



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Gonçala Maria Martins Arita

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TESTES DE CONTROLE DE QUALIDADE DE
VACINAS ANTI-RÁBICAS INATIVADAS PARA USO ANIMAL E PRODUÇÃO
EXPERIMENTAL DA VACINA DE REFERÊNCIA NACIONAL**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Gonçala Maria Martins
Arita
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do Título de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular na Área de Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Weis Arns

CAMPINAS - SP
2002

199016002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	AR 436
V	EX
TOMBO BCI	53020
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	250,1100
DATA	08/04/03
Nº CPD	

CM00180997-9

BIB ID 287635

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Arita, Gonçalves Maria Martins

Estudo comparativo entre testes de controle de qualidade de vacinas anti-rábicas inativas para uso animal e produção experimental da vacina de referência nacional / Gonçalves Maria Martins Arita. -- Campinas, SP:[s.n], 2002.

Orientadora: Clarice Weis Arns

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia

1. Vacinas. 2. Controle de qualidade. 3. ELISA. I. Arns, Clarice Weis.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

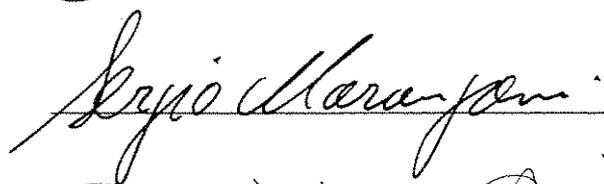
Campinas, 13 de dezembro de 2002

Banca Examinadora

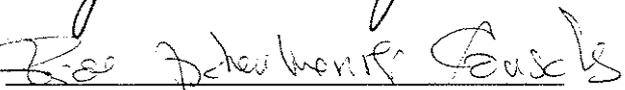
Profa. Dra. Clarice Weis Arns
Orientadora



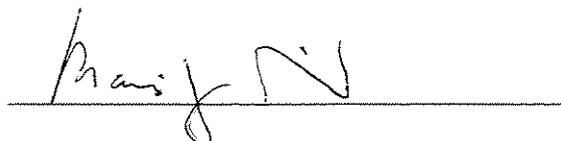
Prof. Dr. Sergio Marangoni



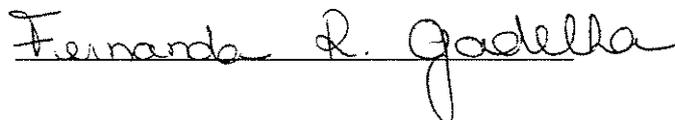
Profa. Dra. Cleide Aschenbrenner Consales



Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto



Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha



Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco
Carvalho

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Trabalho executado no Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e no Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA - Campinas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Dedico à Hanae, Harue e Harumi, aos meus pais e ao tio Amaro “*in memoriam*” e ao Hiromi, com carinho e gratidão pelo incentivo e apoio nos momentos de dificuldades e pela infinita paciência e compreensão em todos os momentos

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora, Clarice Weis Arns, orientadora dessa tese, pela confiança, oportunidade, amizade, apoio e ajuda para torná-la realidade.

Ao Professor Doutor, Carlos Francisco Bonafé, então Coordenador do Curso de Bioquímica, à Prof. Dra. Eneida de Paula, Coordenadora do Curso de Biologia Funcional e Molecular, aos Membros da Comissão de Pós-Graduação pela aceitação e acolhida nesse Curso e às Secretárias Andréia e Marina pelo apoio concedido.

Aos Membros da Banca Prévia, Prof. Dr. Sergio Marangoni, Prof. Dr Tomomaso Yano e em especial à Dra. Cleide Consales, pelas inúmeras sugestões e significativa ajuda na correção da redação final desse trabalho.

Ao Médico Veterinário, José Guedes Deak, Chefe do Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/Campinas – Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, pela permissão, apoio, incentivo e confiança em mim depositada.

À Farmacêutica, Amélia Mitiko Nishigawa Barbosa, Chefe Substituta do LARA/Campinas, pelo apoio, amizade, incentivo, confiança e ação no momento oportuno para possibilitar a execução dos testes.

À Médica Veterinária, Ivanete Kotait, pesquisadora do Instituto Pasteur de São Paulo, pela revisão geral e inúmeras sugestões apresentadas, desde o projeto até a redação dessa tese, e acima de tudo pela atenção, ajuda, apoio e amizade demonstrada.

Ao Médico Veterinário, Cleber Taylor Carneiro, Coordenador dos Laboratórios da Área Animal do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, pela permissão, aquisição de material e apoio oferecido.

Ao Professor Doutor Carlos Roberto Zanetti, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela acolhida, orientação e ajuda na realização das provas de ELISA indireto.

À Médica Veterinária, Maria Tereza Terreran e equipe do Laboratório de Pesquisa do Instituto Vallée, pela valiosa colaboração na realização das provas de ELISA de imunocaptura, que foram de grande importância para a realização desse trabalho.

Aos Biólogos, Amaury dos Santos e Amiris, Chefes Substitutos da Seção de Análises Biológicas do LARA/Campinas, pela presteza, disposição e determinação sempre constantes de oferecer a ajuda necessária.

Aos Biólogos, José Ferreira, Adilson dos Santos e toda a Equipe dos Setores de Produção de Células e Meios de Cultura do LARA/Campinas, pelo apoio técnico, no fornecimento de materiais, na presteza e disposição sempre constantes de oferecer ajuda e principalmente pela atenção, apoio e amizade.

À toda a Equipe do antigo Setor de Diagnóstico do LARA/Campinas, pelo apoio técnico, na produção da vacina experimental, em especial a Mirian pela contínua colaboração prestada e principalmente pela dedicação, apoio e amizade de todos.

Às Equipes dos Setores de Biotério e Raiva do LARA/Campinas, respectivamente, pelo fornecimento dos animais e pela colaboração na realização dos testes relativos a animais empregados nesse trabalho.

À Estatística, Margarida Maria Zaroni e ao Biólogo Mateus Barradas pela valiosa colaboração na execução e ajuda na interpretação da avaliação estatística dessa tese.

À Médica, Neide Takaoka, Diretora do Instituto Pasteur de São Paulo, pelo apoio, atenção e colaboração da equipe técnica daquele Instituto, em especial à Dra. Zélia, pelo apoio e amizade e às Bibliotecárias, Graça e Edna, pela presteza na disponibilização de material bibliográfico.

Ao Médico Veterinário, Roberto Correia, do Laboratório BIOVET pelo fornecimento da betapropiolactona e pela liofilização de alguns dos materiais usados nessa pesquisa.

À Bióloga, Maria Mércia Barradas, consultora do Conselho Nacional de Pesquisas pelas revisões do texto e principalmente, pela atenção e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB/UNICAMP Renata, Lia, Lica, Regina e Rodrigo e ao funcionário Genessi, pelo companheirismo, apoio, importante ajuda e atenção, que permitiram a finalização dessa tese e a superação dos momentos de dificuldades.

Às minhas irmãs Isabel e Auzairtes, que mesmo à distância, me ajudaram com palavras de ânimo, incentivo e apoio significativo.

A todas as pessoas e/ou Instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

	Página
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Apêndices	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Agente etiológico.....	1
1.2 Patogênese.....	4
1.3 Resposta imune.....	7
1.4 Sintomatologia.....	9
1.5 Controle da doença.....	12
1.6 Vacinas.....	13
1.6.1 Amostras de vírus rábico utilizadas na produção de vacinas.....	16
1.6.2 Vacinas contra a raiva humana.....	16
1.6.3 Vacinas contra a raiva de uso veterinário	17
1.6.3.1 Vacinas a vírus vivo modificado ou atenuadas.....	19
1.6.3.2 Vacinas inativadas.....	20
1.6.3.3 Inativantes.....	22
1.6.3.3.1 Beta propiolactona.....	22
1.6.3.3.2 Acetil etilenoimina.....	23
1.6.3.3.3 Bromo etilenoimina binária.....	23
1.6.3.4 Adjuvantes.....	24
1.6.3.4.1 Hidróxido de alumínio.....	25
1.6.3.4.2 Saponina.....	25
1.6.3.4.3 Adjuvantes oleosos.....	25
1.6.3.4.4 Outros adjuvantes.....	26
1.7 Controle de vacinas anti-rábicas inativadas.....	26
1.7.1 Controle de esterilidade ou pureza.....	27
1.7.2 Controle de inocuidade ou segurança.....	27
1.7.3 Controle de eficiência ou potência.....	27
1.7.3.1 Testes “in vivo” aplicáveis à avaliação da potência de vacinas anti-rábicas inativadas.....	28
1.7.3.1.1 Teste de Habel.....	28
1.7.3.1.2 Teste NIH.....	29
1.7.3.2 Testes “in vitro” aplicáveis à avaliação da potência de vacinas anti-rábicas inativadas.....	30
1.7.3.2.1 Teste de imunodifusão radial simples.....	31
1.7.3.2.2 Teste de redução de placas.....	31
1.7.3.2.3 Teste de anticorpos ligantes.....	32
1.7.3.2.4 Ensaios proliferativos.....	32
1.7.3.2.5 Vírus neutralização.....	33
1.7.3.2.6 Ensaio imunoenzimático	33

1.7.3.2.6.1	Aplicação do ELISA à quantificação de anticorpos anti-rábicos.....	34
1.7.3.2.6.2	Aplicação do ELISA à quantificação da glicoproteína do vírus rábico.....	36
2	OBJETIVOS.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Teste de Habel.....	39
3.2	Teste NIH.....	39
3.3	Comparação entre os testes de Habel e NIH.....	40
3.4	ELISA indireto para identificação de anticorpos.....	41
3.4.1	Placas.....	41
3.4.2	Antígeno.....	41
3.4.3	Amostras de soros.....	41
3.4.3.1	Soros de camundongos não vacinados.....	41
3.4.3.2	Soros de camundongos vacinados.....	41
3.4.3.3	Soro controle positivo.....	42
3.4.3.4	Obtenção dos soros.....	42
3.4.4	Conjugado.....	42
3.4.5	Substrato cromógeno.....	42
3.4.6	Procedimento do ELISA indireto.....	42
3.5	Comparação entre os testes de Habel e ELISA indireto.....	43
3.6	Determinação da diluição de uso dos soros no ELISA indireto.....	43
3.7	Produção experimental da vacina de referência nacional.....	44
3.7.1	Amostra viral.....	44
3.7.2	Linhagem celular.....	44
3.7.2.1	Manutenção das culturas celulares.....	44
3.7.2.2	Preparação das culturas celulares em garrafas.....	44
3.7.3	Meio de cultura.....	45
3.7.4	Inoculação viral.....	45
3.7.4.1	Inoculação de células em suspensão.....	45
3.7.5	Suspensões virais.....	46
3.7.5.1	Titulação das suspensões virais.....	46
3.7.5.2	Quantificação do conteúdo de glicoproteínas.....	46
3.7.5.3	Seleção e ultrafiltração das suspensões virais.....	47
3.7.6	Inativações.....	47
3.7.6.1	Bromo etilenoimina binária.....	47
3.7.6.2	Beta propiolactona.....	48
3.7.7	Testes de controle.....	48
3.7.7.1	Teste de inocuidade.....	49
3.7.7.1.1	Vírus residual.....	49
3.7.7.1.2	Toxicidade.....	49
3.7.7.2	Teste de esterilidade.....	49
3.7.7.3	Testes de potência.....	49
3.7.7.4	Teste de imunogenicidade.....	50

3.7.7.5 Teste de proteção.....	50
3.8 Avaliação estatística.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Teste de Habel.....	51
4.2 Teste NIH.....	53
4.3 Relação entre os resultados obtidos nos testes de Habel e NIH.....	56
4.4 Aplicação do ELISA indireto ao controle de vacinas anti-rábicas.....	59
4.4.1 Teste de Habel.....	59
4.4.2 ELISA indireto.....	60
4.4.3 Relação entre os testes de Habel e ELISA indireto.....	64
4.4.4 Determinação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos de resultados positivo e negativo para o ELISA indireto.....	67
4.4.5 Determinação da diluição de uso dos soros no ELISA indireto.....	68
4.5 Produção experimental da vacina de referência nacional.....	70
4.5.1 Cultura de células.....	70
4.5.1.1 Adaptação da amostra viral.....	70
4.5.1.2 Suspensões virais.....	71
4.5.1.3 Composição antigênica.....	74
4.5.1.4 Cinética de inativação viral.....	74
4.5.1.4.1 Inativação pelo bromo etilenoimina binária.....	74
4.5.1.4.2 Inativação pela betapropiolactona.....	76
4.5.1.4.3 Relação entre a inativação pela BEI e pela BPL.....	77
4.5.2 Testes de Controle.....	80
4.5.2.1 Teste de inocuidade.....	80
4.5.2.1.1 Vírus residual.....	80
4.5.2.1.2 Toxicidade.....	80
4.5.2.2 Teste de esterilidade.....	80
4.5.2.3 Testes de potência.....	80
4.5.2.3.1 Teste de Habel.....	80
4.5.2.3.2 Teste NIH.....	80
4.5.2.4 Teste de imunogenicidade.....	81
4.5.2.5 Teste de proteção.....	81
5 DISCUSSÃO.....	85
6 CONCLUSÕES.....	113
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
8 APÊNDICES.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Representação esquemática dos sete genotipos do gênero lissavirus, baseado na comparação de seqüências obtidas do gene da ribonucleoproteína (A). Genoma do vírus rábico, mostrando os genes que codificam as proteínas estruturais (B). Diagrama de um lissavirus típico, mostrando uma visão estilizada do genoma e dos antígenos virais.....	3
Figura 2: Distribuição de freqüência dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil. Normalidade segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (D).....	52
Figura 3: Distribuição de freqüência dos títulos obtidos pelo vírus CVS utilizado nos testes de Habel (recíproca da DL 50). Normalidade, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (D).....	52
Figura 4: Distribuição de freqüência dos resultados obtidos pela aplicação do teste NIH a 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil. Normalidade segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (D).....	54
Figura 5: Classificação das 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil, segundo os pontos de corte determinados para aprovação no teste NIH.....	54
Figura 6: Dispersão dos valores das doses letais 50% camundongo/0,03 mL (DL 50) do vírus CVS e dos valores de doses efetivas 50% (DE 50) da vacina de referência utilizada nos testes NIH.....	55
Figura 7: Distribuição dos valores transformados e corrigidos das doses letais 50% camundongo/0,003/mL (DL 50) do vírus padrão de prova (CVS) e das doses efetivas 50% (DE 50) da vacina de referência utilizada nos testes NIH.....	55
Figura 8: Relação entre os resultados obtidos nos testes de Habel e NIH, aplicados a 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil.....	57
Figura 9: Distribuição de freqüência dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil. Normalidade, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (D).....	60
Figura 10: Distribuição de freqüência dos valores de absorvância (Å) obtidos pela aplicação do ELISA indireto a soros de camundongos vacinados com 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil.....	62
Figura 11: Médias e limites de confiança de 99% de probabilidade ($m \pm 3s$, $s = \text{erro padrão da média}$) para a verdadeira absorvância dos soros de animais imunizados com vacinas reprovadas e aprovadas pelo teste de Habel.....	63

Figura 12:	Relação entre os resultados obtidos nos testes de Habel e ELISA indireto aplicados a 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil.....	65
Figura 13:	Comparação entre as médias dos valores das absorbâncias a 492 nm obtidos pela aplicação do ELISA indireto ao soro de camundongos não vacinados (SCNV) e ao soro controle positivo (SCP).....	69
Figura 14:	Razão entre os resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto ao soro controle positivo (SCP) e ao soro de camundongos não vacinados (SCNV).....	69
Figura 15:	Cinética de inativação obtida pelo uso da bromo etilenoimina binária (BEI), medida através da titulação em camundongos lactentes (expressa em DL 50%) e da quantificação do conteúdo de glicoproteína total (expressa em $\mu\text{g/mL}$), ressaltando os parâmetros de infectividade e degradação viral, respectivamente.....	75
Figura 16:	Cinética de inativação obtida pelo uso da betapropiolactona (BPL), medida através da titulação em camundongos lactentes (expressa em DL 50%) e da quantificação do conteúdo de glicoproteína total (expressa em $\mu\text{g/mL}$), ressaltando os parâmetros de infectividade e degradação viral, respectivamente.....	77
Figura 17:	Comparação entre a inativação pela bromo etilenoimna binária (BEI) e pela betapropiolactona (BPL), através da equação de regressão linear dos resultados obtidos pela titulação em camundongos lactentes (DL 50), expressa em porcentagem de redução da infectividade viral.....	78
Figura 18:	Comparação entre a inativação pela bromo etilenoimna binária (BEI) e pela betapropiolactona (BPL), através da equação de regressão linear dos resultados obtidos pela quantificação do cGT, expressa em $\mu\text{g/mL}$	79
Figura 19:	Resultados obtidos pela quantificação do conteúdo da glicoproteína total (cGT) e insolúvel (cGI), antes (ai) e depois (pi) da inativação pela bromo etilenoimina binária (BEI) e betapropiolactona (BPL).....	79
Figura 20:	Estimativa da probabilidade de proteção conferida pelas vacinas experimentais A_1 , A_2 , B_1 e B_2 , comparativamente à vacina de referência produzida pelo INPPAZ.....	83

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Distribuição de frequência absoluta e em porcentagem da associação do teste de Habel ($\geq 10^{4,0}$) com o NIH aplicados a 210 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas ⁽¹⁾ , com níveis mínimos de significância das comparações para $P_{RNAH} = P_{RHA}$	58
Tabela 2: Distribuição de frequência absoluta e em porcentagem (entre parênteses) da associação entre os valores de absorvâncias obtidos pela aplicação do ELISA indireto, segundo o valor do ponto de corte por diluição, a soros de animais imunizados com 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas testadas pelo teste de Habel (aprovação $\geq 10^{4,00}$).....	66
Tabela 3: Valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos de resultados positivo e negativo, expressos em porcentagem, para cada diluição dos soros no ELISA indireto, comparativamente ao teste de Habel.....	67
Tabela 4: Resultados obtidos pela quantificação do conteúdo de glicoproteína total, através do ELISA de imunocaptura, expressos em absorvância (Å) a 492 nm, nas suspensões virais, em 2 ^a , 3 ^a e 4 ^{as} (I e II) passagens, em células.....	71
Tabela 5: Resultados das titulações, em camundongos lactentes (CL) e camundongos adultos jovens (CAJ) e quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT) das suspensões virais (5 ^a passagem – 1 ^a e 2 ^a colheitas).....	73
Tabela 6: Resultados da quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT), através do ELISA de imunocaptura, expressos pela absorvância (Å) a 492 nm, das suspensões virais, em 5 ^a passagem (1 ^a e 2 ^a colheitas).....	73
Tabela 7: Resultados obtidos pela aplicação dos testes de Habel e NIH (média de duas observações) às amostras A ₁ , A ₂ , B ₁ e B ₂ , produzidas experimentalmente e do NIH da vacina de referência do INPPAZ (VRI).....	82
Tabela 8: Resultados do teste de imunogenicidade obtidos pela aplicação do ELISA indireto, na diluição 1/400, expresso pela absorvância (Å) a 492 nm, a soros de camundongos imunizados com as vacinas experimentais A ₁ , A ₂ , B ₁ e B ₂ e com a VRI.....	82

ÍNDICE DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE A: Metodologia aplicada na avaliação estatística do estudo comparativo entre testes de controle de qualidade de vacinas anti-rábicas e na produção experimental da vacina de referência nacional.....	125
APÊNDICE B: Estatística descritiva de resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 210 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas para uso animal, no Brasil.....	128
APÊNDICE C: Estatística descritiva de resultados obtidos pela aplicação do teste NIH a 210 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas para uso animal, no Brasil, considerando os parâmetros de aprovação do teste de Habel.....	128
APÊNDICE D: Estatística descritiva dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 70 partidas de diferentes vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil.....	129
APÊNDICE E: Estatística descritiva dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 70 partidas de diferentes vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil.....	129
APÊNDICE F: Estatística descritiva dos resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto (Å) a soros de camundongos vacinados com 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil, considerando o parâmetro de aprovação para o teste de Habel.....	130
APÊNDICE G: ANOVA para valores de absorbâncias obtidas pelo ELISA indireto a soros (diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800) de animais imunizados com 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas reprovadas e aprovadas pelo teste de Habel.....	131
APÊNDICE H: Estatística descritiva para os verdadeiros valores de absorbância em soros de animais vacinados com vacinas reprovadas e aprovadas pelo teste de Habel.....	131
APÊNDICE I: Estatística descritiva dos resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto, expresso em absorbância a 492 nm (Å), a soros de camundongos não vacinados e ao soro controle positivo.....	132
APÊNDICE J: Número de animais inoculados (nai), protegidos (nap), estimativa da probabilidade de proteção (epp) para a VRI, A ₁ , A ₂ , B ₁ e B ₂ nas diluições (1/5, 1/25, 1/125, 1/625 e 1/3125).....	133
APÊNDICE L: Valores estimados e seus desvios padrões, entre parênteses, dos parâmetros da equação $LD=a+b\log_{10}(\text{diluição})$ para a estimativa dos probitos, os valores do Qui-quadrado (χ^2_0) para o teste de bom ajustamento da curva normal de probabilidade acumulada com seus níveis de significância p, valores das LD50 e os limites fiduciais de 95% de confiança para o verdadeiro valor da LD50 para a VRI, A ₁ , A ₂ , B ₁ e B ₂	133

RESUMO

A eficiência das vacinas anti-rábicas inativadas comerciais de uso animal, no Brasil, são avaliadas pelo teste de Habel, considerando o índice $\geq 10^{4,0}/\text{DL } 50$ para aprovação oficial das partidas.

O objetivo do presente estudo é comparar os testes NIH (“National Institute of Health”) e o ELISA indireto com o teste de Habel e produzir experimentalmente a vacina de referência nacional (VRN), para uso no NIH.

Foram testadas 210 partidas de vacinas, paralelamente pelos testes de Habel e NIH. O teste de Habel aprovou 82,38% de partidas, enquanto o NIH, segundo os limites de 0,9; 0,97; 0,98; 1,0 e 1,1 aprovou, respectivamente, 77,62%; 75,71%; 75,23%; 73,81% e 71,90%. O valor discriminante encontrado para o NIH foi acima de 0,98, sugerindo o uso oficial de 1,0 UI.

O teste ELISA indireto foi aplicado a soros de camundongos imunizados com 70 partidas de vacinas, com diferentes índices no Habel. Os pontos de corte, a sensibilidade (S), a especificidade (E), os valores preditivos de resultados positivo (VPRP) e negativo (VPRN) e a razão entre o soro controle positivo e soro de camundongos não vacinados foram determinados, sendo então, recomendado o uso da diluição 1/400, que apresentou ponto de corte de 0,225; S=97%; E=100%; VPRP=100% e VPRN=78%, nesse método.

A vacina de referência nacional (VRN) foi produzida experimentalmente em células BHK-21, C 13, infectadas com o vírus Pasteur (PV). As suspensões virais (5ª BHK) apresentaram títulos $10^{7,66}/\text{DL } 50/\text{mL}$ em camundongos lactentes e $10^{7,17}/\text{DL } 50/\text{mL}$ em camundongos adultos jovens e 3,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de glicoproteína total. O material foi dividido em duas amostras (A e B) e inativado, respectivamente, pela bromo etilenoimina binária (BEI) e pela β -propiolactona (BPL). Para ambos os inativantes houve decréscimo rápido da infectividade e o conteúdo de glicoproteína (cG) total apresentou lenta redução da degradação viral. As amostras A (BEI-12 horas) e B (BPL-6 horas) apresentaram cG insolúvel de 1,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 2,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente e apresentaram resultados satisfatórios nos testes de inativação viral, toxicidade e esterilidade. Para o teste de potência A e B foram sub-divididas em A₁ e B₁ (5x concentradas) e A₂ e B₂ (10x concentradas), que apresentaram bom desempenho nos testes de controle de qualidade e foram capazes de estimular a resposta imune em camundongos, manifestada pela quantificação de anticorpos IgG e pela proteção ao desafio viral, sugerindo que a metodologia de produção foi adequada à obtenção de uma VRN, compatível com a Vacina de Referência Regional do INPPAZ, podendo ser ampliada para atender à demanda nacional, no NIH.

COMPARATIVE STUDY BETWEEN QUALITY CONTROL TESTS OF ANTI-RABIES INACTIVATED VACCINES FOR ANIMAL USE AND EXPERIMENTAL PRODUCTION OF THE NATIONAL REFERENCE VACCINE FOR NIH

ABSTRACT

The efficiency of anti-rabies inactivated vaccines that are commercialized for animal use, in Brazil, is evaluated by the Habel test, considering $\geq 10^{4.0}$ /DL 50 for official approval of the lots.

The goals of the present study is to compare the NIH ("National Institute of Health") and the indirect ELISA tests to the Habel test and produce the National Reference Vaccine (VRN) experimentally, to be used in the NIH.

Two hundred and ten lots of vaccine have been tested by the NIH test parallel to the Habel test. The NIH test, following the limits 0,9UI; 0,97UI; 0,98UI; 1,0UI and 1,1UI approved, respectively, 77,62%; 75,71%; 75,23%; 73,81%; 71,90%, while the Habel test approved 82,38% of the lots. The cut off value determined for the NIH was more than 0,98 UI so 1,0 UI is recommended as the official cut-off value.

The indirect ELISA was applied in seras of mice immunized with 70 lots of vaccines with varied results in the Habel. The cut off values, the sensibility (S), the specificity (E), the predictable values for positive (VPRP) and negative (VPRN) results and the ratio between positive standard sera and no vaccinated mice sera were determined, so it was decided to adopt in this method the dilution of 1/400 that presents cut-off value of 0,225; S=97%; E=100%; VPRP=100% and VPRN=78%.

The National Reference Vaccine (VRN) was produced in BHK cells, C 13, with the Pasteur virus (PV). The viral suspensions (5th BHK) had been titres of $10^{7.66}$ DL 50/mL in lactents mice and $10^{7.17}$ DL 50/mL in young adult mice and 3,10 $\mu\text{g/mL}$ of total rabies glycoproteins (G). The final volume was divided into samples A and B, that were inactivated, respectively, by binary ethyleneimine (BEI) and by β - propiolactone (BPL). For both inactivants there was a fast decrease of the infectivity and a slow decrease of viral degradation in G content. Sample A (BEI-12 hours) and B (BPL-6 hours) presented insoluble G=1,92 $\mu\text{g/mL}$ and 2,02 $\mu\text{g/mL}$, respectively, as the contents. Both presented satisfactory results in the viral inactivation, in toxicity and in sterility tests. For the potency test, samples A and B were sub-divided into A₁ and B₁ (5x concentrated) and into A₂ and B₂ (10x concentrated), that presented good response in quality control tests and were capable of inducing immune response in mice, mesured through IgG quantification and protection against the viral challenge, suggesting that the production methodology was adequate to the VRN obtention, compatible to the Regional Reference Vaccine -INPPAZ-, able to be amplified to supply the national request, in the NIH.

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa viral de evolução aguda, que se manifesta sob as formas paralítica e furiosa. É de distribuição cosmopolita, mundialmente endêmica. Atinge todas as espécies de mamíferos, inclusive o homem. A transmissão ocorre dos animais para o homem (antropozoonose). É uma doença conhecida e estudada desde a antigüidade. A sua descrição, em animais domésticos, foi atribuída a Demócrito (500 a.C.) e a Aristóteles (320 a.C.). Os povos do século I já conheciam a infecciosidade da saliva de cães raivosos, chamando esse material de “vírus”, que significa veneno, em latim (BAER *et al.*, 1985).

1.1 Agente etiológico

O agente viral pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. O vírus rábico possui um genoma contendo RNA de fita simples, não segmentado, com polaridade negativa complementar ao RNA mensageiro (BAER *et al.*, 1985). Através da caracterização genética de muitas regiões do vírus os genótipos foram divididos em genótipo 1, vírus rábico; 2, vírus isolados de morcegos da região de Lagos (LBV); 3, vírus Mokola (MOKV); 4, vírus Duvenhage (DUVV); 5, isolados de morcegos europeus (EBVL-1); 6, isolados de morcegos europeus (EBVL-2) e 7, lissavírus isolados de morcegos da Austrália (ABLV) (Fig. 1.A) (REGENMORTEL *et al.*, 2000 ed.; RUPPRECHT *et al.*, 2002).

O vírus da raiva é sensível a solventes lipídicos (detergentes, éter, clorofórmio, acetona etc), etanol a 45% – 70% °GL, preparações à base de iodo e compostos de amônia quaternária; apresenta resistência à dessecação e a repetidos congelamentos e descongelamentos; tem estabilidade relativa a pH entre 5 e 10, sensibilidade à pasteurização, luz ultravioleta e inativantes químicos (KAPLAN, 1996).

