérias, apresentam dados que indicam uma maior imunogenicidade que as vacinas preparadas pelos processos tradicionais. Estes autores utilizaram doses iguais ou superiores a 1,0 Mrad, mais que suficientes para inativar suspensões bacterianas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Determinação da Dose Mínima Inativante - DMI

Utilizou-se como modelo para determinação da DMI a *Salmonella typhimurium* 6.616 registrada na coleção do Instituto Robert Kock (Berlim) e gentilmente cedida pelo Instituto A dolfo Lutz de São Paulo.

4.1.1 - Preparo da Suspensão Bacteriana

A bactéria foi cultivada no seguinte meio líquido:

Extrato de carne	0,5%
Peptona	1,0%
Glucose	0,1%
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	0,3%
NaCl	0,2%
pH ajustado para	7,4

Uma garrafa de Roux com 100 ml do caldo de cultura a cima foi inoculada com a bactéria e posta para incubar por 12 - 14 horas a 37°C. Após esse tempo, quando a cultura já tinha atingido a fase logarítmica, processou-se a etapa de obtenção da suspensão das células bacterianas. Nessa etapa, o caldo de cultura foi centrifugado a 2.000 x g por 15 minutos, numa temperatura entre 0 - 4°C . O precipitado foi ressuspensão numa solução fisiológica tamponada, dada por LIMA e SILVA (1970). Estas operações de centrifugação foram repetidas por mais três vezes.

Solução salina tamponada:

Na_2HPO_4 M/15	40 ml
KH_2PO_4 M/15	10 ml
NaCl	8,5 g
Água destilada completando	1000 ml
pH ajustado para	7,4

Após a última centrifugação, as bactérias foram ressuspensas na solução fisiológica tamponada, padronizando-se a suspensão para a concentração equivalente ao valor 3 da escala Mc Farland, o que corresponde a mais ou menos 10^9 células bacterianas por ml de suspensão. Esta suspensão foi distri-

buída em frascos de vidro de 30 mm de diâmetro, sendo que cada frasco recebeu 10 ml.

4.1.2 - Irradiações

Os frascos contendo 10 ml da suspensão, foram irradiados num irradiador Gammabeam - 650, da Atomic Energy of Canada Commercial Products, emissor de raios gama provenientes do ^{60}Co .

Foram feitos cinco experimentos com 11 doses de radiação gama, sendo utilizado para cada dose um frasco com 10 ml da suspensão bacteriana. As doses usadas foram: 0,00 ; 0,20 ; 0,25 ; 0,30 ; 0,35 ; 0,40 ; 0,45 ; 0,50 ; 0,55 ; 0,60 ; e 0,65 MR , numa taxa de dose de 2,00 MR / hora. A temperatura na sala do irradiador durante as irradiações foi em média de 38°C.

A escolha dessas doses foi feita baseada em experimentos preliminares, nos quais expôs-se bactérias a doses que variavam entre 0,00 e 2,00 MR. Nestes experimentos, não se obteve sobreviventes nas doses acima de 0,65 MR. O critério de escolha da taxa de dose de 2,0 MR/hora foi o de curto tempo de irradiação, evitando-se assim a multiplicação das bactérias.

Após a irradiação, o conteúdo de cada frasco foi semeado em dez placas de Petri (1 ml/placa) contendo o meio de cultura já citado, com mais 1% de agar. Estas placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C . Como é muito difícil evitar-se

contaminação durante a fase de semeadura nas placas, foi utilizado como controle para a contaminação casual em cada experimento, 10 ml de solução fisiológica esterilizada em autoclave por 20 minutos a 1,25 atmosferas, e distribuídas em dez placas de Petri com o mesmo meio de cultura e incubadas nas mesmas condições.

4.1.3 - Contagens dos Sobreviventes e Análise Estatísticas

Todos os processos de determinação de curvas de sobrevivência feitos pela metodologia usual, além de trabalhosos são pouco precisos na determinação de 100% de mortalidade. Em vista disso, utilizou-se um processo baseado na metodologia descrita em 4.1.2 . Nesta não se considerou a célula bacteriana individual como unidade experimental, mas sim cada placa de cultura semeada com 1 ml de uma suspensão contendo 10^9 bact./ml . Desse modo ficou simplificada a detecção de uma resposta positiva ou negativa a uma determinada dose de radiação aplicada, bastando para isso um simples exame da placa. Nessas leituras não houve preocupação com o número de sobreviventes por placa, mas com a presença ou não de sobreviventes. Dessa forma no presente trabalho a presença de sobreviventes era anotada com o sinal (+) e a ausência com o sinal (-) .

Com esse tipo de leitura, obtêm-se portanto dados na forma dicotômica, isto é, duas classes de dados. Para análise

estatística utilizou-se o teste binomial, não paramétrico, com aproximação para a distribuição normal por terem sido utilizados 50 amostras (10 placas para cada experimento), conforme CAMPOS (1976).

4.2 - Estudo Comparativo da Imunogenicidade de Células de *Salmonella typhimurium* Inativadas por Radiação Gama e Calor

4.2.1 - Teste de Proteção em Camundongos

4.2.1.1 - Animais

Foram utilizados 200 camundongos albinos machos de aproximadamente dois meses de idade, provenientes do biotério do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA). Estes foram distribuídos em dez gaiolas, procurando-se manter homogeneidade de tamanho entre os grupos.

4.2.1.2 - Tratamentos

Foram feitos cinco tratamentos, como segue:

- Testemunha — solução salina tamponada esterilizada em autoclave por vinte minutos a 1,25 atmosferas;

- VSI - 0,55 — vacina irradiada com 0,55 MR (1 DMI) de radiação gama;
- VSI - 1,10 — vacina irradiada com 1,10 MR (2 DMI) de radiação gama;
- VSA - 60 — vacina aquecida a 60°C por 60 minutos;
- VSA - 100 — vacina aquecida a 100 C por 3 minutos.

Para cada tratamento foram utilizados 40 camundongos distribuídos em duas gaiolas. As gaiolas correspondentes a cada tratamento foram sorteadas, ficando na seguinte disposição:

Tratamento	Gaiolas
Testemunha	4 e 7
VSI - 0,55	1 e 10
VSI - 1,10	8 e 9
VSA - 60	3 e 5
VSA - 100	2 e 6

4.2.1.3 - Preparo das vacinas e vacinação

As vacinas foram preparadas a partir de uma cultura de *S. typhimurium* 6.616 cuja virulência foi aumentada por passagens consecutivas em camundongos, de acordo com o seguinte processo:

Um inóculo de mais ou menos 10^9 células de *S. typhimurium* 6.616 foi "semeado" em placas de Petri contendo o meio de cultura anteriormente descrito, mais 75 µg/ml de quimice-

tina. Após 24 horas de incubação a 37°C , verificou-se algumas colônias que adquiriram resistência ao antibiótico. Uma dessas colônias foi transferida para um tubo de ensaio de 95 x 13 mm com caldo de cultura, contendo também 75 µg/ml de quimicetina e incubado para a multiplicação da bactéria.

Um ml desse caldo foi injetado por via intraperitoneal em camundongos iguais aos relacionados em 4.2.1 . Quando os animais apresentavam sintomas de septicemia aguda, foram sangrados assepticamente e o sangue inoculado em placas de Petri contendo o meio de cultura com quimicetina. Após incubação por 24 horas a 37°C , e com as colônias que apareceram repetiu-se o processo por mais três vezes. O uso da quimicetina visou facilitar o re-isolamento da mesma cepa bacteriana.

O processamento das vacinas foi feito lavando-se a cultura bacteriana por três vezes em solução salina tamponada, conforme descrito em 4.1.1. A suspensão lavada, contendo 10^9 células bacterianas por ml, foi acondicionada em frascos estéreis de 10 ml e fechados hermeticamente.

Após submeter os frascos à irradiação e ao tratamento térmico, foram feitas as provas de esterilidade das vacinas.

As vacinas assim preparadas eram injetadas nos camundongos por via intraperitoneal, na dose de 0,50 ml de suspensão (5×10^8 bactérias/ml).

4.2.1.4 - Inoculação dos camundongos

Oito dias após a vacinação, os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal, com 10^{10} células de *S. typhimurium* 6.616 vivas, com virulência aumentada, conforme descrito em 4.2.1.3.

Para o estudo da proteção dada pelas vacinas computou-se as mortes dos camundongos durante 30 dias e os dados para cada tratamento correlacionados entre si.

4.2.2 - Teste de Dupla Difusão em Agar

4.2.2.1 - Obtenção dos anti-soros

Suspensões de 10^9 células da *S. typhimurium* 6.616 em solução fisiológica tamponada sem nenhum tratamento (SN), tratada com calor (SA) e tratada com radiação gama (SI), respectivamente, foram injetadas em coelhos albinos machos da raça Nova Zelândia, de 2 a 3 kg de peso vivo, provenientes do biotério do CENA. Para cada tratamento utilizaram-se três coelhos. O esquema das injeções foi o seguinte:

- Dez injeções por via intravenosa (orelha) em doses crescentes de 0,1 a 1,0 ml aplicadas em dias alternados.

- Em seguida seis injeções por via intraperitoneal em doses de 1,0 ml da suspensão emulsionadas em 1,0 ml de Adjuvante Completo de Freund, com 7 dias de intervalo.
- Dez dias após a última injeção foi feito sangria completa por punção cardíaca.
- O sangue foi sorado e o soro centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos para separação das células sanguíneas. O soro foi estocado num congelador após adição de mertiolato para uma concentração final de 1 / 10.000.

4.2.2.2 - Condução do teste de dupla difusão em agar

O teste de dupla difusão em agar foi feito segundo OUCHTERLONY, dado em LIMA e SILVA (1970), utilizando-se o seguinte equipamento da Gelman. Um conjunto que consta de um suporte plástico para seis lâminas comuns de microscópio ótico e que se adapta a um suporte metálico. Este é colocado numa caixa plástica, com função de câmara úmida, onde se processa a difusão dos antígenos e anticorpos. Possui também furadores em formatos e posições variadas. No presente caso, foi utilizado um furador com um orifício circular central, circundado por seis outros, em posição hexagonal. A distância entre cada orifício em relação ao outro é de 4 mm.

