

T. 636.08969  
A663a  
1976

RÓBISON FORTES DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DE QUALIDADES DAS VACINAS B19,  
FABRICADAS NO BRASIL

Belo Horizonte  
Minas Gerais - BRASIL  
1976

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



000460098304 0400

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

OK  
02/03/04/06  
L7 p/04

Agradecimientos

ÉLVIO CARLOS MOREIRA - Professor Assistente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - ORIENTADOR

RONALDO REIS - Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - CONSELHEIRO

MARÍLIA DA CONCEIÇÃO NOGUEIRA - LABORATORISTA do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

O presente trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte - M.G.

Aos meus pais, pelo exemplo.  
À minha esposa, pelo estímulo.



ÍNDICE

	Página
Introdução -----	2
Literatura -----	5
Material e Métodos -----	10
Resultados -----	17
Discussão -----	31
Conclusões -----	36
Resumo -----	39
Referências Bibliográficas -----	43

1. Introdução



A brucelose é, certamente, uma das mais importantes zoonoses, sendo considerada significativo problema de saúde pública. Essa doença é a causa de perdas consideráveis nos rebanhos e, ao mesmo tempo, responsável por numerosos casos de doença no homem. Segundo a FAO/OMS (1958) estima-se que o número de casos da doença no homem chega a 30.000 na Itália e de um a cinco novos casos por ano, para cada 1.000 habitantes de certas regiões da América Latina.

Além de significativo problema de saúde pública, a brucelose, ocorrendo de forma endêmica ou epidêmica, acarreta elevados prejuízos à pecuária das áreas atingidas. No Brasil, a informação disponível da brucelose bovina (BRASIL, 1975) indica uma prevalência média de 5,69% de casos positivos e 4,92% de suspeitos, no período de 1966 a 1974. Em 3.007.348 bovinos testados.

Tomando por base os indicadores acima referidos, quanto às perdas em carne e leite, dos bovinos brucélicos, foram estimados os seguintes prejuízos no ano de 1970: com relação à produção de carne - 120.396 toneladas, no valor global de Cr\$237.181.794,00, equivalente ao dobro do total exportado pelo Brasil no período; e leite - 65.758 toneladas, no valor global de Cr\$32.879.273,00 o que corresponde o suficiente para o consumo de 854.000 habitantes durante um ano, ao nível de 211 gramas *per capita* ao dia.

A profilaxia da brucelose bovina constitui um problema cons

tante. Segundo a recomendação do COMITÉ MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DE LA BRUCELOSE (1964) o controle da brucelose em áreas endêmicas deve se basear na vacinação sistemática da fêmea, na idade de seis a oito meses.

Introduzida por BANG (1906) a imunização contra brucelose tem sido largamente utilizada durante vários anos. HUDDLESON (1922) sugeriu a utilização de amostras não virulentas ou de virulência atenuada inaugurando, assim, uma série de estudos que colocaram em prática diferentes vacinas, de virulência mais ou menos atenuada. BUCK (1930) mostrou a possibilidade de se vacinar bezerras de seis meses de idade, com uma amostra de *Brucella abortus*, pouco virulenta, denominada amostra B19. Esse trabalho inicial abriu uma linha de pesquisa, onde COTTON (1932) e COTTON & cols. (1933) estudaram o poder imunogênico de amostras de virulências diversas, em cobaios e bovinos e demonstraram que a etiquetada por BUCK (1930) — amostra B19 —, mostrou ser de melhor qualidade imunogênica e bastante apatogênica para os animais e para o homem, servindo, assim, como base para a imunização dos animais. Na atualidade, essa amostra é usada em vários países, em forma de vacina atenuada ou inativada.

Segundo regulamentação do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1958) vêm sendo usadas somente vacinas produzidas com amostra B19 atenuada, para o rebanho bovino.

Segundo a FAO/OMS (1958) as vacinas elaboradas com a amostra B19 devem atender às seguintes características: a) não constituir perigo para o homem e animais; b) ser relativamente avirulenta; c) não se alterar após passagens sucessivas em animais vacinados; d) não ocasionar interferência com os métodos de diagnósticos (quando aplicada na faixa etária de seis a oito meses); e) ser de fácil elaboração, conservação e aplicação; e f) ter, no mínimo,  $60 \times 10^9$  germes viáveis não dissociados por dose no momento da vacinação.

Em decorrência da falta de informações precisas dos laboratórios nacionais sobre as vacinas elaboradas com a amostra B19, para as quais não existe controle de qualidade, propõe-se neste trabalho estudar a pureza, viabilidade, concentração, inocuidade e imunidade dessas vacinas. O conhecimento dessas características é necessário para a avaliação das qualidades imunogênicas e antigênicas da vacina B19, produzidas no Brasil.

2. Literatura

COTTON & cols. (1933) concluíram que a vacinação de bovinos com mais de cinco a seis meses de gestação, com amostra B19, pode provocar aborto, indicando, nestes casos, o uso de vacinas inativadas não aglutinogênicas.

MUNGER & HUDDLESON (1938) apontam um método com grande sensibilidade, no reconhecimento de variantes das brucelas, consistindo de provas opsonocitofágicas, utilizando sangue de animais não infectados. Os leucócitos poliformonucleares do sangue normal não têm a capacidade fagocitária para as brucelas; entretanto, quando as brucelas sofrem modificações em suas estruturas antigênicas, perdem suas resistências à ação leucocitária, apresentando quadros mais ou menos intensos de fagocitose.

MINGLE & cols. (1941) nos Estados Unidos e TAYLOR & MC DIARMID (1949) na Inglaterra, fizeram seis passagens via endovenosa em bovino, com amostra B19, não verificando nenhuma modificação, concluindo ser esta amostra de remarcável inocuidade e estabilidade.

MC LEAD (1944), LEVINE & WILSON (1949), MORGAN (1961), KRAFT (1965), JONES & cols. (1965), WILLIAMS & cols. (1965) e ALTON & JONES (1969) afirmam que a amostra B19 apresenta todas as características do biótipo 1 de *Brucella abortus* mas difere, em certos detalhes, das outras amostras desse mesmo biótipo. Em raras ocasiões, tem-se obtido cultivos parecidos aos da amostra B19, a partir de a-

nimais vacinados. A amostra B19 não exige uma atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> para seu crescimento e é mais sensível ao azul de tionina do que a maioria das outras amostras. A amostra B19 é mais sensível à penicilina do que a maioria das outras amostras de brucelas; bastando 5 unidades de penicilina por ml, no meio de cultura, para inibir seu crescimento. A adição de eritrol ao meio de cultivo estimula o crescimento de quase todas as amostras de *Brucella*, ao contrário da amostra B19, que apresenta uma sensibilidade peculiar a esse produto.

BRAUN & BONESTELL (1967) verificaram que o envelhecimento dos cultivos, com acúmulo de resíduos metabólicos, representa um papel importante na dissociação das brucelas. Com uma aplicação imediata desses conhecimentos, procura-se evitar as causas mais frequentes de dissociação para manter em sua forma "S" nos cultivos, particularmente aqueles destinados à preparação de vacinas e antígenos.

MANTHEI & cols. (1951), GORDON (1953) e MC DIARMID (1962a) afirmam que o grau de imunidade se mantém de uma maneira satisfatória até a quinta gestação. Existem casos em que a imunidade se mantém até mesmo dez anos após a vacinação, à idade ideal de seis a oito meses. Entretanto, para que esse fenômeno ocorra, é importante a qualidade da vacina, especialmente a sua viabilidade e estabilidade para que se possa obter tais resultados esperados.

JENDRUSCH (1958) afirma que a liofilização bem conduzida é um método de conservação da vacina B19, não alterando suas características morfológica e fisiológica, nem as propriedades imunológicas do antígeno.

MANTHEI (1959) demonstrou que a vacinação tem provado ser mais satisfatória, quando a amostra B19 satisfaz aos padrões de viabilidade. Afirma também que a qualidade antigênica da cultura empre-

gada e o número de germes viáveis são dois fatores que influenciam na qualidade da vacina - amostra B19 - e devem ser observados no momento da vacinação.

MC DIARMID (1962) cita o interesse considerável do uso de vacinas preparadas por suspensão de *Brucella abortus*, amostra 45/20, inativada, não aglutinogênica, em adjuvante. A aplicação recomendada - duas injeções desta vacina, seis a 12 semanas de intervalo - é considerada necessária para o desenvolvimento de uma imunidade satisfatória contra a brucelose bovina. Embora tenha sido demonstrada uma imunidade satisfatória em bovinos, num prazo relativamente curto após a vacinação, pouco se sabe com relação à duração dessa imunidade.