As partículas virais são cilíndricas, com um final cônico arredondado e outro plano convexo, com aspecto de projétil ou bala de revólver, diâmetro médio de 50 a 90 nm e comprimento aproximado de 130 a 300 nm. O vírus pode ser dividido em duas unidades estruturais: uma central e densa formada pelo ribonucleocapsídeo helicoidal (RNP) e uma fina camada circundante, recoberta por projeções na superfície, sob forma de espículas, no envelope. No interior do RNP localiza-se o genoma, constituído de uma molécula de RNA de aproximadamente 12 Kb, com uma seqüência “leader” de 50 nucleotídeos e cinco genes que

codificam as cinco proteínas estruturais (Fig. 1.B e C) (REGENMORTEL *et al.*, 2000 ed.; RUPPRECHT *et al.*, 2002).

As cinco proteínas do vírus da raiva são: RNA - polimerase (L), nucleoproteína (N), glicoproteína (G), fosfoproteína (P) e proteína matriz (M), sendo a estrutura viral determinada pela ordem e tamanho relativo dos genes no genoma (Fig. 1.B) (BAER *et al.*, 1985; TORDO 1996; REGENMORTEL *et al.*, 2000 ed.; RUPPRECHT *et al.*, 2002).

A proteína L é uma RNA polimerase, com peso molecular (PM) de 180 Kd, que apresenta de 20 a 150 moléculas por virion e fica localizada no ribonucleocapsídeo (TORDO, 1996). Entre as funções incluem a transcrição e a replicação da RNA-polimerase dependente, com associação do mRNA final 5', 3' poli A, e a atividade de proteinaquinase (REGENMORTEL *et al.*, 2000 ed.).

A nucleoproteína N é fosforilada, com PM de 57 Kd e contém 1.750 moléculas por virion. É a principal proteína da estrutura do vírus, e encontra-se associada ao genoma e à proteína L. Exerce a função de proteger o RNA, é importante na imunidade celular, por induzir um aumento significativo da resposta de células T auxiliares, na vacinação anti-rábica. Apresenta uma menor variabilidade antigênica, sendo a proteína mais conservada do vírus. Estimula a produção de anticorpos (Ac) detectáveis por fixação de complemento, imunofluorescência e precipitação, mas não apresenta atividade biológica (TORDO, 1996).

A glicoproteína (G) é a unidade antigênica básica das espículas do vírus, existe sob duas formas, a glicoproteína insolúvel (GI), com PM de 66 Kd, e a glicoproteína solúvel (GII), com PM de 56 Kd (SAKAMOTO *et al.*, 1999), num total de 1.800 moléculas, que formam aproximadamente 400 espículas triméricas arranjadas compactamente na superfície do vírus. Tem importante papel na patogênese da raiva, por ser a responsável pela adsorção vírus-célula e exerce um papel crucial na indução da resposta imune humoral, através da produção de anticorpos neutralizantes e na resposta imune celular, através da estimulação das células T auxiliares e T citotóxicas, sendo considerado o mais importante antígeno para a imunização (BOURHY *et al.*, 1990; TORDO, 1996).

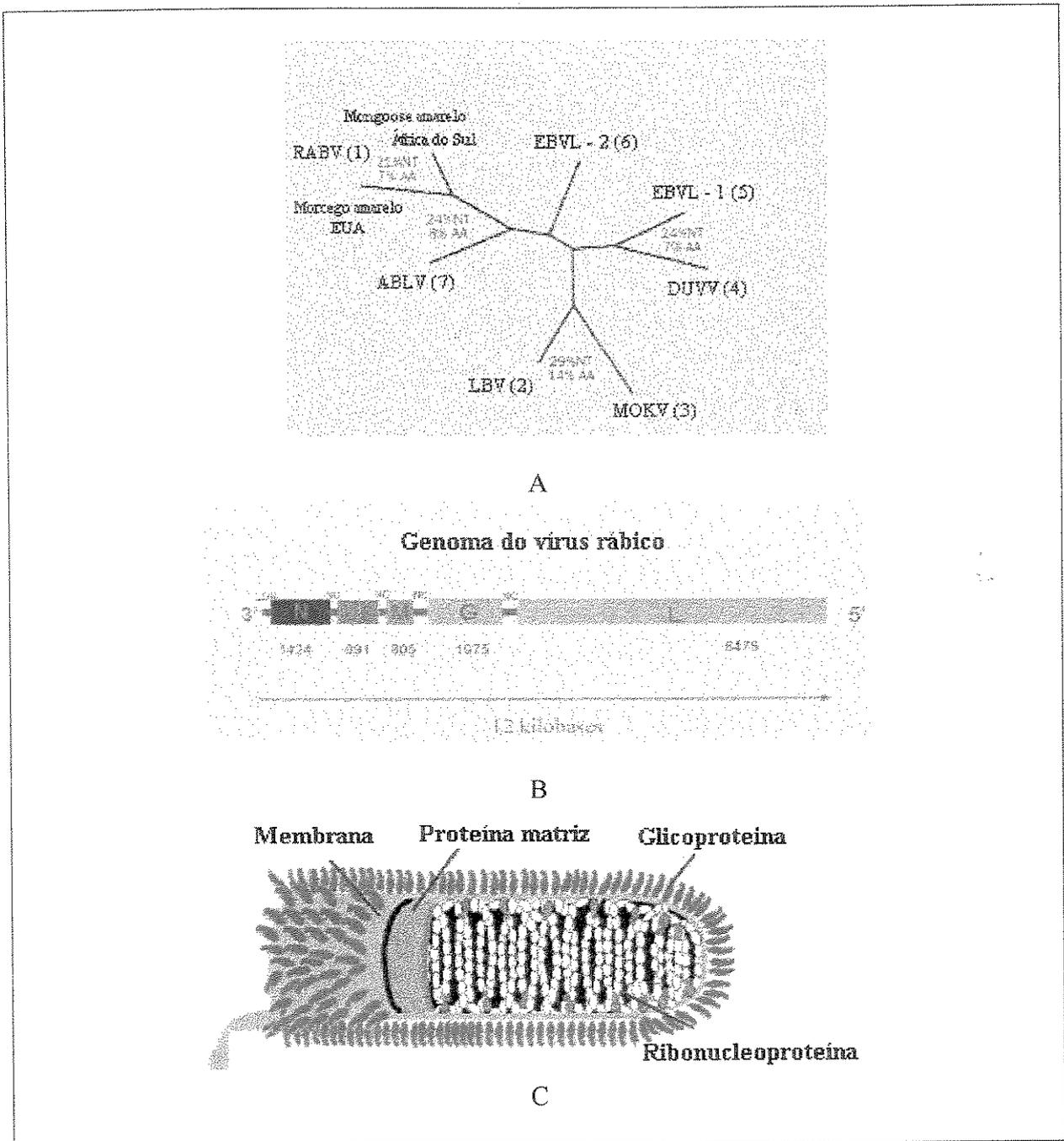


Figura 1: Representação esquemática dos sete genótipos do gênero lissavirus, baseado na comparação de seqüências obtidas do gene da ribonucleoproteína (A). Genoma do vírus rábico, mostrando os genes que codificam as proteínas estruturais (B). Diagrama de um lissavirus típico, mostrando uma visão estilizada do genoma e dos antígenos virais (C).

Fonte: (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies>). Acesso em 10 de setembro de 2002; (<http://infection.thelancet.com>). Acesso em 05 de outubro de 2002; RUPPRECHT *et al.*, 2002

A proteína P apresenta-se com diferentes extensões de fosforilação, peso molecular 41 e 38 nm e com 950 moléculas por virion. Faz parte do nucleocapsídeo viral, sendo requerida para transcrição, encontrando-se ligada à proteína L. Apresenta-se sob forma solúvel no citoplasma de células infectadas, podendo prevenir a agregação da proteína N, auxiliar a mesma na encapsidação do RNA e mostra capacidade de induzir resposta imune mediada por células (TORDO, 1996; REGENMORTEL *et al.*, 2000 ed.).

A proteína M (proteína matriz) apresenta duas conformações diferentes relativas ao número de pontes dissulfeto internas, a M I, com PM de 24 Kd, e a M II, com PM de 25 Kd. Está associada à proteína G, fazendo parte da estrutura externa do envelope viral, tendo por isso importância na indução da resposta imune, parecendo ter influência na morfogênese viral e sendo considerada a proteína central de ligação dos rabdovírus (TORDO, 1996; REGENMORTEL *et al.*, 2000 ed.).

1.2 Patogênese

A transmissão da raiva ocorre através da penetração do vírus presente na saliva do animal contaminado, durante a mordedura, arranhão ou ferimento. Muito menos freqüente do que a transmissão por mordedura, pode ser também pelo consumo de carcaças congeladas contaminadas (Região Ártica) ou pela inalação de aerossóis, em cavernas densamente povoadas por morcegos infectados (MURRAY *et al.*, 2000).

O neurotropismo é o principal fator associado com a infecção, porém não está totalmente esclarecido se o vírus penetra diretamente nos nervos periféricos, antes de migrar para o sistema nervoso central (SNC), ou se isto ocorre através de um mecanismo indireto, após replicação em tecidos fora do mesmo. Vários autores comprovaram que, no período anterior à invasão neural, o vírus se multiplica nos miócitos, no local da inoculação, persistindo 3 a 4 dias nas placas motrizes, antes de penetrar nas terminações nervosas periféricas, o que pode representar um passo de amplificação, aumentando a persistência do vírus e prolongando o período de incubação (ACHA, 1981; ATANASIU & SUREAU, 1987; MURRAY *et al.*, 2000).

A penetração do vírus através do sistema nervoso periférico (SNP) se dá pelo axoplasma, ao nível de receptores específicos, sendo sugerido, em particular, um co-receptor do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). Há indicações de que fosfolípidios,

gangliosídeos e resíduos de carboidratos sejam componentes de um complexo receptor. Estudos moleculares confirmam a similaridade estrutural entre um segmento da glicoproteína do vírus rábico e as neurotoxinas do veneno curare (α -bungarotoxina). No entanto, a capacidade de infectar terminações sensoriais e culturas de células, que não expressam o receptor de acetilcolina, indica que esse vírus pode usar outros receptores de superfície (ACHA, 1981; ATANASIU & SUREAU, 1987; MURRAY *et al.*, 2000). A penetração pode ocorrer tanto por adsorção, através de endocitose, como por fusão direta com a membrana celular. Em seqüência, partículas virais, com ou sem envoltório, têm sido visualizadas cerca de 5 minutos após a infecção, dentro de vesículas. Nos lisossomos, ocorre uma troca funcional (pH-dependente), seguida da liberação do nucleocapsídeo viral para o citoplasma, onde a replicação ocorre (ACHA, 1981; ATANASIU & SUREAU, 1987; MURRAY *et al.*, 2000).

Uma vez atingido o SNC, a replicação viral ocorre inicialmente nos neurônios e a propagação se dá através dos mesmos. O vírus ligado nas terminações neuronais, após o brotamento na membrana plasmática e inclusive na membrana pós-sináptica, é propagado, via transporte axonal retrógrado, através das fibras sensoriais e motoras para os dendritos e para as células do corpo do neurônio subsequente. Este tipo de transporte tem sido visto, predominantemente, nos estágios iniciais da infecção cerebral e permite que o vírus infecte todas as áreas do cérebro (ACHA, 1981).

Em adição ao movimento centrípeto por fluxo axoplásmico o vírus se move centrifugamente a quase todos os nervos do corpo. Essa disseminação viral segue a infecção do tecido periférico, como as fibras musculares, glândulas salivares, córnea, medula adrenal, glândula lacrimal, miocárdio, rins, pulmões, pâncreas e epiderme. A infecção das glândulas salivares, onde têm sido detectados títulos virais mais altos que no cérebro, é de importância fundamental porque favorece a transmissão da doença para muitas espécies animais. Na maioria dos casos, a eliminação de vírus pela saliva se inicia com a enfermidade, porém em muitas espécies se tem comprovado o aparecimento antes da manifestação dos sintomas clínicos, constituindo um importante fator de perpetuação do vírus na natureza (CECCALDI, *et al.*, 1993; ALAN, 2002).

Têm sido isolados vírus em diferentes órgãos e tecidos, tais como pulmões, glândulas supra-renais, gordura parda dos morcegos (glândula sub-escapular), rins, bexiga, ovários, testículos, glândulas sebáceas, células germinativas dos bulbos pilosos, córnea, papilas da

língua, parede intestinal e outros. Convém ter em conta que a distribuição do vírus não é uniforme, a frequência da infecção de diferentes órgãos é variável e a disseminação através do líquido cérebro-espinhal pode ocorrer, mas somente nos estágios finais da infecção (CECCALDI, *et al., et al.*, 1993; ALAN, 2002).

Geralmente não são observadas, através de microscopia comum, anomalias no cérebro, exceto uma variação do grau de edema cerebral (ACHA, 1981).

Constatou-se que muitos dos neurônios do cérebro são infectados, sendo encontrados antígenos virais em corpúsculos de Negri e fora deles. Na verdade, as alterações histopatológicas mais surpreendentes são sempre observadas no cordão espinhal, onde ocorre infiltração linfocitária, degeneração neuronal do corno de Amon, trompa e corneto anterior, proliferação de células microgliais, especialmente na forma paralítica da raiva. Lesões espongiiformes do SNC têm sido relatadas durante a infecção natural em animais, sendo estas sempre localizadas no núcleo talâmico e no envoltório interno do córtex cerebral (ALAN, 2002). A meningite também pode estar presente, em diferentes graus (ACHA, 1981; CECCALDI, *et al.*, 1993).

Os corpúsculos de Negri são formados por neurônios em degeneração, circundados por macrófagos e, ocasionalmente, por outras células inflamatórias. As estruturas internas desses corpúsculos têm sido atribuídas às organelas celulares e partículas virais, bem como aos ribossomos, visto que são prontamente corados por corantes basófilos. Esses corpúsculos têm sido observados na córnea e células ganglionares da retina, sendo sua presença demonstrada por imunofluorescência no córnea-teste (ATANASIU & SUREAU, 1987).

Em várias ocasiões pode-se comprovar uma viremia breve, fugaz e de baixo título, porém não tem sido possível demonstrar de forma eficiente a ocorrência de uma disseminação hematogêna do vírus, nem que a mesma exerça alguma função na patogenia da doença. O “estado de portador” em raiva pode ser considerado raro, de pouca importância na epidemiologia e um fenômeno que poderia não ser levado em consideração para as práticas de saúde pública (BERAN & CROWLEY, 1983).

Importantes aspectos ainda devem ser considerados na patogênese da raiva, que incluem: o papel do nucleocapsídeo como um superantígeno no homem e em camundongos; a indução de imunossupressão; o fenômeno da morte precoce e a imunopatogênese periférica, que é responsável pela paralisia dos membros posteriores. No entanto, é ainda difícil

correlacionar esses eventos com a disfunção neural e os sinais clínicos. Por outro lado, relatos recentes, que mencionam alterações na síntese de citocinas (IL-1), do fator de necrose tumoral (TNF- α) e nos ligantes de receptores de citocinas, oferecem novas perspectivas na infecção experimental, que evidenciam manifestações prejudiciais ao sistema imune e ao sistema nervoso (CECCALDI, *et al.*, 1993; MURRAY *et al.*, 2000).

1.3 Resposta imune

A resposta imune constitui uma das formas de controle da infecção pelo vírus rábico, envolvendo mecanismos imunes inespecíficos e específicos. A incapacidade de controlar a infecção viral pode resultar na morte do indivíduo infectado (JOFFRET *et al.*, 1991; MORGEAUX, 1992).

Como mecanismos imunes inespecíficos podem ser considerados: a fagocitose, a lise espontânea de partículas virais ou de células infectadas pelos vírus, através da ação de células do sistema mononuclear fagocítico, representadas, principalmente, pela ação citotóxica das células “natural killer” (NK) e das células “killer” (função não dependente de anticorpos); a ativação do sistema complemento (via alternativa); a indução de produção de interleucinas, dentre outros fatores. Estes mecanismos podem atuar de forma isolada ou sinergicamente com os componentes da resposta imune específica (SISSONS & OLDSTONE, 1980; BOURHY *et al.*, 1990; JOFFRET *et al.*, 1991; TIZAR, 2000).

A imunidade específica representada, principalmente, pelas respostas imune celular e humoral, é de grande importância no controle da infecção viral. Os vírus são complexas misturas antigênicas, cujo grau de complexidade é dado pelo número de proteínas que codificam. Pela sua estrutura, o vírus da raiva é fortemente imunogênico, em particular a glicoproteína G expressa na superfície das partículas virais, e de células infectadas, exerce importante papel na imunogenicidade, sendo a mais acessível estrutura alvo para o sistema imune (BOURHY *et al.*, 1990; TORDO, 1996).

A resposta imune humoral compreende a formação de imunoglobulinas ou anticorpos específicos (BOURHY *et al.*, 1990; TORDO, 1996).

As imunoglobulinas, capazes de neutralizar o vírus, são sintetizadas pelos linfócitos B, após a expansão clonal e diferenciação destes em plasmócitos, sendo produzidas, primariamente, as da classe IgM (detectáveis de 3 a 7 dias) e as IgG, entre os dias 8 a 16 pós-

vacinação. A glicoproteína G de superfície é capaz de induzir a síntese de anticorpos neutralizantes, que impedem a invasão do SNC pelo vírus, tendo em vista que, após a difusão no SNC, o vírus fica isolado do reconhecimento imune. Acredita-se que os anticorpos dirijam-se à superfície da glicoproteína, bloqueando as regiões da superfície viral necessárias para a ligação às células susceptíveis e, através do processo de neutralização, implementa a fagocitose, além de provocar possível lise direta das partículas virais, via ativação do complemento (SISSONS & OLDSTONE, 1980; MORGEAUX, 1992).

A ribonucleoproteína (RNP) também induz a produção de anticorpos, que podem contribuir na proteção contra a infecção, porém os mecanismos de inibição da replicação viral não são bem conhecidos (SISSONS & OLDSTONE, 1980; LODMELL *et al.*, 1993).

Após o processo de infecção, a resposta imune frente ao vírus rábico, em animais e no homem, é rara, sendo detectada apenas no ciclo final da doença. Geralmente a dose infectante é insuficiente para induzir uma resposta imune, podendo a amplificação viral nas células musculares ser adequada para infectar os nervos terminais, mas não o suficiente para ser imunogênica. Além disso, a disseminação e a replicação no tecido nervoso permitem que este agente escape e se refugie das células efectoras do sistema imune do hospedeiro (TURNER, 1985). Por isso, a recuperação da doença é extremamente rara no homem e em espécies selvagens, e ocasional em cães, cobaias e camundongos (SMITH, 1981). Os aspectos da resposta imune envolvidos na recuperação não foram, ainda, determinados, embora se saiba que são dependentes da resposta humoral, uma vez que, nestes casos, títulos altos de anticorpos são observados (TURNER, 1985; DELLEPIANE & DIAZ, 1986; KING & TURNER, 1993).

A resposta imune celular compreende, principalmente, o desencadeamento de linfócitos T auxiliares (LTh) e de linfócitos T citotóxicos (LTc). Os LTh (CD4+), que reconhecem o antígeno quando apresentado, após ligação e processamento pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente macrófagos, no contexto do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), classe II, exercem um papel importante na imunidade contra o vírus rábico. Uma das funções desses linfócitos é cooperar com os linfócitos B para a secreção de anticorpos. As células apresentadoras de antígeno secretam uma variedade de mediadores químicos solúveis (citocinas), sendo o principal fator a Interleucina 1 (IL-1), que envia um segundo sinal à célula T, ativada para proliferação e

ativação de outras células da resposta imune, dentre as quais os linfócitos B (BOURHY *et al.*, 1990; TORDO, 1996; LAFON, 2002).

Os linfócitos LTc (CD8+), após o reconhecimento de peptídeos do vírus, são expressos na superfície celular, em associação às moléculas da classe I, do MHC, e responsáveis pela eliminação das células infectadas, o mesmo não ocorrendo com o vírus livre (DOHERT, 1985). A resposta de LTc também é gerada em resposta à vacinação. Como para outros vírus, a imunidade anti-rábica tem encontrado várias respostas complexas dependentes notadamente da atividade das células T (JOFFRET *et al.*, 1991; MORGEAUX, 1992; LAFON, 2002).

A interleucina-2 (IL-2) e o interferon γ (IFN- γ), também com função de ativar macrófagos, LTc, células NK e outras células da resposta imune, são importantes para eliminação do vírus presente na superfície das células infectadas (JOFFRET *et al.*, 1991; MORGEAUX, 1992). Experimentos “*in vitro*” demonstraram, que o IFN- γ inibe a replicação do vírus, sendo também induzido “*in vivo*” por amostras de rua e por amostras fixas. Está presente mais abundantemente, imediatamente antes da morte, no tecido cerebral de animais experimentalmente infectados (KING & TURNER, 1993). SMITH (1981) verificou que títulos de IFN- γ corresponderam a títulos virais no cérebro, contribuindo para a sobrevivência do animal após a infecção rábica. Além disso, a habilidade que o IFN- γ apresenta de aumentar a atividade citotóxica de linfócitos poderá ser benéfica para o hospedeiro, auxiliando na eliminação do vírus do SNC, apesar de este poder surgir, para proteção, tardiamente na doença (KING & TURNER, 1993; LAFON, 2002).

1.4 Sintomatologia

A raiva pode se apresentar, em geral, de duas formas: raiva furiosa e parálitica ou muda, de acordo com a sintomatologia mostrada pelo indivíduo infectado (MURRAY *et al.*, 2000).

No homem, o período de incubação ocorre de 2 a 8 semanas, podendo variar de 10 dias até oito meses ou mais. O maior ou menor tempo de incubação depende da dose de vírus inoculada pela mordedura ou arranhadura, do local da mesma, da amostra viral e da gravidade da lesão. O período de incubação é mais longo quanto maior for a distância entre as lesões e o SNC (MURRAY *et al.*, 2000; RUPPRECHT *et al.*, 2002).

A enfermidade começa com uma sensação de angústia, cefaléia, pequena elevação da temperatura corpórea, mal estar e alterações sensoriais, geralmente no local da mordedura. Na fase seguinte, ocorre excitação, hiperestesia e uma extrema sensibilidade à luz e ao som, dilatação das pupilas e um aumento da salivação. À medida que a enfermidade progride, há espasmos nos músculos de deglutição e os líquidos são rejeitados violentamente por contrações musculares. Esta disfunção da deglutição se observa na maioria dos enfermos, muitos dos quais apresentam contrações espasmódicas laringofaríngeas à simples vista de um líquido, e se abstêm de deglutir sua própria saliva (hidrofobia). Também se podem observar espasmos dos músculos respiratórios e convulsões generalizadas. A fase de excitação pode ser predominante até a morte, ou substituída por uma fase de paralisia generalizada. A enfermidade dura, em média, de 2 a 6 dias, algumas vezes um período maior e, de modo quase invariável, termina com a morte (MURRAY *et al.*, 2000).

Nos cães e gatos, o período de incubação é, em geral, de 10 dias a 2 meses. Na fase prodrômica, estes animais manifestam alterações de comportamento, se escondem em locais escuros ou mostram uma agitação inusitada, dando voltas, intranqüilos (BRASIL, 2002b).

Na forma furiosa a excitabilidade reflexa está exaltada e o animal se sobressalta ao menor estímulo. Observa-se que ocorrem anorexia, irritação na região da mordedura, estimulação das vias genito-urinárias e um ligeiro aumento da temperatura corpórea. Depois de 1 a 3 dias, acentuam-se, de forma notória, os sintomas de excitação e agitação. O cão ou o gato se torna agressivo, com tendência a morder objetos, animais e o homem, inclusive o seu proprietário, e muitas vezes morde a si mesmo, provocando graves feridas. A salivação é abundante, já que o animal não deglute a saliva, devido à paralisia dos músculos da deglutição, havendo, nos cães, uma alteração do latido, pela paralisia parcial das cordas vocais, com um latido rouco e prolongado. Os cães raivosos têm propensão a abandonar suas casas e percorrer grandes distâncias, quando podem atacar outros animais. Na fase terminal da enfermidade, com frequência, podem ser observadas convulsões generalizadas, após as quais ocorrem incoordenação muscular e paralisia dos músculos do tronco e das extremidades, seguida de coma e morte (ATANASIU & SUREAU, 1987).

A forma muda ou parálitica caracteriza-se pelo predomínio de sintomas paralíticos, tanto que a fase de excitação é muito curta ou às vezes está ausente. A paralisia começa pelos músculos da cabeça e pescoço; o animal tem dificuldade na deglutição e inicialmente suspeita-

se que esteja engasgado e, quando o proprietário tenta socorrê-lo, expõe-se à infecção. Logo se manifesta a paralisia das extremidades, em seguida paralisia geral e morte. O curso da enfermidade pode durar de 1 a 11 dias (ATANASIU & SUREAU, 1987; RUPPRECHT *et al.*, 2002).

Nos herbívoros a raiva é transmitida principalmente por morcegos e o período de incubação é longo, com variações. Os sintomas predominantes são do tipo paralítico e, por isso, se denomina raiva bovina paralisante ou paralítica. Os animais afetados se afastam do grupo; alguns apresentam as pupilas dilatadas e o pêlo eriçado, outros apresentam sonolência e depressão. Observam-se movimentos anormais das extremidades posteriores, lacrimejamento e catarro nasal. Os acessos de fúria são raros, porém nota-se tremores musculares, inquietação, priapismo e hipersensibilidade no local da mordedura, de modo que os animais se roçam, podendo até provocar ulcerações. Ao evoluir a enfermidade, se observa incoordenação muscular e contrações tonicoclônicas na musculatura do pescoço, tronco e extremidades. Os animais têm dificuldade na deglutição e param de ruminar. Por último, caem e não conseguem mais se levantar, assim permanecendo até a morte. Os sinais de paralisia aparecem, em geral, entre o segundo e terceiro dias após o início dos sintomas. A duração da enfermidade atinge 2 a 5 dias, porém, em determinadas ocasiões, pode se estender a 8 - 10 dias (MURRAY *et al.*, 2000; RUPPRECHT *et al.*, 2002).

Os dados epizootiológicos, tais como a presença de morcegos hematófagos, achados de mordeduras provocadas por esses animais, a ocorrência de múltiplos casos, a predominância de manifestações paralíticas e, sobretudo, a ausência de raiva canina na região, induzem à suspeita de raiva transmitida por morcegos (KOTAIT *et al.*, 1998).

A raiva ocorre, também, naturalmente em muitas espécies de canídeos e de outros mamíferos silvestres. Com base em dados experimentais e epidemiológicos, as raposas, os coiotes, chacais e lobos são considerados os mais susceptíveis. Os morcegos apresentam um grau menor de susceptibilidade. O período de incubação é variável e raramente inferior a 10 dias ou superior a 6 meses. A sintomatologia clínica, em raposas e outras espécies silvestres, infectadas experimentalmente, é semelhante à dos cães. A maioria dos animais manifesta raiva do tipo furiosa, sendo que, alguns, no entanto, apresentam raiva muda. A duração da enfermidade é de 2 a 4 dias em raposas, e de 4 a 9 dias nas outras espécies silvestres. Nos morcegos, tanto hematófagos como não hematófagos, se observa a raiva paralítica, com

período de incubação muito variável, porém geralmente longo (BERAN & CROWLER, 1983).

1.5 Controle da doença

O Programa de Controle da Raiva, preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pela Organização Panamericana de Saúde (OPS) e pelo Ministério da Saúde do Brasil define a vacinação de cães e gatos, a apreensão de cães errantes, o atendimento de pessoas envolvidas em agravos com animais, a observação clínica de cães e gatos, o tratamento das pessoas expostas ao risco de infecção rábica, a vigilância epidemiológica, contemplando dentre outros tópicos a colheita e envio de material para exames laboratoriais, e o controle de áreas de foco de raiva e a educação em saúde, como atividades para o estabelecimento de um sistema eficiente de controle da raiva canina e humana, tendo em vista, que nos países em desenvolvimento, o cão é ainda o principal agressor e transmissor da doença aos seres humanos, sendo a avaliação da circulação do vírus na espécie canina um dos principais parâmetros para que a doença seja considerada controlada (BRASIL, 2002b).

Deve-se ressaltar que a vacinação é uma das principais ações de controle de raiva em áreas urbanas, quando aplicada em conjunto com as atividades estabelecidas para o sistema de controle da doença e é responsável pela diminuição do número de casos de raiva canina, felina e, conseqüentemente, da raiva humana (BRASIL, 2002b).

A profilaxia da raiva humana pode ser feita pré ou pós-exposição ao vírus. A profilaxia pré-exposição utiliza vacinas e é indicada para as pessoas que, devido à atividade profissional, correm o risco de exposição ao vírus. A profilaxia pós-exposição é indicada para as pessoas que acidentalmente se expuseram ao vírus: combina a limpeza criteriosa da lesão e a administração da vacina, isoladamente ou em associação com o soro ou a imunoglobulina humana anti-rábica. É o único meio disponível para evitar a morte do paciente infectado, desde que adequada e oportunamente aplicada (DREESEN, 1997; COSTA *et al.*, 2000).

A raiva dos animais de interesse econômico, ou simplesmente raiva rural ou dos herbívoros, vem aumentando desde a década de 80, na maioria dos estados brasileiros e nos países da América Latina, onde existe o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*). A raiva dos herbívoros é responsável por inúmeros prejuízos econômicos diretos na América Latina, da ordem de 30 milhões de dólares/ano, sendo que no Brasil este valor se aproxima de 15

milhões de dólares com a morte de cerca de 40.000 cabeças bovinas. As ações de controle para a raiva dos herbívoros, conforme preconizadas internacionalmente, compreendem vacinações dos susceptíveis e controle da população dos morcegos hematófagos, de forma contínua e sistemática (KOTAIT *et al.*, 1998).