Nas lâminas de microscópio depositou-se uma camada de 3 mm de agar fundido, a 0,75% , com mertiolato a 1/10.000. Após solidificação, fez-se os orifícios para então serem colocados os antígenos e anti-soros para difusão. Os antígenos foram colocados uma hora antes dos anti-soros.

Os antígenos foram preparados desintegrando-se as células bacterianas por vibração ultrassônica de um aparelho Megason, modelo 2 G . 300 . 20 . 1, na sua potência máxima por um tempo suficiente para arrebentar pelo menos 90% das células. Após a desintegração, centrifugou-se o extrato a 20.000 x g por 10 minutos para eliminar as partículas maiores.

Após 48 horas de difusão na câmara úmida a temperatura ambiente obtiveram-se as linhas de precipitação. As lâminas que apresentavam linhas de precipitação foram então lavadas com solução fisiológica por três dias e com água destilada por mais três dias. A seguir fazia-se a coloração com Comassie Blue, por 4 horas e lavagem na solução removedora. Depois de coradas as lâminas foram secadas a 28°C e fotografadas.

Corante:

Comassie Brilliant Blue C - 250	1,25 g
Metanol	227 ml
Ácido Acético Glacial	46 ml
Água destilada completando	500 ml
Filtrar em papel de filtro comum.	

Solução Removedora:

Metanol	50 ml
Ácido Acético Glacial	75 ml
Água destilada completando	1000 ml

Visando selecionar o anti-soro com mais título de anticorpos precipitantes dentre os obtidos dos três coelhos para cada tratamento, foram feitos testes preliminares de dupla difusão em agar.

4.3 - Estudo do Efeito da Radiação Gama e do Calor sobre a Morfologia Externa da Célula de *S. typhimurium* à Nível de Microscopia Eletrônica

Para exame ao microscópio eletrônico, as suspensões bacterianas foram preparadas como segue: Cultivaram-se as bactérias em tubos de ensaio de 95 x 13 mm, com 5,0 ml de meio de cultura líquido por 14 - 16 horas a 37°C. Os tubos de cultura foram então submetidos a 0,55 MR e 1,10 MR de radiação gama e ao aquecimento por 60 minutos a 60°C e por três minutos a 100°C. Nestes tubos assim tratados e à testemunha (sem nenhum tratamento) foi adicionado formaldeído para uma concentração final de 10%. Após essa fixação, as células foram lavadas por centrifugação para retirar os resíduos do meio de cultura e ressuspensas em solução fisiológica.

Algumas gotas destas suspensões foram colocadas sobre grades de 400 ou 200 mesh cobertas com um filme de parlódio-carvão e o excesso foi drenado com auxílio de um papel de filtro. A seguir foi feita uma coloração negativa com o ácido fosfotungstístico a 3% (PTA) ou a metalização com ouro ou prata, conforme BRADLEY (1965).

Uma outra metodologia utilizada, baseou-se na técnica apresentada por DERRICK (1973) que permite uma observação qualitativa e até quantitativa em eletromicrografias dos fitovírus em extrato bruto, devida a especificidade serológica.

Essa técnica foi adaptada para observações de células bacterianas em caldo de cultura, e seguiu-se a seguinte rotina: uma grade coberta com parlódio foi posta flutuando sobre a superfície de uma alíquota de anti-soro por uma hora a 37°C. Em seguida foi feita uma lavagem com solução fisiológica para retirar o anti-soro não adsorvido no filme de parlódio. A seguir pôs-se a grade para flutuar numa alíquota do caldo de cultura bacteriana, fixado com formaldeído a 10% , por aproximadamente 24 horas e uma temperatura de 4°C . Posteriormente, lavava-se a grade em solução fisiológica e em água destilada, e sendo depois secada ao ar. Após essa secagem faz-se a coloração negativa com PTA ou o sombreamento metálico.

O material assim preparado foi examinado num microscópio eletrônico Elminskop IA da Siemens. As eletromicrografias foram reveladas, fixadas e copiadas pelos processos usuais, conforme DAWES (1971).

5 - RESULTADOS

5.1 - Determinação da Dose Mínima Inativante - DMI

5.1.1 - Dados de Irradiação de Células de *S. typhimurium* 6.616

Nos exames das placas observava-se que com o aumento da dose não só o número de placas com sobreviventes diminuía, como também o número de colônias nestas placas diminuíam. Nas doses maiores apareciam somente uma ou duas colônias nas poucas placas com sobreviventes.

Na Tabela 1 encontram-se os dados referentes às irradiações de *Salmonella typhimurium* 6.616. Constam nas colunas as doses utilizadas (em MR) e nas linhas as 50 repetições (amostras).

TABELA 1 - Resultados dos 5 experimentos de irradiação de células de *S. typhimurium* 6.616 com raios- γ do ^{60}Co , com 10 repetições cada experimento

Doses (MR)	Experimentos de irradiação											
	1		2		3		4		5		Total	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
0,00	10	00	10	00	10	00	10	00	10	00	50	00
0,20	09	01	10	00	10	00	10	00	10	00	49	01
0,25	10	00	10	00	10	00	05	05	10	00	45	05
0,30	10	00	04	06	06	04	04	06	10	00	34	16
0,35	10	00	01	09	02	08	00	10	08	02	21	29
0,40	09	01	07	03	00	10	02	08	03	07	21	29
0,45	09	01	02	08	01	09	01	09	01	09	14	36
0,50	00	10	03	07	00	10	03	07	05	05	11	39
0,55	00	10	02	08	00	10	00	10	01	09	03	47
0,60	01	09	00	10	01	09	01	09	00	10	03	47
0,65	02	08	01	09	01	09	01	09	00	10	05	45
C.C.	02	08	02	08	01	09	00	10	01	09	06	44

(+) Significa placas com sobreviventes

(-) Significa placas sem sobreviventes

(C.C.) Significa Contaminação Casual

Utilizando-se os valores das frequências observadas na Tabela 1 e deduzindo-se o valor encontrado (6) para a contaminação casual, procurou-se obter a curva representativa do fenômeno à luz da Teoria do Alvo de LEA.

No método aqui apresentado a unidade experimental não foi uma célula bacteriana, mas sim um número fixo de células bacterianas contidas em um determinado volume, a curva obtida não é uma exponencial simples. Neste caso o mais provável é que a curva represente a teoria dos múltiplos alvos (one-hit multi-target-theory) cuja equação dada por GIBSON (1975) é:

$$S = 1 - (1 - e^{-pR})^t$$

Nesta equação tem-se dois parâmetros:

- a - \underline{p} — que é a declividade da reta, quando as frações de sobreviventes são muito baixas num gráfico semi-logarítmico, ou então a tangente à curva no ponto onde S é muito pequeno. Para obtê-lo utilizou-se a dose para a menor fração de sobrevivência do experimento aqui apresentado.
- b - \underline{t} — que é o número de alvos do objeto irradiado. Como já foi dito anteriormente, não parecia lógico que neste método \underline{t} fosse igual a 1. Então para a determinação do valor de \underline{t} foi necessário pesquisar entre uma família de curvas que segue a equação

$$S = 1 - (1 - e^{-pR})^t$$

aquela que melhor se adaptasse aos resultados experimentais. Para isso, foi feito um programa de computação, no qual o valor t das curvas é incrementado de uma unidade ($t \in N^*$) e processada a regressão da curva para os dados experimentais. Notou-se que o coeficiente de determinação da curva (r^2) para cada t aumentava até um determinado valor, a partir do qual começava a diminuir. Adotou-se então o critério de que a curva mais representativa dos dados experimentais seria aquela para a qual o r^2 era máximo.

A Figura 1, mostra a curva que se obtém da equação:

$$S = 1 - (1 - e^{-10,59 R})^{21},$$

com um r^2 igual a 0,9787 e cujo teste t revela ser altamente significativo a um nível inferior a 0,1% .