CORET & PILET (1963) afirmam que a vacina - amostra B19 - líquida deverá ser utilizada dentro de dois a três meses após a data de fabricação, quando conservada a 4°C, sendo aconselhada a sua utilização dentro da primeira quinzena da elaboração, ao passo que na vacina liofilizada, os germes podem permanecer vivos durante 12 meses ou mais, se empregada uma boa técnica de liofilização, seguida de conservação eficiente.

LOVE (1966) estocando vacinas anti-brucela em refrigerador (4°C), temperatura ambiente (25°C) e na estufa (37, 5°C), verificou que a viabilidade das vacinas, ao final de cada período, é inversamente proporcional à temperatura de estocagem, sendo que a temperatura ideal foi fixada em 4°C. Quando estocada a 4°C, a viabilidade das vacinas era satisfatória dentro do período de validade. Ainda LOVE (1966) reporta que o máximo de viabilidade pode ser obtido, mais efetivamente, quando a vacina de amostra B19 líquida é ajustada e tamponada entre pH de 5,9 a 6,8 (com preferência pH 6,3).

ALTON & JONES (1969) afirmam que o emprego da vacina em fêmeas deve-se fazer entre os quatro a oito meses de idade, injetan-

do-se, por via subcutânea, uma só dose de uma vacina aprovada nos testes de eficiência; a dose recomendada é de 5 ml, com um conteúdo de  $60 \times 10^9$  de germes viáveis no momento da vacinação. Não se recomenda vacinar touros e bezerras; também não se aconselha a vacinação de vacas adultas, salvo se a prevalência da brucelose for muito elevada e não sendo possível aplicar outros métodos de controle. Todos os animais vacinados devem ser identificados, com marca especial, segundo regulamento de cada país.

ALTON & JONES (1969) recomendam uma dose mínima de 60 bilhões de germes vivos (não dissociados por dose) no momento da vacinação, inoculados pela via subcutânea, para conferir uma imunização satisfatória, com uma duração de proteção máxima.



3. Material e Métodos

As informações da Divisão de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura sobre as vacinas de brucelose registradas e produzidas no país indicaram quatro laboratórios particulares e dois oficiais. Posteriormente, consultando estas fontes produtoras, verificou-se que somente os laboratórios particulares estavam em atividade de produção nesta época; os laboratórios oficiais, quando produziam, eram partidas esporádicas. A produção dessas vacinas pelos laboratórios particulares deveriam seguir técnica recomendada pela ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1969) (OLIVEIRA, 1973). De acordo com as informações acima, solicitou-se às fontes produtoras o envio de amostras de vacinas. Nessa época, esses quatro laboratórios da indústria privada eram responsáveis, praticamente, por 98% das vacinas B19, distribuídas no mercado nacional.

1. Vacinas (Fabricação: 1973)

- a) Vacina liofilizada contra brucelose bovina (aborto infeccioso das vacas - amostra B19). Laboratório Pfizer Química Ltda, licenciado pelo D.D.S.A. (M.A.), sob o nº 2.063/65.
- b) Vacina liofilizada, preventiva do aborto contagioso das vacas ou brucelose (Anabortina bovina B19). Laboratório Rhodia-Merieux S.A., licenciado pelo D.D.S.A. (M.A.) sob o nº 904, de 4/8/1953.

- c) Vacina líquida contra brucelose Vallée (Brucelina B19 Vallée) Instituto Vallée S.A.
- d) Vacina líquida contra brucelose. Laboratório Hertape S.A., licenciado pelo D.D.S.A. (M.A.) sob o nº 2.108.

Para uma melhor uniformização dos resultados, analisou-se quatro amostras distintas de cada vacina, de acordo com o seguinte esquema: amostra 1, fornecida pelas fontes produtoras e as outras três obtidas no mercado distribuidor (drogarias e farmácias veterinárias). As vacinas obtidas no mercado distribuidor foram selecionadas com período de validade inicial, médio e final, agrupadas e designadas como amostras 2, 3 e 4 respectivamente.

## 2. Amostra desafio

Para desafio dos animais vacinados utilizou-se a amostra de *Brucella abortus* 544, gentilmente cedida pelo Laboratório Central de Veterinária - Weybridge, Inglaterra, na dose aproximada de 10.000 bactérias, no volume de 0,2 ml, de acordo com as técnicas preconizadas por PILET & GARREC (1967) e PILET & BONNEAU (1970).

As provas constantes desse trabalho baseiam-se nas recomendações técnicas da ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (1969) e outros métodos de avaliação citados por vários autores, na análise da eficiência antigênica e imunogênica das vacinas (ELBERG, 1960; ELBERG & cols., 1960; BRAUN & cols., 1962; DELARENAY, 1962; STINERLING, 1963; FAUVE, 1964; ELBERG & cols., 1964 e FAUVE & cols., 1964; PILET & GARREC, 1967).

## Teste de pureza

Para verificação da pureza da amostra de vacina, trabalhou-se segundo a técnica recomendada pela ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1969) dentro do seguinte esquema:

1. Semeadura de cada amostra de vacina, em tubo de fermentação com caldo dextrose de Andrade, incubado a 37°C e observado durante os sete primeiros dias, para verificação da formação de ácido ou gás.
2. Semeadura em meio de Tarozzi, incubado e observado durante 72 horas.
3. Semeadura em tubos de ágar Triptose, incubado à temperatura de 37°C durante 72 horas, para verificação do crescimento das brucelas.
4. Preparação de esfregaços corados pelo método de Gram e examinados para uma indicação preliminar do material e verificação da morfologia e coloração dos germes.

Requisito: segundo a Organización Panamericana de la Salud (1969), a vacina B19 deve estar livre de qualquer contaminação.

#### Teste de concentração e viabilidade

1. Determinação do volume celular, feita com o auxílio de tubos de Hopkins (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1969). Foram utilizados quatro tubos para cada amostra de vacina calculando-se em seguida, a média, com o auxílio de uma centrífuga horizontal, com coroa de 30 cm de diâmetro e uma rotação de 2.750 por minuto, durante 75 minutos. O volume celular requerido deve ser de 0,36% de células por volume.
2. Determinação da viabilidade celular - feitas as diluições de 1 ml de cada vacina em solução diluente (água peptonada pH 6,4) seameos 0,1 ml da diluição a 1:1.000.000 em duas placas de ágar batata e duas de ágar triptose. Da diluição de 1:10.000.000 seameos 0,1 ml em quatro placas de ágar batata. Em seguida as placas foram incubadas na posição invertida, a 37,5°C, durante 96 horas, quando processamos a contagem de colônias em cada placa da

diluição 1:10.000.000. As duas placas de ágar triptose, semeadas cada uma com 0,1 ml da diluição de 1:1.000.000, serviram para verificação da percentagem de dissociação celular. Viabilidade celular requerida é de  $60 \times 10^9$  bactérias viáveis por dose da vacina.

#### Teste de inocuidade

Para cada vacina, um lote de cinco camundongos de 20 a 25 g foi inoculado com 0,3 ml de vacina por via subcutânea, sendo observado durante 15 dias, para verificação de reação local ou geral.

#### Teste de dissociação

1. Através da observação com luz oblíqua (HENRY, 1933) com auxílio de um microscópio estereoscópico de pequeno aumento, com iluminação oblíqua e reflexa com um ângulo de  $45^\circ$ , verificou-se a presença de colônias típicas, redondas e brilhantes, de coloração ligeiramente azul esverdeada, correspondente às colônias lisas, de colônias com aspecto granuloso, ressecada, de cor branca-amarelada, denominadas colônias rugosas e, ainda de colônias transparentes foscas com aspecto viscoso, classificadas como mucóides. As colônias intermediárias, de difícil diferenciação por suas características morfológicas, situadas entre a lisa e as rugosas, não foram computadas.
2. Prova de cristal violeta - as culturas utilizadas no teste anterior foram, em seguida, inundadas com uma solução de cristal violeta, durante 15 a 20 segundos e examinadas ao microscópio estereoscópico (WHITE & WILSON, 1951), para verificação da presença de colônias lisas "S" e rugosas "R", segundo técnica de ALTON & JONES (1969).
3. Prova de acriflavina - várias colônias de cada placa de cultura

de amostra das vacinas em estudo foram suspensas, cada uma, com uma gota de acriflavina (diluída a 1/1000 em água destilada e solução recém preparada), verificando-se a homogeneidade da suspensão, segundo técnica de BRAUN & BONESTELL (1947). Os requisitos de dissociação celular é de até 5%.