1.6 Vacinas

A tentativa inicial de prevenção da raiva foi realizada por Pasteur, que produziu a primeira vacina contra a doença e realizou o primeiro tratamento, com sucesso, em 1885. Essa vacina foi preparada a partir da medula espinhal de coelhos adultos infectados com o vírus fixo, parcialmente inativada pelo fenol e emulsificada em glicerina. A indicação era de um esquema de 13 doses consecutivas, com a desvantagem de que apresentava vírus residual e causava seqüelas neurológicas (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955; DREESEN, 1997).

Essa preparação foi, posteriormente, inativada completamente pela associação de fenol e temperatura -método de Semple-, com a vantagem de ser segura quanto à inocuidade, mas mantendo as desvantagens de imunidade curta e a ocorrência de reações neurológicas (BLANCOU, 1986). Seguiram-se as vacinas preparadas em tecido nervoso de animais jovens de diferentes espécies, tais como: carneiros, bezerros e camundongos, sendo indicados, sempre, animais com menos de 9 dias de idade. A utilização de camundongos recém nascidos, com 1 ou 2 dias de idade, permitiu que se inoculasse uma menor quantidade de tecido cerebral e, desta forma, sem prejuízo da indução de imunidade. As vantagens eram a maior sensibilidade dos animais jovens ao vírus, diminuição das reações adversas e acidentes neuroparalíticos, devido à presença de menor quantidade de mielina, além de permitir uma diminuição na concentração da suspensão viral na relação volume/dose. Foram usadas várias amostras de vírus fixo e inativação com a luz ultravioleta (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955; BLANCOU, 1986; DIAZ *et al.*, 1996; DREESEN, 1997).

Foram introduzidas, então, as vacinas a vírus vivo modificado: Flury “low egg passage” (LEP), baixas passagens e, Flury “high egg passage” (HEP), altas passagens, ambas em ovo embrionado de galinhas; “Street Alabama Dufferin” (SAD); Kelev etc, que são apresentadas, geralmente, sob forma liofilizada. Estas apresentavam a vantagem de longa imunidade e tecnologia relativamente simples, porém não eram inócuas e tinham limitação de

uso a determinadas espécies animais, sendo termo-sensíveis (BLANCOU, 1986; DREESEN, 1997; KOTAIT *et al.*, 1998).

Com o advento das culturas de células animais, grandes foram os avanços tecnológicos nesta área (ESPESETH, 1996). Na década de 60, o Wistar Institute, na Filadelfia, desenvolveu a primeira vacina em cultura de células diplóides humanas (“Human diploid cell vaccine” - HDCV), que foi liberada para uso em 1976. A vacina era produzida com a amostra Pitman-Moore (PM), inativada e apresentada na forma liofilizada (BRANCHE, 1996; DREESEN, 1997). Poucas são as manifestações adversas, sendo a incidência de reações neurológicas baixa, não havendo relato de óbitos associados ao seu uso. O principal fator limitante para o uso dessa vacina, em larga escala, era o preço (DREESEN, 1997; COSTA *et al.*, 2000).

Células VERO utilizadas como substrato deram origem à vacina purificada, preparada também com a amostra PM inativada e concentrada por ultracentrifugação. Também a cultura de células de embrião de galinhas tem sido utilizada para a produção de vacina purificada (“Purified Chick-Embryo Cell Vaccine” – PCEV), preparada com a amostra Flury LEP-C25 e desenvolvida em fibroblastos de embrião de galinhas, sendo concentrada por ultracentrifugação. Estes dois tipos de vacina têm mostrado comportamento semelhante à HDCV, em especial no que diz respeito à resposta imune (eficácia) e a incidência de reações adversas (segurança e tolerabilidade) (BARTH & FRANKE, 1996a; DREESEN, 1997; MONTAGNON & FANGET, 1996; COSTA *et al.*, 2000).

Outros substratos celulares vêm sendo utilizados em diversos países do mundo. A vacina adsorvida, produzida em cultura de células diplóides de pulmão de feto de macaco “Rhesus” (“Rabies Vaccine Adsorbed” – RVA), vem sendo utilizada apenas nos Estados Unidos da América. É produzida com a amostra Kissling, concentrada e adsorvida com fosfato de alumínio (BARTH & FRANKE, 1996b). Na Rússia é produzida a vacina em cultivo primário de rim de hamster (“Primary Hamster Kidney Cell Vaccine” – HKCV), com a amostra Pequim, e largamente utilizada na Rússia e na China. Na Suíça é produzida a vacina purificada em ovos embrionados de patos - “Purified Duck-Embryo Vaccine” - (PDEV). É produzida com a amostra PM e também concentrada por ultracentrifugação. Causa maior incidência de eventos adversos, embora moderados, quando comparada com a HDCV (BARTH & FRANKE, 1996b; DREESEN, 1997).

A OMS (“World Health Organization” - WHO), em 1988, através de um levantamento (“World Rabies Survey”), que contou com a participação de 112 países, detectou que 32 países (28% dos participantes) produziam vacinas para uso humano. Dentre esses países, todos localizados na África e na Ásia, e 90% dos localizados na América Central e América do Sul relataram produzir vacinas a partir de tecido cerebral, tanto de mamíferos adultos, como de lactentes. As vacinas humanas preparadas a partir de tecido cerebral representavam 85% das doses produzidas ou importadas por aqueles países, enquanto no caso das vacinas de uso veterinário mais que 60% das doses utilizadas eram preparadas em cultivo celular. Foi observado que a China e a Rússia, desde 1980, já produziam vacinas em cultivo celular, ficando então demonstrado que em 1988, as vacinas de cultivo celular representavam 35% das doses de vacina, para uso humano distribuídas pelo mundo (MESLIN & KAPLAN, 1996).

O surgimento de problemas de segurança com as vacinas atenuadas levou ao desenvolvimento de vacinas inativadas, nos anos 70. Porém, não se obteve sucesso com o uso oral dessa vacina nos animais silvestres. Com os avanços na clonagem e expressão gênica surgiu uma nova geração de vacinas, utilizando os orthopoxvírus, tais como o vírus “vaccinia”. Esses vírus recombinantes (VRG) expressam o gene de glicoproteína do vírus rábico e não têm a capacidade de causar raiva. A vacina recombinante (VRG) quando administrada oralmente a animais de laboratório, induz rapidamente altos níveis de anticorpos neutralizantes e confere proteção contra o desafio com amostras de campo antigenicamente distintas. Subseqüentemente, foi demonstrado que carnívoros poderiam ser vacinados por via oral através do consumo de “iscas” contendo a vacina, que vêm sendo usada extensivamente para o controle da raiva no ambiente silvestre, mas outras vacinas recombinantes deverão entrar em teste nos próximos anos (MESLIN & KAPLAN, 1996; CPFA, 2002).

Até meados dos anos 60, o controle da raiva nas populações de animais silvestres era baseado na redução populacional através de armadilhas, caçadas, envenenamento por “iscas” contendo estriçnina, e utilização de substâncias anticoagulantes, no caso de morcegos (largamente utilizada em todo o mundo). Porém o alto custo e a ineficiência deste tipo de controle para os mamíferos terrestres fizeram com que a atenção fosse concentrada em encontrar: uma vacina oral efetiva, que não oferecesse risco para humanos e espécies não visadas; desenvolver uma “isca” adequada; encontrar a estratégia e tática certa para a distribuição das “iscas” e obter conhecimento suficiente do ecossistema dos vetores, para

determinar os parâmetros para a eliminação da raiva (MESLIN & KAPLAN, 1996; CPFA, 2002).

1.6.1 Amostras de vírus rábico utilizadas na produção de vacinas

As amostras fixas de vírus rábico utilizadas para a produção de vacinas são: a Paris Pasteur (isolada na França, de bovino, em 1882, submetida a 300 passagens em cérebro de coelhos e também adaptada a células VERO); PV (vírus fixo Pasteur, adaptado a cérebro de coelhos e a cultivos de rim de bovinos, rim de hamsters–BHK 21, C 13 e células VERO); PM (originária da PV, adaptada a cérebro de coelhos, células diplóides humanas, cultivo primário de rim de cães, células VERO e NIL-2); CVS (“Challenge Virus Standard”, originária da PV, adaptada a cérebro de camundongos, células BHK-21, embrião de galinhas e células relacionadas); Nishigara (originária da PV, Japão - 1915, adaptada a cérebro de coelhos e cérebro de cobaias lactentes); CVS-51 (isolada de um cão raivoso, no Chile, em 1943, adaptada a cérebro de camundongos); CVS-91 (isolada de humano, no Chile, em 1943, adaptada a cérebro de camundongos); Kelev (isolada de cão, em Israel, em 1950, e depois de 100 passagens em embrião de galinhas foi adaptada também a cérebro de camundongos); SAD (isolada de cão no Alabama, USA, em 1935, foi adaptada a cérebro de camundongos e células BHK-21); “Evelyn-Rokitniki-Abelseth” (ERA) (originária da amostra SAD, adaptada a células de rim de suínos e células BHK-21); Vnukovo-32 (originária da SAD, adaptada a células primárias de rim de hamster); Flury (isolada de humano, na Geórgia/USA, em 1939, adaptada a embrião de galinhas), sendo Flury “low egg passage” (LEP), com 40-50 passagens em embrião de galinhas, também adaptada a células primárias de embrião de galinhas e células BHK-21 e Flury “high egg passage” (HEP), com mais de 180 passagens em embrião de galinhas e também adaptada a células primárias de embrião de galinhas (SACRAMENTO *et al.*, 1992; DIAZ *et al.*, 1996; RECLARD, 1996).

1.6.2 Vacinas contra a raiva de uso humano

Todas as vacinas contra a raiva humana devem ser inativadas. A vacina utilizada de rotina nos programas de saúde pública no Brasil é a Vacina Fuenzalida & Palácios Modificada (FPM). É a única vacina anti-rábica para uso humano que se produz na América Latina (MESLIN & KAPLAN, 1996). É preparada em cérebro de camundongos recém-nascidos,

infectados com vírus fixo Pasteur (PV) ou CVS e deve conter cerca de 2% de tecido nervoso, sendo administrada por via intramuscular. Eventos adversos, temporalmente associados à vacina FPM, podem ocorrer durante a administração do esquema de prevenção ou após o seu término, sendo que a incidência dessas manifestações neurológicas, citada na literatura, é de 1 caso para 8.000 tratamentos (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955; BLANCOU, 1986; DREESEN, 1997).

Desde a década de 50, vários substratos têm sido utilizados para a replicação viral, resultando nas vacinas conhecidas: HDCV, VERO, PCEV e RVA. Atualmente, os países desenvolvidos utilizam apenas vacinas produzidas em linhagens celulares (DREESEN, 1997).

Todas as vacinas contra a raiva, de uso humano, são inativadas com a betapropiolactona e não podem apresentar vírus ativos (“vivos”) (BRANCHE, 1996; BARTH & FRANKE, 1996a e 1996b). A potência dessas vacinas, é avaliada pelo método NIH (“National Institute of Health” - USA), sendo a atividade antigênica da vacina, tipo FPM de, no mínimo, 1,0 Unidade Internacional (UI) por dose, enquanto as vacinas produzidas em cultivo celular devem apresentar uma potência mínima requerida de 2,5 UI por dose. A dose destas vacinas depende do laboratório produtor. Em geral, a dose indicada para esquemas de pré ou pós-exposição, para uso pela via intramuscular, é 0,5 mL (PVCV) ou 1,0 mL (HDCV, PCEV, PDEV). Quando utilizadas em esquema de pré-exposição, as vacinas HDCV, PVCV e PCEV (mas não a PDEV) também podem ser administradas pela via intradérmica, na dose de 0,1 mL (COSTA *et al.*, 2000). Todas estas vacinas devem ser conservadas permanentemente sob refrigeração, entre 2°C e 8°C (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955; BRANCHE, 1996; BARTH & FRANKE, 1996a e 1996b).

No Brasil, as vacinas produzidas em cultura de células ou em embrião de pato estão disponíveis na rede pública de saúde, em Centros de Imunobiológicos Especiais, para pacientes imuno-deprimidos e para os que apresentam eventos adversos graves à vacina FPM (COSTA *et al.*, 2000) e no Estado de São Paulo encontra-se disponível, nos postos de saúde, a vacina preparada em cultura de células para todos os pacientes.

1.6.3 Vacinas contra a raiva de uso veterinário

No Brasil, a imunização de animais pode ser feita, ainda, através de dois tipos de vacinas: as inativadas (produzidas em cérebro de camundongos e/ou em cultivos celulares) e

as de vírus vivo modificado ou atenuadas. As vacinas produzidas em tecido cerebral são chamadas vacinas de primeira geração e, as produzidas em cultivos celulares, vacinas de segunda geração. Existem ainda, em outros países, as vacinas recombinantes, principalmente indicadas para a imunização por via oral de espécies silvestres (WHO, 1992, CORTES *et al.*, 1993; KOTAIT *et al.*, 1998).

Uma variedade de vacinas de uso veterinário tem sido usada no Brasil nos últimos 30 anos para o controle da raiva, incluindo Formidogel, Flury LEP, Flury HEP, FPM e mais recentemente a vacina produzida em cultura de células (CORTES *et al.*, 1993; KOTAIT *et al.*, 1998).

As vacinas produzidas em tecido cerebral são usadas, principalmente, na América Latina, no Caribe e na África do Norte, em programas de controle da raiva canina (DIAZ *et al.*, 1996; WHO, 1992; MESLIN & KAPLAN, 1996). No Brasil, a vacinação contra a raiva canina, realizada por órgãos públicos, utiliza a vacina do tipo FPM (REICHMANN *et al.*, 1999). Esta vacina tem a vantagem de conferir boa imunidade e apresentar inocuidade em animais experimentais e na rotina de vacinação. É uma das vacinas mais imunogênicas e seguras e tem permitido o controle da raiva nos países sul-americanos que a têm utilizado sistematicamente em programas bem delineados e executados (VAZ, 1999). Porém, se forem realizadas inoculações múltiplas ainda podem ocorrer, embora raramente, reações neuroalérgicas (BLANCOU, 1986).

Há uma tendência crescente de substituição do substrato usado em vacinas caninas, até pouco tempo constituído predominantemente por tecido cerebral de camundongos, para cultivos celulares. A primeira preparação, em células BHK, no Brasil, foi investigada por FENJE, em 1960 (*apud* CORTES *et al.*, 1993), sendo que a primeira produção comercial em larga escala, data de 1978, cujo processo de produção foi descrito por GUIDOLIN *et al.* (1983), citados por CORTES *et al.*, (1993). Esta e outras vacinas similares, produzidas em culturas de células, são agora extensivamente usadas.

As vacinas comerciais produzidas atualmente são todas preparadas em culturas celulares, tanto as atenuadas, que são apresentadas sob forma liofilizada, como as inativadas, que contêm adjuvantes (KOTAIT *et al.*, 1998). É importante destacar que as vacinas preparadas em cultivo celular são superiores às demais, principalmente em relação à inocuidade e estabilidade (BLANCOU, 1986), embora tenham sido consideradas por

GERMANO *et al.* (1990) como de tecnologia mais dispendiosa, inviabilizando o seu uso em massa nos países do terceiro mundo.

As vacinas atenuadas rotineiramente usadas no nosso país são derivadas das amostras Flury (produzidas em embrião de galinhas), ERA e SAD (em células de rim de suínos). No entanto, vacinas de ambos os tipos, são preparadas em outros sistemas celulares, em geral, originárias de células caninas, bovinas e outras linhagens (CORTES *et al.*, 1993), dentre elas as células NIL-2 (rim de hamster recém-nascido), acrescidas ou não de adjuvantes (GERMANO *et al.*, 1990; CORTES *et al.*, 1993; KOTAIT *et al.*, 1998). Na América do Sul, LARGHI *et al.* (1976) mostraram que vacinas experimentalmente produzidas em células BHK-21, C 13, inativadas com bromo etilenoimina binária (BEI) e contendo o hidróxido de alumínio como adjuvante, são imunógenos potentes e capazes de conferir imunidade persistente em bovinos. A introdução dessas vacinas no Brasil é relativamente recente. RIBEIRO NETO *et al.* (1973) testaram uma vacina importada produzida em culturas de células, e observaram uma imunidade comparável à das atenuadas, amostra ERA, também importada e significativamente melhor que as nacionais produzidas, até então, em tecido cerebral (*apud* CORTES *et al.*, 1993).

1.6.3.1 Vacinas a vírus vivo modificado ou atenuadas

Os requerimentos para produção de vacinas vivas de uso veterinário são, em geral, consideravelmente menos exigentes do que aqueles das vacinas inativadas. As técnicas de produção são simples e os volumes de células e de cultivos virais muito menores. No entanto, apresentam muitas desvantagens, dentre as quais o fato de amostras vivas possuírem patogenicidade residual, que varia de acordo com a espécie animal, com a via e a dose de inoculação. Esta patogenicidade residual tem sido demonstrada estar associada às vacinas preparadas com as amostras Flury LEP, ERA e SAD. Vacinas atenuadas são estáveis somente sob condições estritas de estocagem e devem ser usadas somente quando liofilizadas (RECLARD, 1996).

As vacinas atenuadas, para serem utilizadas, devem: não produzir enfermidade ao serem inoculadas nas condições sob às quais se pratica a vacinação; multiplicar-se no organismo em grau adequado para determinar o estado de imunidade e manter essas características através das passagens por meio das quais são mantidas (FUENZALIDA &

PALACIOS, 1955). O risco do uso sistemático em todas as espécies animais, que inclusive é dependente da idade do animal, é demasiadamente importante na recomendação do seu emprego (BLANCOU, 1986; KOTAIT *et al.*, 1998). Esse tipo de vacina está historicamente associado à indução de resposta rápida e elevada e ainda à persistência de imunidade. Se consideradas, as dificuldades de armazenamento, existentes em um país tropical, a possibilidade de reversão do vírus atenuado e o despreparo dos vacinadores, entende-se que as citadas vantagens, não são obtidas com freqüência. O mecanismo de ação baseia-se na replicação viral em progressão geométrica, que estimula o sistema imunológico com proporcional produção de anticorpos (KOTAIT *et al.*, 1998; VAZ, 1999).

Recentemente, por questões de segurança biológica, tem havido uma tendência de uso preferencial de vacinas inativadas, que atualmente contêm massa antigênica capaz de conferir elevado poder imunogênico, em especial pela adição de adjuvantes (GERMANO *et al.*, 1990; CORTES *et al.*, 1993). De modo geral, a substituição das vacinas anti-rábicas atenuadas pelas inativadas contribui, de forma significativa, para a diminuição de acidentes pós-vacinais, causados pelos vírus atenuados (GERMANO *et al.*, 1990). São freqüentes os acidentes com vacinadores, o que requer, nestes casos, tratamento anti-rábico completo (soro-vacinação). A vacina atenuada foi praticamente abandonada nos países desenvolvidos, e seu uso proibido. No Brasil, atualmente, apenas os estados das regiões Norte, Nordeste e parte do Centro-Oeste utilizam, principalmente, vacinas atenuadas e, os estados das regiões Sudeste, Sul e parte do Centro-Oeste, vacinas inativadas (KOTAIT *et al.*, 1998).

No Brasil, há de cerca de 9 produtos comerciais disponíveis no mercado. É interessante notar que não existem vacinas atenuadas importadas, sendo todas de procedência nacional preparadas em linhagens celulares, que na grande maioria são originárias de células de rim de suínos, infectadas principalmente com as amostras ERA ou SAD e apresentadas sob forma liofilizada.

1.6.3.2 Vacinas inativadas

As vacinas comerciais inativadas produzidas atualmente, no Brasil, são todas preparadas em culturas celulares e com adjuvante. Isto faz com que a resposta imunológica seja quantitativamente e qualitativamente equiparada à das vacinas atenuadas, quando conservadas em condições ideais. Alguns autores, embora considerando que as vacinas

inativadas não mostram as vantagens das atenuadas, quanto à rapidez da resposta imune, ressaltam as vantagens de serem inócuas e termoestáveis (KOTAIT *et al.*, 1998; VAZ, 1999).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa (IN) nº 005 (2002) autoriza, a partir de setembro de 2002, apenas o uso de vacinas inativadas (BRASIL, 2002a). As vacinas inativadas preparadas em cultivos celulares conferem boa imunidade, são inócuas e se mantêm estáveis a temperatura ambiente. Exigem, porém tecnologia mais avançada para a sua produção, sendo que apresentam a vantagem de indução de imunidade semelhante à induzida pelas vacinas atenuadas (BLANCOU, 1986).

Dentre as vacinas inativadas em uso no Brasil, existem cerca de 20 diferentes produtos comerciais disponíveis, de procedência nacional e importada, sendo apenas um produzido em cérebro de camundongos. Os demais são preparados em cultivos celulares, sendo a grande maioria nas células BHK-21, C 13, infectadas com as amostras PV, ERA, SAD e Flury.

GERMANO *et al.* (1990), estudando a eficácia de proteção das vacinas anti-rábicas inativadas, produzidas em células BHK-21, C 13, infectadas com vírus PV, observaram que as mesmas, com e sem hidróxido de alumínio, quando aplicadas em múltiplas doses, apresentaram o mais elevado grau de eficácia contra as variantes selváticas, observando-se variabilidade de comportamento apenas sobre as variantes de laboratório DR-19 e CVS. Estes autores verificaram ainda que, em doses únicas, as vacinas com adjuvante foram ligeiramente superiores às sem adjuvante, com maior variabilidade nos graus de proteção comparativamente aos resultados obtidos com o uso de doses múltiplas.

A resposta imune induzida por vacinas anti-rábicas inativadas, de uso comercial, produzidas em células BHK, com PV, contendo como adjuvante hidróxido de alumínio ou em combinação com avridine (amino lipóide sintético), foi manifestada por uma alta produção de anticorpos e proteção contra desafio em bovinos (CORTES *et al.*, 1993). Esses autores demonstraram que, na primo-vacinação, a adição de avridine aumenta a resposta imune em termos do nível e persistência de anticorpos. Mostraram também que 12 meses após a revacinação, tanto com vacinas contendo avridine ou hidróxido de alumínio, acima de 90% dos bovinos vacinados estavam protegidos contra o desafio experimental e que a vacina inativada estudada foi capaz de manter os títulos acima dos níveis de proteção por mais de dois anos. Deste modo, durante a aplicação desta vacina no campo, no Brasil e na Venezuela, não houve notificação de acidentes vacinais, em animais, que pudessem ser atribuídos a essa

vacina inativada (CORTES *et al.*, 1993). Resultados semelhantes foram observados por LARGHI & NEBEL (1980), na Argentina, usando vacina anti-rábica produzida em células BHK.

1.6.3.3 Inativantes

A inativação do vírus da raiva foi inicialmente realizada, no Brasil, pelo uso de fenol e formaldeído (CUNHA, 1947). O fenol e o formaldeído não são agentes inativantes satisfatórios porque atuam sobre todas as proteínas, inclusive sobre a glicoproteína do envelope, reduzindo a antigenicidade do vírus e também liberando resíduos tóxicos ou irritantes. A luz ultravioleta, também indicada para a inativação desse vírus, apresenta a limitação de exigir equipamento apropriado, tornando-se por isso de alto custo e de difícil manutenção (LARGHI *et al.*, 1976).

Mais recentemente, vários métodos e diferentes substâncias químicas têm sido usadas como inativantes na produção de vacinas. Atualmente são utilizados os de primeira ordem, entre os quais, a β propiolactona (BPL) (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955; SILVA & CUNHA, 1973; BLANCOU, 1986; MORGEAUX, 1992; COSTA *et al.*, 2000); a Acetil etilenoimina (AEI) e a etilenoimina (EI); as Bromo etilenoamina (BEA) e imina binária (BEI); outras iminas (CORTES *et al.*, 1993; VAZ, 1999) e a radiação ultravioleta (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955).

1.6.3.3.1 Beta propiolactona

O inativante mais amplamente utilizado na inativação do vírus rábico é a betapropiolactona (BPL), geralmente numa diluição em torno de 1:3.500 e em meio alcalino, conforme indicação do fabricante (B-PRONE – Grand Laboratories Inc[®]). Muitos métodos que combinam a ação do calor e da BPL são empregados para assegurar a completa inativação do vírus e a total hidrólise do agente inativante (MORGEAUX, 1992; RECLARD, 1996). A BPL é uma lactona tumorígena, que possui propriedades viricida e bactericida, sem afetar significativamente a antigenicidade desse vírus. Ela pode se decompor rapidamente em um produto não tóxico, o ácido propiônico, catalizável pelo organismo dos mamíferos. A BPL é um reagente alquilante e acidulante muito reativo em meio aquoso. Reage com os grupamentos carboxilas, hidroxilas, tióis e aminas presentes nos centros nucleofílicos dos

ácidos nucleicos e proteínas (MORGEAUX, 1992; RECLARD, 1996). A BPL reage com grupos SH e SS, afetando mais freqüentemente a metionina e resíduos de cisteína (PERRIN *et al.*, 1990).

1.6.3.3.2 Acetil etilenoimina

Com relação aos outros inativantes de primeira ordem, a Acetil etilenoimina (AEI), a Etilenoimina (EI), as bromo EA e EI e outras iminas são também empregados para a inativação do vírus da raiva (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955; LARGHI, *et al.*, 1976; CORTES *et al.*, 1993). Dos muitos inativantes testados nos últimos anos, apenas os componentes “aziridinas”, principalmente a N-AEI e o derivado EI são agora usados extensivamente na produção de vacinas (BAHNEMANN *et al.*, 1974). A AEI é um inativante mais seguro que o formaldeído, visto que o seu mecanismo de ação no processo de inativação gera uma reação de primeira ordem, mas tem a desvantagem de ser instável à temperatura ambiente. O seu derivado EI apresentou inativação semelhante à apresentada pela AEI, em trabalhos com vírus de febre aftosa, e mostrou ser estável à temperatura ambiente; mas, como as muitas “aziridinas”, é altamente tóxico e requer cuidados especiais no manuseio. Esta característica da EI e de outras “aziridinas” faz de sua aplicação, e do seu uso em larga escala na produção de vacinas, um procedimento potencialmente perigoso e alguns poucos acidentes têm ocorrido com o uso da AEI (BAHNEMANN *et al.*, 1974; BAHNEMANN, 1975).

1.6.3.3.3 Bromo etilenoimina binária

A bromo etilenoimina binária (BEI) é preparada através da ciclização de 2-bromo etilenoamina (BEA) hidrobromide (HBr) ou 2- cloroethylenoamina hydrochloride, sob condições alcalinas, pela manutenção de 0,1 M de BEA em 0,2 N de NaOH, por uma hora a 37°C, em banho maria. Desta forma, é promovida a redução da toxicidade da EI preparada, sob forma diluída, de 2-bromo etilamina em solução alcalina, reduzindo consideravelmente o risco potencial associado com o uso da EI pura e das outras “aziridinas” e também o perigo no manuseio rotineiro do inativante. BAHNEMANN *et al.* (1974), em trabalhos com o vírus da febre aftosa, observaram que a BEI é fácil de preparar e a preparação é consideravelmente menos tóxica que a N-acetiletileno imina (AEI). Esses autores concluíram que esta característica facilita a aplicação na produção industrial de vacinas e faz dessa preparação um

inativante indicado também para trabalhos com o vírus da raiva (LARGHI *et al.*, 1976; CORTES *et al.*, 1993). Estudos de inativação com o vírus da febre aftosa por BEI mostraram que a substância formada é igualmente útil como inativante, comportando-se da mesma forma que a EI pura (BAHNEMANN *et al.*, 1974; BAHNEMANN, 1975; LARGHI *et al.*, 1976).

1.6.3.4 Adjuvantes

Todas as vacinas contra a raiva inativadas, produzidas em cultivo celular, contêm adjuvantes. Os adjuvantes mais freqüentemente utilizados em vacinas contra a raiva são o hidróxido de alumínio, a saponina e o avridine, sozinhos ou associados ao hidróxido de alumínio e, em menor escala, os oleosos (CORTES *et al.*, 1993; KOTAIT *et al.*, 1998; VAZ, 1999). Adjuvantes são substâncias não específicas, não imunógenas, que quando adicionadas ou emulsificadas a um antígeno favorecem e potencializam a resposta imune específica a esse antígeno, sem contudo, colaborar diretamente na especificidade da resposta imune (BIER *et al.*, 1982; TIZAR, 2000).

O mecanismo de ação dos adjuvantes não está totalmente esclarecido, vários autores admitem que exercem os efeitos de aumentar a persistência do antígeno, pela retenção prolongada do mesmo no organismo –ação de depósito-, aumentam o sinal co-estimulatório, induzem a formação de granuloma, facilitam a captação de antígenos pelos macrófagos e estimulam a proliferação de linfócitos inespecíficos, dentre outras (BIER *et al.*, 1982; TIZAR, 2000). Esta ação pode ser exercida sobre o antígeno e/ou sobre o sistema imunológico. Sobre o antígeno, a ação pode ser de proteção do mesmo pelo sistema imunitário, modificação ao conjugar-se a ele para estimular uma maior resposta específica, pela denaturação parcial do antígeno pode torná-lo heterogêneo e insolúvel, diminuindo a sua destruição. Sobre o sistema imunológico, promovem ativação de macrófagos e do sistema complemento, combinam-se com as proteínas do soro, tornando-se insolúveis e atuando na ativação de linfócitos T e B.