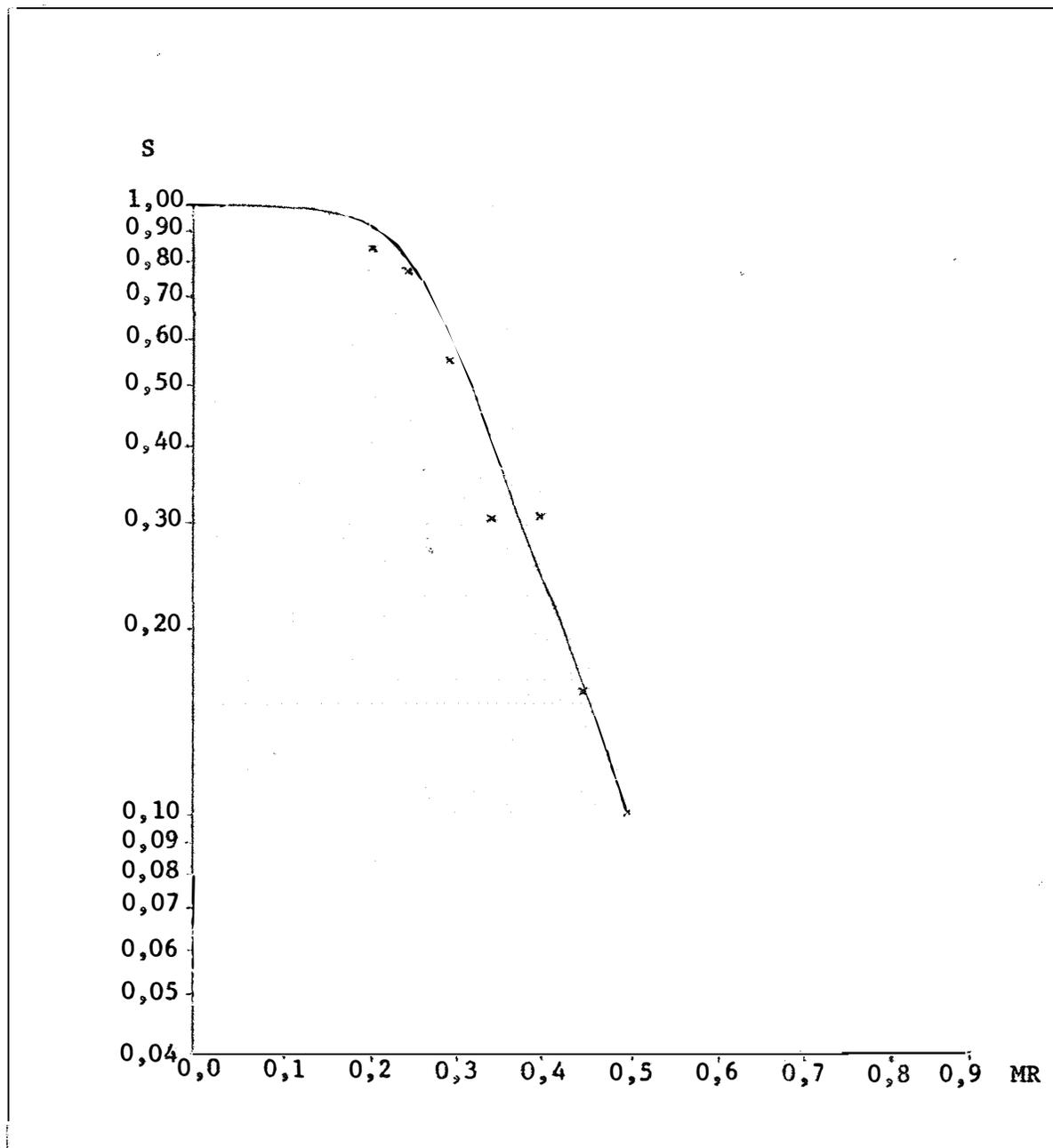


Fig. 1 - Curva de regressão para os dados da sobrevivência de células de *S. typhimurium* 6.616, segundo a equação

$$S = 1 - (1 - e^{-10,59 R})^{21}$$

da "one-hit multi-target theory". S é a fração de sobrevivência e R é a dose de radiação gama em Mega-Roentgen.

5.1.2 - Análise Estatística

Conforme justificativa anterior, aplicou-se o teste binomial, devido a existência de somente duas classes de dados ou seja, dados dicotômicos.

Da tabela 1 tem-se:

$$N = 50 \text{ placas}$$

$$B = \text{número de placas com sobreviventes}$$

$$B_c = 6 = \text{placas com contaminação casual}$$

Portanto:

$$\hat{p}_c = \frac{B_c}{N} = \frac{6}{50} = 0,12 \text{ ou } 12\% \text{ de contaminação casual.}$$

Intervalo de Confiança (I.C.) para a contaminação casual:

$$(\alpha = 0,05)$$

Como $N > 20$ será usada a aproximação normal:

Então:

$$I.C. = \hat{p}_c \pm z_{\alpha/2} \cdot s(\hat{p}_c)$$

$$z_{\alpha/2} = 1,96 \quad (\text{limite superior da distribuição normal ao nível de } 2,5\% \text{ de probabilidade})$$

$$s(\hat{p}_c) = \sqrt{\frac{\hat{p}_c \cdot \hat{q}_c}{N}}$$

$$s(\hat{p}_c) = \sqrt{\frac{0,12 \cdot (0,88)}{50}} = 0,046$$

$$I.C. = 0,12 \pm 1,96 (0,046)$$

$$I.C. = 0,12 \pm 0,09$$

$$0,03 \leq p_c \leq 0,21$$

Para maior segurança foi escolhida $p_c = 0,09$ (9%) como sendo a proporção de casos em que ocorrem sobreviventes por contaminação no processo de sementeira das amostras, e testou-se:

$$H_0: p = 0,09 \quad \text{vs} \quad H_a: p > 0,09$$

onde:

H_0 é a hipótese da nulidade, e

H_a é a hipótese alternativa.

Se H_0 for rejeitada admitir-se-á que a proporção ($B/N = p$) é estatisticamente superior a 9% e, conseqüentemente, concluir-se-á que não está havendo 100% de mortalidade, ou seja, os sobreviventes detectados nas placas não são devido apenas à contaminação.

Pela aproximação normal do teste binomial, para $N = 50$ e considerando-se um nível de significância de $\alpha = 5\%$ rejeita-se H_0 se:

$$B^* = \frac{B - N p_c}{\sqrt{N p_c q_c}} \cdot z_\alpha \quad (1)$$

ou

$$B \geq z_\alpha \sqrt{N p_c q_c} + N p_c \quad (2)$$

onde:

B = número de placas com sobreviventes para determinada dose;

N = número total de placas examinadas para determinada dose (50);

p_c = proporção admitida por contaminação casual (0,09);

z_α = limite superior da tabela de distribuição normal ao nível α ;

α = nível de significância considerado (5%).

Aplicando-se os valores na equação (2) , fica:

$$B \geq 1,645 \sqrt{50 (0,09)(0,91)} + 50 (0,09)$$

$$B \geq 3,33 + 4,50 = 7,83 \approx 8$$

$$B \geq 8$$

Se $B \geq 8$, rejeita-se-ã H_0 , isto é, admitir-se-ã que a proporção de sobreviventes é superior a 9% , não se tratando pois de contaminação casual.

Voltando à Tabela 1 , verifica-se que as doses iguais e maiores que 0,55 MR apresentam $B < 8$, portanto, tomou-se 0,55 MR como a dose mínima inativante - DMI.

5.2 - Estudo Comparativo da Imunogenicidade de Células de *Salmonella typhimurium* Inativada com Radiação Gama e com Calor

5.2.1 - Teste de Proteção em Camundongos

5.2.1.1 - Mortalidade dos camundongos

Os resultados referentes à mortalidade dos camundongos em cada gaiola são apresentadas na Tabela 2 , incluindo-se o número inicial de animais inoculados com a bactéria virulenta viva.

TABELA 2 - Número de sobreviventes no teste de proteção em camundongos, constando o número de sobreviventes no dia da inoculação com *S. typhimurium* 6.616 viva e nos 30 dias seguintes à inoculação para cada gaiola

Dias após a inoculação	Gaiolas									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
00 **	19*	19*	20	20	20	20	20	20	20	20
01	19	19	20	19	20	20	17	20	19	20
02	18	17	20	16	20	19	16	19	18	20
03	18	16	20	15	20	19	16	19	18	20
04	18	16	30	15	20	19	16	19	18	20
05	18	16	20	15	20	19	16	19	18	20
06	18	15	20	15	20	19	14	19	18	20
07	18	16	20	14	20	18	12	19	18	20
08	18	16	20	13	20	18	12	19	18	20
09	18	16	20	13	20	18	09	19	18	20
10	18	16	20	12	20	18	07	19	18	20
11	18	16	20	12	20	18	07	19	18	20
12	18	16	20	09	20	18	07	19	18	20
13	18	16	20	09	20	18	07	19	18	20
⋮										
30	18	16	20	09	20	18	07	19	18	20

(*) Mortos devido ao traumatismo decorrente da vacinação

(**) Dia da inoculação com bactéria virulenta viva.

O número total de camundongos mortos para cada tratamento e respectiva porcentagem de mortos são apresentados na Tabela 3 .

TABELA 3 - Razão entre os camundongos mortos e inoculados com a *S. typhimurium* viva e respectiva porcentagem para cada tratamento

	Tratamentos				
	Testemunha	VSA - 60	VSA-100	VSA-0,55	VSI-1,10
Mortos / Inoculados	26 / 40	0 / 40	5 / 39	1 / 39	3 / 40
Porcentagem (%)	65,00	0,00	12,8	2,6	7,50

5.2.1.2 - Análise estatística

Na análise estatística dos resultados do teste de proteção em camundongos, aplicou-se o teste de χ^2 para determinar o efeito da vacina, em comparação com a testemunha. Para essa comparação agruparam-se os dados numa tabela de contingência 2 x 2 . O valor do χ^2 encontrado foi de 76,46 , significando com a margem de erro de 0,1% ser a mortalidade reduzida devido a vacinação.

Em seguida as vacinas foram comparadas entre si através do teste Exato de Fisher e os resultados constam da Tabela 4 .

TABELA 4 - Resultados do Teste Exato de Fisher comparando a eficiência de proteção entre as diversas vacinas

Tratamentos	VSA-60	VSA-100	VSI-0,55	VSI-1,10
VSA-60	-	0,025	0,494	0,102
VSA-100	0,025	-	0,100	0,339
VSI-0,55	0,494	0,100	-	0,316
VSI-1,10	0,102	0,339	0,316	-

Obs.: - Em cada casa encontra-se a probabilidade da vacina constante da coluna não diferir da eficiência da vacina apresentada na respectiva linha.

5.2.2 - Teste de Dupla Difusão em Agar

Através da análise dos resultados obtidos nos testes de dupla difusão em agar, puderam ser obtidos alguns dados que foram considerados válidos para se conhecer os efeitos das radiações ionizantes e do calor, nos antígenos da célula bacteriana.

Os resultados obtidos encontram-se Figura 2, onde são apresentados as fotografias dos três tipos de reações e um desenho esquemático das principais linhas de precipitação. Representam reações que se repetiam pelo menos dez vezes nos testes de dupla difusão em agar.