#### Teste do poder imunogênico

Avaliação do poder imunogênico feita indiretamente pela pesquisa de anticorpos aglutinantes na circulação e, diretamente pelo desafio dos camundongos vacinados, com o auxílio da amostra-desafio *Brucella abortus* 544, de acordo com a técnica preconizada por PILET & GARREC (1967). Utilizou-se neste estudo apenas amostra 1, fornecida pelos laboratórios.

1. Estudo indireto - cada lote de seis camundongos, incluindo um lote controle, recebeu no dia 0 (zero) 0,2 ml de vacina subcutânea (a vacina B foi padronizada na dose de 2 ml para 5 ml) exceto o lote testemunha que recebeu 0,2 ml de solução fisiológica. Foram feitas coletas de amostras de sangue, por punção do sinus orbitário (com o auxílio de pipeta de Pasteur) nos dias 0, 7, 14, 28 após a vacinação, e submetidas à soro-aglutinação lenta (método de WRIGHT), segundo a técnica preconizada por PILET & GARREC ... (1967).
2. Estudo direto - iguais lotes de seis camundongos foram vacinados com 0,2 ml de cada vacina para obtenção de uma inoculação de, aproximadamente,  $2,4 \times 10^8$  de *Brucella abortus* amostra B19. Um lote de seis camundongos inoculados com 0,2 ml de salina serviu de controle. Decorridos 28 dias da vacinação, os camundongos foram inoculados com a amostra-desafio de *Brucella abortus* 544, na dose de 10.000 bactérias, por via intraperitoneal (PILET & GARREC, 1967).

Transcorridos dez dias da inoculação da amostra-desafio, todos os animais foram sacrificados com o auxílio de clorofórmio, e o baço colhido com emprego de material cirúrgico próprio, esterilizado antes de cada coleta. O baço assim obtido, foi depositado em um vidro com tampa de rosca, contendo 5 ml de diluente estéril (água peptonada, pH 6,4). Os baços foram triturados individualmente com o auxílio de um gral estéril semeando-se, em seguida, 0,1 ml da suspensão em três placas com ágar triptose, adicionada de 0,1 ml de uma solução de erytrol a 10% (PILET & GARREC, 1967); com o emprego de alça de Drigalski, fez-se a semeadura. Após a incubação a 37°C, em atmosfera enriquecida de 10% de CO<sub>2</sub>, por um período de 72 horas, as colônias foram enumeradas com o auxílio de um contador de colônias avaliando-se, assim, a infecção em cada animal dos diversos lotes, correspondendo em cada um o grau de proteção conferido em cada vacina, comparado com o do lote-controle.

3. O pH foi avaliado com o auxílio de um Potenciômetro Beckman Expandomatic SS-2-MUX100.

4. Resultados



### 1. Contaminação

Nas amostras 1 e 2, respectivamente, fornecidas pelos laboratórios e adquiridas no mercado com período de validade em fase inicial, todas as vacinas continham germes de contaminação. Nas amostras 3 e 4, correspondendo respectivamente a vacinas em fase média e em final de período de validade, a contaminação esteve presente nas vacinas A, B e D da amostra 3 e C da amostra 4 (Tabela I).

### 2. Produção de gás e ácidos dos germes contaminantes encontrados em 1 ml à diluição de $10^{-7}$ .

Com exceção das vacinas A amostras 2 e 4, B amostras 1, 3 e 4, C amostras 2 e 3 e D amostra 4, que não apresentaram crescimento de contaminantes à diluição acima descrita, todas as demais continham germes produtores de gases e/ou ácidos (Tabela II).

### 3. Volume celular

As variações dos valores encontradas no volume celular nas vacinas A e B das amostras 1, 2, 3 e 4 foram de 0,80 a 0,30% de volume, enquanto que nas amostras 1, 2, 3 e 4 das vacinas C e D as variações foram de 0,35 a 0,06% de células por volume, confor-

me podemos observar na Tabela I e Gráficos I, II, III e IV.

4. Germes viáveis por ml de vacina

Os valores encontrados para os números de germes viáveis nas amostras 1, 2, 3 e 4 das vacinas A e B foram de 91 a  $20 \times 10^8$  germes viáveis por ml de vacina e nas amostras 1, 2, 3 e 4 das vacinas C e D de 78 a  $1 \times 10^8$  germes viáveis por ml conforme resultados das Tabelas I e V, Gráficos I, II, III e IV.

5. Dissociação

Em todas as amostras estudadas, a dissociação esteve praticamente ausente, conforme podemos observar na Tabela I.

6. Indução da produção de anticorpos aglutinantes

A produção de anticorpos aglutinantes em vários estágios da imunização indicou maior indução aos sete dias da vacinação, com média de 63,7 UI e a menor aos 28 dias, com média de 10,7 UI, conforme está registrado na Tabela III. Os camundongos do grupo controle não apresentavam reações positivas.

7. Proteção contra a infecção

Os diferentes níveis de proteção contra a infecção, que foram observados nas vacinas analisadas, estão registrados na Tabela IV onde verificamos que a melhor proteção foi fornecida pela vacina A, que revelou uma média de 119 colônias de brucelas, amostra desafio, por ml de suspensão de baço, contrastando com a vacina D, onde foi observada a média de 776 colônias de brucelas, amostra desafio, por ml de suspensão de baço.

#### 8. Análises do pH

Os resultados encontrados nas análises do pH das vacinas estudadas mostravam valores que oscilaram entre 6,30 a 7,58, e a maioria esteve acima do pH 6,8 (Tabela I).

NOTA: A tabela nº 5 nos mostra os resultados encontrados, comparados com o padrão de referência.

TABELA I

Resultados de pH, contaminação, dissociação, volume celular e germes viáveis, encontrados.

Vacinas	pH	Contaminação	Dissociação em %	Volume celular em %	Germes viáveis por ml/vacina
A - 1	7,03	+	0	0,80	85 x 10 <sup>8</sup>
B - 1	7,10	+	1	0,45	91 x 10 <sup>8</sup>
C - 1	6,38	+	2	0,28	55 x 10 <sup>8</sup>
D - 1	7,32	+	0	0,35	2 x 10 <sup>8</sup>
A - 2	7,11	+	0	0,70	84 x 10 <sup>8</sup>
B - 2	7,00	+	0	0,35	60 x 10 <sup>8</sup>
C - 2	6,30	+	1	0,25	10 x 10 <sup>8</sup>
D - 2	7,58	+	0	0,10	1 x 10 <sup>8</sup>
A - 3	7,02	+	0	0,75	82 x 10 <sup>8</sup>
B - 3	7,05	+	0	0,42	83 x 10 <sup>8</sup>
C - 3	6,35	-	0	0,28	78 x 10 <sup>8</sup>
D - 3	7,25	+	0	0,06	1 x 10 <sup>8</sup>
A - 4	7,08	-	1	0,60	20 x 10 <sup>8</sup>
B - 4	7,00	-	1	0,30	30 x 10 <sup>8</sup>
C - 4	6,45	+	0	0,20	13 x 10 <sup>8</sup>
D - 4	7,45	-	0	0,10	1 x 10 <sup>8</sup>
Padrão de Referência	6,4 a 6,8	-	0 a 5	0,36	12 x 10 <sup>8</sup>

TABELA II

Produção de gás e ácidos dos germes contaminantes encontrados à diluição  $10^7$

Vacinas	Nº de colônias por ml/vacina	Com produção de gás	Com produção de ácido
A - 1	$1 \times 10^7$	+	+
B - 1	0	-	-
C - 1	$1 \times 10^7$	-	-
D - 1	$1 \times 10^7$	±	+
A - 2	0	-	-
B - 2	$1 \times 10^7$	-	+
C - 2	0	-	-
D - 2	$1 \times 10^7$	-	+
A - 3	$1 \times 10^7$	-	+
B - 3	0	-	-
C - 3	0	-	-
D - 3	$1 \times 10^7$	-	+
A - 4	0	-	-
B - 4	0	-	-
C - 4	$1 \times 10^7$	-	+
D - 4	0	-	-
Padrão	0	-	-