Os adjuvantes podem apresentar-se sob forma de adjuvantes inertes (suspensões ou géis minerais) e adjuvantes dinâmicos, extratos solúveis de microrganismos associados ou não aos adjuvantes oleosos (BIER *et al.*, 1982; TIZAR, 2000).

1.6.3.4.1 Hidróxido de alumínio

O hidróxido de alumínio é produzido a partir de uma solução de sulfato de alumínio tratada com uma solução de sulfato de amônia. Foi usado pela primeira vez na década de 30, com toxina diftérica, sendo depois indicado, como referência mundial, na Dinamarca (SMITH, 1981). A ação do hidróxido de alumínio se dá pela deposição do antígeno no local de aplicação, formando um granuloma para onde migram os elementos celulares. Ocorre a liberação lenta do antígeno, tornando o contato com os elementos do sistema imune constante e prolongado. Atualmente sabe-se que o hidróxido de alumínio atua na ativação do sistema complemento, na ativação de macrófagos e também na migração através do sistema linfático, em especial, quando associado à saponina, que apresenta eluição lenta, ativando fortemente todos os elementos do sistema imune (BIER *et al.*, 1982; TIZAR, 2000).

1.6.3.4.2 Saponina

A saponina é um produto químico complexo de extração vegetal (Quillaia Saponina Molina), podendo ser utilizada como detergente, provocando diminuição da tensão superficial. Foi usada pela primeira vez em vacinas contra o carbúnculo. Quando associada ao hidróxido de alumínio forma reações que são mais duradouras e apresentam ação prolongada, constituindo-se uma excelente combinação. Como em outros adjuvantes, admite-se, na saponina, a existência de um complexo glico-viral. A atuação da saponina é basicamente a nível celular, centraliza-se no colesterol da membrana do linfócito, tornando-o impermeável e induzindo a resposta imune contra si e contra o antígeno ao qual estiver adsorvido (DANIEL ABARACON, informação pessoal, maio de 1982). Foi demonstrado por PETERMANN *et al.* (1970), que a saponina injetada separadamente ou incorporada à vacina anti-rábica inativada, preparada em cultivos celulares, contendo ou não hidróxido de alumínio, potencializou consideravelmente a atividade imunológica, em bovinos.

1.6.3.4.3 Adjuvantes oleosos

Os adjuvantes oleosos protegem o vírus e o apresenta ao sistema imunitário de forma a ser reconhecido pelo mesmo. Atuam sob três mecanismos básicos de ação, conforme citados anteriormente: depósito (tornando a eluição lenta), atração pelos elementos de defesa (formação de granuloma) e migração pela via linfática. Apresentam as vantagens de não

induzir uma resposta imune contra si próprios, protegem o antígeno, estimulam o sistema imunológico, mas provocam forte reação local. Nesta categoria incluem-se os adjuvantes de Freund, que são constituídos basicamente de uma mistura de óleo mineral e de um agente emulsificante, desta forma chamado “adjuvante incompleto de Freund” e, quando acrescidos de micobactérias, inativadas pelo calor, passam a ser denominados de “adjuvante completo de Freund” (BIER *et al.*, 1982; TIZAR, 2000).

1.6.3.4.4 Outros adjuvantes

Vários outros adjuvantes vêm sendo utilizados nas preparações de vacinas anti-rábicas. FLORENCE *et al.* (2000), avaliando a efetividade de glicopeptídeos polares - componentes da parede celular do *Mycobacterium chelonae* (pGL-Mc) - demonstraram que a vacinação de camundongos com vacina inativada comercial, de uso humano, resultou na indução de interleucina – 1 (IL-1), interleucina –2 (IL-2) e ação do fator de necrose tumoral (TNF α) na estimulação de células T e de células capazes de induzir a produção de interferon – IFN α , β e γ , IL-3, IL-4 e IL-6. Demonstraram ainda altos níveis de anticorpos e resistência de camundongos ao desafio com amostras de vírus fixo e com amostras de vírus de rua, por duas vias de inoculação. Estes autores sugerem que, tendo em vista a simplicidade do procedimento de produção e o baixo custo do produto, a pGL-Mc poderá vir a ser um potencial adjuvante para as vacinas de uso veterinário, inclusive aquelas preparadas em tecido cerebral. O pGL-Mc ativa os três estágios da reação imune (fagocitose, imunidade mediada por células e resposta imune humoral).

1.7 Controle de vacinas anti-rábicas inativadas

Uma vacina que apresente pureza, segurança, potência e eficácia e que seja fácil de administrar e econômica é essencial para a manutenção da saúde animal e o sucesso operacional de um programa sanitário. A imunização de animais, com vacinas de alta qualidade, é sem dúvida um fator primário de controle de algumas doenças animais, sendo empregada em conjunto com outras medidas sanitárias nos programas de controle e erradicação das doenças. Os procedimentos de controle a serem adotados obedecem a padrões internacionais, para assegurar a uniformidade e consistência dos produtos (ESPESETH, 1996; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1999). Os critérios adotados no Brasil, para atender a essas

exigências obedecem a normas estabelecidas, que compreendem a realização dos testes de esterilidade, inocuidade (representada pelos testes de vírus residual e toxicidade) e testes de potência (BRASIL, 1988).

1.7.1 Controle de esterilidade ou pureza

O controle de esterilidade ou pureza visa detectar contaminações por agentes estranhos, principalmente os microbianos, não devendo ser observado crescimento bacteriano ou fúngico durante o teste do produto final (BRASIL, 1988). O efetivo controle de esterilidade deve basear-se, principalmente, na aplicação de técnicas e procedimentos corretos de produção, sendo indicado não apenas o controle do produto final, que é de extrema importância, mas a observação dos preceitos de boas práticas de produção, que devem ser seguidos rigorosamente a fim de serem obtidas vacinas seguras e também potentes (GUPTA, 1997).

1.7.2 Controle de inocuidade ou segurança

Os testes de inocuidade ou de segurança, em vacinas anti-rábicas, são realizados para detectar materiais ou propriedades que possam ser prejudiciais ao receptor, como as contaminações por agentes estranhos, toxicidade ou inativação incompleta do vírus (SIZARET, 1996). O uso de antígenos bem caracterizados e controlados, métodos consistentes de produção, equipamentos validados e a documentação e fiscalização dos procedimentos utilizados na fabricação da vacina também são importantes para que se evite o comprometimento da inocuidade do produto (GUPTA, 1997; VAZ, 1999).

1.7.3 Controle de eficiência ou potência

A necessidade de avaliação da potência imunizante de cada lote final das vacinas anti-rábicas, para liberação, foi reconhecida desde a época de Pasteur (SIZARET, 1996). A avaliação de potência das vacinas inativadas tem, há muito, sido motivo de pesquisas, experimentos, publicações e discussões. É difícil encontrar um método único, através do qual todos os parâmetros necessários para os diferentes tipos de vacinas anti-rábicas inativadas possam ser satisfatoriamente medidos. São indicados os testes “in vivo” e os “in vitro”, que medem a antigenicidade (BARTH *et al.*, 1988). O Comitê de Especialistas da OMS

recomenda o teste NIH e a vírus-neutralização (VN), após vacinação, para a avaliação da potência dessas vacinas (JOFFRET *et al.*, 1991).

1.7.3.1 Testes “in vivo” aplicáveis à avaliação da potência de vacinas anti-rábicas inativadas

Os testes “in vivo” mais conhecidos são o teste de Habel, o NIH e testes com desafio periférico (SIZARET, 1996).

1.7.3.1.1 Teste de Habel

As tentativas de desenvolvimento de testes para avaliar a eficiência das vacinas anti-rábicas tiveram início com a descoberta da própria vacinação. A necessidade de um teste quantitativo prático, para aferição das vacinas, levou os pesquisadores a executar testes em animais, sendo então verificado que o camundongo se prestava admiravelmente ao estudo da raiva, quer pela sensibilidade ao vírus, quer pelo seu comportamento regular, utilizando-se então estes animais para testes de verificação do valor imunizante das vacinas comerciais em uso nos EUA. Foram então, estabelecidos testes usando a via intracerebral (i.c.) para inoculação do vírus, que trouxeram uma apreciável melhora na qualidade das vacinas em uso, e possibilitaram estudar os vários fatores que influíam na sua produção e, ao mesmo tempo, assegurar ao público consumidor o emprego de um produto de eficiência comprovada (CUNHA, 1947; BAER, 1985).

O teste de Habel foi estabelecido em 1940, e é do tipo de ruptura de imunidade, no qual todos os animais recebem a mesma dose de vacina e doses variadas do vírus-desafio, apresentando boa reprodutibilidade, sendo, portanto confiável (HABEL, 1976; BAER, 1985; DIAZ *et al.*, 1989).

No Brasil, o teste de Habel foi executado primeiro por CUNHA (1947), que empregou camundongos para sua execução e sugeriu o seu uso para controle de cada partida fabricada, antes que fosse colocada no mercado, depois por SILVA & CUNHA (1973), que além de camundongos usaram também cobaias, CUNHA *et al.* (1977), CORTES *et al.* (1993), VAZ (1999) entre outros pesquisadores. É ainda, o teste indicado para a avaliação oficial das vacinas anti-rábicas inativadas destinadas ao uso animal, no nosso país (BRASIL, 1988).

1.7.3.1.2 Teste NIH

O NIH, desenvolvido posteriormente pelo “National Institute of Health”, em 1953, tem sido o método mais amplamente usado e internacionalmente recomendado. É o teste “in vivo”, em uso, que em condições ótimas está mais padronizado e uniforme e apresenta resultados altamente comparáveis (HABEL, 1976). Foi adotado pelo Comitê de Especialistas em Raiva da OMS e é agora parte de muitas exigências nacionais e internacionais para o controle de qualidade de vacinas anti-rábicas inativadas. Tem sido executado sem adequações ou alterações desde a sua introdução (HABEL, 1976; BARTH *et al.*, 1988; WILBUR & AUBERT, 1996).

O referido teste é, basicamente, um método de extinção de antígeno, no qual, os animais recebem 2 doses de diferentes diluições da vacina frente a uma dose fixa do vírus-desafio, calculada previamente. A amostra fixa padrão de prova – CVS - é a indicada para o desafio. A inclusão de uma vacina de referência nacional, padronizada frente a uma de referência internacional – “International Standard for Rabies Vaccine”, em paralelo com as vacinas a serem testadas, em cada série de testes, é essencial para permitir a expressão dos resultados em Unidades Internacionais (UI). A proteção é medida pela diferença na mortalidade de camundongos vacinados com a vacina teste e de camundongos vacinados com a vacina de referência (WUNDERLI *et al.*, 1991). A dose efetiva 50% (DE 50) da vacina em teste é calculada e comparada com a DE 50 da preparação de referência (HABEL, 1976; BARTH *et al.*, 1988; WILBUR & AUBERT, 1996).

Mais recentemente, testes envolvendo vacinação pela via intramuscular (i.m.) e desafio viral periférico vêm sendo desenvolvidos, considerando que o desafio, por essa via, é o que mais se aproxima da condição de exposição natural, quando comparado ao desafio i.c. O autor admite que o mesmo pode vir, no futuro, a substituir o NIH. No entanto, esses testes apresentaram desvantagens. Vários experimentos, em camundongos e outras espécies animais, com vacinas recombinantes expressando nucleoproteína de vírus rábico não confere proteção ao desafio i.c., mas induzem proteção contra desafio periférico. O NIH, executado com desafio i.c. não fornece uma medida de proteção conferida pela RNP contida no virion completo presente na vacina (SIZARET, 1996). BAER (1997) avaliou a imunidade induzida pelas vacinas inativadas para herbívoros domésticos, através do NIH convencional e do teste

desenvolvido pelo “Centers for Disease Control” (CDC), empregando vacinação e desafio i.m. com CVS e 5 amostras de vírus de rua, simulando, assim, o desafio mais próximo da transmissão natural, principalmente a exercida pelos morcegos. A potência relativa foi mais alta no NIH do que no teste indicado pelo CDC, resultando em uma potência mais alta das vacinas produzidas com a amostra homóloga e mais baixos com as outras amostras.

1.7.3.2 Testes “in vitro” aplicáveis à avaliação da potência de vacinas anti-rábicas inativadas

A substituição dos testes de potência “in vivo” pelos métodos “in vitro” é uma discussão atual na literatura científica e também pelos grupos de Especialistas da OMS. De acordo com a recomendação desses grupos a substituição parcial do teste de potência “in vivo” por teste de antigenicidade “in vitro” é permitida, não aceita ainda internacionalmente, porém métodos alternativos vêm sendo realizados para avaliar a qualidade das vacinas inativadas (ROOIJAKKERS *et al.*, 1996a; PIZA *et al.*, 2002). Durante a última década, considerável experiência tem sido adquirida na avaliação de potência de diferentes tipos de vacinas inativadas por testes “in vitro”, que podem medir a antigenicidade e a imunogenicidade das mesmas (BARTH *et al.*, 1988; PERRIN *et al.*, 1990; ELMGREN & WANDELER, 1996).

A antigenicidade das vacinas anti-rábicas pode ser avaliada pela titulação da glicoproteína, considerando que a mesma é o principal antígeno do vírus, responsável pela indução de anticorpos (Ac) neutralizantes e provedor da proteção contra o desafio i.c. (PERRIN *et al.*, 1990; ELMGREN & WANDELER, 1996). A imunogenicidade dessas vacinas pode ser testada através de ensaios proliferativos e de testes sorológicos (ZALAN *et al.*, 1979; JOFFRET *et al.*, 1991). Os métodos “in vitro” são, predominantemente, testes para determinação do conteúdo antigênico das vacinas. Dentre eles estão o teste de imunodifusão radial simples - IDRS (FERGUSON, 1996), o teste de redução de placas (AKRO, 1976), o teste de anticorpos ligantes modificado (BARTH, 1996), o ensaio de proliferação de linfócitos (JOFFRET *et al.*, 1991), a vírus-neutralização e vários sistemas de ensaio imunoenzimático – ELISA (PERRIN *et al.*, 1990; ELMGREN & WANDELER, 1996; SIZARET, 1996).

1.7.3.2.1 Teste de imunodifusão radial simples

A imunodifusão radial simples (IDRS) foi aplicada ao controle de vacinas a partir de 1982. O teste se baseia na quantificação das glicoproteínas, por comparação da sua reação com soro anti-glicoproteína específico em um sistema de IDRS, paralelamente com uma preparação de referência. As amostras são tratadas com detergente para liberar o antígeno – glicoproteína - das partículas virais e, distribuídas, em diluições seriadas, dentro de cavidades em gel de agarose. A glicoproteína solubilizada difunde-se radialmente e reage com o anticorpo anti-glicoproteína incorporado no gel, produzindo uma zona de precipitação. A área da zona de difusão tem demonstrado ser proporcional à quantidade de glicoproteína presente na vacina (FERGUSON, 1996). A aplicação do método foi sugerida apenas para vacinas anti-rábicas inativadas preparadas em cultura de células, considerando que as derivadas de tecido cerebral e preparações em que o vírus é adsorvido a adjuvantes são inadequadas para teste por esse método (BARTH *et al.*, 1988; FERGUSON, 1996). A IDRS é rápida e apresenta capacidade de estimar o conteúdo de glicoproteína de forma altamente reproduzível, sem a necessidade de uso de vírus infeccioso, tendo sido considerada por PERRIN *et al.* (1990) como mais difícil de ser executada e menos sensível que o ELISA.

1.7.3.2.2 Teste de redução de placas

AKRO *et al.* (1976) relataram a determinação da antigenicidade de vacinas anti-rábicas inativadas, preparadas em tecido cerebral, em células de embrião de galinhas ou em culturas de células, através da medida de sua capacidade de combinar-se com anticorpos “*in vitro*”. Os anticorpos anti-rábicos de um soro padronizado se adsorvem ao conteúdo antigênico de uma vacina, em diluições seriadas. Os anticorpos não adsorvidos podem ser detectados, “*in vivo*”, através de uma prova de vírus-neutralização em camundongos, ou “*in vitro*”, pela prova de redução de placas. Com este método descrito pelos autores, o tempo necessário para determinar os valores de potência dessas vacinas se reduz de 28 dias (tempo necessário para a execução dos testes de Habel e NIH) para 14 dias, quando a prova é feita por inoculação em camundongos, ou para 5 a 6 dias, pela aplicação da técnica de redução de placas (AKRO *et al.*, 1976).

1.7.3.2.3 Teste de anticorpos ligantes

O teste de anticorpos ligantes (ABT), desenvolvido por AKRO *et al.*, (1976), e subsequenteiramente modificado (ABTM) por BARTH (1996), envolve a diluição da vacina e incubação com o soro, seguido de coloração por fluorescência. Os resultados são interpretados de modo que a diluição 50% do teste e da vacina de referência seja a mais alta diluição do antígeno, na qual 50% das cavidades contenham um ou mais focos fluorescentes. O conteúdo de glicoproteína da vacina, em teste, expresso em UI/mL, pode então, ser calculado pela comparação com os valores observados para a vacina de referência. O ABTM vem sendo empregado rotineiramente no acompanhamento do processo de produção de vacinas anti-rábicas, testando o vírus coletado durante as distintas etapas de produção e no lote de vacina final, em paralelo com o NIH, bem como, para avaliar a estabilidade da vacina a diferentes temperaturas. Apresenta maior reprodutibilidade e menor variabilidade que o NIH. O uso de uma técnica “in vitro”, como o teste ABTM, no controle do processo de produção e avaliação da potência das vacinas anti-rábicas poderá reduzir a necessidade do teste em animais, desde que este seja validado adequadamente, atendendo às exigências da OMS (BARTH *et al.*, 1988; BARTH, 1996).

1.7.3.2.4 Ensaios proliferativos

A imunogenicidade das vacinas anti-rábicas tem sido testada, também, através de ensaios proliferativos, em camundongos e no homem. Assim, a proliferação de células B e/ou células T, tanto quanto CD4+ e CD8-, poderia ser avaliada (MELINO *et al.* (1989) *apud* JOFFRET *et al.*, 1991) através de experimentos de medida de IL-2, nos quais os autores observaram que não somente a produção de IL-2 refletiu na atividade das células CD4+ CD8-, mas também na atividade potencial de células carregando receptores de IL2. Conseqüentemente, em adição à determinação de conteúdo de glicoproteínas e determinação do nível de anticorpos neutralizantes, a medida da IL-2 poderia ser favoravelmente considerada para a avaliação da potência das vacinas anti-rábicas, em substituição ao teste NIH (JOFFRET *et al.*, 1991).

1.7.3.2.5 Vírus neutralização

Os métodos de detecção de anticorpos também podem ser utilizados para a avaliação da qualidade das vacinas anti-rábicas. Desde a adaptação do teste de soroneutralização, em camundongos (WEBSTER & DAWSON, 1935), para detectar anticorpos em resposta à vacinação têm sido empregados muitos métodos. Estes métodos incluem, principalmente, a imunofluorescência, em impressão de cérebros de camundongos infectados (GOLDWASSER & KIESLING, 1958); a hemoadsorção mista (ESPMARK, 1967); a hemoaglutinação passiva (GOLGH & DIERKS, 1971); a imunofluorescência, em cultura de tecidos (DEBBIE *et al.*, 1972); o radioensaio (WIKTOR *et al.*, 1972); o teste rápido de inibição de focos fluorescentes (SMITH & BAER, 1973); o teste de anticorpo fluorescente antígeno solúvel (GARNHAM *et al.*, 1977) e o ensaio imunoenzimático, desenvolvido por ATANASIU, em 1977 (*apud* ZALAN *et al.*, 1979).

O teste de inibição rápida de focos fluorescentes (IRFF) detecta exclusivamente anticorpos neutralizantes e protetores e, apresenta alta correlação com a neutralização em camundongos, sendo por isso, aceito e escolhido para a detecção de anticorpos anti-rábicos em soros humanos e de animais (ZALAN *et al.*, 1979). Posteriormente, os mesmos autores descreveram uma técnica para a quantificação de anticorpos neutralizantes anti-rábicos, baseada no princípio da IRFF, que combina a vantagem desse teste com a praticidade da microtécnica (IFM). Os resultados reportados indicaram que o IFM é um método simples, comparável e reproduzível. Além disso, foi demonstrado que a resposta de anticorpos à glicoproteína do vírus da raiva, medida pela neutralização, correlaciona bem com os resultados observados no teste NIH (ZALAN *et al.*, 1979; WUNDERLI *et al.*, 1991).

No Brasil, em 1993, foi desenvolvido por FAVORETTO *et al.*, no Instituto Pasteur de São Paulo, um micro-teste de inibição de fluorescência simplificado, que desde então, vem sendo utilizado para avaliação sorológica.

1.7.3.2.6 Ensaio imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é amplamente utilizado em estudos com vírus, tanto para a detecção de anticorpos (Ac) como para a avaliação antigênica. As técnicas usualmente empregadas, em ambos os casos, são custosas, consomem muito tempo e, às vezes, não detectam anticorpos na fase inicial da resposta imune. A introdução desse ensaio

oferece alternativas para o diagnóstico da doença, bem como para o controle de vacinas anti-rábicas (ATANASIU *et al.*, 1978; ELMGREN & WANDELER, 1996).

1.7.3.2.6.1 Aplicação do ELISA à quantificação de anticorpos anti-rábicos

As técnicas mais comumente usadas para detecção e quantificação de anticorpos anti-rábicos são a soroneutralização em camundongos (SN) e o teste rápido de inibição de focos fluorescentes (IRFF), que são os métodos preconizados pela OMS (ATANASIU *et al.*, 1978; CLIQUET *et al.*, 2000). O ELISA foi adaptado para a detecção de anticorpos anti-rábicos primeiro por ATANASIU *et al.*, em 1978, seguido por vários autores (NICHOLSON & PRESTAGE, 1982; KAVAKLOVA *et al.*, 1984; PERRIN *et al.*, 1986; MEBATSION *et al.*, 1989; ELMGREN & WANDELER, 1996; PIZA, 1997; CLIQUET *et al.*, 2000). A introdução do ELISA para a avaliação de anticorpos anti-rábicos permitiu aos autores detectar, alguns dias mais cedo, anticorpos em soros de pacientes com a infecção, que não tinham recebido tratamento profilático e nem tinham mostrado anticorpos neutralizantes, até muitos dias após o aparecimento dos sintomas. Subseqüentemente, o mesmo teste foi aplicado para a detecção de ambas as classes de imunoglobulinas (IgM ou IgG), usando uma IgG anti-humana marcada com peroxidase (ATANASIU *et al.*, 1978).

NICHOLSON & PRESTAGE (1982) desenvolveram um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos da classe IgG, em soros de pessoas imunizadas com a vacina HDCV. O objetivo foi avaliar a sensibilidade e a especificidade do ELISA para o diagnóstico da raiva e comparar os resultados obtidos com aqueles observados pela neutralização.

Um ensaio imunoenzimático duplo para detecção de anticorpos anti-rábicos foi elaborado por KAVAKLOVA *et al.* (1984). O referido ensaio imunoenzimático provou ser específico, foi mais rápido e consumiu menos tempo para obtenção dos resultados. Esses autores evidenciaram que o ELISA é uma técnica sensível e acurada para a quantificação desses anticorpos em soros de voluntários humanos imunizados, correlacionando bem com a SN.

PERRIN *et al.*, (1986), para estudar a influência do tipo de imunoabsorvente e as vantagens da aplicação da glicoproteína purificada, executaram comparativamente os testes ELISA e a SN para a titulação de anticorpos anti-rábicos, em soros de camundongos e de pessoas imunizadas com vacinas de cultivo celular e de tecido neural. O teste foi executado

em placas sensibilizadas com vírus completo, glicoproteínas purificadas ou nucleocapsídeo purificado. Os títulos neutralizantes foram determinados pelo teste IRFF e pela SN, incluindo uma rápida avaliação enzimática de antígenos intracelulares.

MEBATION *et al.* (1989) desenvolveram um teste para detecção de IgG contra o vírus rábico, em soros humanos e de diferentes espécies de carnívoros, visando descrever o uso da proteína A de estafilococo marcada com enzima, no ELISA, para avaliação sorológica e cálculo de sensibilidade e concordância comparativamente à soro-neutralização. Desta forma, foi possível quantificar anticorpos nessas espécies, sendo por isso considerado pelos autores altamente conveniente para os laboratórios de diagnóstico de raiva, particularmente nos países em desenvolvimento.

Considerando a simplicidade, a facilidade e a rapidez de execução do método, ELMGREN & WANDELER (1996) desenvolveram o ELISA – competitivo (C-ELISA) para a detecção de anticorpos contra o vírus da raiva. Esses autores ressaltaram que o uso de antígeno purificado aliado ao uso dos anticorpos monoclonais neutralizantes (AcMN) conjugados a enzima, promove uma condição ideal para a avaliar a soroconversão contra antígenos rábicos.

No Brasil, o método imunoenzimático foi adaptado para quantificar anticorpos anti-rábicos em soros de pessoas previamente imunizadas, utilizando como antígeno partículas purificadas e inativadas e, como conjugado, proteína A marcada com a peroxidase. Foram testados soros de pessoas imunizadas com as vacinas HDCV e FPM. Segundo os autores, o ELISA desenvolvido pode ser utilizado como prova de apoio à rotina laboratorial, independentemente da vacina anti-rábica utilizada na imunização (PIZA *et al.*, 1999). Quando empregaram esse método, para a avaliação de resposta imune humoral, em bovinos imunizados, com vacinas inativadas e atenuadas, SILVA *et al.* (2000) não detectaram quantidades de anticorpos neutralizantes abaixo do nível de anticorpos totais (IgG) induzidos pela vacina atenuada, em comparação com o título observado no teste de neutralização.

O ELISA foi também aplicado para a quantificação de anticorpos em soros de raposas do campo, usando microplacas prontamente sensibilizadas com glicoproteínas do vírus rábico. O teste mostrou ter equivalente capacidade de detectar anticorpos em amostras provenientes de raposas vacinadas com o duplo mutante SAG2 da amostra SAD ou com a glicoproteína recombinante ao vírus vaccinia (VRG). Forte correlação foi demonstrada entre os títulos obtidos pelo ELISA ou pela SN e a proteção contra o desafio de raposas vacinadas com

“iscas” SAG2, por via oral. Este método foi proposto para levantamentos soro/epidemiológicos em acompanhamento às campanhas de vacinação via oral, podendo ainda ser recomendado para o controle de rotina laboratorial na avaliação de anticorpos anti-rábicos (CLIQUET *et al.*, 2000).

1.7.3.2.6.2 Aplicação do ELISA à quantificação da glicoproteína do vírus rábico

A quantificação do conteúdo de glicoproteína do vírus rábico, “in vitro”, tem sido proposta por vários autores (PERRIN *et al.*, 1990; ROOIJAKKERS *et al.*, 1996a, 1996b; THARENHART, 1996; PIZA *et al.*, 2002).

O conteúdo de glicoproteína de vacinas anti-rábicas produzidas em cultivo celular foi primeiro avaliado através do ensaio imunoenzimático não competitivo (Essen-ELISA) proposto por THARENHART & RAMAKRISHNAN (1989). Posteriormente esse método foi indicado para a avaliação de potência das vacinas produzidas em cultivo celular inativadas de diferentes tipos, de vacinas com adjuvantes, para o acompanhamento do processo de produção e para testar a estabilidade de vacinas a diferentes temperaturas. O método é altamente específico e mostrou boa correlação com os resultados do teste NIH, podendo, também, ser utilizado para estimar o conteúdo antigênico do nucleocapsídeo contido em vacinas contra a raiva (*apud* THARENHART, 1996).

PERRIN *et al.* (1990) estudaram o ELISA de imunocaptura (IC) e o ELISA com cobertura da placa direto com o antígeno a ser testado (EC), usando anticorpos neutralizantes policlonais (AcP) e monoclonais (AcM). A medida do conteúdo de glicoproteína através do método IC, tanto pelo uso dos AcM como dos AcP, associada à determinação da razão entre AcP/AcM, têm fornecido informações adicionais no acompanhamento e no monitoramento do processo de produção de vacinas. Na opinião desses autores, o método IC, baseado no uso do AcM anti-glicoproteína, pareceu ser um conveniente instrumento para determinação da potência “in vitro” das vacinas anti-rábicas e dos produtos correspondentes às diferentes etapas de produção (PERRIN *et al.*, 1996).

Estudos focalizando o uso de AcM baseado num sistema ELISA ligante competitivo para a detecção quantitativa de glicoproteína e nucleoproteína do vírus de raiva, em vacinas para uso humano e uso veterinário, foram desenvolvidos por ROOIJAKKERS *et al.* (1996b). Esses mesmos autores tinham demonstrado, anteriormente, a aplicabilidade desta técnica a

vacinas preparadas com diferentes amostras de vírus, bem como a antigenicidade observada frente a um painel de vacinas anti-rábicas produzidas em cultura de células caninas, que mostraram correlação com os resultados obtidos através do teste de potência NIH (ROOIJAKKERS *et al.*, 1996a).