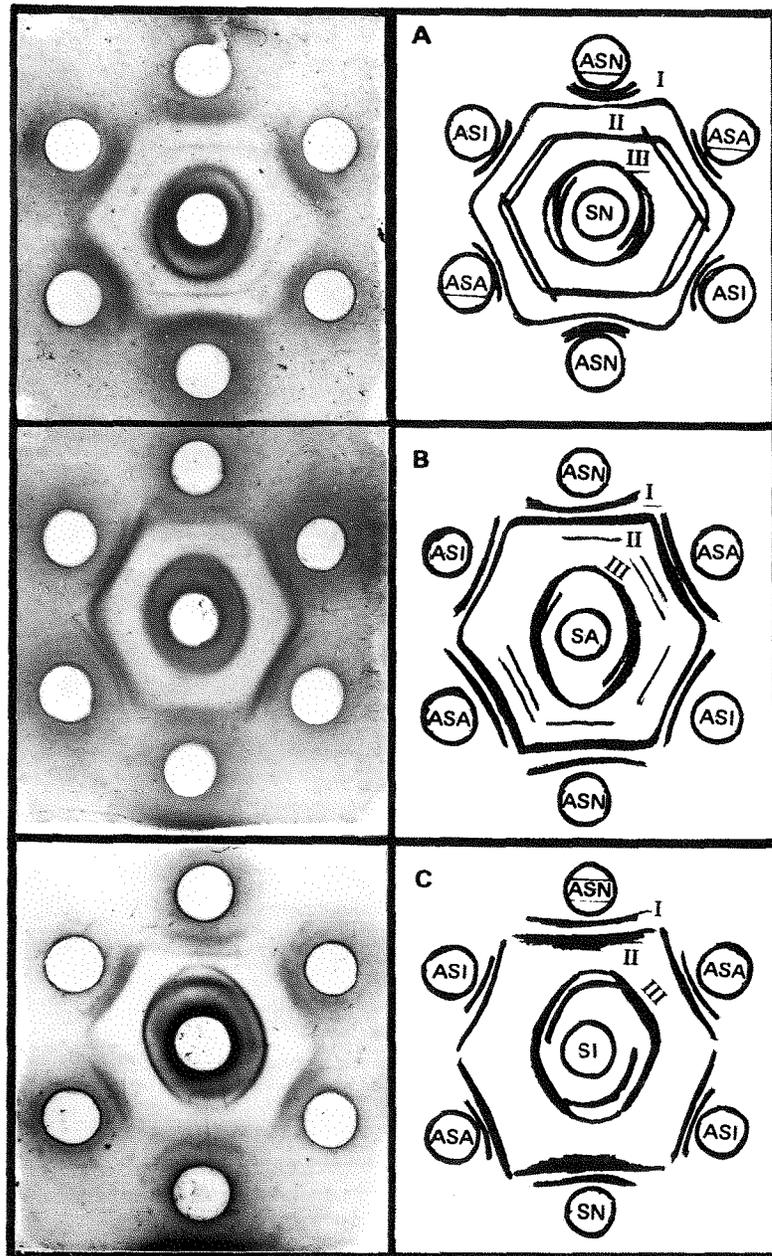


FIGURA 2. Linhas de precipitação do teste de dupla difusão em ágar. S N, S A e S I são os extratos de células de *S. typhimurium* 6.616 não tratadas, aquecidas e irradiadas respectivamente. A S N, A S A e A S I são os anti-soros contra células da mesma bactéria normal, aquecida e irradiada. I, II e III são os diferentes grupos de linhas de precipitação.

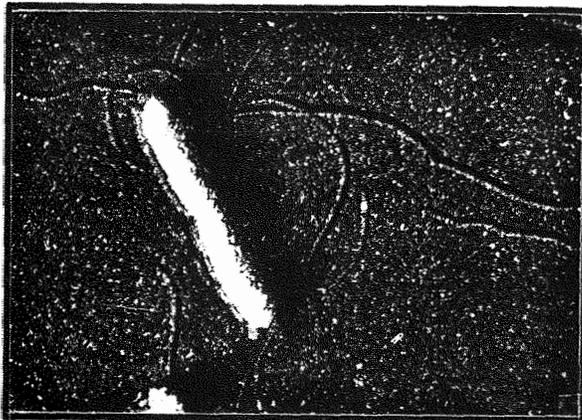
5.3 - Efeito da Radiação Gama e do Calor sobre a Morfologia Externa da Célula de *S. typhimurium* a Nível de Microscopia Eletrônica

Os resultados aqui apresentados são os obtidos através das eletromicrografias. Na Figura 3, é apresentada uma sequência fotográfica das bactérias com diversos tratamentos. Nessas preparações foi utilizada a técnica de sombreamento com ouro. As fotos mostram as superfícies das células bacterianas, não tratadas, tratadas com calor e com radiação gama.

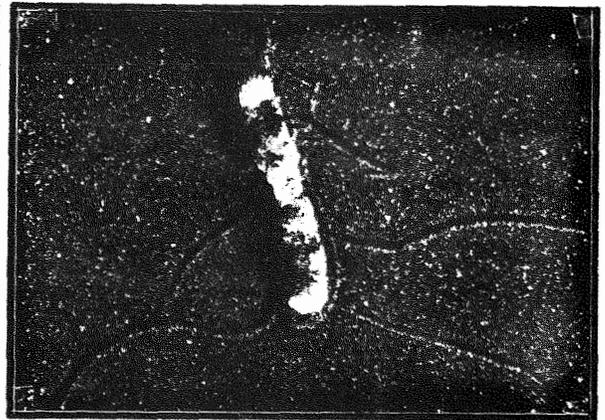
Quando se utilizou a técnica de coloração negativa pelo PTA obtiveram-se as eletromicrografias apresentadas na sequência da Figura 4. Nestas eletromicrografias observam-se os prováveis danos causados na célula bacteriana pelos diversos tratamentos em comparação com a testemunha.



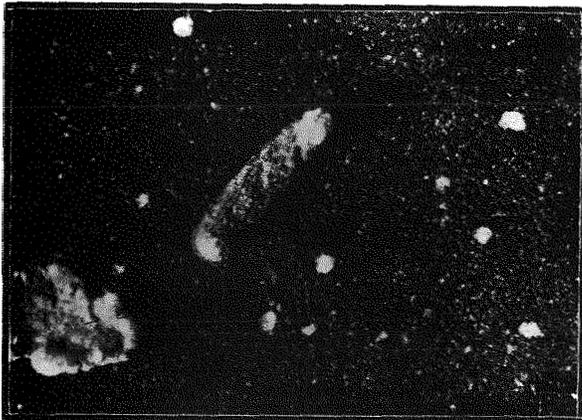
S N; Aumentos: 9.700 x



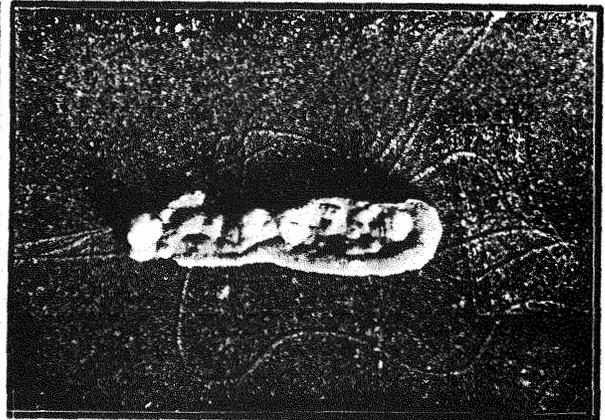
S I - 0,55; Aumento: 9.700 x



S I - 1,10; Aumento: 9.700 x

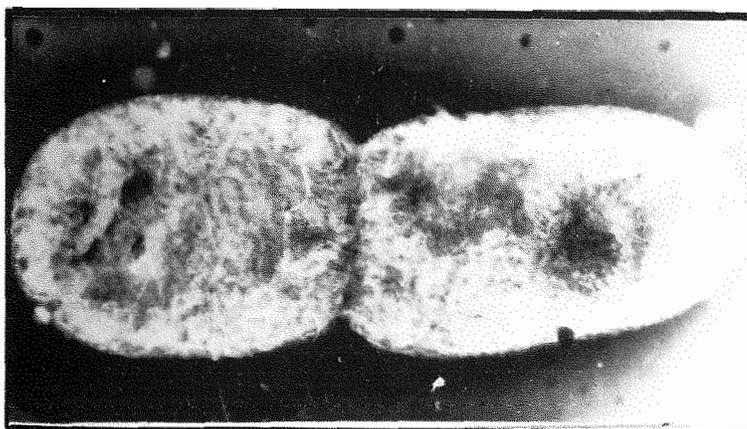


S A - 60; Aumento: 9.700 x

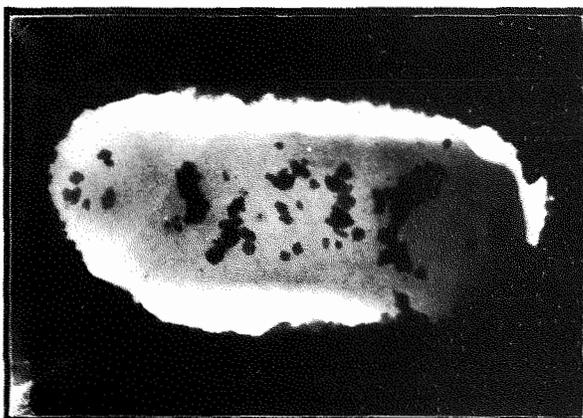


S A - 100; Aumento: 9.700 x

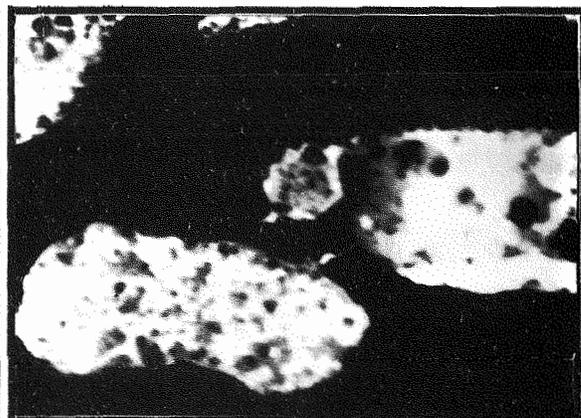
FIGURA 3. Eletromicrografias de células de *S. typhimurium* 6.616 obtidas pela técnica de metalização com ouro. S N = bactéria não tratada; S I - 0,55 = bactéria irradiada com 0,55 M R; S I - 1,10 = bactéria irradiada com 1,10 M R; S A - 60 = bactéria aquecida a 60° C por 60 minutos e S A - 100 = bactéria aquecida a 100° C por 3 minutos.