TABELA III

Produção de anticorpos em camundongos vacinados com as quatro vacinas amostra B19 elaboradas no Brasil em 1973

Vacinas	Animais	Dias após a vacinação			
		+7	+14	+21	+28
A	1	1/80UI	1/40UI	1/20UI	1/10UI
	2	1/40	1/20	1/20	1/10
	3	1/160	1/80	1/80	1/20
	4	1/80	1/40	1/40	1/20
	5	1/80	1/40	1/40	1/10
	6	1/40	1/40	1/40	1/20
	Média		80,0UI	43,3UI	40,0UI
B	1	1/40	1/80	1/40	1/20
	2	1/160	1/80	1/40	1/20
	3	1/80	1/80	1/80	1/40
	4	1/80	1/40	1/10	0
	5	1/40	1/40	1/10	0
	6	1/80	1/80	1/80	1/10
	Média		80,0UI	66,6UI	43,3UI
C	1*	1/40	-	-	-
	2	1/20	1/40	1/20	0
	3	1/10	1/10	1/10	0
	4	1/80	1/40	1/10	1/10
	5	1/20	1/40	1/10	1/10
	6	1/40	1/80	1/20	1/20
	Média		35,0UI	42,0UI	14,0UI
D	1	1/20	1/10	0	0
	2	1/40	1/10	1/40	1/10
	3	1/20	1/10	1/10	0
	4	1/40	1/10	1/40	1/10
	5	1/80	1/40	1/20	0
	6	1/160	1/80	1/20	1/10
	Média		60,0UI	26,6UI	21,6UI
Média Geral		63,7UI	44,6UI	29,7UI	10,7UI

\* Morte após a primeira sangria

TABELA V

Resultados encontrados e corrigidos à dose ideal, de  $600 \times 10^8$  de germes viáveis nas quatro amostras das vacinas A, B, C e D, produzidas em 1973 (amostra B19)

Vacinas	Germes viáveis por ml/vacina.	Dose recomendada pelo Laboratório (ml)	Germes viáveis por dose recomendada na vacina	Diferença entre dose ideal e dose encontrada	Dose corrigida na vacina
A - 1	$85 \times 10^8$	5	$425 \times 10^8$	$175 \times 10^8$	7,25
B - 1	$91 \times 10^8$	2	$182 \times 10^8$	$418 \times 10^8$	6,10
C - 1	$55 \times 10^8$	5	$275 \times 10^8$	$325 \times 10^8$	10,25
D - 1	$2 \times 10^8$	5	$10 \times 10^8$	$590 \times 10^8$	300,00
A - 2	$84 \times 10^8$	5	$420 \times 10^8$	$180 \times 10^8$	7,00
B - 2	$60 \times 10^8$	2	$120 \times 10^8$	$480 \times 10^8$	10,00
C - 2	$10 \times 10^8$	5	$50 \times 10^8$	$550 \times 10^8$	60,00
D - 2	$1 \times 10^8$	5	$5 \times 10^8$	$595 \times 10^8$	600,00
A - 3	$82 \times 10^8$	5	$410 \times 10^8$	$190 \times 10^8$	7,13
B - 3	$83 \times 10^8$	2	$166 \times 10^8$	$434 \times 10^8$	7,38
C - 3	$78 \times 10^8$	5	$390 \times 10^8$	$210 \times 10^8$	7,27
D - 3	$1 \times 10^8$	5	$5 \times 10^8$	$595 \times 10^8$	600,00
A - 4	$20 \times 10^8$	5	$100 \times 10^8$	$500 \times 10^8$	30,00
B - 4	$30 \times 10^8$	2	$60 \times 10^8$	$540 \times 10^8$	20,00
C - 4	$13 \times 10^8$	5	$65 \times 10^8$	$535 \times 10^8$	46,10
D - 4	$1 \times 10^8$	5	$5 \times 10^8$	$595 \times 10^8$	600,00

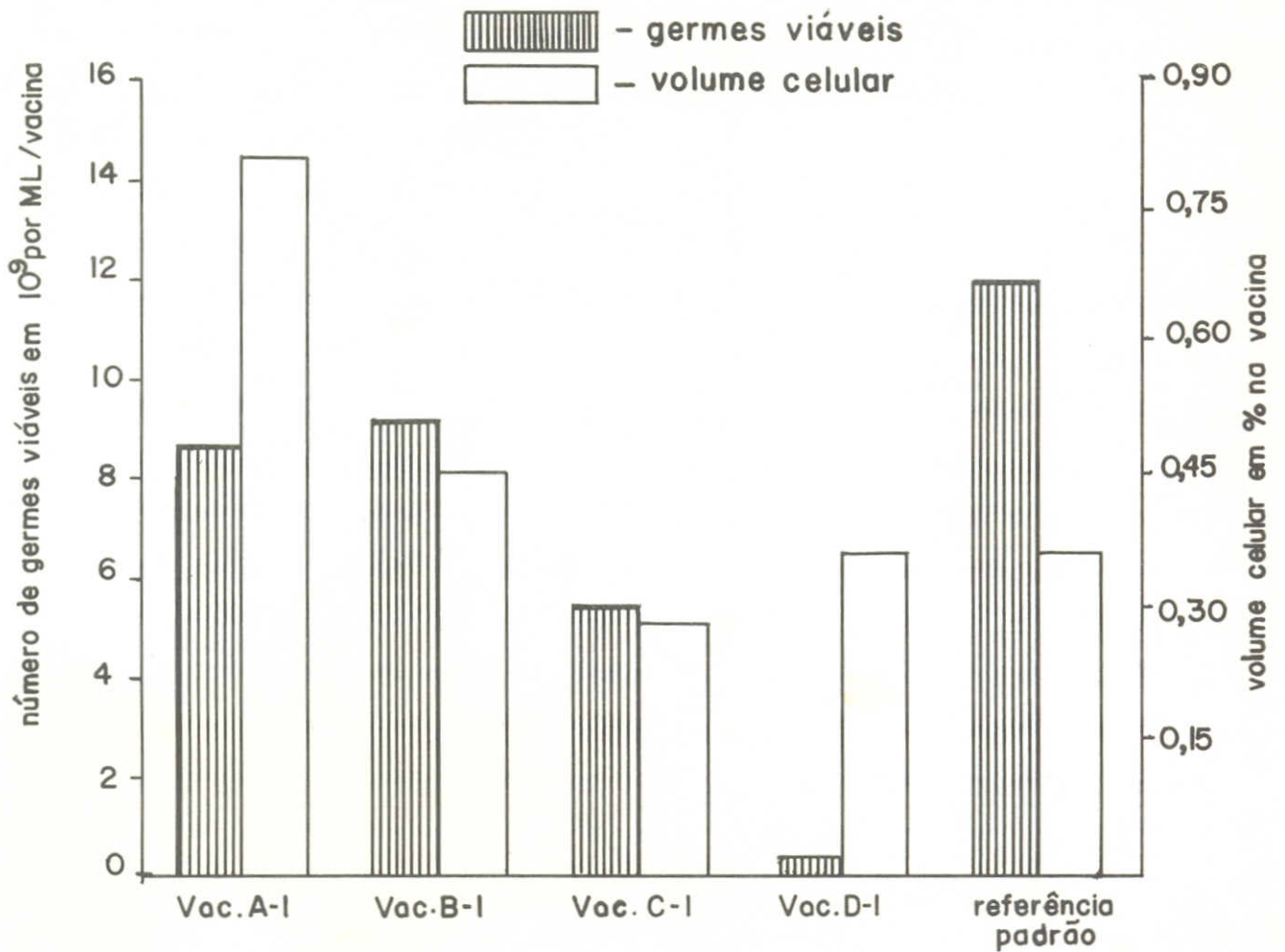
TABELA IV

Número de *Brucellas* (amostra 544) isoladas de baço de camundongos vacinados com as vacinas A, B, C e D e desafiados

Vacinas	Número de <i>Brucellas</i> em 0,1 ml suspensão de baço
A	119
B	212
C	613
D	776
Testemunha	931