No Brasil, o ELISA de imunocaptura foi aplicado para avaliar o efeito do conteúdo e forma de apresentação da glicoproteína do vírus rábico, na avaliação da potência de vacinas (PIZA *et al.*, 2002).

Considerando a necessidade de utilização de vacinas de elevada qualidade imunogênica na profilaxia da raiva, e diante das limitações apresentadas pelo teste de potência em uso na rotina do controle oficial de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no nosso país, aliado ao fato da inexistência de vacina de referência nacional para a execução do teste NIH e na busca de alternativas para implementação de melhorias no controle de qualidade dessas vacinas, o presente estudo tem os seguintes objetivos:

2. OBJETIVOS

2.1 - Estabelecer comparação entre os resultados do teste Habel e do NIH, aplicados ao controle de eficiência das vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil;

2.2 - Determinar o valor discriminante para aprovação NIH comparado ao valor $\geq 10^{4,0}$ de Habel preconizado para aprovação de partidas no nosso país;

2.3 - Avaliar a aplicação do teste imunoenzimático ELISA-indireto ao controle de qualidade das vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, através da resposta imune humoral, em comparação com o teste de Habel;

2.4 - Determinar o ponto de corte para aprovação do ELISA-indireto, por diluição, comparado ao valor $\geq 10^{4,0}$ de HABEL preconizado para aprovação de partidas de vacinas no nosso país;

2.5 - Determinar os parâmetros de aprovação para o ELISA-indireto através do cálculo de sensibilidade, especificidade e valores preditivos de resultados positivos e negativos;

2.6 - Determinar a diluição de uso de soros no ELISA-indireto;

2.7 - Produzir experimentalmente a vacina de referência nacional para utilização no teste NIH e estabelecer comparação com a vacina de referência do INPPAZ.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Teste de Habel

Este teste baseia-se na vacinação de 60 camundongos jovens, de mesmo sexo, com 11-14 gramas de peso, na dose de 0,25 mL, por via intraperitoneal (i.p.), com cada uma das partidas de vacina diluída. No caso de vacinas produzidas em cultura de células usou-se a diluição 1/10, e nas produzidas em cérebro de camundongos lactentes a diluição foi ajustada de modo a conter 0,5 % de tecido cerebral. As vacinações, em número de seis, foram repetidas em intervalo de dois a três dias. No 14º dia após a primeira vacinação, os animais foram distribuídos em cinco grupos e desafiados com a amostra CVS, em diluições base 10 (10^{-1} até 10^{-5}), com inoculação de 0,03 mL por via intracerebral (i.c.) de cada diluição. O grupo controle, com iguais características e procedência, composto por camundongos não vacinados, recebeu as diluições de CVS, base 10 (10^{-5} até 10^{-8}) do vírus de desafio, nas condições citadas anteriormente para a titulação referencial da prova. Os animais foram observados durante 14 dias, sendo, os parâmetros considerados, paralisia e morte atribuídas à raiva. O título do CVS foi calculado pelo método de REED & MÜENCH (1938), sendo determinado, para cada partida de vacina, o índice entre o resultado do título obtido no grupo controle (não vacinado) e o obtido no grupo de animais vacinados (HABEL, 1976). A vacina foi considerada eficiente quando conferiu proteção à inoculação de 10.000 Doses Letais 50 %, (DL 50) do vírus padrão de prova, em camundongos adultos jovens com 11 a 14 g de peso vivo, ou seja, apresentou índice $\geq 10^{4,0}$ DL 50, de acordo com Normas Técnicas estabelecidas pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal do MAPA (BRASIL, 1988).

3.2 Teste NIH

O teste NIH foi executado em camundongos jovens da mesma faixa etária e peso que os utilizados no teste de Habel. Foram feitas duas vacinações, em intervalo de sete dias, na dose de 0,5 mL por via i.p. com vacina diluída (base 5), iniciando-se pela diluição 1/5 até 1/625. Cada grupo de doze animais recebeu uma diluição da vacina a ser testada, totalizando 50 animais por partida. O teste foi acompanhado de uma vacina de referência, que continha potência antigênica de 1 Unidade Internacional/mL (UI/mL) e foi testada nas mesmas condições que as outras partidas. No 14º dia após a primeira vacinação foi feito o desafio viral

ou “challenge” com o CVS, em diluição única (calculada com base em título prévio), contendo 32 Doses Letais camundongos 50% (DLCam.50), sendo inoculado na dose de 0,03 mL por via i.c. Os animais foram observados durante 14 dias, sendo os parâmetros utilizados a paralisia e a morte atribuída à raiva. A dose efetiva 50% (DE 50) protetora de cada partida, inclusive a da vacina de referência, foi calculada pelo método de Sperman & Kärber, sendo os resultados validados para valores da DL 50 do CVS entre 5 e 50 (SELIGMANN, 1976). A partir da DE 50 obteve-se o valor antigênico (VA) da vacina em teste, pela relação da DE 50 da mesma, frente a DE 50 da vacina de referência, expresso em UI/mL (WILBUR & AUBERT, 1996). O valor antigênico (VA) para aprovação de partidas de vacinas ainda não está estabelecido para as vacinas anti-rábicas comerciais, inativadas, de uso animal, produzidas no Brasil. Para a realização dos testes NIH foram usadas as vacinas de referência do Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS) - FIOCRUZ/MS e do Instituto Panamericano de Proteção Alimentária e Zoonoses (INPPAZ)/OPS.

3.3 Comparação entre os testes de Habel e o NIH

Para o estudo comparativo entre os testes de Habel e o NIH as amostras de vacinas foram escolhidas ao acaso, de acordo com o recebimento para os testes de controle oficial, no Laboratório Regional de Apoio Animal-LARA/Campinas. Foram testadas as vacinas inativadas comerciais, para uso animal, de origens e procedências diferentes, em um total de 210 partidas. Dessas partidas, 41 eram produzidas em cérebro de camundongos lactentes, infectadas com vírus padrão de desafio (CVS) e 169 produzidas nas linhagens celulares, BHK-21, C 13, sendo 121, infectadas com o vírus de produção – PV, 12 com a amostra ERA, 4 com a amostra SAD e 3 com a amostra Flury LEP e produzidas na linhagem celular NIL-2, 29 infectadas com a amostra Wister, porém essa variação não foi estudada. Nestas vacinas eram usados como inativantes a BPL, a BEA e a BEI. Os adjuvantes, quando utilizados, eram o hidróxido de alumínio, a saponina e o avridine. As vacinas eram apresentadas sob forma líquida ou liofilizada.

3.4 ELISA-indireto para identificação de anticorpos

3.4.1 Placas

Utilizaram-se microplacas de poliestireno, fundo chato, com 96 cavidades, tipo Maxisorp, Marca NUNC®.

3.4.2 Antígeno

Usou-se a vacina anti-rábica inativada, preparada a partir da amostra PM/WI 38-1503-3M, cultivada em células diplóides humanas. Após a replicação na cultura de células, a suspensão viral foi filtrada, submetida a ultrafiltração e inativada pela betapropiolactona e ainda foi submetido à centrifugação zonal através de gradiente de sacarose, segundo informações do fabricante (PASTEUR MERIEUX CONNAUGHT®), utilizada na diluição de 1/40, conforme titulação prévia (Carlos Roberto Zanetti - Informação pessoal, 10 de outubro de 2000).

3.4.3 Amostras de soros

Os soros testados pelo ELISA indireto foram soros de camundongos não vacinados (SCNV), soros de camundongos imunizados com cada uma das 70 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal e soros de camundongos vacinados com a vacina de referência do INPPAZ (VRI).

3.4.3.1 Soros de camundongos não vacinados

Foram sangrados 20 camundongos não vacinados, sem contato prévio com vírus rábico, originários do plantel de camundongos do LARA/Campinas, com idade e peso equivalentes aos dos animais utilizados nos testes de Habel (Brasil, 1988).

3.4.3.2 Soros de camundongos vacinados

Foram imunizados 8 camundongos com cada uma das 70 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas comerciais, em paralelo com a vacinação para o teste de Habel. O esquema de vacinação foi o mesmo descrito no item 3.1. No 14º dia após a primeira vacinação, os animais foram separados e sangrados. As amostras de soro provenientes dos 8 animais imunizados

com cada uma das partidas de vacinas foram misturadas, conservadas a -20°C , até serem submetidas ao teste ELISA indireto.

3.4.3.3 Soro controle positivo

Utilizou-se como soro controle positivo (SCP) uma mistura de soros de 12 camundongos vacinados com a vacina de referência do INPPAZ - potência antigênica de 1 UI/mL - (ARGENTINA, 1995c). O esquema de vacinação foi o mesmo adotado para a vacinação dos animais utilizados no teste de Habel, conforme indicado no item 3.1, sendo os animais sangrados, no 14º dia após a primeira vacinação.

3.4.3.4 Obtenção dos soros

As amostras de soro sangüíneo, obtidas por punção cardíaca, foram colocadas em frascos individuais. O sangue, após coagulação total à temperatura ambiente, foi refrigerado por 1 hora, dessorado através de centrifugação a 1.500xg, durante 10 min, acondicionados individualmente e conservados a -20°C , até serem submetidos ao ELISA indireto.

3.4.4 Conjugado

Anticorpos antiimunoglobulina G (anti-IgG) de camundongo, marcados com peroxidase, Marca Sigma® (084H-4804)/USA, na diluição 1/2.000, conforme titulação prévia (Carlos Roberto Zanetti - Informação pessoal, 10 de outubro de 2000).

3.4.5 Substrato cromógeno

O substrato cromógeno é constituído de orto-fenileno-diamina (OPD), diluído em tampão citrato e adicionado de água oxigenada (H_2O_2).

3.4.6 Procedimento do ELISA-indireto

O ELISA indireto foi executado conforme adaptado por PIZA *et al.* (1999). O antígeno, na diluição de uso, foi adicionado à placa na proporção de 100 μL em cada cavidade, diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 e incubado a 37°C , em ambiente úmido, durante 3 horas. No intervalo de cada uma das etapas da prova foram realizadas 6 lavagens com tampão fosfato salina (PBS), 0,05 M, pH 7,4 a 7,6 acrescido de 0,05 % de tween

20. Visando bloquear possíveis espaços na placa, foram colocados, em cada cavidade, 200µL de tampão tris-NaCl-gelatina a 1%. As placas foram incubadas a 37°C, em ambiente úmido, durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 100 µL de soro teste, em diluições base 2, iniciando-se pela diluição 1/100 até a 1/800 ou 1/1600, em tampão PBS-gelatina a 1%, sendo as placas incubadas a 37°C, em ambiente úmido, durante 1 hora. Procedeu-se às lavagens, seguido da adição de 100 µL de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Marca Sigma[®]), diluído em PBS-BSA, no título de uso, conforme determinado através de titulação prévia e incubação a 37°C/1 hora. Procedeu-se novamente às lavagens e colocou-se o substrato cromógeno, constituído de 10 mg de orto-fenileno-diamina - OPD (Sigma[®] P1526) diluído em 25 mL de tampão citrato, pH 5,6 adicionado de 25 µL de peróxido de hidrogênio - H₂O₂ (Marca Sigma[®]), incubando-se à temperatura ambiente, durante 30 min, quando então procedeu-se à adição de 50 µL de solução 4N de ácido sulfúrico para promover a parada da reação, seguida da leitura da densidade óptica [absorbância (Å)], em espectrofotômetro - Titertek Multiskan[®] (MCC/340), em comprimento de onda (λ) de 492 nm.

3.5 Comparação entre os testes de Habel e o ELISA-indireto

O estudo comparativo entre esses dois testes foi conduzido de modo a encontrar um valor discriminante ou ponto de corte para o teste ELISA, que correspondesse ao valor oficial de aprovação do teste de Habel $\geq 10^{4,0}$ DL 50. Essa determinação foi realizada pela avaliação dos resultados obtidos através do ELISA-indireto, aplicado à mistura de soros dos camundongos imunizados, conforme esquema descrito no item 3.1, com cada uma das 70 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas, comerciais, de uso animal, com diferentes índices no teste de Habel, visando correlacionar os dois testes.

3.6 Determinação da diluição de uso dos soros no ELISA-indireto

Visando utilizar apenas uma diluição de soro, na aplicação do ELISA indireto ao controle de vacinas anti-rábicas, em trabalhos subseqüentes, foi calculada a diluição de uso dos mesmos através do cálculo da razão entre a média dos valores de absorbância (A) obtidas nas diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800 dos soros-controle positivos (SCP) e de uma mistura

de soros de 20 camundongos não vacinados (SCNV) frente a uma diluição fixa de antígeno, pela média de 6 repetições.

3.7 Produção experimental de vacina de referência nacional

Tendo em vista o fato de a vacina de referência ser indispensável para a realização do teste NIH, esta vacina foi produzida experimentalmente, visando a sua utilização como vacina de referência nacional (VRN) (ARGENTINA, 1995c).

3.7.1 Amostra viral

Foi utilizado o vírus de produção, vírus Pasteur, amostra PV, fornecido pelo INPPAZ.

3.7.2 Linhagem celular

Utilizou-se a linhagem celular BHK-21, C 13, derivada de rim de hamster recém-nascido, “Baby Hamster Kidney” (MackPHERSON, 1962). As culturas celulares foram preparadas na Central de Meios e Células do LARA/Campinas, SP (BARAHONA *et al.*, 1985). O estoque de células, diluído em meio de cultura acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de glicerina, foi mantido sob congelamento, em nitrogênio líquido (N₂).

3.7.2.1 Manutenção das culturas

As culturas foram submetidas a tratamento com tripsina a 0,1%, tamponada, para promover o desprendimento do tapete celular e individualização das células. O meio de crescimento foi descartado das garrafas, e a monocamada lavada com tampão fosfato salino (TFS) para retirada de resíduos de soro, eventualmente existentes. Após a inativação da tripsina com meio Eagle (pH 6,8), contendo 20% de SFB, uma alíquota de 1 mL foi retirada e adicionada de 1 mL de azul de trypan a 0,2%, para ser submetida à contagem de células viáveis, em câmara de Neubauer (BARAHONA *et al.*, 1985).

3.7.2.2 Preparação das culturas celulares em garrafas

As culturas celulares foram semeadas em garrafas tipo rolantes, com diluições variadas das suspensões iniciais de células, com base nas contagens realizadas previamente, sendo inoculados 300 mL nas referidas garrafas. O inóculo continha, aproximadamente, 300.000

células por mL, de modo a obter-se um tapete confluyente, entre 24 e 48 h de incubação a 37°C, em estufa provida de aparelho apropriado, com 6 ciclos de rotação por hora, onde permaneceram durante todo o período de incubação (MARTIN *et al.*, 1971).

3.7.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o Eagle, na forma “Minimum Essential Medium” (MEM-Gibco®), acrescido de vitaminas, caldo triptose fosfato (CTF) e bicarbonato de sódio, a partir de soluções concentradas preparadas previamente e estocadas a -20°C. Após a mistura nas proporções balanceadas, o pH do meio foi ajustado, por borbulhamento de CO₂, para 6,6 a 6,8, no meio destinado ao crescimento celular, que foi acrescido de 10% de SFB e para pH 7,4 a 7,6 no caso de meio destinado à manutenção das culturas de células infectadas. O meio foi esterilizado em filtros de membranas de acetato celulose (HAWP-45), com porosidade 0,22 µm e conservadas em câmara fria até o momento de uso, após terem sido feitos os testes de esterilidade (BARAHONA *et al.*, 1985).

3.7.4 Inoculação viral

A amostra viral (PV) foi inoculada em garrafas contendo monocamadas confluentes da linhagem BHK-21, C 13, com o objetivo de adaptação e de preparação subsequente das sementes de suspensões virais para uso na produção experimental da vacina de referência nacional (ARGENTINA, 1995a). Após a quarta passagem, quando a amostra viral foi considerada adaptada à linhagem celular, as inoculações foram feitas em células em suspensão, da seguinte forma:

3.7.4.1 Inoculação de células em suspensão

A amostra viral (PV), em 4ª passagem, após adaptação, foi inoculada no volume de 20 mL, juntamente com a suspensão de células, em garrafas (tipo rolantes), incubadas a 37°C, durante 18 horas, em estufa provida de aparelho apropriado, com 6 ciclos de rotação por hora. Após esse tempo, as garrafas foram observadas ao microscópio invertido (MI) para verificação do crescimento celular, quando então, já com a monocamada confluyente, 24 horas, o meio de cultivo foi removido da garrafa, a monocamada celular submetida a três lavagens com TFS 0,05 M, pH 7,6 e substituído por meio de manutenção, acrescido de 1% de SFB, 10% de

hidrolisado de lactoalbumina, continuando a incubação entre 33° e 34°C, até completar as 120 horas previstas, com observação diária em MI. Foram realizadas duas colheitas, sendo a primeira colheita, 72 horas após a inoculação (p.i.), quando novo meio foi colocado e as garrafas mantidas nas mesmas condições de incubação. A segunda colheita, executada 48 horas após a primeira, correspondeu ao tempo de 120 horas após a inoculação do vírus. Após cada colheita, o sobrenadante das culturas foi congelado e conservado a -70°C, constituindo-se nas suspensões virais.

3.7.5 Suspensões virais

As suspensões virais (5ª passagem) foram tituladas em camundongos lactentes com 4 a 6 dias de idade (CL) e em camundongos adultos jovens com 11 a 14 gramas de peso (CAJ) e por quantificação do conteúdo de glicoproteínas totais (cGT), através da técnica ELISA de imunocaptura.

3.7.5.1 Titulação das suspensões virais

Para a titulação das suspensões virais foram preparadas diluições em base 10, iniciando-se por 10^{-1} até 10^{-8} , com posterior inoculação de 0,01 mL nos CL e 0,03 mL nos CAJ, por via intracerebral (i.c.). Os animais foram observados durante 21 dias, com leituras diárias, considerando os sintomas característicos de raiva. O cálculo da dose letal camundongo 50% (DL 50) foi realizado pelo método de REED & MÜENCH (1938).

3.7.5.2 Quantificação do conteúdo de glicoproteínas

As glicoproteínas presentes nas suspensões virais foram quantificadas através da reação imunoenzimática ELISA de imunocaptura, executada no Laboratório do Vallée Nordeste, de acordo com técnica descrita por PERRIN *et al.* (1996). Foram utilizadas microplacas sensibilizadas com 200 µL, contendo aproximadamente 1 µg/mL de anticorpos (anti-glicoproteínas de vírus rábico) purificados (diluídos em tampão carbonato 0,05 mol/L, pH 9,6). A seguir foram adicionadas as suspensões virais a serem testadas, em diluição base 2 (200 µL), acompanhadas de uma amostra de referência (semente padrão de produção de vírus rábico-PSRV), também em diluição base 2, sendo que a diluição mais baixa continha 1µg/mL. No intervalo de cada uma das etapas da prova, foram realizadas 5 lavagens com tampão

fosfato salino (PBS), 0,05M, pH 7,4 a 7,6 acrescido de 0,05 % de tween 20, seguido da adição de 200 μ L de anticorpo conjugado a peroxidase, no título de uso, conforme determinado através de titulação prévia. Procedeu-se novamente às lavagens e colocou-se o substrato cromógeno, constituído de 10 mg de orto-fenileno-diamina - OPD (Sigma[®] P1526), diluído em 25 mL de tampão citrato, pH 5,6 adicionado de 25 μ l de peróxido de hidrogênio - H₂O₂ (Marca Sigma[®]), incubando-se à temperatura ambiente, durante 30 min, quando procedeu-se à colocação de 50 μ L de solução 4N de ácido sulfúrico para promover a parada da reação, seguida da leitura em espectrofotômetro - Titertek Multiskan[®] (MCC/340), em comprimento de onda (λ) de 492 nm.

3.7.5.3 Seleção e ultrafiltração das suspensões virais

A seleção das suspensões virais (5^a passagem) foi realizada com base nos resultados obtidos nas titulações em camundongos e na quantificação das glicoproteínas totais, conforme descrito nos itens 3.7.5.1 e 3.7.5.2, respectivamente. As amostras selecionadas foram, a seguir, misturadas e submetidas à filtração clarificante em filtro de membrana - Millipore[®] (Mod. 142), montado com pré-filtro (AP-25) e membranas de acetato celulose com porosidade 0,45 μ m, seguido de filtração tangencial pulsante em filtro cassete (Millipore[®]) usando membrana "Pellicon" com capacidade nominativa limitante (CNL) de PM=25.000 (ARGENTINA, 1995b; MONTAGNON & FANGET, 1996). O volume total de suspensão viral obtido foi dividido em duas frações, sendo uma submetida à inativação pela bromo etilenoimina binária (BEI) e a outra pela betapropiolactona (BPL), sendo denominadas amostra A e amostra B, respectivamente.

3.7.6 Inativações

3.7.6.1 Bromo etilenoimina binária

Uma das frações de suspensão viral (amostra A) foi submetida à inativação com a bromoetilenoimina binária (BEI), preparada a partir de uma solução 1M de BEA (20,5 g de BEA por litro), numa solução de 0,175 M de NaOH (7 g de NaOH em 1 litro de água destilada estéril) a 37°C, durante 1 hora, utilizando o B-naftol a 0,05% como indicador da reação. A

solução inicialmente apresentou-se de cor violeta, pH entre 10,0 e 12,0, sendo incubada a 37°C, para favorecer a conversão do BEA em BEI, o que ocorre entre 15 a 45 minutos, tornando a cor alaranjada e pH 8,5 a 9,5. O inativante assim preparado foi usado na proporção de 20 mL para cada litro de antígeno. Após o tratamento, a suspensão viral, sob agitação magnética, foi incubada a 37°C, durante 12 h, seguido de neutralização do inativante com 0,03 % de solução de 1 M de tiosulfato de sódio e posterior resfriamento a 4°C (BARAHONA *et al.*, 1985).

3.7.6.2 Beta propiolactona

A outra fração (amostra B) foi submetida à inativação pela B – propiolactona – BPL (B-PRONE – Grand Laboratories Inc.[®]) na proporção de 1/4.000, em água destilada fria estéril, sob agitação magnética e incubação a 37°C, durante 6 horas. Foi mantida sob agitação constante, por um tempo adicional de 12 horas a 4°C, para completar a hidrólise do BPL, conforme indicações do fabricante (ARGENTINA, 1995c; SINGH, 1996).

Durante o processo de inativação, em ambos os tratamentos, foram coletadas amostras para o acompanhamento da cinética de inativação viral, que foi realizado através de titulação em camundongos lactentes, com 4 a 6 dias de idade (CL) e quantificação do conteúdo de glicoproteínas totais (cGT), através do ELISA de imunocaptura, conforme descritos nos itens 3.7.5.1 e 3.7.5.2, respectivamente. A última amostra de cada tratamento, BEI (12 h) e BPL (6 h) foi submetida à quantificação de conteúdo de glicoproteínas insolúveis (GI), também através da técnica ELISA de imunocaptura. Após a inativação, as amostras denominadas, vacina A (inativada pelo BEI) e vacina B (inativada pela BPL) foram distribuídas em frascos com 20 mL e acondicionadas a -70°C, para posterior liofilização e testes subseqüentes.

3.7.7 Testes de controle

Os testes de controle foram realizados no LARA/Campinas, Unidade Oficial de Controle de Vacinas Anti-rábicas do MAPA, de acordo com Normas Técnicas estabelecidas pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal (BRASIL, 1988).

3.7.7.1 Testes de inocuidade

A inocuidade das vacinas experimentais A e B foi determinada pelos testes de Vírus Residual e Toxicidade.

3.7.7.1.1 Vírus residual

Esse teste foi executado pela inoculação de 0,01 mL de cada vacina experimental não diluída, por via i.c. em 16 camundongos lactentes, de 4 a 6 dias de idade e de 0,03 mL do mesmo material em 10 camundongos jovens de 11 a 14 g de peso. Após a inoculação, os animais permaneceram sob observação diária, durante 21 dias, para verificação de sintomas característicos de raiva.

3.7.7.1.2 Toxicidade

Essa prova consistiu da inoculação de camundongos (adultos jovens de 11 a 14 g de peso vivo) e cobaias (pesando 300 a 400 g) com 0,5 mL de cada uma das vacinas experimentais não diluídas, por via subcutânea (s.c.). As cobaias foram pesadas no início e no final do teste. Os animais foram todos observados durante 21 dias para verificação de alterações locais ou sistêmicas relacionadas às vacinas inoculadas.

3.7.7.2 Teste de esterilidade

As amostras foram semeadas nos meios Caldo Casoy, Caldo Tioglicolato e Agar Sabouraud. Utilizaram-se 6 frascos de cada meio inoculando-se 1,0 mL das vacinas não diluídas em cada tubo, contendo 10 mL de meio, visando manter a proporção de 1/10. Os caldos Casoy e Tioglicolato foram incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o Agar Sabouraud a 22°C , durante 14 dias.

3.7.7.3 Testes de potência

Para os testes de potência Habel e NIH, aplicados em paralelo, as vacinas A (inativada pela BEI) e B (inativada pela BPL) foram hidratadas respectivamente, com 4 mL e 2 mL de água destilada estéril, passando a denominar-se A₁, A₂, B₁ e B₂, que correspondem à concentração relativa de 5x (A₁, B₁) e 10 x (A₂, B₂), respectivamente. Os referidos testes foram executados, conforme descrito nos itens 3.1 e 3.2. Para o teste NIH, a vacina de

referência do INPPAZ (VRI) foi hidratada com 10 mL de água destilada estéril, conforme indicação do fabricante.

3.7.7.4 Teste de imunogenicidade

A resposta imune humoral foi avaliada pelo método ELISA-indireto, conforme descrito no item 3.4. Foram preparados lotes de soros de camundongos imunizados com as vacinas experimentais A₁, A₂, B₁, B₂ e com a VRI (1UI/mL), utilizando 12 animais, com 11 a 14 gramas de peso para cada lote. O esquema de vacinação adotado foi semelhante ao utilizado para o teste NIH, conforme descrito no item 3.2 e a sangria dos animais ocorreu no 14º dia após a imunização.

3.7.7.5 Teste de proteção

A proteção foi medida em camundongos inoculados com as vacinas experimentais A₁, A₂, B₁, B₂ e com a VRI (1 UI/mL), em esquema de imunização e desafio semelhante ao utilizado para o teste NIH, conforme descrito no item 3.2.

3.8 Avaliação estatística

A avaliação estatística dos resultados obtidos, no presente estudo, foi realizada pela Empresa Júnior do IMECC/UNICAMP. As análises estatísticas foram obtidas utilizando-se os programas MINITAB® e SAS®. Os gráficos apresentados foram obtidos com os recursos do EXCEL®. A metodologia empregada na avaliação estatística desse trabalho está descrita detalhadamente no Apêndice A (p. 125).

4 RESULTADOS

4.1 Teste de Habel

A distribuição de freqüência dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 210 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas está sendo mostrada na figura 2. Segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov ($D=0,455$; $p>0,05$) observa-se uma distribuição normal dos resultados.

Os índices de Habel, nos resultados gerais, conforme mostrado no Apêndice B (p. 128), variaram de $10^{2,62}$ a $10^{7,08}$ DL 50, expressos pela recíproca destes valores, isto é, 2,62 e 7,08, respectivamente, sendo a média 5,09, a mediana 5,16 e o coeficiente de variação 21,22%. No conjunto de vacinas aprovadas por Habel ($\geq 4,0$) os índices variaram de 4,01 a 7,08, sendo a média 5,44, a mediana 5,48 e o coeficiente de variação 15,28%, enquanto no conjunto de reprovadas ($< 4,0$), os índices variaram de 2,62 a 3,97, sendo a média 3,44, a mediana 3,48 e o coeficiente de variação 11,63%.

Considerando o valor $\geq 10^{4,0}$ doses letais camundongos/0,03 mL (DL 50), determinado pela legislação em vigor, para aprovação pelo teste de Habel, das 210 amostras testadas, 173 foram aprovadas (82,38 %), enquanto 37 foram reprovadas (17,62%). Dentre as quais, as produzidas em cérebro de camundongos, infectadas pela amostra CVS (41) apresentaram 100% de aprovação, as produzidas em cultura de tecidos, células BHK-21, C 13, as infectadas pelas amostras PV (121), ERA (12), SAD (4) e Flury LEP (3) obtiveram 71,07%, 91,66%, 75% e 100%, respectivamente e as produzidas nas células NIL-2 (29) apresentaram também 100% de aprovação.

Os títulos do vírus padrão de prova (CVS) utilizado nos testes de Habel, representado pela DL 50 obtida em cada teste realizado, apresentaram em média o valor $10^{7,3}$, sendo o valor mínimo $10^{6,45}$ e o valor máximo $10^{8,05}$. Observa-se que os resultados têm distribuição assimétrica em torno do valor médio. Segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov ($D=0,06$; $p>0,05$), os dados pertencem a uma distribuição normal (Fig. 3), sendo confirmado pela aplicação do teste Qui-quadrado ($\chi^2=4,155$; $p=0,245$), usado como auxiliar ao teste de normalidade.