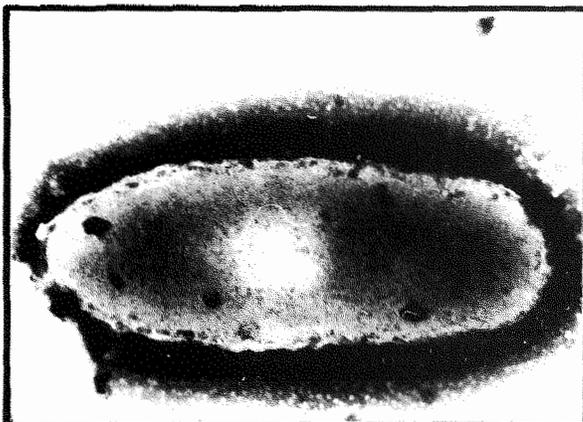
S N; Aumento: 29.200 x



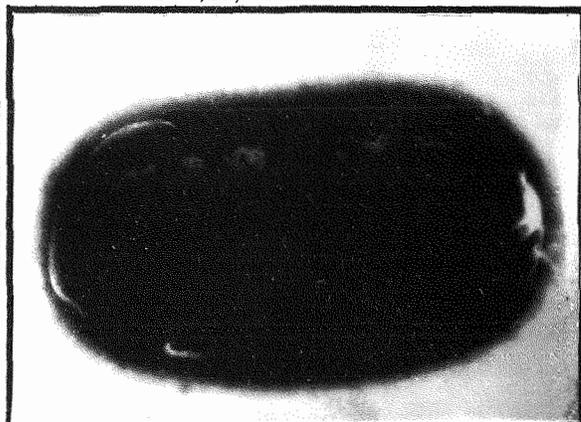
S I - 0,55; Aumento: 31.240 x



S I - 1,10; Aumento: 29.100 x



S A - 60; Aumento: 29.100 x



S A - 100; Aumento: 34.920 x

FIGURA 4. Eletromicrografias de células de *S. typhimurium* 6.616 obtidas pela técnica de coloração negativa pelo ácido fosfotungstístico (P T A). S N = bactéria não tratada; S I - 0,55 = bactéria irradiada com 0,55 M R de raios gama; S I - 1,10 = bactéria irradiada com 1,10 MR; S A - 60 = bactéria aquecida a 60° C por 60 minutos e S A - 100 = bactéria aquecida a 100° C por 3 minutos.

6 - DISCUSSÃO

O método empregado para determinação da dose mínima inativante (DMI) apresentou-se com características consideradas interessantes, pois além de se mostrar bastante simplificado permitiu obter uma DMI definida, com um valor de 0,55 MR para a *Salmonella typhimurium* 6.616. Como poucos dados existem na literatura indicando valores para a DMI, muito provavelmente devido às dificuldades existentes em se definir esse valor dentro da metodologia usualmente adotada. Alguns autores como TUMANIAN *et alii* (1958), limitaram-se a apresentar uma faixa de dose (0,40 a 0,60 MR) onde se situa a dose letal para as enterobacteriáceas. Como a *S. typhimurium* é uma enterobactéria, pode-se aceitar o valor 0,55 MR como concordan-

dante com o encontrado pelos autores citados. No trabalho de PREVITE (1968), que também faz referência a esse valor, o autor ressalta que uma exaustiva investigação foi necessária para concluir que 1,0 MR é mais ou menos o dobro da dose necessária para reduzir, a zero, o número de células vivas após a irradiação de uma suspensão salina de *S. typhimurium*. Também neste caso o valor 0,55 MR é perfeitamente aceitável.

A simplicidade do método apresentado nesta Dissertação se baseia principalmente na leitura dos resultados. Ao se adotar como unidade experimental cada placa ~~semeada~~ com um volume adequado da suspensão bacteriana irradiada contendo um número fixo de células (no presente caso, 1 ml de uma suspensão com 10^9 células/ml), diminuiu-se sensivelmente a quantidade de material e o trabalho empregado. Neste método eliminou-se a necessidade de diluições para contagens de cada célula sobrevivente à irradiação, expediente usado na metodologia convencional. A simples constatação da presença ou não de sobreviventes é uma operação praticamente isenta de erros, o que não ocorre quando se pretende ler o número exato de sobreviventes.

Vale ressaltar que a mudança da unidade experimental para um determinado volume de suspensão bacteriana, em uma concentração fixa, como era de se esperar, não alterou a curva de sobrevivência, que continuou sendo uma função exponencial como a obtida pelo método convencional (Figura 1).

Outro aspecto a se considerar, é o problema das diferenças de assepsia do local de trabalho. Este, dada a sua im-

portância, pode levar a resultados conflitantes na determinação da dose para atingir 100% de mortalidade de microorganismos. Pela metodologia aqui apresentada, os problemas das diferenças de assepsia ficam minimizados, devido ao controle da contaminação casual e ao método de análise estatística utilizados. No presente caso, tem-se um intervalo de confiança para a contaminação casual de 0,3 a 0,21, para um valor observado de 0,12 sendo que foi utilizado o valor 0,09 para a contaminação casual. Entretanto, pelo teste estatístico empregado pode-se adotar um valor para a contaminação casual mais rigoroso, admitindo-se uma probabilidade de contaminação igual ao limite inferior do intervalo de confiança observado experimentalmente. A análise estatística é uma simples aplicação do teste binomial, permitindo a determinação de um valor definido para a DMI, com níveis de significância aceitáveis. Neste caso obtém-se o valor B, que é um indicador do nível de contaminação do local (quanto maior o valor de B, menor o nível asséptico do local). Na indústria, poder-se-ia utilizar este valor para controlar as condições assépticas do local e as provas de inativação das vacinas irradiadas.

No estudo das imunogenicidades das vacinas pelo teste de proteção em camundongos, pode-se fazer as seguintes considerações. Quanto à eficiência protetora da vacinação, os dados obtidos neste trabalho vem contrariar a teoria de pesquisadores como HOBSON (1957); MITSHUHASHI *et alii* (1958); USHIBA *et alii* (1959); KAWAKAMI *et alii* (1966) e OSAWA *et alii* (1967)

que negam a eficiência das vacinas mortas contra infecções letais das salmonelas. Os resultados relatados nesta Dissertação mostram que as quatro vacinas aqui estudadas (VSA-60 , VSA-100 , VSI-0,55 e VSI-1,10) , foram altamente eficientes ($p < 0,001$) em relação aos animais não tratados.

Do ponto de vista do autor desta Dissertação, as vacinas irradiadas não podem ser consideradas como vacinas mortas, pois conforme LEA (1956) ; CARPENTER *et alii* (1959) , AHN *et alii* (1962) e NISHIHARA *et alii* (1964) as células bacterianas submetidas a doses inativantes, mantêm as atividades respiratórias, continuando numa "vida interfásica".

Comparando-se as proteções dadas pelas vacinas mortas por calor e pelas vacinas irradiadas, não se pode constatar diferenças quanto à proteção, indicando que a VSI-0,55 oferece semelhante proteção à da melhor vacina tratada com calor (VSA-60). Contudo pelo teste Exato de Fisher, observa-se que há diferenças entre a VSI-0,55 e VSA-100 , e entre VSA-60 e VSI-1,10 a níveis de probabilidade de 10%. Estes resultados ressaltam a importância da utilização de um ponto ótimo para a inativação de bactérias pela radiação ou pelo calor. A utilização de 0,55 MR e de 60°C por 60 minutos superou os outros tratamentos, mas não podem ser tomados ainda como o ponto ótimo para inativação.

Comparando-se as eletromicrografias da Figura 3 com os dados do teste de proteção em camundongos, parece haver certa relação entre a eficiência de cada vacina e o aspecto morfo

lógico externo da bactéria. A superfície da bactéria não tratada e da bactéria irradiada com 0,55 MR ou da bactéria aquecida a 60°C por 60 minutos praticamente não apresentam diferenças externas. Contudo, num exame geral ao microscópio eletrônico observou-se uma maior semelhança morfológica entre a bactéria irradiada com 0,55 MR e a bactéria testemunha, não tratada. Já na bactéria irradiada com 1,10 MR nota-se o aparecimento de deformações granulares na célula bacteriana, que se tornam mais acentuadas na bactéria aquecida a 100°C por três minutos. Essas granulações parecem revelar uma coagulação das proteínas da parede celular. Na Figura 4, onde as eletromicrografias foram obtidas pela técnica de coloração negativa com o PTA, aparecem as mesmas relações entre a morfologia das células nos diversos tratamentos e a eficiência da vacina correspondente. Pode-se notar que a bactéria aquecida a 100°C por três minutos apresenta uma retração do citoplasma. Na célula irradiada a 0,55 MR e na célula aquecida a 60°C por 60 minutos não se nota diferenças com relação à célula não tratada. A célula irradiada com 1,10 MR apresenta um aspecto intermediário entre a aquecida a 100°C por três minutos e as outras.

O exame dos testes de dupla difusão em agar combinando-se os extratos de *S. typhimurium* normal (SN), aquecida (SA) e irradiada (SI) com os anti-soros contra a *S. typhimurium* normal (ASN), aquecida (ASA) e irradiada (ASI), mostrou que os resultados eram extremamente complexos e por si sô incapazes de revelarem com clareza todas as alterações ocorridas nos an-

tígenos bacterianos tratados com calor ou com radiação gama. Todavia, tentou-se através de análise dos resultados mais simples obter alguma informação preliminar sobre as alterações provocadas pelos tratamentos. Para simplificação dessa análise elegeu-se a reação da Figura 5 A , onde foi colocado SN no orifício central e nos orifícios externos os três anti-soros (ASN, ASA e ASI). No desenho esquemático apresentado ao lado da fotografia E, estão representados três grupos de linhas de precipitação (I , II e III) que foram desenhadas baseando-se não só na foto A , mas também na observação de um grande número de reações iguais.