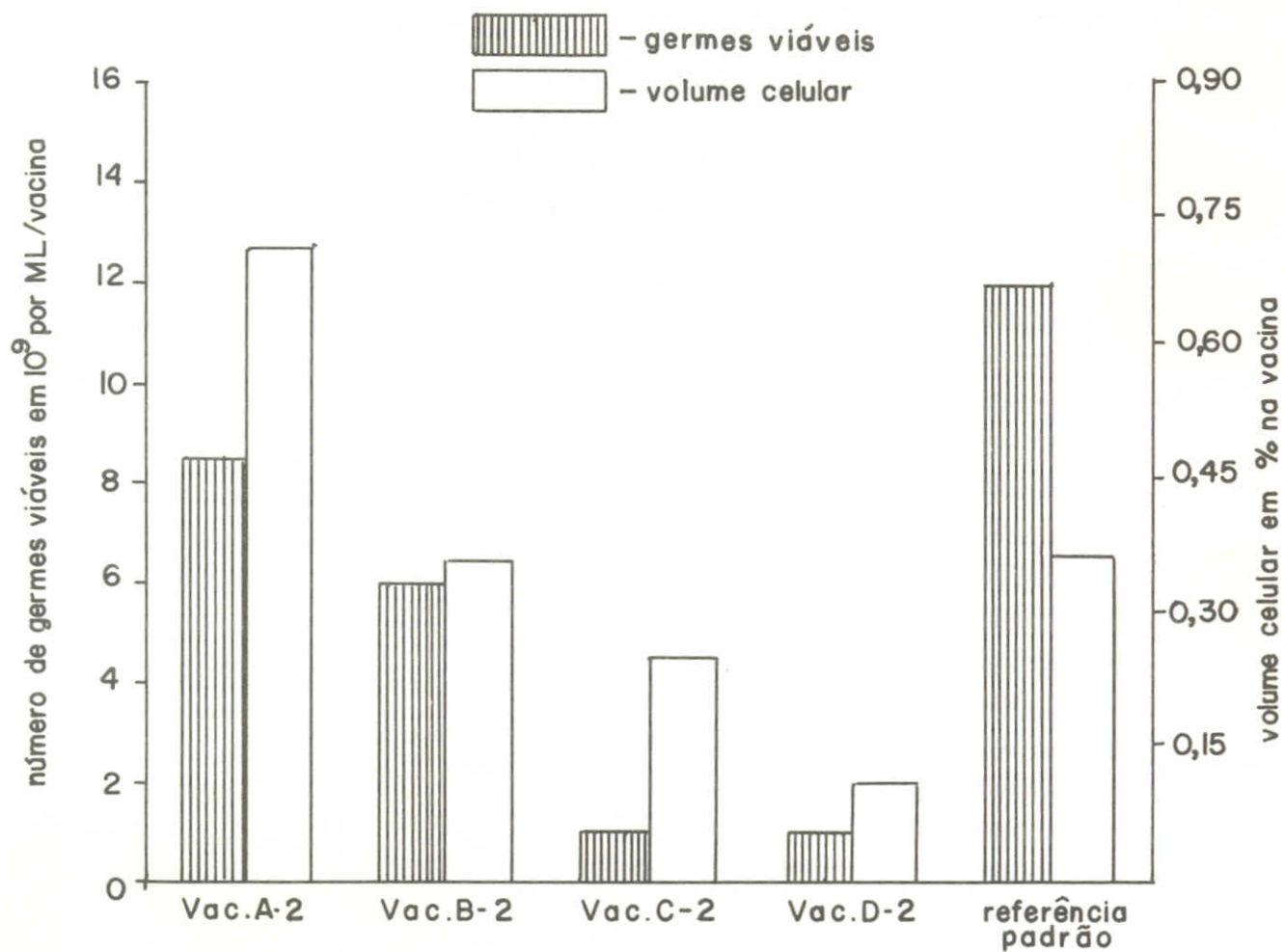


gráfico - I



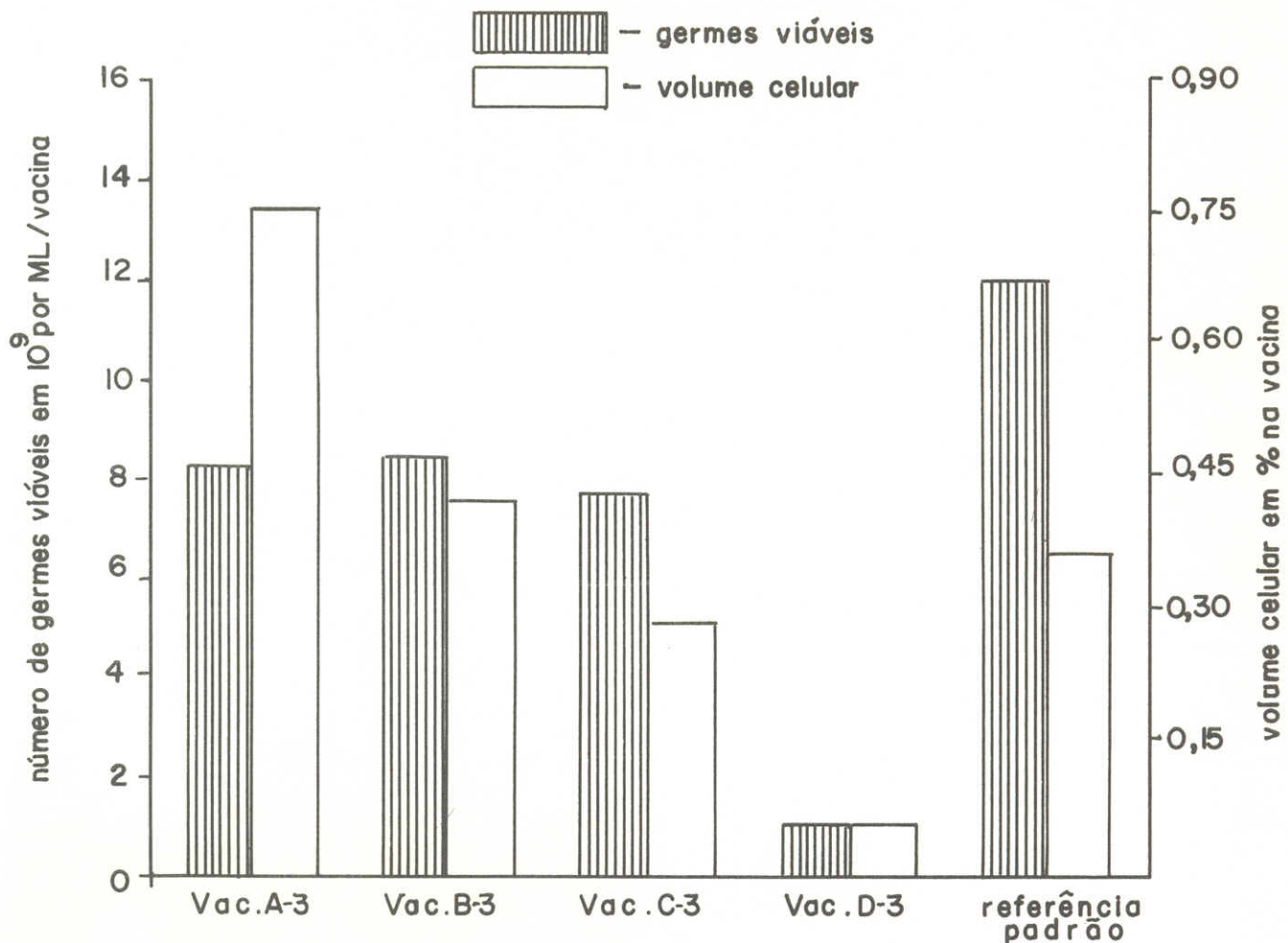
Concentração e viabilidade celular da amostra I das vacinas anti-brucélicas fabricadas no Brasil em 1973 (amostra B19).