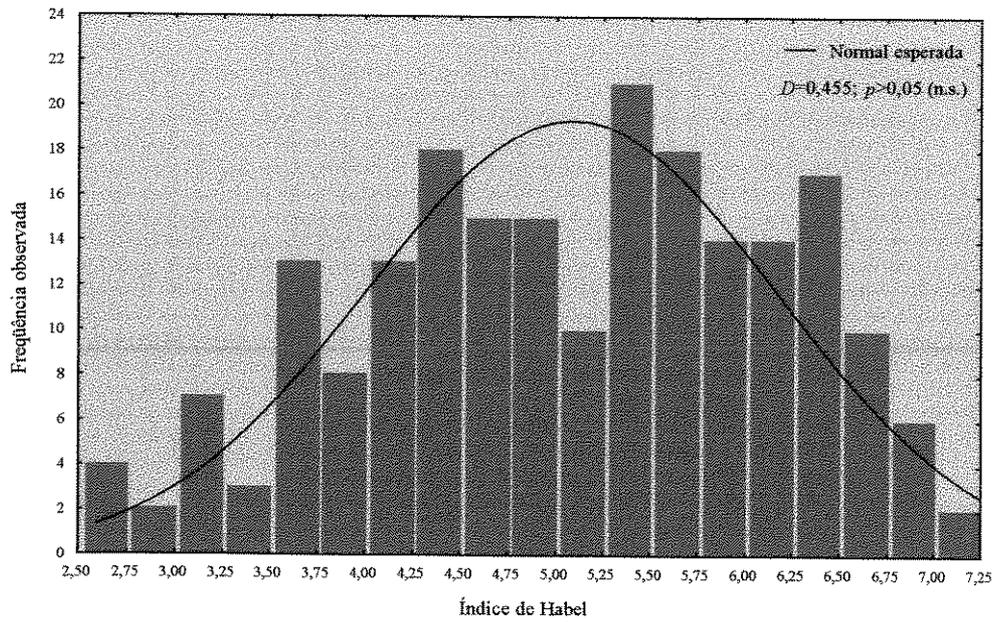


Figura 2: Distribuição de frequência dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil. Normalidade, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (D)

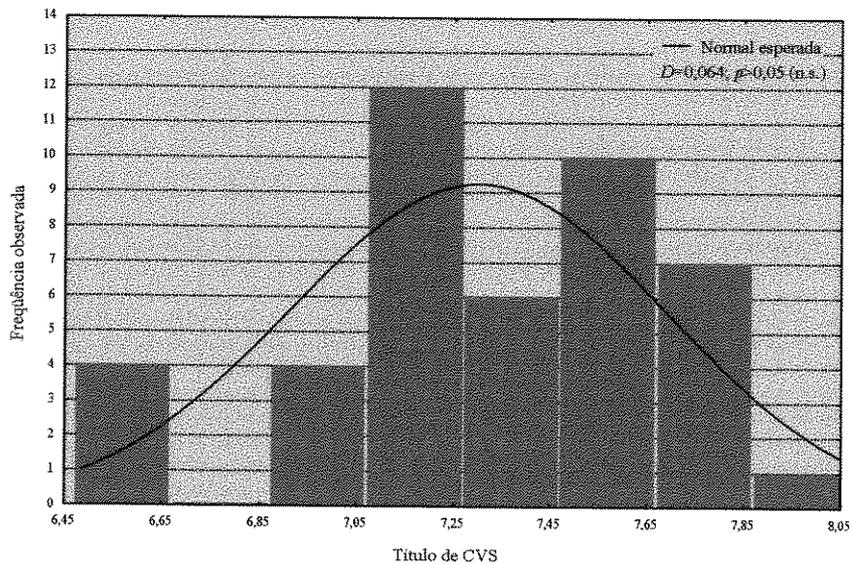


Figura 3: Distribuição de frequência dos títulos obtidos pelo vírus CVS utilizado nos testes de Habel (recíproca da DL 50). Normalidade, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (D)

4.2 Teste NIH

A distribuição de frequência dos valores antigênicos obtidos pela aplicação do teste NIH às 210 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas pode ser vista na figura 4. Nota-se que, segundo o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($D=0,151$; $p<0,001$), os dados não pertencem a uma distribuição normal, sendo confirmado pelo teste Qui-quadrado, usado como auxiliar ao teste de normalidade, que apresentou valores $\chi^2=13,563$; $p=0,333$.

Observa-se que nos resultados gerais os valores antigênicos obtidos no NIH variaram de 0,23 a 10,01 UI/mL, com média 2,69, mediana 1,98 e coeficiente de variação 84,39%. No conjunto de resultados, considerando vacinas aprovadas pelo teste de Habel (índices $\geq 4,0$), a variação do valor antigênico correspondente foi de 0,39 a 10,01, com média 2,99 mediana 2,23 e coeficiente de variação de 78,26%, enquanto no conjunto de resultados, considerando vacinas reprovadas pelo teste de Habel (índices $< 4,0$), a variação do valor antigênico correspondente foi de 0,23 a 5,23, com média 1,26, mediana 0,91 e coeficiente de variação de 88,89% (Apêndice C, p. 128).

Considerando que não há na legislação brasileira, em vacinas para uso animal, a definição do parâmetro de aprovação para o teste NIH, das 210 amostras testadas por esse método - para os valores antigênicos de 0,90 UI/mL; 0,97 UI/mL; 0,98 UI/mL; 1,0 UI/mL e 1,1 UI/mL - foram aprovadas, respectivamente, 163, 159, 158, 155 e 151 partidas (Fig. 5), representando 77,62%, 75,71%, 75,23%, 73,81% e 71,9%, respectivamente (Tab. 1).

As Doses Letais 50% (DL 50) obtidas pelo CVS, nos testes NIH variaram de 10,00 a 42,65 enquanto as Doses Efetivas 50% (DE 50), das vacinas de referência utilizadas, variaram de 8,12 a 89,89. A figura 6 mostra a dispersão dos valores das DL 50 e das DE 50 correspondentes. Verifica-se que não há correlação ($p=-0,088$) e é não significativa ($p=0,569$). Os valores de DE 50 corrigidos a partir dos resultados das DL 50 do CVS estão sendo mostrados na figura 7.

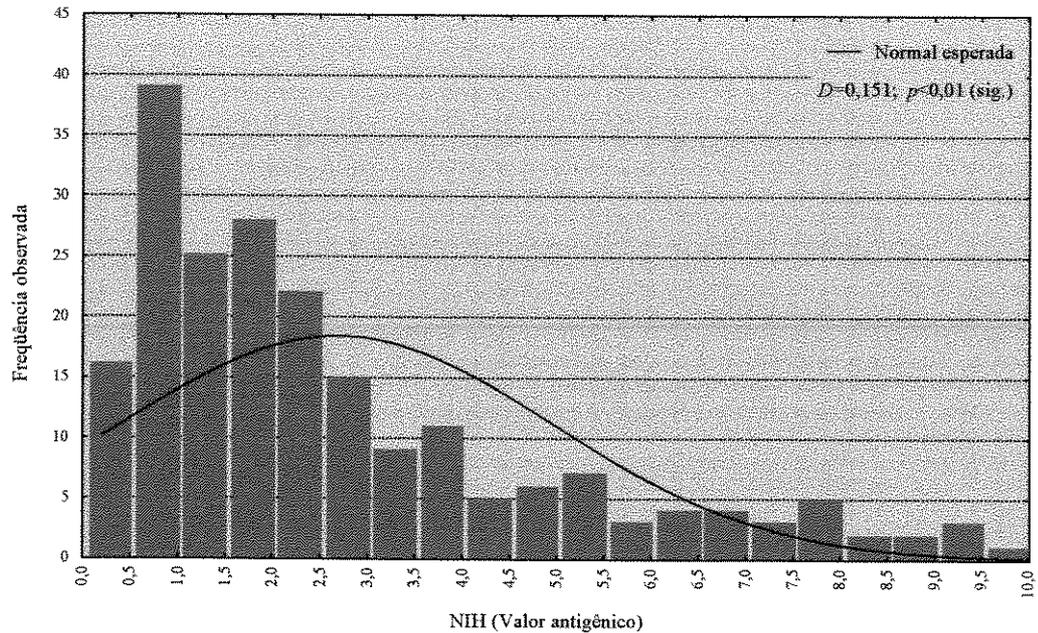


Figura 4: Distribuição de freqüência dos resultados obtidos pela aplicação do teste NIH a 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil. Normalidade segundo Kolmogorov-Smirnov (D)

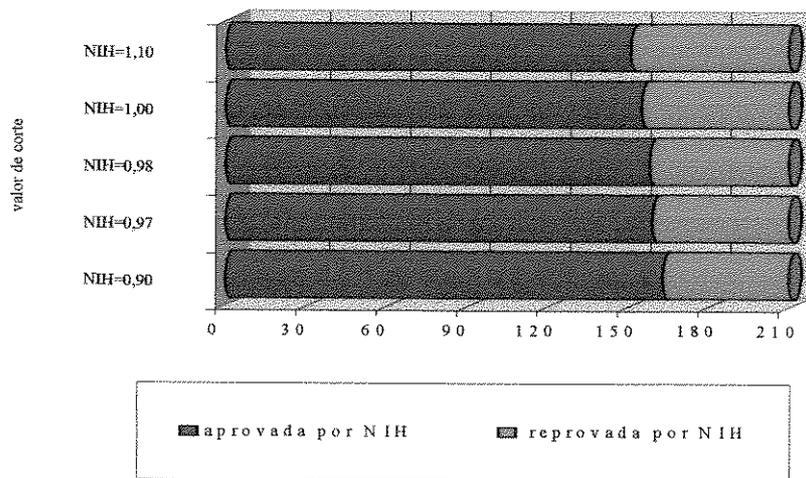


Figura 5: Classificação das 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil, segundo os pontos de corte determinados para aprovação no teste NIH

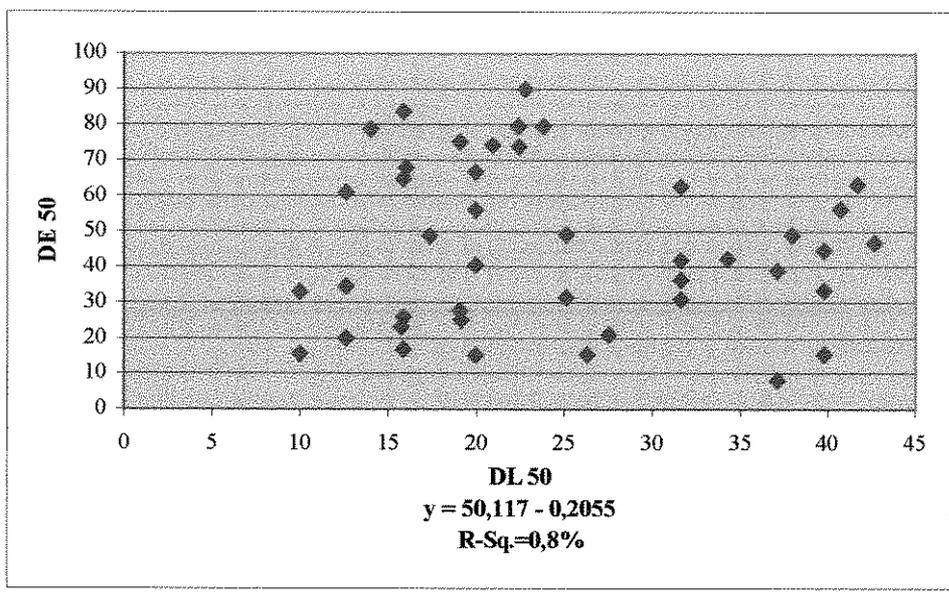


Figura 6: Dispersão dos valores das doses letais 50% camundongo/0,03 mL (DL 50) do vírus CVS e dos valores de doses efetivas 50% (DE 50) da vacina de referência utilizada nos testes NIH

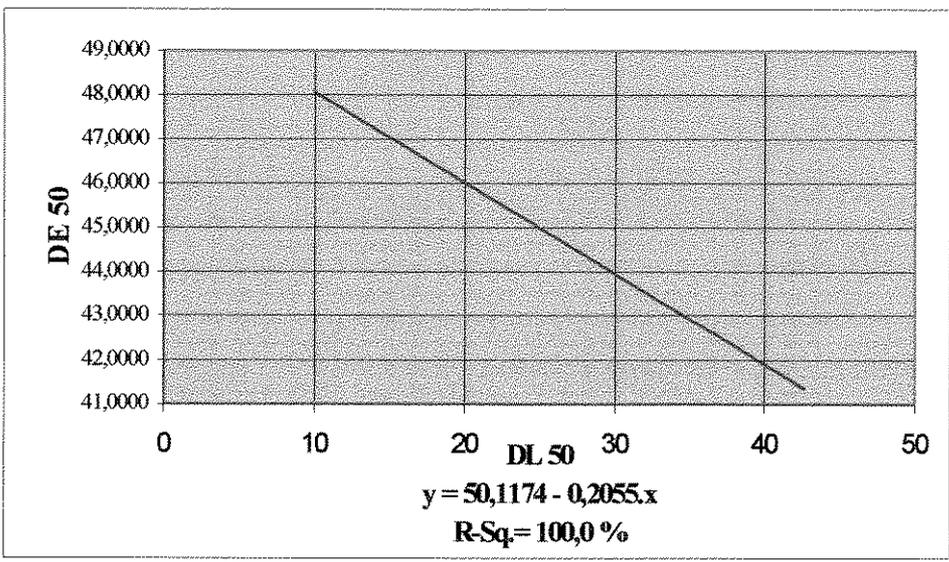


Figura 7: Distribuição dos valores transformados e corrigidos das doses letais 50% camundongo/0,03/mL (DL 50) do vírus padrão de prova (CVS) e dos valores das doses efetivas 50% (DE 50) da vacina de referência utilizada nos testes NIH

4.3 Relação entre os resultados obtidos nos testes de Habel e no NIH

A relação entre os resultados dos testes de Habel e do NIH, aplicados ao controle de vacinas anti-rábicas inativadas (210 partidas) está sendo mostrada na figura 8. Quando relacionados os resultados obtidos por essas partidas, testadas paralelamente pelos dois testes, considerando o valor de aprovação oficial $\geq 10^{4,0}$ DL 50, o teste de Habel aprovou 82,38 % de partidas, enquanto o NIH, segundo os limites - 0,9; 0,97; 0,98; 0,99; 1,0 e 1,1 -, aprovou 77,62%; 75,71%; 75,23%; 73,81%; 73,81% e 71,9%, respectivamente (Tab. 1). Conseqüentemente, o complementar desses valores corresponde ao percentual de partidas reprovadas pelo NIH entre as aprovadas por Habel, ou seja: 16,76%, 17,34%, 17,92%, 18,50%; 18,50% e 20,23%, respectivamente. No que diz respeito aos 17,62% que correspondem às partidas reprovadas por Habel, quando considerados os valores de pontos de corte para o NIH, encontra-se em 48,65%, 56,75%, 56,76%, 62,16%, 62,16% e 64,86%, respectivamente, reprovadas também por NIH (Tab. 1).

A correlação observada entre o teste de Habel e o NIH, quando calculada pelo teste de Pearson, foi da ordem de 0,452 ($p < 0,001$).

Ao verificar-se estatisticamente a igualdade entre as proporções de aprovadas por Habel e NIH observa-se que para o valor de corte 0,98 ($p=0,041$) a percentagem estimada de partidas de vacinas reprovadas por NIH e aprovadas por Habel é de 68,42%, enquanto a percentagem estimada de partidas aprovadas por NIH e reprovadas por Habel é de 58,58%, a partir do qual nota-se um aumento significativo, sendo, para os valores de corte 0,99 e 1,0 (70,63% e 51,27%, respectivamente) e para o valor 1,1 (71,99% e 48,87%, respectivamente), conforme mostrado na tabela 1.

NIH (VA)

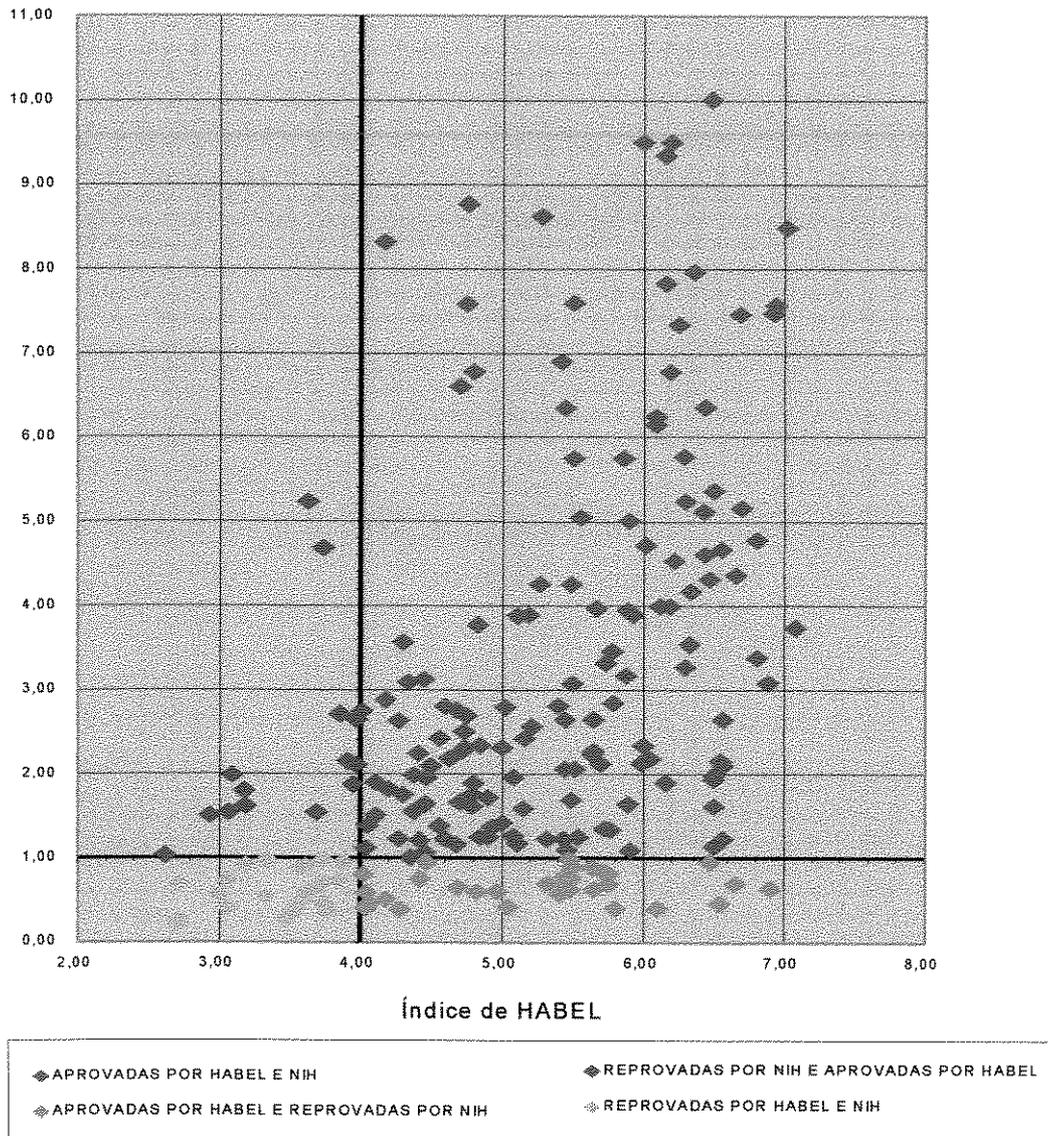


Figura 8: Relação entre os resultados obtidos nos testes de Habel e NIH, aplicados a 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil

Tabela 1: Distribuição de freqüência absoluta e em percentagem da associação do teste de Habel ($\geq 10^{4,0}$) com o NIH aplicados a 210 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas⁽¹⁾, com níveis mínimos de significância das comparações para $P_{RNAH} = P_{RHA}$, p

NIH=0,9 (p=0,194)				
HABEL	Aprovada	Reprovada	Total	%
Aprovada	144 (83,24)	29 (16,76)	173 (100,00)	82,38
P_{RNAH}		74,89		
Reprovada	19 (51,35)	18 (48,65)	37 (100,00)	17,62
P_{RHA}	66,16			
Total	163 (77,62)	47 (22,38)	210 (100,00)	100,00
NIH=0,97 (p=0,055)				
HABEL	Aprovada	Reprovada	Total	%
Aprovada	143 (82,66)	30 (17,34)	173 (100,00)	82,38
P_{RNAH}		71,39		
Reprovada	16 (43,24)	21 (56,75)	37 (100,00)	17,62
P_{RHA}	57,12			
Total	159 (75,71)	51 (24,29)	210 (100,00)	100,00
NIH=0,98 (p=0,041)				
HABEL	Aprovada	Reprovada	Total	%
Aprovada	142 (82,08)	31 (17,92)	173 (100,00)	82,38
P_{RNAH}		68,42		
Reprovada	16 (43,24)	21 (56,76)	37 (100,00)	17,62
P_{RHA}	58,58			
Total	158 (75,23)	52 (24,77)	210 (100,00)	100,00
NIH=0,99 e NIH=1,0 (p=0,012)				
HABEL	Aprovada	Reprovada	Total	%
Aprovada	141 (81,50)	32 (18,50)	173 (100,00)	82,38
P_{RNAH}		70,63		
Reprovada	14 (37,84)	23 (62,16)	37 (100,00)	17,62
P_{RHA}	51,27			
Total	155 (73,81)	55 (26,19)	210 (100,00)	100,00
NIH=1,1 (p=0,002)				
HABEL	Aprovada	Reprovada	Total	%
Aprovada	138 (79,77)	35 (20,23)	173 (100,00)	82,38
P_{RNAH}		71,99		
Reprovada	13 (35,14)	24 (64,86)	37 (100,00)	17,62
P_{RHA}	48,87			
Total	151 (71,9)	59 (28,10)	210 (100,00)	100,00

⁽¹⁾ P_{RNAH} =% aprovação NIH e reprovação Habel e P_{RHA} =% aprovação Habel e reprovação NIH

4.4 Aplicação do ELISA indireto ao controle de vacinas anti-rábicas

A seguir, são apresentados resultados obtidos pela aplicação do teste ELISA indireto a 70 soros de camundongos vacinados, com diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas, que foram submetidas paralelamente ao teste de Habel.

4.4.1 Teste de Habel

A figura 9 apresenta a distribuição de freqüência dos resultados obtidos no teste de Habel para as 70 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas testadas paralelamente pelo ELISA indireto, onde se nota uma distribuição normal dos resultados, com apresentação de simetria. Segundo o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($D=0,073$; $p=0,05$), os dados pertencem a uma distribuição normal, confirmado pela aplicação do teste Qui-quadrado ($\chi^2=3,679$; $p=0,451$), usado como auxiliar ao teste de normalidade.

A estatística descritiva relativa aos índices obtidos pelas partidas de vacinas, no referido teste, está sendo mostrada no Apêndice C (p. 128). Observa-se que, para os resultados gerais, os índices variaram de $10^{3,1}$ DL 50 a $10^{7,08}$ DL 50, expressos pela recíproca desses valores (3,1 e 7,08, respectivamente), sendo a média 5,32, a mediana 5,42 e o coeficiente de variação de 20,83%. No grupo das partidas de vacinas aprovadas por Habel ($\geq 4,0$), os valores encontrados variaram de 4,01 a 7,08, com média 5,59, mediana 5,56 e coeficiente de variação 16,33%, enquanto para o grupo das reprovadas por Habel ($< 4,0$), os valores variaram de 3,10 a 3,89, com média 3,51, mediana 3,63 e coeficiente de variação 9,83% (Apêndice D, p. 129).

Considerando o valor $\geq 10^{4,0}$ DL 50, determinado pela legislação em vigor para aprovação de partidas de vacinas anti-rábicas inativadas pelo teste de Habel, verifica-se que das 70 partidas testadas, 61 foram aprovados, representando 87,14%, enquanto 9 foram reprovados (12,86%) (Tab. 2).

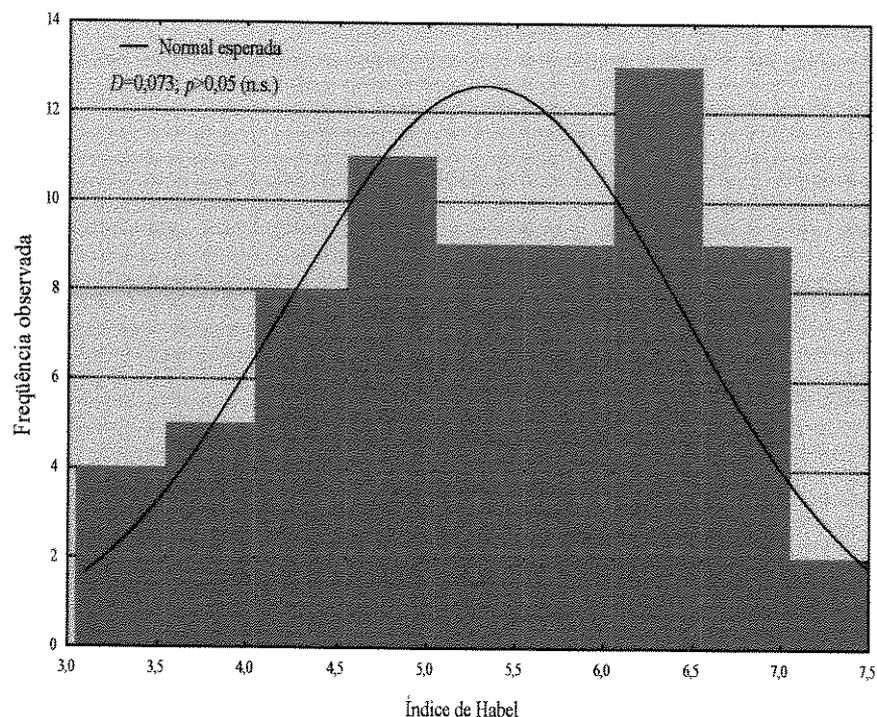


Figura 9: Distribuição de frequência dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil. Normalidade, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (D)

4.4.2 ELISA indireto

A distribuição de frequência dos valores de absorbância (\AA) obtidos pela aplicação do teste ELISA indireto em cada uma das diluições dos 70 soros de camundongos, vacinados com as diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas está sendo apresentada, na figura 10. Os valores máximos e mínimos de \AA encontrados foram 0,45 e 1,521 (diluição 1/100); 0,29 e 1,113 (diluição 1/200); 0,17 e 0,679 (diluição 1/400) e 0,075 e 0,42 (diluição 1/800).

A estatística descritiva dos resultados obtidos no ELISA indireto, expressos em \AA , está sendo mostrada no Apêndice E (p. 129). Observa-se que os valores de absorbância variaram,

na diluição 1/100, de 0,450 a 1,521, com média 0,774, mediana 0,697 e coeficiente de variação 32,28%; na diluição 1/200, variaram de 0,290 a 0,113, com média 0,496, mediana 0,443 e coeficiente de variação de 34,20%; na diluição 1/400 a variação foi de 0,170 a 0,679, com média 0,330, mediana 0,307 e coeficiente de variação 29,86% e, na 1/800 variaram de 0,075 a 0,422, com média 0,212, mediana 0,195 e coeficiente de variação 32,98% (Apêndice E, p. 129).

Quando considerados os resultados obtidos frente aos soros de camundongos imunizados com as partidas de vacinas aprovadas pelo teste de Habel (índice $\geq 4,0$), observa-se que não há correlação entre os valores de \dot{A} e os índices obtidos por esse método, bem como a distribuição desses valores não apresentam uma distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,03$), para todas as diluições testadas pelo ELISA indireto, porém, pelo teorema do limite central sendo o número de observações grande (acima de 30) os dados tendem para uma distribuição normal (Apêndice F, p. 130). Pela ANOVA encontra-se diferença entre as médias dos valores de \dot{A} , em cada diluição, nesse conjunto de dados.

Quando considerados os resultados obtidos pelo ELISA indireto nos soros de camundongos imunizados com as partidas reprovadas pelo teste de Habel, os valores de \dot{A} apresentam uma distribuição normal, conforme mostrado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para todas as diluições testadas, com p variando de $p = 0,08$ a $p > 0,015$ (Apêndice F, p. 130).

Os pontos de corte encontrados para o ELISA indireto considerando o valor de aprovação $\geq 10^{4,0}$ DL 50 do teste de Habel e de forma a limitar os resultados falsos negativos, foram 0,512 (1/100), 0,341 (1/200), 0,225 (1/400) e 0,111 (1/800), confirmados pela ANOVA (Apêndice E, p. 129) e pelo teste das médias (Apêndice F, p. 130). Observa-se que os pontos de corte ou pontos críticos obtidos correspondem aos limites mínimos das \dot{A} em cada uma das diluições testadas e encontram-se dentro do intervalo de confiança média mais três desvios padrão da média ($M \pm 3DP$) (Fig. 11).