Analisando-se os três grupos de linhas de precipitação separadamente pode-se verificar que:

- a - O grupo I mostrou para a combinação SN - ASN três linhas de precipitação, enquanto que para as combinações SN - ASA e SN - ASI só apareceram duas. É provável que tenha ocorrido neste caso, uma modificação de um antígeno pelo tratamento com calor ou com radiação e que o anticorpo formado para este antígeno modificado não se combina mais com o antígeno nativo. A linha referente a este antígeno modificado apareceu nas reações combinando SA - ASA , SA - ASI , SI - ASA e SI - ASI , mostradas nas Figura 5.B e C .
- b - O grupo II aparentemente mostrou duas linhas de precipitação para as combinações SN - ASA e SN - ASI , e somente uma para a combinação SN - ASN . Notou-se também a ocorrência

de cruzamentos diferentes entre as linhas desse grupo. Enquanto que as linhas da combinação SN - ASI se unem com a linha da SN - ASN, somente a linha mais externa da SN - ASN se une com a linha da SN - ASA. A linha mais interna da combinação SN - ASA cruza com a linha da SN - ASN, forma um "esporão" com a linha mais interna da SN - ASN, e cruza com a mais externa.

A hipótese mais simples para explicar estes fatos foi a seguinte:

- 1 - Existiriam vários tipos de anticorpos neste grupo de linhas de precipitação.
- 2 - Dois destes anticorpos apareceriam em todos os anti-soros, porém na combinação SN - ASN as duas linhas de precipitação estariam sobrepostas, enquanto nas combinações SN - ASA e SN - ASI estariam separadas.
- 3 - No anti-soro para a *S. typhimurium* aquecida apareceria um anticorpo que não existe nos outros dois anti-soros.

Isto só é explicável, admitindo-se que o tratamento com o calor liberaria algum antígeno que na célula normal não está exposto ao sistema formador de anticorpos do coelho, o que não ocorreria com a radiação gama. A desintegração com o ultra-som utilizada na preparação do extrato da *S. typhimurium* para os testes de difusão em agar, também liberaria esse antígeno da célula. A linha de precipitação entre esse antígeno

e o anticorpo presente no ASA seria sobreposta à linha mais interna das duas já referidas.

c - O grupo III , constou de uma linha da combinação SN - ASN, duas da SN - ASA e três da SN - ASI. Neste caso pareceu ter ocorrido a formação de um anticorpo diferente no ASA e dois no ASI, mas que dão reações cruzadas idênticas à do anticorpo presente no ASN. Isto sugere que o antígeno presente na bactéria normal poderia ser afetado pelo calor provocando uma alteração numa fração da população de antígeno. A radiação gama causaria dois tipos de alterações em moléculas antigênicas diferentes, fazendo surgir três tipos de anticorpos no ASI. Essas linhas extras apareceram nas reações das Fotos B e C , o que indica serem realmente tipos diferentes de antígenos surgidos nas bactérias submetidas ao tratamento com calor ou com radiação gama.

As hipóteses feitas parecem dar uma explicação dos fatos observados nos testes de dupla difusão, entretanto, somente pesquisas sistemáticas sobre os efeitos do calor e da radiação gama nos antígenos da célula bacteriana, é que viriam comprovar em definitivo os fenômenos ora observados.

As análises preliminares das linhas de precipitação indicaram que tanto a tratamento pelo calor como pela radiação gama provocam alterações nos antígenos, bem como liberação de antígenos que normalmente são inacessíveis. Esses fatos suge-

rem que a análise serológica correlacionada com o teste de proteção em camundongos poderá indicar até que ponto essas alterações podem influir positiva ou negativamente na eficiência de uma vacina.

Pelos dados do teste de proteção em camundongos ficou evidente que vacinas contra *S. typhimurium* inativadas pelo calor ou pela radiação ionizante deram proteção contra infecções letais da bactéria virulenta viva. É lógico também supor que existe uma dose ótima para inativação das bactérias, tanto com calor como com radiação, visando obter maior imunogenicidade. Nas doses em que a bactéria apresentava maior imunogenicidade notava-se nas eletromicrografias que a morfologia bacteriana estava menos danificada.

Na obtenção da dose ótima para o processamento de vacinas irradiadas intervêm muitos fatores que devem ser cuidadosamente estudados. Embora LEA (1956) tenha postulado que a inativação de bactérias é obtida por uma simples ionização primária ou por um pequeno número de eventos de ionizações, baseado nas curvas de sobrevivências de microrganismos, é bem conhecido que se inicia um complexo de complicadas reações, danificando igualmente todos os componentes celulares. O dano celular pode ocorrer pela ação direta da radiação ou pela ação indireta, através dos radicais livres, produzidos no fluido intracelular ou no líquido que envolve a célula. Uma sugestão citada por AHN *et alii* (1962) é que a lesão inicial pode ocasionar uma diminuição das barreiras celulares, resultando na

liberação de enzimas da própria célula, que atacam as moléculas essenciais para a manutenção das funções biológicas.

A nível celular, BACQ e ALEXANDER (1966), admitem três efeitos imediatos da radiação ionizante: 1) fisiológico ; 2) lise de célula ou morte interfásica e, 3) deleção ou morte mitótica. O estudo de AHN *et alii* (1962) indica que os fatores correlacionados com a função reprodutiva da célula bacteriana são mais radiosensíveis que as enzimas respiratórias. A perda da integridade reprodutiva é postulada como o resultado da ação de poucas radiações ionizantes em poucas moléculas da célula. Essas moléculas essenciais para a proliferação podem ser enzimas, ácidos nucléicos, assim como outras proteínas.

Dentre os fatores que afetam a extensão do dano causado pela radiação, estão as quantidades de água e de oxigênio presentes durante a irradiação. Certas reações são dependentes de oxigênio, enquanto que outras não. As reações dependentes de oxigênio requerem a presença de uma certa quantidade de água para se manifestarem. AHN *et alii* (1962) citam que em sistemas aquosos a presença de oxigênio aumenta cerca de 300% o efeito do dano para uma determinada dose de irradiação, quando comparada ao dano no estado seco. Nos experimentos desses autores, com *Bruceella* liofilizada, a presença de oxigênio durante a irradiação, numa dada dosagem, diminuiu a atividade respiratória das células de somente 75 a 90% em relação as células irradiadas sob vácuo ou nitrogênio.

Os estudos de PREVITE *et alii* (1967) e PREVITE (1968) demonstraram que o meio líquido favorece à inativação ou detoxicação da endotoxina de *Salmonella typhimurium*, que é um lipopolissacarídeo. Ainda com referência a esse lipopolissacarídeo, os autores evidenciaram a existência de dois ou mais determinantes letais e antigênicos. O efeito da radiação é diferencial nesses determinantes e nos componentes pirogênicos, indicando provavelmente sítios funcionais separados para as atividades letal, antigênica e pirogênica. Os autores encontraram também que a toxicidade das vacinas obtidas por aquecimento da *S. typhimurium* à temperatura de ebulição da água por duas horas foi menor ($LD_{50} = 3,2 \times 10^9$ células) do que das vacinas irradiadas com 1,0 Mrad ($LD_{50} = 2,2 \times 10^9$ células). Encontraram também que os dois ou mais grupos de determinantes letais, um deles foi sensível ao efeito de 1,0 Mrad. No presente estudo se utilizou $0,5 \times 10^9$ células de *S. typhimurium* irradiadas com 0,55 MR para vacinação de camundongos, e um dos animais morreu antes da inoculação com a bactéria virulenta viva. O mesmo ocorreu com a vacinação com $0,5 \times 10^9$ células aquecidas a 100°C por três minutos. Estas mortes poderiam ser devidas à toxicidade dos lipopolissacarídeos ligados à célula bacteriana, contudo é mais provável que seja devido a trauma causado pela vacinação.

Quanto à inativação dos microrganismos pelo calor observa-se também fatores intervindo no processo. O efeito letal produzido pelo calor sobre os microrganismos resulta de um

processo de desnaturaçãõ e subsequente coagulaçãõ das proteí - nas citoplasmáticas. E essa coagulaçãõ depende principalmente de dois fatores: temperatura e tempo de exposiçãõ. Geralmente, a 60°C por 30 ou 60 minutos, morrem as bactérias não esporuladas. Segundo DiGIOIA *et alii* (1970) a perda da função biológica de algumas macromoléculas pela desnaturaçãõ térmica requer a ruptura de no mínimo três pontes de hidrogênio adjacentes, que causa a abertura da molécula e perda de sua configuração biológica. Também as vacinas processadas pelo aquecimento devem sê-lo no seu ponto ótimo, pois conforme dados do teste de proteção em camundongos a vacina inativada por exposiçãõ a 60°C por 60 minutos superou a vacina inativada por exposiçãõ a 100°C por três minutos ($p = 0,25$).

Quando se analisam os resultados dos trabalhos que comparam as imunogenicidades de vacinas irradiadas às vacinas preparadas por outros processos, nota-se que os mesmos se apresentam conflitantes por não ter havido uma preocupação em otimizar as condições de inativaçãõ da bactéria. Por exemplo, quando PREVITE (1968) irradiou *S. typhimurium* numa dose de 1,0 Mrad em suspensão salina, a comparaçãõ foi feita com uma vacina inativada pelo calor a mais ou menos 100°C por duas horas. Neste caso, nem na vacina irradiada, nem na vacina aquecida foi utilizada a dose mínima inativante (DMI), pois o autor estava mais preocupado com a toxicidade das vacinas. Por outro lado, quando NISHIHARA *et alii* (1964) compararam vacinas irradiadas com as preparadas por outros processos, utilizaram uma

dose de 1,0 MR para inativar *B. melitensis* liofilizada. A vacina aquecida foi preparada com aquecimento a 60°C por 10 minutos. Nos dois casos as vacinas irradiadas superaram as aquecidas. Porém MALAFIEJ *et alii* (1974), irradiando a *S. typhi* com 0,4 a 0,80 Mrad de raios gama em suspensão salina e comparando com vacinas aquecidas a 60°C por 30 e 60 minutos, encontraram maior atividade protetiva para a aquecida.