gráfico - II



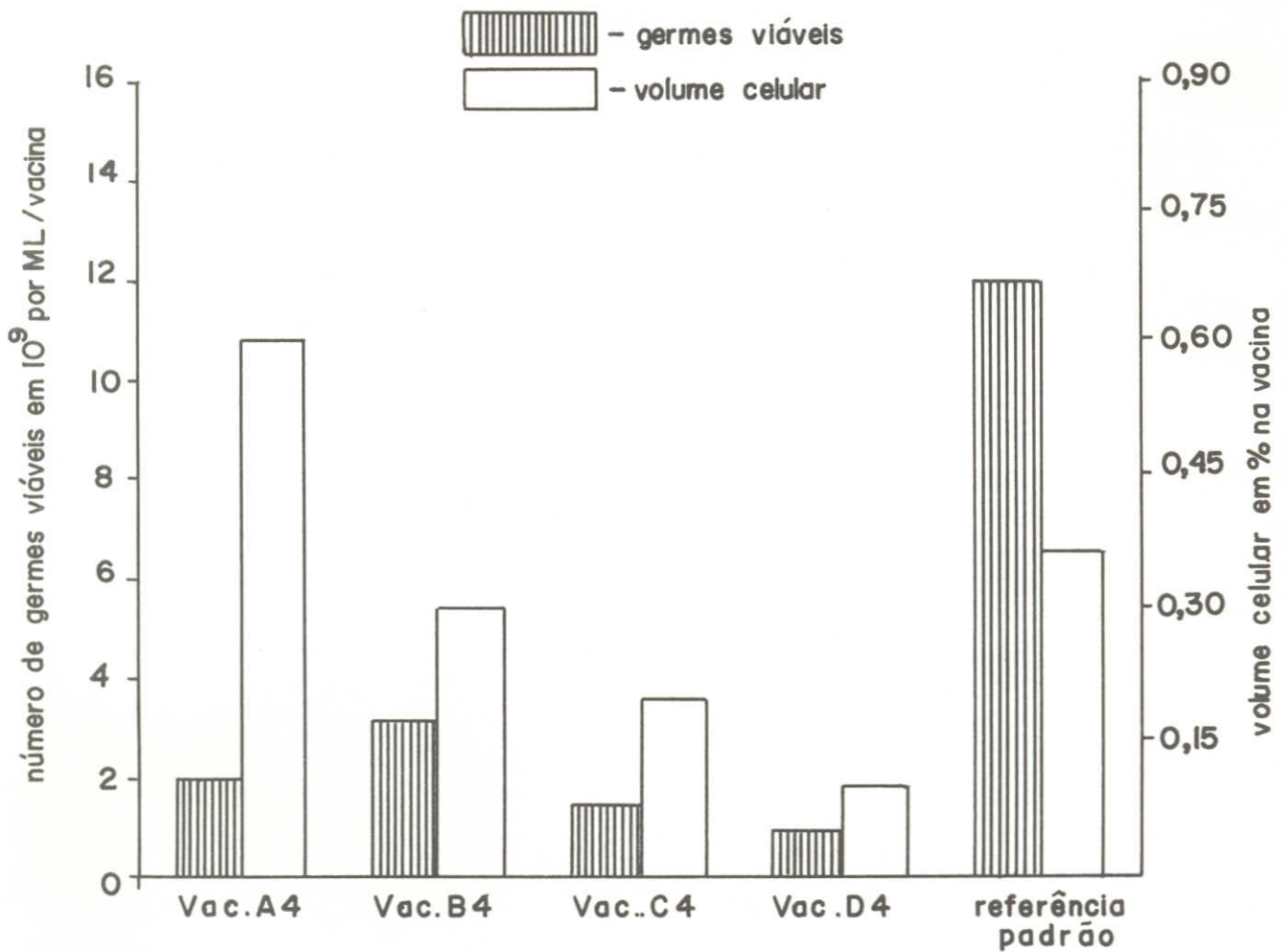
Concentração e viabilidade celular da amostra 2 das vacinas anti-brucélicas fabricadas no Brasil em 1973 (amostra B19).

gráfico III



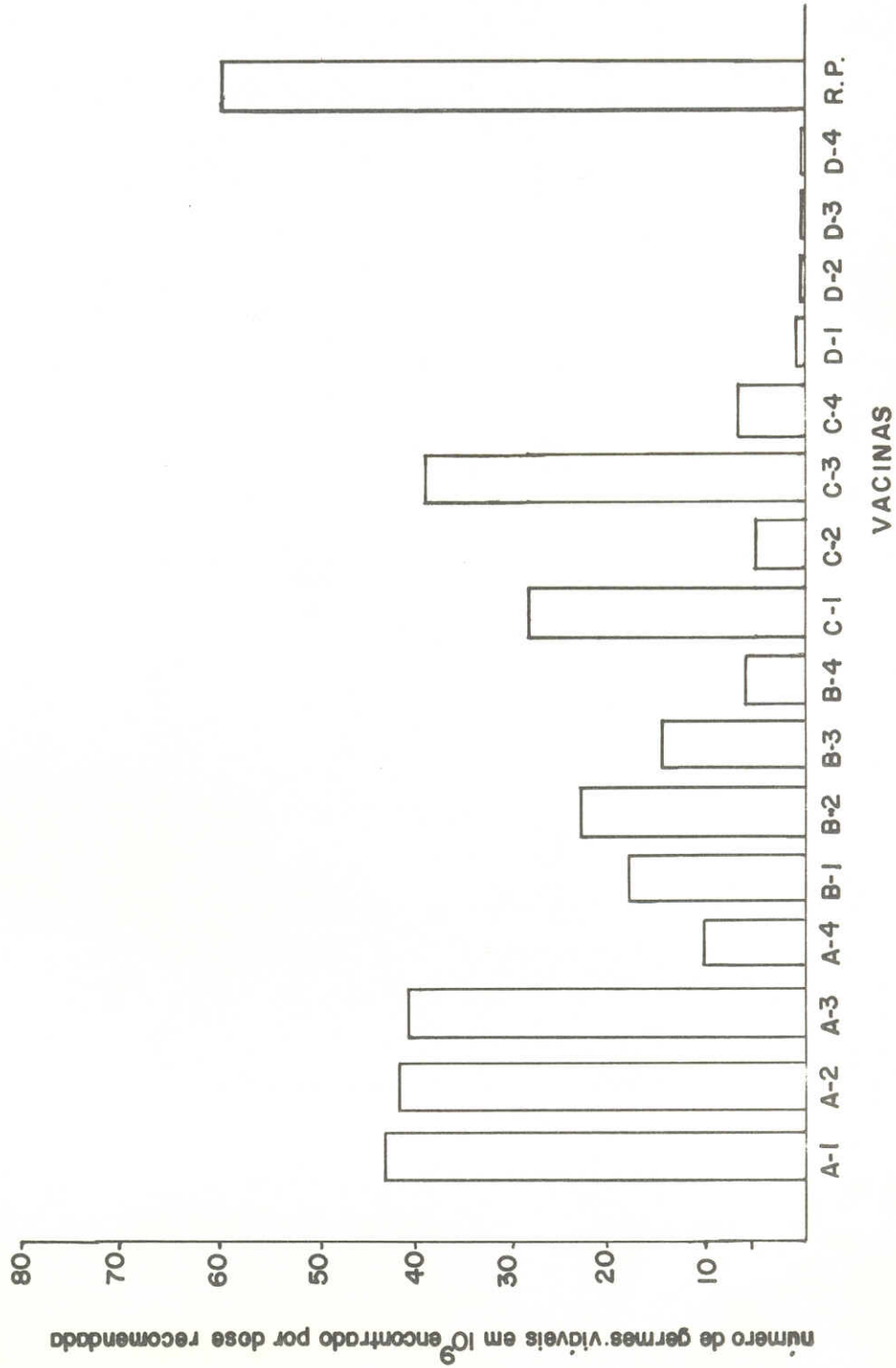
Concentração e viabilidade celular da amostra 3 das vacinas anti-brucélicas fabricadas no Brasil em 1973 (amostra B19)

gráfico IV



Concentração e viabilidade celular da amostra 4 das vacinas anti-brucélicas fabricadas no Brasil em 1973 (amostra B19)

Gráfico - V



Número de germes viáveis encontrado nas amostras das vacinas A,B,CeD em comparação com a referência padrão (R.P.)

5. Discussão

Na avaliação do pH das vacinas estudadas, podemos observar, através dos dados da Tabela I, que somente uma amostra (C-4) esteve dentro dos limites padrões de 6,4 a 6,8 preconizados segundo a ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1969). Na vacina C, as amostras 1, 2 e 3 o pH esteve próximo do limite mínimo indicado. LOVE (1966) encontrou bons resultados de crescimento e sobrevivência das brucelas, quando o pH do meio variou de 5,9 a 6,8 e, dentro desses valores, melhores resultados com o pH 6,3. Em todas as amostras das vacinas A, B e D, o pH esteve acima do limite recomendado, alcançando valores mínimos de alcalinidade. A variação do pH, por si só, não explica o pequeno número de germes viáveis encontrados nas dosagens recomendadas embora este, entre outros fatores, possa estar determinando uma redução da viabilidade das brucelas nestas vacinas.