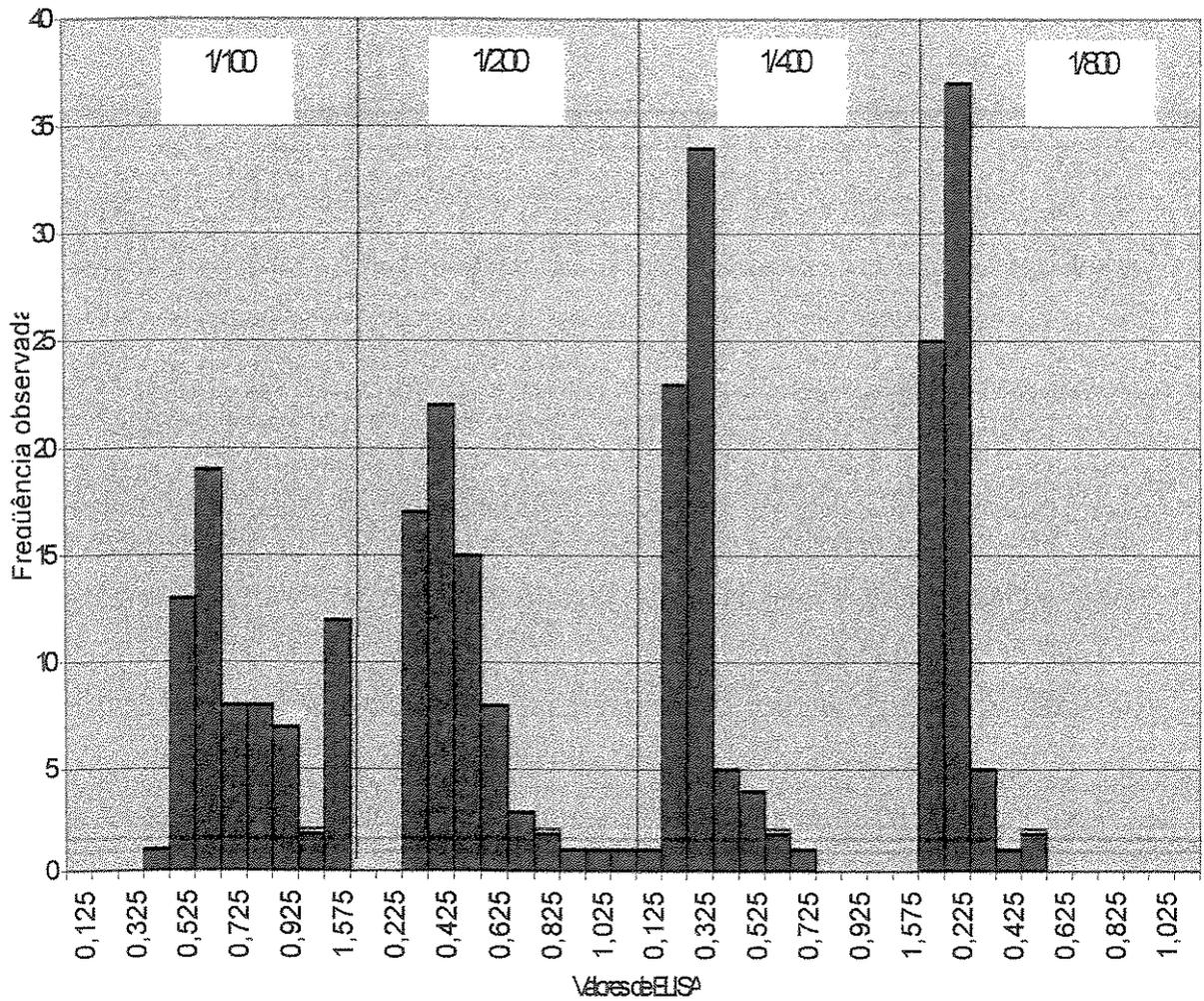


Figura 10: Distribuição de frequência dos valores de absorbância (Å) obtidos pela aplicação do ELISA indireto a soros de camundongos vacinados com 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil

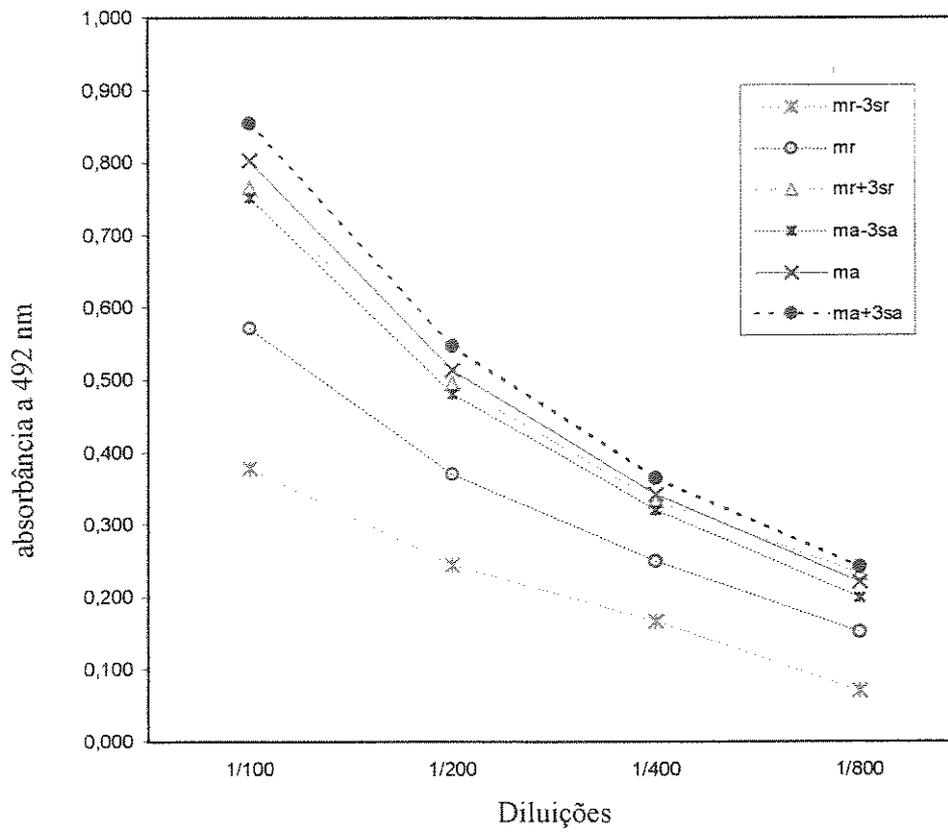


Figura 11: Médias e limites de confiança de 99% de probabilidade ($m \pm 3s$, s =erro padrão da média) para a verdadeira absorbância dos soros de animais imunizados com vacinas reprovadas e aprovadas pelo teste de Habel

4.4.3 Relação entre os testes de Habel e o ELISA indireto

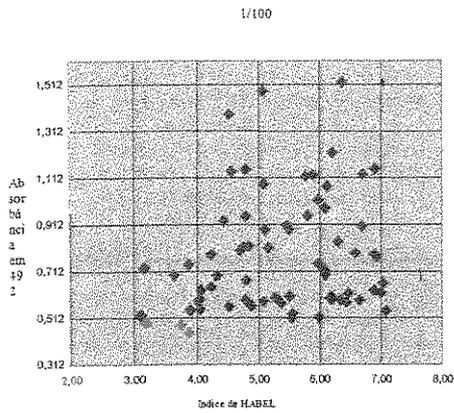
A relação entre os resultados obtidos nos testes de Habel e no ELISA indireto aplicados a 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas está sendo mostrada através do diagrama de dispersão dos valores de absorvância (\bar{A}) obtidos pelo ELISA indireto, nas diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800 (Fig. 12), segundo os valores dos respectivos pontos de corte estimados para cada uma das diluições testadas.

Quando relacionados os testes de Habel e o ELISA indireto, observa-se que das 70 partidas testadas paralelamente pelos dois testes, o teste de Habel aprovou 87,14%, enquanto o ELISA indireto, segundo os pontos de corte 0,512, 0,341, 0,225 e 0,111, aprovou 96% (1/100), 93% (1/200), 90% (1/400) e 90% (1/800), respectivamente (Tab. 2).

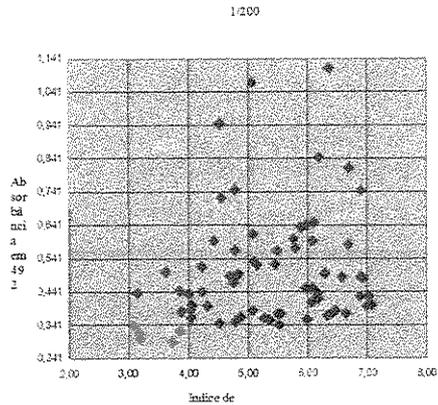
Não há correlação entre os valores de absorvância (\bar{A}) encontrados no ELISA indireto ($p=0,45$) com os índices obtidos no teste de Habel, quando considerados soros de animais imunizados com as vacinas aprovadas por Habel, isto é, esses resultados são aleatórios em função dos índices obtidos no teste de Habel, enquanto pela análise de variância (ANOVA) (Apêndice G, p. 131) observa-se que há diferença entre as médias dos valores de \bar{A} obtidos pelo ELISA indireto nos soros do grupo de animais imunizados com vacinas aprovadas e reprovadas por Habel, em cada diluição.

As médias das \bar{A} entre os soros de animais imunizados com as partidas de vacinas reprovadas e aprovadas pelo teste de Habel diferem estatisticamente entre si, sendo a média das vacinas aprovadas maior do que a média das vacinas reprovadas (Apêndice H, p.131).

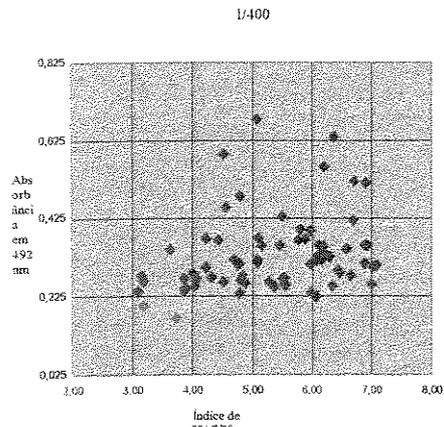
Ao comparar-se os limites de 90% de probabilidade das \bar{A} entre os soros de animais imunizados com as vacinas reprovadas e aprovadas por Habel, verifica-se que, a variação foi entre 0,457 e 0,688 e 0,759 e 0,848, respectivamente (1/100) e entre 0,104 e 0,204 e 0,209 e 0,239, respectivamente (1/800) (Apêndice H, p.131).



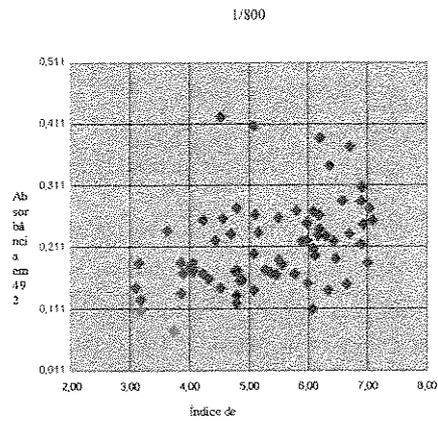
◆ aprovado por Habel e absorbância $\geq 0,512$ pelo teste Elisa indireto
 ◆ reprovado por Habel e absorbância $\geq 0,512$ pelo teste Elisa indireto
 ◆ reprovado por Habel e absorbância $\geq 0,512$ pelo teste Elisa indireto



◆ aprovado por Habel e absorbância $\geq 0,341$ pelo teste Elisa indireto
 ◆ reprovado por Habel e absorbância $\geq 0,341$ pelo teste Elisa indireto
 ◆ reprovado por Habel e absorbância $\geq 0,341$ pelo teste Elisa indireto



◆ aprovado por Habel e absorbância $\geq 0,225$ pelo teste
 ◆ reprovado por Habel e absorbância $\geq 0,225$ pelo teste
 ◆ reprovado por Habel e absorbância $\geq 0,225$ pelo teste



◆ aprovado por Habel e absorbância $\geq 0,111$ pelo teste
 ◆ reprovado por Habel e absorbância $\geq 0,111$ pelo teste
 ◆ reprovado por Habel e absorbância $\geq 0,111$ pelo teste

Figura 12: Relação entre os resultados obtidos nos testes de Habel e no ELISA indireto aplicados a 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil

Tabela 2: Distribuição de frequência absoluta e em percentagem (entre parênteses) da associação entre os valores de absorvâncias obtidos pela aplicação do ELISA indireto, segundo o valor do ponto de corte por diluição, a soros de animais imunizados com 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas testadas pelo teste de Habel (aprovação $\geq 10^{4,00}$)

		Teste de Habel		
		Reprovado (d ⁺)	Aprovado (d ⁻)	
1/100 (0,512)	S ⁻	3(100)	0(0)	3(4)
	S ⁺	6(9)	61(91)	67(96)
		9(13)	61(87)	70(100)
		Teste de Habel		
		Reprovado (d ⁺)	Aprovado (d ⁻)	
1/200 (0,341)	S ⁻	5(100)	0(0)	5(7)
	S ⁺	4(6)	61(94)	65(93)
		9(13)	61(87)	70(100)
		Teste de Habel		
		Reprovado (d ⁺)	Aprovado (d ⁻)	
1/400 (0,225)	S ⁻	7(100)	0(0)	7(10)
	S ⁺	2(3)	61(97)	63(90)
		9(13)	61(87)	70(100)
		Teste de Habel		
		Reprovado (d ⁺)	Aprovado (d ⁻)	
1/800 (0,111)	S ⁻	7(100)	0(0)	7(10)
	S ⁺	2(3)	61(97)	63(90)
		9(13)	61(87)	70(100)

4.4.4 Determinação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos de resultados positivo e negativo para o ELISA indireto

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos através do cálculo de sensibilidade, especificidade e os valores preditivos de resultados positivo e negativo (expressos em porcentagem), para cada diluição dos soros testados pelo ELISA indireto, comparativamente ao teste de Habel.

Observa-se que, a probabilidade estimada, de que um soro de animal vacinado, testado pelo ELISA indireto, cuja vacina usada foi reprovada pelo Habel, seja também reprovada pelo ELISA indireto, variou de 91% (diluição 1/100) a 97% (diluições 1/400 e 1/800) (Sensibilidade). A probabilidade estimada de que um soro de animal vacinado, testado pelo ELISA indireto, cuja vacina usada foi aprovada pelo Habel, seja também aprovada pelo ELISA indireto, é de 100% para todas as diluições testadas (Especificidade). Ainda, a probabilidade de que um soro de animal vacinado, testado pelo ELISA indireto, cuja vacina usada foi reprovada pelo Habel, seja aprovada pelo ELISA indireto, é de 100% para todas as diluições testadas (Valor preditivo de resultado positivo) e a probabilidade de que um soro de animal vacinado, testado pelo ELISA indireto, cuja vacina usada foi aprovada pelo Habel, seja reprovada pelo ELISA indireto é de 33% para a diluição 1/100, 44% para a diluição 1/200 e 78% para as diluições 1/400 e 1/800 (Valor preditivo de resultado negativo).

Tabela 3: Valores de sensibilidade, especificidade e os valores preditivos de resultados positivo e negativo, expressos em porcentagem, para cada diluição dos 70 soros testadas pelo ELISA indireto, comparativamente ao teste de Habel

ELISA indireto	Diluição dos soros			
	1/100	1/200	1/400	1/800
Parâmetros				
Sensibilidade (%)	91	92	97	97
Especificidade (%)	100	100	100	100
Valor preditivo positivo (%)	100	100	100	100
Valor preditivo negativo (%)	33	44	78	78

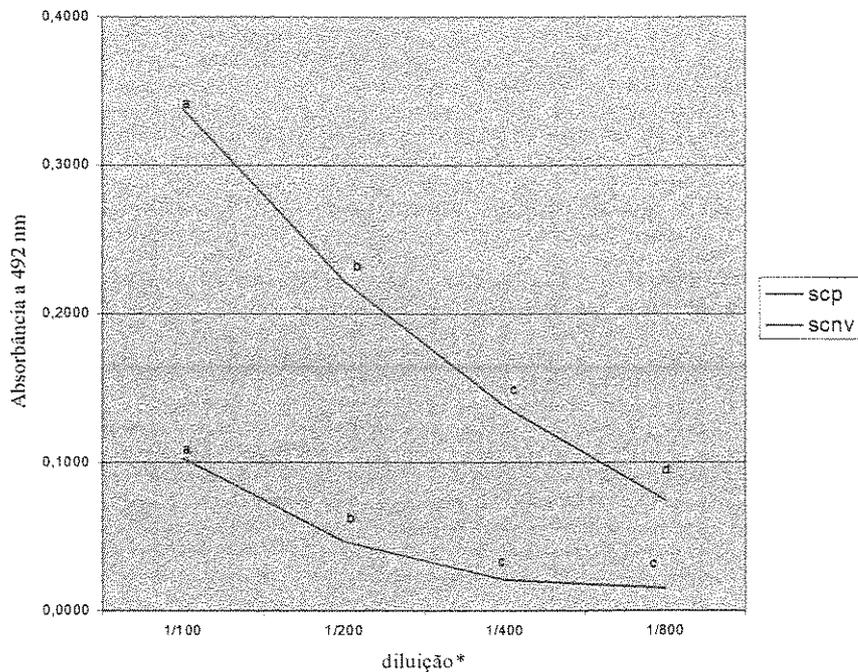
4.4.5 Determinação da diluição de uso dos soros no ELISA indireto

Visando utilizar apenas uma diluição de soro, na aplicação do ELISA indireto ao controle de vacinas anti-rábicas, em trabalhos subseqüentes, determina-se a diluição de uso. A figura 13 apresenta os resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto, expresso pela absorbância (\AA) a 492 nm, a soros de camundongos não vacinados (SCNV) e ao soro controle positivo (SCP), mostrando o comportamento das duas amostras frente às diluições 1/100 a 1/800 (média de seis repetições). Observa-se que as curvas formadas não apresentam perfis paralelos ($p < 0,05$).

A análise estatística aplicada às diluições dos referidos soros mostra que as médias gerais são diferentes ($\chi^2 = 27,63$; $p < 0,0021$). Pela ANOVA, observa-se que as médias gerais das \AA entre os SCP e SCNV também diferem estatisticamente ($F = 669,62$; $p < 0,0001$).

A estatística descritiva dos resultados dos SCP e SCNV, no ELISA indireto, está sendo apresentada no Apêndice I (p. 132). Para o soro controle positivo as médias das \AA diferem estatisticamente entre si para cada diluição (ns) ($F = 201,81$; $p < 0,0001$). Para o soro de camundongos não vacinados as médias das \AA também diferem estatisticamente entre as diluições (ns) ($F = 24,87$; $p < 0,0001$), porém, pelo teste de Student-Newmann-Keuls ressalta-se que as médias das \AA nas diluições 1/400 e 1/800 não apresentam diferença estatística significativa entre si ($p = 0,02072$ e $p = 0,01518$, respectivamente) (*), sendo menores que a média da diluição 1/200 (0,24655), que por sua vez é menor do que a da diluição 1/100 (0,10267).

A razão calculada entre os valores de \AA obtidos nas diferentes diluições do SCP e do SCNV, frente a uma diluição fixa de antígeno, está sendo mostrada na figura 14. Os valores obtidos foram 3,29 na diluição 1/100; 4,77 na diluição 1/200; 6,65 na diluição 1/400 e 4,91 na diluição 1/800 (Apêndice I, p. 132). Observa-se que a diluição 1/400 foi a que apresentou a maior razão entre os valores de \AA obtidos para os referidos soros.



*médias com as mesmas letras são não significantes ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Student-Newmann-Keuls

Figura 13: Comparação entre as médias dos valores das absorbâncias a 492 nm obtidos pela aplicação do ELISA indireto ao soro de camundongos não vacinados (SCNV) e ao soro controle positivo (SCP).

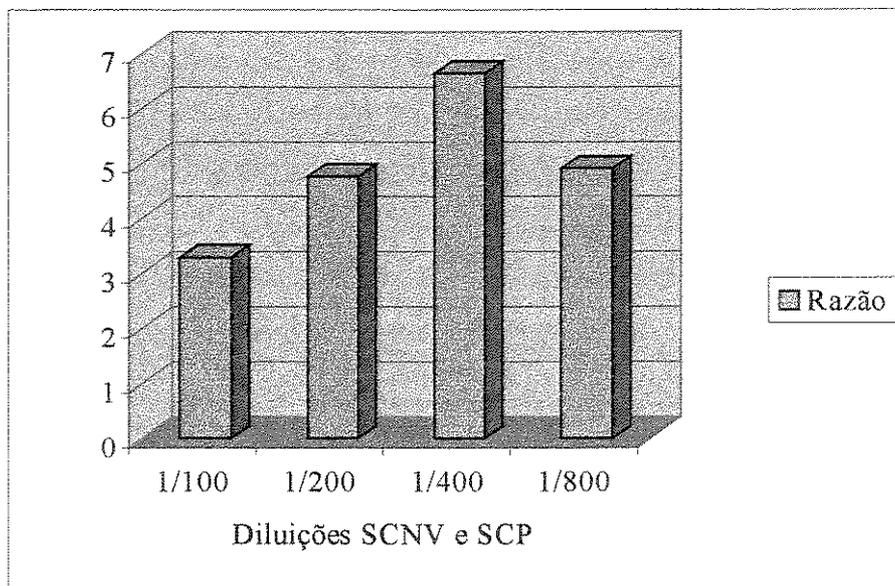


Figura 14: Razão entre os resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto ao soro controle positivo (SCP) e ao soro de camundongos não vacinados (SCNV)

4.5 Produção experimental da vacina de referência nacional

4.5.1 Cultura de células

As células BHK-21, C 13, apresentaram um crescimento adequado, com a obtenção de um tapete confluyente, no período de 48 a 72 horas. Na semeadura em garrafas tipo rolante, houve a formação de camada de células confluyente em 24 horas, conforme o ajuste da concentração celular.

4.5.1.1 Adaptação da amostra viral

A adaptação da amostra PV às células BHK-21, C 13, ocorreu após a 4^a passagem. Os materiais obtidos nas 2^{as} e 3^{as} passagens, coletados 72 horas pós-inoculação (pi), apresentaram ambos um valor de 0,5 µg/mL do conteúdo de glicoproteína total (cGT). Os materiais resultantes da 4^a passagem (amostra I e II) apresentaram rendimento satisfatório, sendo 0,8 µg/mL e 1,0 µg/mL de glicoproteína total, respectivamente (média de duas observações) (Tab. 4).

Através da análise estatística dos valores da quantificação do cGT das 2^{as}, 3^{as} e 4^{as} passagens, verifica-se, através da aplicação do GLM, que há diferença entre as médias dos valores de glicoproteína observados ($F=59,86$; $p<0,001$; $R^2=0,975552$). A aplicação da ANOVA demonstra que há diferença entre os resultados obtidos nas distintas passagens (2^a, 3^a e 4^{as}). Quando aplicado o teste de Tukey, a um nível de significância de $\alpha = 0,005$, que compara as passagens virais duas a duas, constata-se que existe diferença entre o grupo das 4^{as} (a) passagens e o grupo das 2^{as} (b) e 3^{as} (b) passagens, que não apresentam diferenças entre si (Tab. 4).

Tabela 4: Resultados obtidos pela quantificação do conteúdo de glicoproteína total, através do ELISA de imunocaptura, expressos em absorbância (Å) a 492 nm, nas suspensões virais, em 2^{as}, 3^{as} e 4^{as} (I e II) passagens, em células BHK

Amostra	Diluição das amostras					µg/mL	Tukey
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160		
2 ^a BHK	0,2565	0,1955	0,1425	0,1075	ND	0,5	b
3 ^a BHK	0,2495	0,1835	0,1415	0,995	ND	0,5	b
4 ^a BHK – I	0,3405	0,2735	0,1985	0,1515	ND	1,0	a
4 ^a BHK – II	0,3365	0,2405	0,1715	0,1175	ND	0,8	a
PSRV	1,1095	0,9575	0,7625	0,5155	0,2855	2,8	

Tukey para um nível de significância de $\alpha = 0,005$

ND=não determinado

4^a passagem I=amostra I e II=amostra II

PSRV= Semente padrão de produção do VR

4.5.1.2 Suspensões virais

As suspensões virais (5^a BHK) - obtidas em garrafas rolantes, através da inoculação simultânea da cultura de células, em suspensão, com o inóculo viral - resultaram em crescimento celular adequado, com formação de monocamada confluyente, em 24 horas e rendimento satisfatório das amostras coletadas 72 horas pi (1^a colheita) e 120 horas pi (2^a colheita).

A tabela 5 apresenta os resultados das titulações dessas suspensões em camundongos lactentes, com 4 a 6 dias de idade (CL) e em camundongos adultos jovens, com 11 a 14 gramas de peso vivo (CAJ) e da quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT), através da técnica ELISA de imunocaptura. Nota-se que, na 1^a colheita, os títulos variaram de $10^{7,00}$ doses letais 50%/mL (DL 50) a $10^{7,59}$ DL 50 e de $10^{5,68}$ DL 50 a $10^{6,41}$ DL 50, em camundongos lactentes e em camundongos adultos jovens, respectivamente e, na 2^a colheita,

os valores foram $10^{6,79}$ DL 50 a $10^{7,66}$ DL 50 e $10^{5,93}$ DL 50 a $10^{6,88}$ DL 50, quando testados em camundongos lactentes e em camundongos adultos jovens respectivamente.

Os valores da quantificação do cGT variaram, na 1ª colheita, de 0,3 µg/mL a 3,0 µg/mL e na 2ª colheita de 1,5 µg/mL a 5,0 µg/mL. Após mistura e composição das amostras finais de 1ª e 2ª colheita, as mesmas apresentaram 1,13 µg/mL e 1,43 µg/mL (Tab. 6).

Os resultados das titulações das suspensões virais (5^{as} passagens), em camundongos lactentes e em camundongos adultos jovens, quando relacionadas aos resultados das colheitas (1ª e 2ª), através da análise estatística dos valores obtidos, verifica-se pela aplicação do GLM, que há diferença entre as médias dos títulos obtidos frente a esses animais ($F=21,66$; $p<0,0001$; $R^2=0,764686$). Os resultados obtidos pela ANOVA mostraram que há diferença entre o uso das distintas idades de camundongos ($F=56,24$; $p<0,0001$) e também entre as colheitas (1ª e 2ª) ($F=6,87$; $p=0,0164$). Ao analisar-se conjuntamente essas variáveis, verifica-se que não existe diferença entre a interação idades e colheitas ($F=1,88$; $p=0,1856$). Considerando então, a diferença entre os resultados das titulações nas distintas idades e das colheitas, a aplicação do teste de Tukey mostra que os títulos em camundongos lactentes (a) apresentam médias diferentes dos títulos em camundongos adultos jovens (b) e as colheitas, 1ª (a) e 2ª (b) também apresentam valores de títulos virais diferenciados entre si. Ao analisar-se conjuntamente essas variáveis, verifica-se que não existe diferença entre a interação.

Os resultados da quantificação do cGT, nas suspensões virais, em 1ª e 2ª colheitas, avaliados através da análise estatística dos valores de \bar{A} obtidos por diluição, verifica-se pela aplicação do teste para modelos generalizados (GLM), que há diferença entre as médias obtidas nessas colheitas ($F=202,84$; $p=0,0006$; $R^2=0,996316$). Os resultados obtidos pela ANOVA mostraram que há diferença entre o cGT, nas suspensões virais, em 1ª e 2ª colheitas ($F=83,95$; $p=0,0027$), nas diluições (1/10; 1/20; 1/40 e 1/80) ($F=242,47$; $p<0,0004$) e tanto nas colheitas, como nas diluições, quando analisadas conjuntamente. Considerando então a diferença entre as colheitas e entre as diluições, a aplicação do teste de Tukey confirma a existência de diferença entre os valores de \bar{A} obtidos nas diluições empregadas (1/10 (a), 1/20 (b), 1/40 (c) e 1/80 (d) (Tab. 6).