Na procura da "vacina ideal" parece que a preocupação com a toxicidade das endotoxinas de bactérias gram-negativas não é tão importante, pois o número de células bacterianas necessárias para imunização, está muito abaixo do nível letal. Nas pesquisas para obtenção da "vacina ideal" parece que é mais importante estudar melhor os efeitos da radiação ionizante na célula bacteriana, procurando provocar somente a "morte mitótica" minimizando ou anulando o efeito sobre as moléculas vitais e antigênicas. Já se tem algum conhecimento a respeito de como evitar os efeitos indiretos da radiação ionizante, quer diminuindo, quer solidificando a água do meio, ou mesmo, utilizando-se de substâncias protetoras dos efeitos indesejáveis. GORDON *et alii* (1964) utilizando cisteamina a 0,2 M na suspensão bacteriana ao irradiar, conseguiram aumentar a antigenicidade das mesmas. Também POLLEY (1962) utilizou histidina e p-aminohipurato de sódio durante a irradiação de suspensões purificadas de vírus da influenza, conseguindo diminuir a infectividade e manter quase inalterada a antigenicidade. PREVITE *et alii* (1967), mostraram haver menor efeito da radiação quando congelavam a so

lução a 184°C para detoxificação dos lipopolissacarídeos de enterobactérias. A temperatura do meio em que a célula é irradiada, é um fator que interfere nos efeitos causados por uma determinada dose de radiação ionizante, conforme PREVITE (1968); LICCIARDELLO (1969) e DiGIOIA *et alii* (1969).

Pelas considerações feitas nesta Dissertação visando mostrar as propriedades de uma vacina irradiada em comparação com a vacina preparada pelo calor, verificou-se que pela simples utilização da DMI, sem se preocupar com os demais fatores que interferem na sua determinação, foi possível obter vacinas tão eficientes quando a melhor aquecida testada e com eficiência próxima a 100% no teste de proteção em camundongos. Portanto é provável que utilizando-se a DMI e controlando os demais fatores que interferem aumentando ou diminuindo danos das radiações ionizantes na célula bacteriana, se obtenham vacinas irradiadas de alta eficiência, superando as preparadas por outros processos.

7 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e discutidos nesta Dissertação permitem apresentar as seguintes conclusões:

- 1 - Conclusões sobre o método para determinação da dose mínima inativante - DMI
 - 1 - O método para determinação da DMI revelou-se eficiente, simples, permitindo obter um valor definido para a mortalidade de células bacterianas a um nível de 100% com uma precisão estatística não alcançada pelos métodos usuais.
 - 2 - O valor da DMI de radiação gama do ^{60}Co para a *Salmonella typhimurium* 6.616 encontrado pelo teste binomial foi 0,55 MR.

- 3 - O método empregado além de requerer menos trabalho, material e tempo, permite controlar as condições de assepsia do laboratório e as provas de inativação das vacinas irradiadas.
- 4 - A curva experimental de sobrevivência da *S. typhi murium* 6.616 submetida à radiação gama do ^{60}Co ajustou-se à equação

$$S = 1 - (1 - e^{-10,59 R})^{21},$$

de acordo com a "one-hit multi-target theory" com um coeficiente de determinação de 0,98 ($p \neq 0,001$).

II - Conclusões sobre a imunogenicidade das vacinas

- 1 - Pelo teste de proteção em camundongos, as duas vacinas irradiadas e as duas vacinas aquecidas foram altamente eficientes em relação à testemunha ($p < 0,001$).
- 2 - A vacina irradiada com 0,55 MR e a vacina aquecida com 60°C por 60 minutos não diferiram estatisticamente quanto à eficiência, porém estas superaram respectivamente a vacina aquecida a 100°C por 3 minutos e a vacina irradiada com 1,10 MR ($p = 0,10$).
- 3 - Observou-se uma correlação positiva entre a imunogenicidade das vacinas no teste de proteção em camundongos e os danos provocados pelos tratamentos na morfologia da célula bacteriana, vistos ao microscópio eletrônico.

- 4 - A radiação e o calor provocaram mudanças na estrutura antigênica da célula bacteriana, em meio aquoso, detectáveis nos testes de dupla difusão em agar.
- 5 - Em vista da relação entre a DMI e as condições de sua determinação poder-se-á melhorar ainda mais a eficiência da vacina, otimizando as condições de determinação da mesma em pesquisas futuras.

8 - SUMMARY

Salmonellae is a group of bacteria responsible for diarrhea in men and domestic animals causing great damage and high mortality in Brazilian herds.

So far, among the existent treatments for infectious diseases, vaccination is the most efficient and less expensive one. There are several processes for vaccines preparation against bacteria. The use of ionizing radiation is becoming a good alternative for improving the efficiency of the vaccines against bacteria as well as other parasites.

However there are many factors that interfere with the ionizing radiation utilization to inactivate the pathogens that cause diseases. To get irradiated vaccines with maximum efficiency these factors should be optimum.

In the present work, a method to obtain the minimum inactivating dose of radiation (MID) was proposed to achieve the point in which a "mitotic death" for all the cells of a bacterial suspension occurs with the least damage to the antigenic structures. The proposed method is based on the changes of the experimental unit conventionally used for bacteria irradiation, which is each bacterial cell for a constant number of bacterial cells present in a known volume.

Salmonella typhimurium 6.616 and gamma-radiation from ^{60}Co were used as model. The method discussed proved to be simple and efficient, and it demands less work, time and material, than the usual methods and further more permits to get a definite value for MID. The MID value found for *S. typhimurium* 6.616 by the binomial test was 0,55 MR.

The immunogenicity of the irradiated vaccines was also studied by serological and mouse protection test in comparison to the vaccines prepared by heating. The results indicate that when the bacterial suspension is irradiated with that MID a vaccine as efficient as the better vaccine prepared by heating is obtained. It was also found that heating as well as irradiation of bacteria in a watery medium had changed their antigenic structure.

It was observed by electron microscopy a relationship between the damage caused by both treatments in bacterial cell morphology and the protection of the respective vaccine observed by the mouse protection test.

9 - LITERATURA CITADA

AHN, T. H. ; H. NISHIHARA ; C. M. CARPENTER e G. V. TAPLIN,
1962. Respiration of gamma irradiated *Brucella abortus*
and *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Soc. Expt. Biol.
and Med., 111: 771-773.

ARKHIPOV, V. V. ; N. M. NIKIFOROVA e A. V. LUK'YANCHENKO,
1969. Use of ionizing radiation in the preparation of ex-
perimental batches of fowlcholera vaccine. Trudy nuach-
no-kontrol. Inst. Vet. Preparatov., 16: 258-260.

ARKHIPOV, V. V. ; A. G. MALYAVIN ; K. S. BOGDANOVA e E. A.
MATVEEV, 1969.a. Use of ionizing radiation in the prepa-
ration of vaccines against pullorum disease and fowl ty-
phoid. Trudy nuachno kontrol, Inst. Vet. Preparatov., 16:
254-257.

- ARMOUR, J. e J. D. DARGIE; 1974. Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Expt. Parasitol., 35: 381-388.
- BABINI, A. e M. P. LUBOZ; 1966. Inactivation of bacteria by gamma rays. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 20: 835-839.
- BACQ, Z. M. e P. ALEXANDER, 1961. Fundamentals of Radiobiology. 2.^a ed., New York, Pergamon Press. 562 p.
- BARON, L. S. e S. B. FORMAL, 1960. Immunization studies with living vaccine of *Salmonella typhimurium*. Proc. Soc. Expt. Biol. and Med., 104: 565-567.
- BEAUDOIN, R. L. ; C. P. A. STROME ; T. A. TUBERGEN e F. MITCHELL, 1976. *Plasmodium berghei berghei*: irradiated sporozoites of the ANKA strain as immunizing antigens in mice. Expt. Parasitol., 39: 438-443.
- BERGE, T. O. ; I. S. BANKS e W. D. TIGERTT, 1961. Attenuation of venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea pig heart cells. Amer. J. Hyg., 73: 209-218.
- BEUTEL, H., 1962. Immunization with vaccines prepared from X-ray inactivated bacteria. Zbl. Bakt. I., 187: 90-99. Original em Alemão.
- BIER, O., 1965. Bacteriologia e Imunologia. 12.^a ed., São Paulo, Edições Melhoramentos. 983 p.
- BRADLEY, D. E., 1965. Replica and Shadowing Techniques. In: KAY, D., ed. Techniques for Electron Microscopy. 2.^a ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 96-154.

- CAMPOS, H., 1976. Estatística experimental não-paramétrica. 2.^a ed., Piracicaba, ESALQ/USP, 332 p. mimeografado.
- CARPENTER, C. M. ; A. W. C. NAYLOR-FOOTE ; G. V. TAPLIN ; C. A. LAWRENCE e C. L. DRAKE, 1959. Preliminary report on vaccines prepared from gamma-irradiated *Mycobacterium tuberculosis* and *Brucella suis*. Amer. Rev. Tuberc., 79: 374-377.
- DAWES, C. J., 1971. Biological techniques in electron microscopy. New York, Barnes & Noble Inc. 193 p.
- DERRICK, K. S., 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virology, 56: 652-653.
- DiGIOIA, G. A. ; J. J. LICCIARDELLO ; J. T. R. NICKERSON e S. A. GOLDBLITH, 1970. Effect of temperature on radiosensitivity of New Castle disease virus. Applied Microbiology, 19: 455-457.
- DUXBURY, R. E. ; E. H. SADUN, 1975. Relative effectiveness of neutron and gamma radiation of trypanosomes for immunizing mice against African trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 69: 484-485.
- EDEBO, L. e T. HOLME, 1965. Preparation of biologically active fractions of *Salmonella typhimurium*. 3. Extraction of immunogenic components. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 63: 228-234.
- EDDS, G. T. ; L. E. SWANSON e H. ENGELBRECHT, 1963. Immunization experiments with irradiated lungworm larvae. Amer. J. Vet. Res., 24: 139-142.