Segundo recomendações da ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1969), a vacina amostra B19 deverá estar livre de toda contaminação. Os germes contaminantes, através da produção de resíduos metabólicos, oriundos de sua multiplicação, podem ocasionar uma modificação do meio ambiente, com alteração do pH da vacina, podendo ocorrer uma redução do número de brucelas viáveis, condição básica para a imunogenicidade da vacina, como demonstraram os trabalhos de MANTHEI & cols. (1951); MANTHEI (1959); CORDON (1953) e MC DIARMID (1962a). As reações inflamatórias secundárias, oriundas de germes

estranhos na vacina, é um fator que concorre consideravelmente para a redução da imunogenicidade das vacinas de um modo geral. Nos testes a que foram submetidas, as amostras apresentaram o seguinte resultado: nas amostras 1 e 2, contaminação de todas as vacinas; na amostra 3, contaminação das vacinas A, B e D e, na amostra 4, contaminação da vacina C. O índice de contaminação foi de 75% nas 16 amostras analisadas não atendendo, desta forma, às especificações de pureza, segundo a ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1969), conforme está demonstrado na Tabela I.

A porcentagem de colônias dissociadas na vacina B19 é um fator importante na sua qualidade imunogênica, como demonstram os trabalhos de MUNGER & HUDDLESON (1938) e BRAUN & cols. (1962). Os limites de dissociação, preconizados segundo a ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1969) são de 0 a 5%. Nas vacinas estudadas, o maior índice foi de 2% na vacina C da amostra 1. Nessas condições, as vacinas analisadas estiveram dentro dos limites indicados supondo-se, portanto, que os índices de dissociação encontrados não interferiram na baixa imunogenicidade verificada nos resultados (Tabela IV).

O volume celular nas vacinas A e B foi maior que nas vacinas C e D, com valores nas primeiras variando de 0,30 a 0,80% e nas segundas de 0,06 a 0,35%. O volume, preconizado segundo a ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1969) é de 0,36% de células por volume. Entretanto, não se encontrou, na literatura, informações de que volumes superiores possam interferir na qualidade do produto final. Por outro lado, uma concentração inferior a 0,36% afetará diretamente o número de germes viáveis, na dose da vacina.

GORET & PILET (1963) atestam que a vacina amostra B19 líquida deve ser utilizada no período de dois a três meses de fabricação e, melhores resultados serão encontrados na primeira quinzena da



fabricação. Segundo estes autores, as *Brucellas* amostra B19, quando liofilizada, permanecem vivas 12 meses ou mais, de acordo com a técnica de liofilização utilizada. Na análise das Tabelas I e V, as vacinas A e B não corresponderam em quantidade às brucelas viáveis, embora o volume celular fosse satisfatório e, na maioria, acima do limite preconizado. Assim, pode-se admitir a hipótese de que a técnica empregada na liofilização tenha sido responsável pela grande mortalidade das brucelas como foi observado por JENDRUSCH (1958) ao estudar os métodos de liofilização das brucelas.

Nas vacinas C e D, tanto o volume celular como o número de brucelas vivas, por dose, foram bem inferiores ao desejado. Nestas, o volume celular deverá ter influenciado diretamente no número de brucelas viáveis, na dose recomendada.

O grau de imunidade mantém-se, satisfatoriamente, até a 5ª gestação. Há casos, entretanto, que essa imunização permanece até mesmo dez anos após a vacinação na idade ideal de seis a oito meses (MANTHEI & cols., 1951; GORDON, 1953 e MC DIARMID, 1962a). Entretanto, para a concretização desse fenômeno, é necessário que a vacina contenha  $60 \times 10^9$  brucelas vivas, no momento da vacinação, de acordo com a preconização da ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD ... (1969). Observando-se a Tabela V, verifica-se que o maior número de brucelas vivas encontradas na dose recomendada no produto, foi de  $425 \times 10^8$ , sendo necessário um acréscimo de 2,25 ml no volume da dose recomendada e o menor número foi de  $5 \times 10^8$ , faltando 595 ml, ou seja, mais de meio litro de vacina para se conseguir o número de brucelas vivas necessárias à imunização. Observando-se ainda a Tabela V, verificamos que com exceção da amostra 3 da vacina C e amostras 1, 2 e 3 da vacina A, o número de brucelas vivas encontradas foi sempre inferior à metade da dose ideal preconizada. A maior constância foi conseguida na vacina A, amostras 1, 2 e 3, que necessitou de um

acréscimo de menos da metade do volume para atingir a dose ideal; nas amostras 4, todas as vacinas estiveram com o número baixo de brucelas vivas. O limite mínimo de viabilidade para que uma vacina amostra B19 seja considerada razoável é de  $40 \times 10^9$ ; abaixo desse número a vacina deverá ser rejeitada (HULSE, 1958). Com exceção das amostras 1, 2 e 3 da vacina A, em todas as outras amostras o número de brucelas vivas foi bem inferior ao índice mencionado, conforme podemos observar nos Gráficos I, II, III, IV e V e Tabela V.

A produção de anticorpos aglutinantes foi mais pronunciada aos sete dias da vacinação e sempre superior nas vacinas A e B, como podemos verificar observando a Tabela III. Sabe-se que a produção de anticorpos é somente um fator indicativo, não constituindo um bom índice de avaliação da vacina B19. A imunidade ao curso das doenças crônicas bacterianas, em particular a brucelose dos ruminantes, se apoia sobre uma reação celular e, mais especificamente, no aparecimento de imunofagócitos (JOUBERT & VALETTE, 1967).

A proteção conferida pela vacina amostra B19, nos animais vacinados, é inversamente proporcional ao número de brucelas desafiadas encontradas no baço, e este grau de proteção com vacinas anti-brucélicas não excede a 50%, nas melhores condições (JOUBERT & VALETTE, 1967). Os resultados verificados na Tabela IV mostraram melhores resultados conferidos pela vacina A, em relação às aquelas das vacinas B, C e D. Esses resultados, quando comparados com os trabalhos de PILET & GARREC (1967), mostraram que os índices de proteção conferidos pelas vacinas A, B, C e D, foram significativamente baixos.

6. Conclusões

Das 16 amostras de vacinas B19, analisadas no período de 1973, somente uma atendeu aos requisitos de pH.

A contaminação esteve presente em 75% das amostras analisadas, indicando que as condições de assepsia na elaboração dessas vacinas não se encontram dentro das normas recomendadas, sugerindo a hipótese de que essa variação possa ser um dos fatores que colaboraram no baixo índice de brucelas vivas encontrado.

As amostras B19, empregadas na elaboração dessas vacinas, eram de boa qualidade, não verificando dissociação em porcentagem superior àquelas toleradas.

A irregularidade de volume celular encontrada nas vacinas C e D foi um fator no baixo número de brucelas vivas encontrado, por dose de vacina. As vacinas liofilizadas apresentaram sempre um volume celular acima do recomendado; por outro lado, as vacinas líquidas tiveram seu volume celular sempre abaixo do limite padrão.

A elevada porcentagem de brucelas mortas encontrada nas vacinas liofilizadas (A e B) sugere deficiência técnica no processo de liofilização.

A baixa proteção conferida por essas vacinas deve-se ao pequeno número de brucelas vivas nelas encontrado.

Em síntese, face aos resultados encontrados, verifica-se que todas as amostras analisadas não possuíam os requisitos mínimos

preconizados para a imunização.

Na época atual, quando se pensa, em termos oficiais, em um programa de controle da brucelose bovina torna-se necessário, antes de tudo, a comprovação das qualidades imunogênicas das vacinas a serem empregadas. Assim, justifica-se plenamente a introdução do controle da eficiência dessas vacinas, quer pelos órgãos oficiais, quer pelas próprias fontes produtoras, para sua liberação no mercado consumidor.



Foram examinadas 16 amostras de vacina B19 de fontes diferentes quanto a: pureza, pH, concentração, viabilidade, inocuidade, dissociação e poder imunogênico.