- FREGENE, A. O., 1975. Comparative responses of radioattenuated *Trypanosoma brucei* and *T. congolense* in rats. J. Parasitol., 61: 1070-1073.
- GIBSON, D. K., 1975. Survival curves for irradiated cells. In: NEWTON, P. J. F., ed. Dounbut never out - the mathematics and computation of exponential arising in the fields of physics, chemistry, biology, ... Sutherland, A.A.E.C. 11 cap. 8.
- GORDON, M. ; D. M. DONALDSON e G. G. WRIGHT, 1964. Immunization of mice with irradiated *Pasteurella tularensis*. J. Infect. Diseases, 114: 435-440.
- GOVEKAR, L. G. e N. F. LEWIS, 1975. Use of gamma radiation in preparation of *Salmonella* vaccine. In: DEPARTMENT OF ATOMIC ENERGY. II. Use of radiations and radioisotopes in studies of animal production, Bombay, p. 289-298.
- HEYDORN, C., 1975. Vaccination trials in chicks with X irradiated oocysts of *Eimeria acervulina*. Hannover, Vet. Bulletin, 45: 131 p.
- HOBSON, D., 1957. Resistance to reinfection in experimental mouse typhoid. J. Hyg., 55: 334-343.
- HOPMAN, J., 1962. Radiation microbiology and immunology in the USSR. In: C. A. LEONE, ed. Effects of ionizing radiation on immune processes. New York, Gordon and Breach p. 455-504.
- HORSFALL, F. L. Jr. e D. L. WALKER, 1950. Lack of identity in neutralizing and hemagglutination.inhibiting antibodies against influenza viruses. J. Expt. Med., 91: 65-86.

- HUSSEIN, M. F. e H. O. BUSHARA, 1976. Investigations on the development of an irradiated vaccine for animal schistosomiasis. In: I A E A. Nuclear techniques in animal production and health as related to the soil-plant system. Vienna, p. 421-431.
- JENKIN, C. R. e D. ROWLWY, 1965. Partial purification of the "protetive" antigen of *Salmonella typhimurium* and its distribution among various strains of bacteria. Australian J. Expt. Biol. Med. Sci., 43: 65-78.
- JORDAN, R. T. e L. L. KEMPLE, 1956. Inactivation of some animal viruses with gamma radiation from cobalt 60. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 91: 212-215.
- KAPLAN, C., 1960. The antigenicity of γ -irradiated vaccinia virus. J. Hyg., 58: 391-398.
- KAWAKAMI, M. ; N. OSAWA e S. MITSUHASHI, 1966. Experimental salmonellosis. VII - Comparison of the immunizing effect of live vaccine and materials extracted from *Salmonella enteritidis*. J. of Bacteriol., 92: 1585-1589.
- KENNY, K. e M. HERZBERG, 1967. Early antibody response in mice to either infection or immunization with *Salmonella typhimurium*. J. of Bacteriol., 93: 773-778.
- KRAMER, L. D. e J. P. VANDERBERG, 1975. Intramuscular immunization of mice with irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites. Enhancement of protection with albumin. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24: 913-916.
- LEA, D. E., 1956. Actions of radiations on livings cells. 2^a ed., London, Cambridge Press. 416 p.

- LICCIARDELLO, J. J., 1964. Effect of temperature on radiosensitivity of *Salmonella typhimurium*. J. Food Sci., 29: 469-474.
- LIMA, O. e W. D. SILVA, 1970. Imunologia, imunopatologia, alergia — Métodos. São Paulo, Ed. Guanabara Koogan S. A. 673 p.
- MALAFIEJ, E. ; S. LACHMANOWA e A. HOROSZEWICZ-MALAFIEJ, 1974. An evaluation of the applicability of gamma radiation for preparing typhoid fever vaccine. Med. Dosw. Mikrobiol., 26: 93-98. Original em polonês.
- MITSUHASHI, S. ; K. SAITO ; N. OSAWA e S. KURASHIGE, 1967. Experimental salmonellosis. IX - Induction of cellular immunity and formation of antibody by transfer agent to mouse mononuclear phagocytes. J. of Bacteriol., 94: 907-913.
- MULLIGAN, W., 1976. Nuclear techniques in the control of parasitic infections. In: IAEA. Nuclear techniques in animal production and health as related to the soil-plant system. Vienna, p. 413-419.
- NISHIHARA, H. ; T. H. AHN ; C. V. TAPLIN e C. M. CARPENTER, 1965. Immunogenicity of a gamma irradiated *Brucella melitensis* vaccine in mice. Cornel Vet., 54: 573-583.
- ONISHI, T., 1975. Immunological studies on *Metastrongylus apri* infection. 3. Migratory behavior in the guinea pig of 5×10^4 R X-irradiated *M. apri* larvae used as attenuated larval vaccine. Nippon Juigaku Zasshi., 37: 83-89. Original em japonês.

- OSAWA, N. ; M. KAWAKAMI ; S. KURASHIGE e S. MITSUHASHI, 1967. Experimental salmonellosis. VII - The postinfective immunity and its significance for conferring cellular immunity. J. of Bacteriol., 93: 1534-1540.
- PARTODIHARDJO, S. ; M. ISKANDAR ; J. DANUS e S. ASMINAH, 1976 Use of irradiated *Eimeria tenella* for immunization of male chicken. In: IAEA. Nuclear techniques in animal production and health as related to the soil-plant system. Vienna, p. 435.
- PITTMAN, M. e H. J. BOHNER, 1966. Laboratory assays of different types of field trial typhoid vaccines and relations - hip to efficacy in man. J. of Bacteriol., 91: 1713-1723.
- POLLEY, J. R., 1961. Preparation of non-infective soluble antigens with gamma radiation. Can. J. Microbiol., 7: 135-139.
- POLLEY, J. R., 1961.a. Factors influencing inactivation of infectivity and hemagglutinin of influenza virus by gamma radiation. Can. J. Microbiol., 7: 535-541.
- POLLEY, J. R., 1962. The use of gamma radiation for the preparation of virus vaccines. Can. J. Microbiol., 8: 455-459.
- PREVITE, J. J. ; Y. CHANGE e H. M. EL-BISI, 1967. Detoxification of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide by ionizing radiation. J. of Bacteriol., 93: 1607-1614.
- PREVITE, J. J., 1968. Immunogenicity of irradiated *Salmonella typhimurium* cells and endotoxin. J. of Bacteriol., 95: 2165-2170.

- RAMACHANDRAN, C. P., 1975. Attempts at immunization against *Malayan filariasis* using X-irradiated infective larvae. In: IAEA. Nuclear techniques in helminthology research and control of helminthic infections. p. 101-114.
- REGAMEY, R. H. ; W. HENNESSEN ; D. IKIE e J. UNGAR, 1965. V. Standardization of typhoid vaccines. In: Progress in immunobiological standardization. Vol. 2, New York, S. Karger, p. 125-211.
- REITMAN, M. e H. R. TRIBBLE, Jr., 1967. Inactivation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by γ -radiation. Appl. Microbiol., 15: 1456-1459.
- REITMAN, M., 1969. Nonviable venezuelan equine encephalomyelitis hemagglutinin prepared from tissue cultures by gamma radiation. Appl. Microbiol., 18: 278-279.
- REITMAN, M. ; H. R. TRIBBLE, Jr. e L. GREEN, 1970. Gamma-irradiated venezuelan equine encephalitis vaccines. Appl. Microbiol., 19: 763-767.
- ROSSETTINI, S. M. O. ; O. J. CROCOMO ; E. S. ARAUJO e Y. LEVANNON, 1975. Effects of gamma radiation on bovine serum albumin. Rev. Biol. Med. Nuclear, 7: 16-21.
- SALAFRANCA, E. S., 1970. De-toxification of cobra venom and bacterial toxins for biological production. In: IAEA Radiation sensitivity of toxins and animal poisons. p. 19-22.
- SINGH, J. e B. S. GIL, 1975. Radiation of gamma-irradiation on oocysts of *Eimeria necatrix*. Parasitol., 71: 117-124.

- SINGH, J., 1977. Radiation-attenuated vaccine for lungworm disease. Indian Farming, 26: 23-25.
- SINHA, A. K. ; H. C. TEWARI e K. S. SINGH, 1977. Effect of irradiation and storage on the infectivity of *Dictyocaulus fileria* larvae. Sci. Cult., 43: 136-137.
- SKALKA, M. e F. ANTONI, 1970. Effect of radiation on the biological properties of proteins. In: IAEA. Radiation sensitivity of toxins and animal poisons, p. 1-12.
- SKULBERG, A., 1970. Toxins produced by *Cl. botulinum* and their radiosensitivity. In: IAEA. Radiation sensitivity of toxins and animal poisons, p. 19-30.
- SOKOLIC, A. ; M. MOVSESIJAN ; Z. TANIELIAN e N. ABU ALI, 1976. Irradiated *Eimeria brunetti*, *E. necatrix* e *E. tenella* in the simultaneous immunization of chickens. Br. Vet. J., 132: 416-422.
- STEVES, F. E. ; J. D. BAKER ; V. D. HEIN e T. A. MILLER, 1973. Efficacy of a hook-worm (*Ancylostoma caninum*) vaccine for dogs. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 163: 231-235.
- SUBRAHMANYAM, D. e S. CHAUDHURI, 1975. Studies on humoral and cellular immune responses in filariasis: Use of nuclear techniques. In: IAEA. Use of nuclear techniques in research and control of helminthic infections. p. 73-84.
- SUGIMAN, K., 1976. The study of immunological effects of irradiated *P. multocida* vaccine in rabbits. Yogyakarta. Faculty of Veterinary. Gamma Research Centre, 17 p. Original em Indonésio.

- TUMANIAN, M. A. ; A. P. DUPLISCHEVA e T. S. SEDOVA, 1958. The effect of massive doses of γ -radiation on the immunogenic properties of bacteria of bacteria of the intestinal group. J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. (USSR), 29: 497-505.
- USHIBA, D. ; K. SAITO ; T. AKIYAMA ; M. NAKANO ; T. SUGIYAMA e S. SHIRONO, 1959. Studies on experimental typhoid: Bacterial multiplication and host cell response after infection with *Salmonella enteritidis* in mice immunized with live and killed vaccines. Japan J. Microbiol., 3: 231-242.
- WRIGHT, A. C., 1976. Effects of ^{60}Co gamma irradiation on *Eimeria falciformis* (Eimer 1870) Schneirder 1875, a protozoan parasite of the mouse, *Musmusculus* L., Boston Univ., 119 p. (Ph.D. Thesis).
- YOSHINAKA, T. ; K. YANO e H. YAMAGUCHI, 1973. Isolation of highly radioresistant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans* nov. sp. Agr. Biol. Chem., 37: 2269-2275