Foram os seguintes os resultados encontrados: todas as 16 amostras apresentaram menos de 5% de dissociação (0% de dissociação) 12 amostras apresentaram contaminação (75% de contaminação), 15 amostras tiveram pH fora dos limites padrões (93,74% de amostras com pH fora dos limites padrões), todas as 16 amostras tiveram viabilidade celular abaixo dos requisitos padrões (100% de baixa viabilidade celular), a concentração celular foi sempre elevada nas vacinas liofilizadas e baixos nas vacinas líquidas, e a proteção foi considerada baixa em todas elas.

Nenhuma das amostras estudadas possuía todos os requisitos mínimos recomendados.





Various parameter: of 16 samples from 4 origins strain B19 vaccine produced in Brazil in 1973; including tests of dissociation purity, safety, pH, concentration, viability and protection it were studied. Of the parameters tested only dissociacion was found to be with in the required limits in all the samples tested. Bacterial contamination was found in 75% of all vaccine samples tested. Only one sample of vaccine was within the required limits of pH. The concentration of organisms was found to be always elevated in lyophilize vaccines and low in liquid vaccines, and viability was always determined to be less then one-half the ideal dose in all 16 samples. The protection conferred was low in all the vaccine samples tested. No vaccine sample tested possessed the minimum requiriments recomended for this type of vaccine.

9. Referências Bibliográficas

- ALTON, G.G. & JONES, L.M., 1969. Las tecnicas de laboratorio en la brucelosis. Organización Mundial de la Salud. Série de Monografias nº 55. Ginebra. 95 págs.
- BANG, B., 1906. J. Pathol., 9:191. In GORET (1963).
- BRASIL, 1958. Ministério da Agricultura. Posteria nº 438 de 22/4/1958. Instruções para o combate à Brucelose animal. Diário Oficial de 25/4/1958: 9411-9413.
- BRASIL, 1975. Programa Nacional de Saúde Animal - PRONASA. Ministério da Agricultura. Brasília. 122 págs.
- BRAUN, W. & BONESTELL, A.E., 1947. Independent variation of characteristics in *Br. abortus* variants and their detection. Amer. J. Vet. Res., 8:386.
- BRAUN, W., KESSEL, R.W. & POMALES-LEBRION, A., 1962. Failure of vaccination with killed *Brucella* to modify monocyte bacterium intuations. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 109:875.
- BUCK, J.M., 1930. Studies of vaccination during calfhooood to prevent bovine infectious abortion. J. Agric. Res., 41:667.
- COTTON, W.E., 1932. Efficacy and safety of abortion vaccines prepared from *Brucella abortus* strains of different degrees of virulence. J. Agric. Res., 46: 291.
- COTTON, W.E., BUCK, J.M. & SMITH, H.E., 1933. Efficacy of an avirulent strain of *Brucella abortus* for vaccinating pregnant

- cattle. J. Agric. Res., 46:315.
- DELARENAY, A., 1962. Une oeuvre inusable. Vie Méd., 43:261.
- ELBERG, S., 1960. Cellular immunity. Bacter. Rev., 24:67.
- ELBERG, S., MASCARENHAS, P. & FONG, J., 1960. Response of peritoneal exudate cells to *Brucella militensis*. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 104:295.
- ELBERG, S., MASCARENHAS, P. & FONG, J., 1964. Response of normal and immune histiocytes of various animal species to infection by *Brucella militensis*. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 113:879.
- FAO/OMS, 1958. Comité FAO/OMS d'Experts de la Brucellose, 3<sup>e</sup> Repport. Org. Mond. Santé Ser. Rapp. Techn., 148. In RENOUX (1960).
- FAUVE, R.M., 1964. Résistance cellulaire à l'infection bactérienne. Méd. Hyg., 22:164.
- FAUVE, R.M., BONUCHAUD, D. & DELANNAY, A., 1964. Degrès de resistance comparis efferts "in vitro" par des macrophages provenant de souris normales ou vaccinées a l'infection par *Listeria monocytogenes* ou *Corynebacterium rutscheri*. C.R. Acad. Sci., 259:953.
- GORDON, W.S., 1953. Proc. 15th Int. Vet. Cong., 87. In GORET (1963).
- GORET, P. & PILET, C., 1963. Le vaccin B19 dans la premunition anti brucellique des bovins. Rec. Méd., 138:5.
- HENRY, B.S., 1933. Dissociation in the genus *Brucella*. J. Infect. Dis., 52:374.
- HUDDLESON, I.F., 1922. Tech. Bull. Mich. Agric. Exp. Station, 65. In Goret (1963).
- HULSE, E.L., 1958. IV<sup>e</sup> Congrès International de Standardisation Biologique, Bruxelles, 227. In Goret (1963).
- JENDRUSCH, H., 1958. Arch. Expt. Veterinarmed., 12, 1963. In Goret (1963).
- JONES, L.M., MONTGOMERY, V. & WILSON, J.B., 1965. Characteristics of carbon dioxid - independent cultures of *Brucella abortus* isolated

- from cattle vaccinated with strain 19. J. Infect. Dis., 115:312.
- JOUBERT, L.M. & VALETTE, L.R., 1967. Le test immunophagocytaire d'activité des vaccins anti-brucelliques et de leurs immunostimulants. Bull. Acad. Vét., 40:3.
- KRAFT, M.C., 1965. The identification of *Brucella abortus*, strain 19 by Penicillin tolerance. Amer. J. Vet. Res., 16:295.
- LEVINE, H.B. & WILSON, J.B., 1949. The identification of *Brucella abortus* strain 19 by eye bacteriostasis. J. Infect. Dis., 84:10.
- LOVE, E.L., 1966. The standardisation and control of the viability of strain 19 Brucella vaccine. 45th Proc. U.S. Livestock Show A. 65-72.
- MANTHEI, C.A., MINGLE, C.K. & CARTER, R.W., 1951. Duration of immunity to brucellosis induced in cattle with strain 19 vaccine 88th Proc. Book A.V.M.A., An. Meet. 203.
- MANTHEI, C.A., 1959. Summary of controlled research with strain 19. 63rd Proc. U.S. Livestock Show A. 91-97.
- MC DIARMID, A., 1962a. Immunization contra la brucelose au moyen d'une souche ne pas la formation d'agglutinines. An. Inst. Pasteur, 102:792.
- MC DIARMID, A., 1962b. An. Inst. Pasteur, 102:792. In Goret (1963).
- MCLEAD, D.H., 1944. J. Comp. Pathol, 44:248. In ALTON & JONES (1969).
- MINGLE, C.K., MANTHEI, C.A. & JASMIN, A.M., 1941. The stability of reduced virulence exhibited by *Brucella abortus* strain 19. Proc. Book A.V.M.A., 78th An. Meet. 203.
- MORGAN, W.J.B., 1961. J. Gen. Microbiol., 25:135. In ALTON & JONES (1969).
- MUNGER, M. & HUDDLESON, I.F., 1938. The detection of antigenic variants of Brucella by means of an apronocytophagic test. J. Bacter., 35:255.

- OLIVEIRA, G.C., 1973. Comunicação pessoal. Divisão de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura, Brasília, D.F. 1 pág.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1969. Elaboração e normalização da vacina *Brucella abortus*, amostra 19. Nota técnica nº 4, Rev. 1. 59 págs.
- PILET, Ch & Le GARREC, Y., 1967. Controle sur petits animaux de laboratoire du pouvoir immunogène des vaccins antibrucelliques inactivés. An. Inst. Past., 112:384-388.
- PILET, Ch & BONNEAU, M., 1970. Sur un nouveau vaccin antibrucellique non agglutinogène: le vaccin P.B. Rec. Méd. Vet., 145: 25-36.
- RENOUX, G., 1960. Immunisation des caprins et ovins contre la brucellose par un vaccin tué, en excipient huileux. Rec. Méd. Vet., 156:280-302.
- STINERLING, W.R., 1963. Characteristics of intracellularly grown *Brucella abortus*. J. Infect. Dis., 111:117.
- TAYLOR, A.W. & MC DIARMID, A., 1949. The stability of the avirulent characters of *Brucella abortus*, strain 19 and strain 45/20 in lactating and pregnant cows. Vet. Rec., 61:317.
- WHITE, P.C. & WILSON, J.B., 1951. Differentiation of smooth and nonsmooth colonies of *Brucellae*. J. Bacter., 61:239.
- WILLIAMS, A.E., KEPIE, J. & SMITH, H., 1965. J. Gen. Microbiol., 37:285. In Alton & Jones (1969).