Tabela 5: Resultados das titulações, em camundongos lactentes (CL) e camundongos adultos jovens (CAJ) e quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT) das suspensões virais (5^a passagem – 1^a e 2^a colheitas)

Colheita	Titulação em CL, com 4 a 6 dias de idade (DL 50/mL)					
	1 ^a	10 ^{7,00}	10 ^{7,09}	10 ^{7,10}	10 ^{7,11}	10 ^{7,52}
2 ^a	10 ^{6,79}	10 ^{7,19}	10 ^{7,40}	10 ^{7,64}	10 ^{7,66}	10 ^{7,66}
Colheita	Titulação em CAJ, com 11 a 14 g de peso vivo (DL 50/mL)					
	1 ^a	10 ^{5,68}	10 ^{6,14}	10 ^{6,14}	10 ^{6,21}	10 ^{6,23}
2 ^a	10 ^{5,93}	10 ^{6,67}	10 ^{6,68}	10 ^{6,79}	10 ^{6,83}	10 ^{6,88}
Colheita	Glicoproteína Total (µg/mL)					
	1 ^a	0,3	0,3	0,7	1,7	2,5
2 ^a	1,5	1,6	1,7	2,6	2,6	5,0

Tabela 6: Resultados da quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT), através do ELISA de imunocaptura, expressos pela absorvância (Å) a 492 nm, das suspensões virais, em 5^a passagem (1^a e 2^a colheitas)

		Diluição da amostra				µg/mL	Tukey
		1/10	1/20	1/40	1/80		
PSRV		1,1985	1,0400	0,8130	0,5625	3,0	
5 ^a BHK	1 ^a colheita	0,5400	0,4093	0,2997	0,1883	1,13	b
	2 ^a colheita	0,6547	0,5233	0,3850	0,2540	1,42	a
Tukey		a	b	c	d		

Teste de Tukey para um nível de significância de $\alpha = 0,005$

PSRV= Semente padrão de produção do VR

4.5.1.3 Composição antigênica

A partir dos resultados das titulações em camundongos lactentes (CL) e em camundongos adultos jovens (CAJ), e da quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT), foram selecionados lotes de suspensões virais para compor a preparação antigênica a ser usada na vacina de referência nacional experimental (VRN). Foram consideradas suspensões com títulos em camundongos lactentes e em camundongos adultos jovens acima de $10^{6,00}$ DL 50/mL e cGT, no intervalo de 1,5 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$, independente da colheita, que foram misturados e submetidos à concentração de 2 vezes em relação ao volume original, através do sistema cassete Millipore. Após a mistura e a ultrafiltração, a preparação antigênica apresentou títulos de $10^{7,66}$ DL 50 em CL e $10^{7,17}$ DL 50 em CAJ e cGT de 3,10 $\mu\text{g/mL}$, sendo então, o material dividido em duas frações para serem submetidas à inativação pela bromo etilenoimina binária e pela betapropiolactona.

4.5.1.4 Cinética de Inativação Viral

4.5.1.4.1 Inativação pela bromo etilenoimina binária

A cinética de inativação da suspensão viral, amostra PV, inativada pela bromo etilenoimina binária (BEI), durante 12 horas, determinada através da titulação em CL, de amostras coletadas a intervalo de uma hora (média de duas repetições), pode ser vista na figura 15. Os títulos determinados foram ajustados pela equação de regressão linear (Infectividade= $5,564-0,583$ hora)¹. A média dos títulos, que teve como ponto inicial ($10^{5,5636}$ DL 50) e final ($10^{-1,4359}$ DL 50) decresceu 0,583 DL 50 por hora, encontrando o valor zero antes das 10 horas de atuação da BEI.

Na figura 15 encontram-se também os resultados relativos à média de duas amostras coletadas a intervalo de duas horas, testadas pelo ELISA de imunocaptura para quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT). Os valores do cGT foram ajustados pela equação de regressão linear (Degradação viral= $3,129-0,035$ horas)². A média do cGT, que tiveram como

ponto 3,14 $\mu\text{g/mL}$ e final 2,705 $\mu\text{g/mL}$ decresceu 0,035 $\mu\text{g/mL}$ por hora, o que corresponde a um decréscimo de 0,424 $\mu\text{g/mL}$ em 12 horas, ou seja, uma redução de 13,55% da integridade das partículas virais.

Quando relacionados os parâmetros de infectividade e degradação viral, para a inativação com BEI, salienta-se o rápido decréscimo da infectividade, com a lenta redução da degradação viral (expressas em DL 50% e em $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), no decorrer do tempo (Fig. 15).

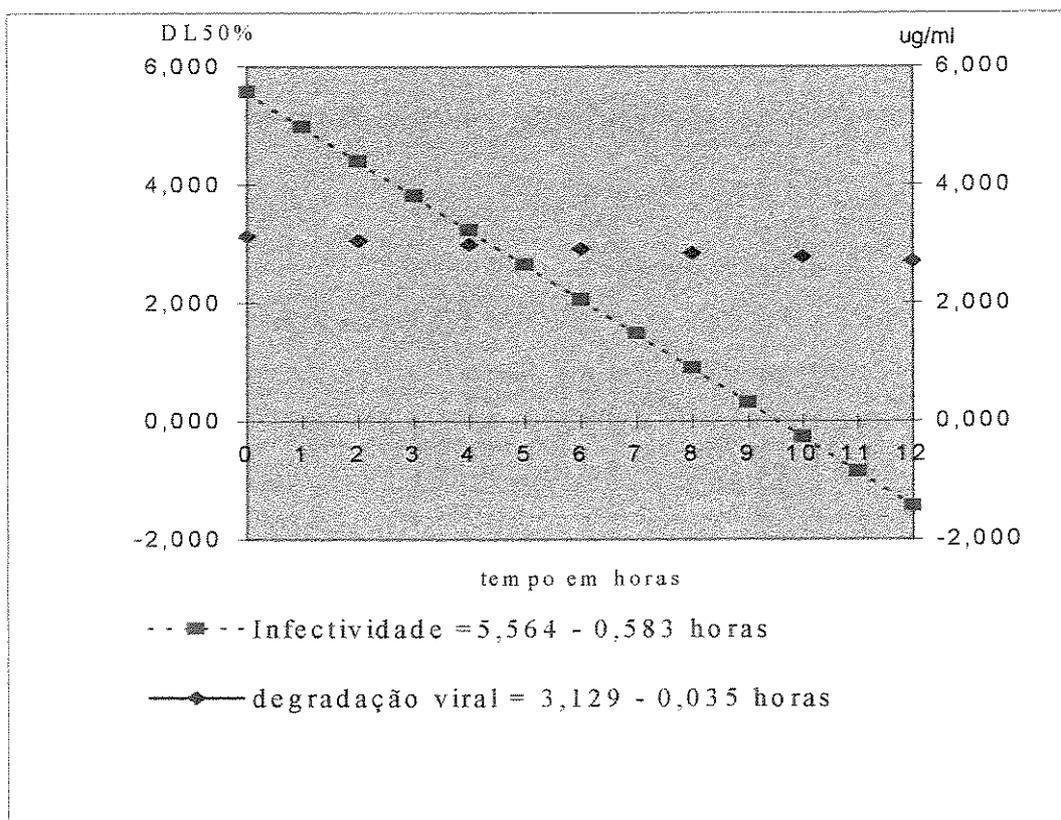


Figura 15: Cinética de inativação obtida pelo uso da bromo etilenoimina binária (BEI), medida através da titulação em camundongos lactentes (expressa em DL 50%) e da quantificação do conteúdo de glicoproteína total (expressa em $\mu\text{g/mL}$), ressaltando os parâmetros de infectividade e degradação viral, respectivamente

4.5.1.4.2 Inativação pela betapropiolactona

A cinética de inativação da suspensão viral, amostra PV, inativada pela betapropiolactona (BPL), durante 6 horas, determinada através da equação de regressão linear aplicada às titulações em camundongos lactentes (CL) de amostras coletadas a intervalo de uma hora, pela média de duas repetições, está sendo mostrada na figura 16. Observa-se que os títulos foram ajustados pela equação de regressão linear (Infectividade=5,481-1,179 horas). Os títulos médios, que tiveram como ponto inicial $10^{5,4814}$ DL 50) e final ($10^{-1,590}$ DL 50) decresceram 1,179 DL 50 por hora, encontrando o valor zero entre 5 e 6 horas de atuação da BPL.

Na figura 16 encontram-se também os resultados relativos à média de duas amostras coletadas a intervalo de duas horas, testadas pela técnica ELISA de imunocaptura para quantificação do conteúdo de glicoproteínas totais (cGT). Os valores do cGT foram ajustados pela equação de regressão linear (Degradação viral=2,781-0,059 horas). A média do cGT, que teve como ponto inicial 2,781 $\mu\text{g/mL}$ e final 2,425 $\mu\text{g/mL}$ decresceu 0,059 $\mu\text{g/mL}$ por hora, o que corresponde a um decréscimo de 0,356 $\mu\text{g/mL}$ em 6 horas, ou seja, uma redução de 12,80% da integridade das partículas virais.

Analogamente à inativação pela BEI, quando relacionados o comportamento da infectividade e da degradação viral, para a inativação com a BPL, salienta-se o rápido decréscimo da infectividade, com a lenta redução da degradação viral (expressas em DL 50 e em $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) no decorrer do tempo (Fig. 16).

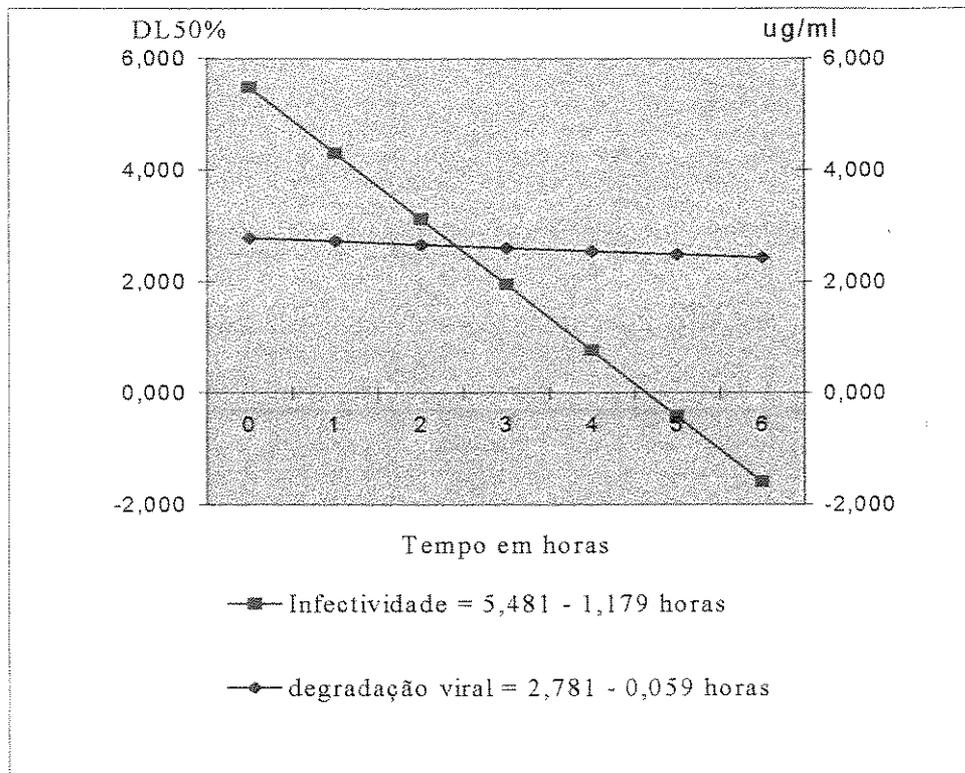


Figura 16: Cinética de inativação obtida pelo uso da betapropiolactona (BPL), medida através da titulação em camundongos lactentes (expressa em DL 50%) e da quantificação do conteúdo de glicoproteína total (expressa em $\mu\text{g/mL}$), ressaltando os parâmetros de infectividade e degradação viral, respectivamente

4.5.1.4.3 Relação entre a inativação pela BEI e pela BPL

A relação entre a inativação pela BEI e pela BPL, está sendo mostrada na figura 17, pelas curvas de cinética de inativação, representadas pelas equações lineares estimadas com 100% de explicação e parâmetros altamente significativos sobre os resultados das titulações em camundongos lactentes (CL), expressas pela porcentagem de redução da infectividade viral, no tempo de exposição ao respectivo inativante. A infectividade viral sob ação da BEI sofreu redução de 10,48%/h, enquanto sob ação da BPL a redução foi de 21,50%/h.

Quando relacionados os processos de inativação pela BEI e BPL através da análise das equações de regressão linear sobre os resultados da quantificação do cGT, expressa em $\mu\text{g/mL}$, que mede a degradação viral durante o tempo de exposição aos respectivos inativantes, observa-se que as inclinações das respectivas equações são diferentes estatisticamente ao nível de probabilidade de 5%, mostrando que não podem ser expressas por

uma única equação (Fig. 18). Pela atuação da BEI o cGT da suspensão viral decresceu 0,035 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{h}$, enquanto sob ação da BPL o decréscimo foi de 0,058 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Quanto aos dois interceptos esses também apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade. Os valores observados pela suspensão viral submetida ao tratamento pela BEI são significativamente maiores que os observados no tratamento pela BPL.

A figura 19 mostra os resultados obtidos pela quantificação do cGT nas suspensões virais submetidas à inativação pela BEI e pela BPL, antes (3,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambas) e depois da inativação (2,41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a BEI e 2,420 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a BPL), após 12 horas e 6 horas, respectivamente. É mostrado também o conteúdo de glicoproteínas insolúvel (cGI) pela BEI (1,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e pela BPL (2,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) após a inativação.

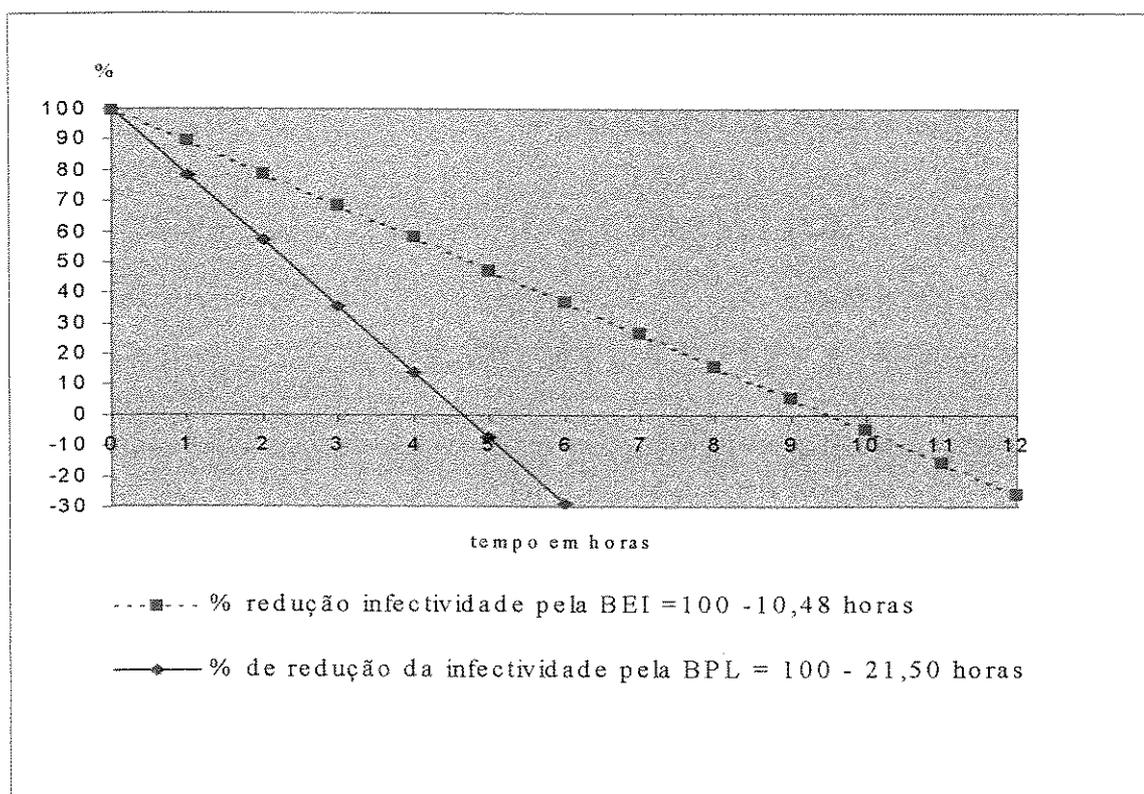


Figura 17: Comparação entre a inativação pela bromo etilenoimina binária (BEI) e pela betapropiolactona (BPL), através da equação de regressão linear dos resultados obtidos pela titulação em CL (DL 50), expressa em porcentagem de redução da infectividade viral

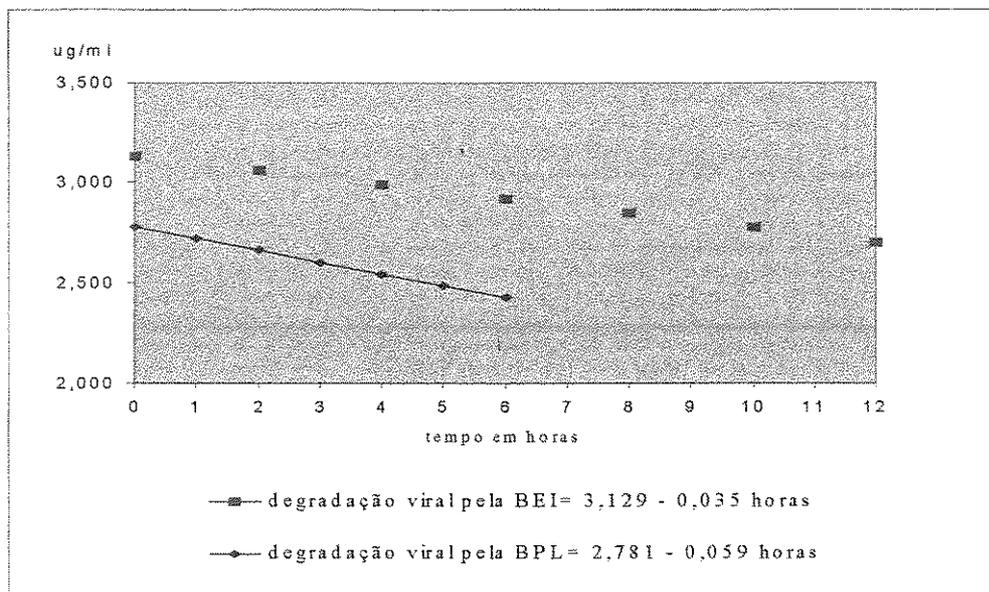


Figura 18: Comparação entre a inativação pela bromo etilenoimina binária (BEI) e pela betapropiolactona (BPL), através da equação de regressão linear dos resultados obtidos pela quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT), expressa em µg/mL

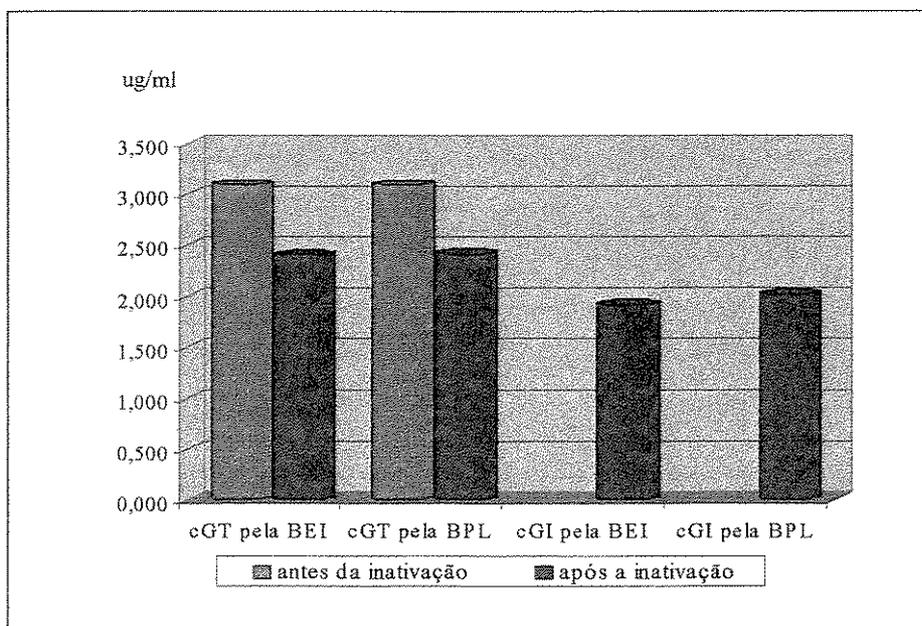


Figura 19: Resultados obtidos pela quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT) e insolúvel (cGI), expressas em µg/mL, antes (ai) e após (pi) a inativação pela bromo etilenoimina binária (BEI) e pela betapropiolactona (BPL)

4.5.2 Testes de controle

4.5.2.1 Testes de inocuidade

4.5.2.1.1 Vírus residual

No teste de vírus residual ou inativação viral, os animais inoculados com as duas amostras testadas não apresentaram nenhuma alteração que pudesse ser atribuída à infecção rábica, mostrando-se em perfeitas condições de saúde durante todo o período de observação.

4.5.2.1.2 Toxicidade

No teste de toxicidade não foram observadas reações locais e/ou gerais (sistêmicas), nenhum caso de morte nos camundongos inoculados e tampouco nas cobaias, não houve redução de peso das mesmas, parâmetro também considerado aceitável, em nenhuma das duas amostras testadas.

4.5.2.2 Teste de esterilidade

Na verificação da esterilidade, os tubos inoculados com as amostras A e B não apresentaram crescimento bacteriano ou fúngico, durante todo o período de observação.

4.5.2.3 Testes de potência

4.5.2.3.1 Teste de Habel

Os resultados do teste de Habel (média de duas observações) aplicado às amostras A₁ e A₂ (inativadas pela BEI) e B₁ e B₂ (inativadas pela BPL), consideradas de acordo com a hidratação após liofilização (A₁ e B₁ - 5x concentradas e A₂ e B₂ - 10x concentradas) são apresentados na tabela 7.

4.5.2.3.2 Teste NIH

Os resultados do teste NIH (média de duas observações) aplicado às amostras A₁ e A₂ (inativadas pela BEI) e B₁ e B₂ (inativadas pela BPL), consideradas de acordo com a hidratação após liofilização (A₁ e B₁ - 5x concentradas e A₂ e B₂ - 10x concentradas),

comparativamente à vacina de referência do INPPAZ, com valor antigênico (VA) previamente estabelecido de 1 UI/mL são mostrados na tabela 7.

4.5.2.4 Teste de imunogenicidade

A resposta imune humoral induzida a camundongos imunizados com as vacinas experimentais A₁, A₂, B₁, B₂ e VRI (nas diluições 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 e 1/3125) está sendo mostrada na tabela 8. Os resultados observados, através da quantificação de anticorpos IgG pelo ELISA indireto, executado na diluição 1/400 mostram que os valores de absorbância são função da concentração antigênica em uma dada diluição da vacina, pois decrescem, conforme aumenta a diluição.

4.5.2.5 Teste de proteção

A proteção conferida pelas amostras A₁, A₂, B₁ e B₂ comparativamente à vacina de referência do INPPAZ (VRI) está sendo mostrada na figura 20 através das curvas de proteção estimada pelas respectivas amostras em função do logaritmo da diluição, em base 10 (log₁₀ diluição).

Os resultados da análise de probito indicam que os dados apresentam uma distribuição normal, confirmado pelo Qui-quadrado (Apêndices J e L, p. 133). A estimativa da probabilidade de proteção (ep) segue uma função normal de probabilidade acumulada, considerando para VRI (p=0,5494), para A₁ (p=0,5421), para A₂ (p=0,8544), para B₁ (p=0,4331) e para B₂ (p=0,5542), podendo-se estimar os probitos para as DL 50 pelos parâmetros estimados (limites fiduciais de confiança a 95% de probabilidade). As estimativas das DL 50, com seus limites de confiança foram para VRI DL 50=125, com limites de confiança variando entre 67 e 239; para A₁ uma DL 50=286, com limites de confiança variando entre 105 e 1043; para A₂ uma DL 50=509, com limites de confiança variando entre 194 e 1043; para B₁ uma DL 50=344, com limites de confiança variando entre 82 e 4.303; e, para B₂ uma DL 50=560, com limites de confiança variando entre 168 e 5.490 (Apêndice J, p. 133).

Tabela 7: Resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel e do NIH (pela média de duas observações) às amostras A₁, A₂, B₁ e B₂, produzidas experimentalmente e do NIH da vacina de referência do INPPAZ (VRI)

Amostras	Habel	NIH	
	Índice	Dose Efetiva 50% DE 50	Valor antigênico VA (UI/mL)
VRI		145	1,00
A ₁	10 ^{4,47}	283	1,95
A ₂	10 ^{5,74}	478	3,32
B ₁	10 ^{4,80}	273	1,89
B ₂	10 ^{5,45}	381	2,64
CVS (DL 50)	10 ^{7,49}		36,5

Tabela 8: Resultados do teste de imunogenicidade obtidos pela aplicação do ELISA indireto, na diluição 1/400, expresso pela absorbância (Å) a 492 nm, a soros de camundongos vacinados com as vacinas experimentais A₁, A₂, B₁ e B₂ e com a VRI

ELISA indireto (Å) Diluição 1/400	Diluições das vacinas				
	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3.125
A ₁	0,1350	0,1230	0,0870	0,0650	0,0330
A ₂	0,2280	0,1230	0,1040	0,0720	0,0290
B ₁	0,1790	0,1190	0,0940	0,0930	0,0490
B ₂	0,2280	0,2110	0,1280	0,0690	0,0640
VRI	0,1428	0,1042	0,1115	0,0697	0,0530

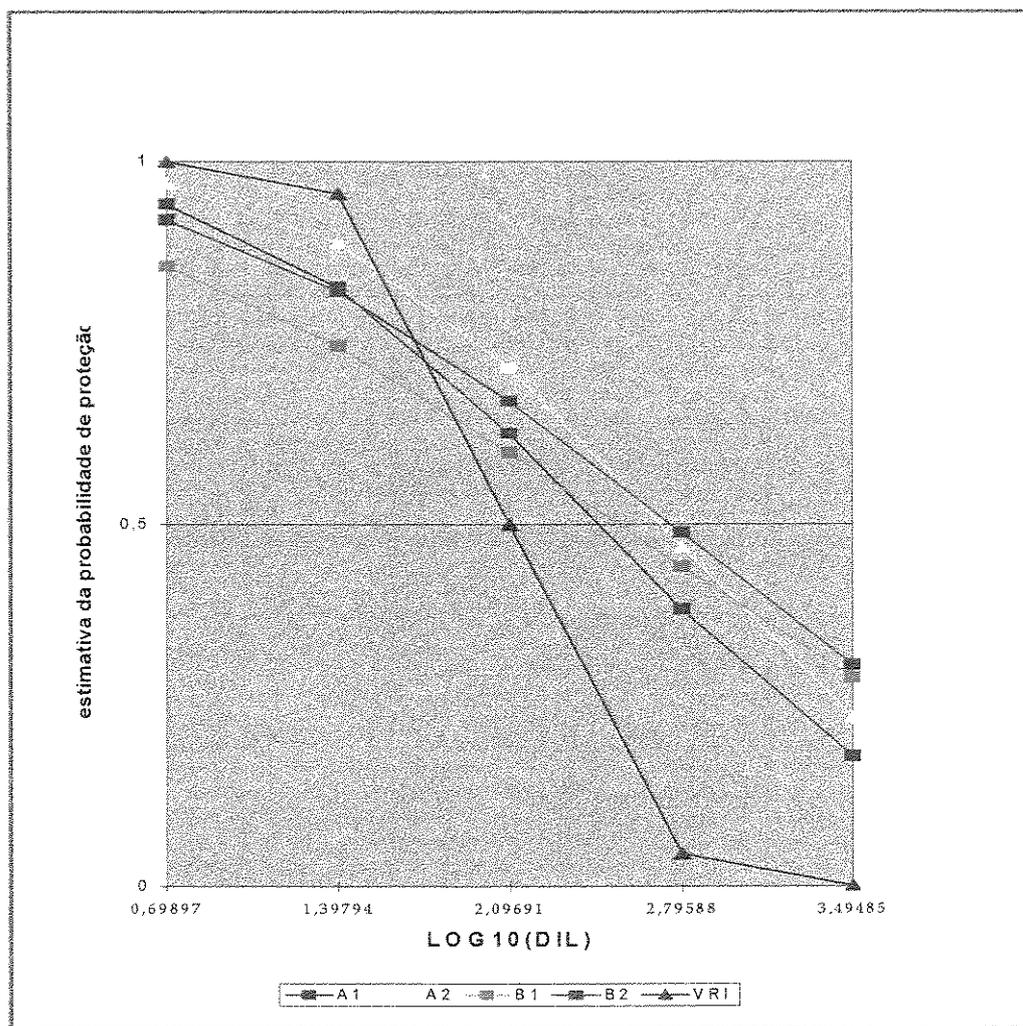


Figura 20: Estimativa da probabilidade de proteção conferida pelas vacinas experimentais A₁, A₂, B₁ e B₂, comparativamente à VRI

5 DISCUSSÃO

O controle da raiva está diretamente associado à aplicação de medidas profiláticas, dentre as quais a vacinação é uma das principais ações de controle, sendo que o uso de vacinas de alto poder imunogênico constitui um dos fatores de maior importância. O controle de vacinas é essencial para garantir a qualidade do produto final. Por isso vem sendo alvo de incessantes questionamentos quanto à eficácia das provas de controle; assim, o aprimoramento das provas já existentes e a incorporação de técnicas mais avançadas têm sido uma preocupação constante de diversos pesquisadores (ESPESETH, 1996; SIZARET, 1996).

Através de avaliação oficial da eficácia de vacinas anti-rábicas para uso animal, de origens e procedências diferentes, utilizadas no Brasil, no período de 1988 a 1996, pela aplicação do teste de Habel, foi possível a VAZ (1999) concluir que o teste de potência foi a principal causa de reprovação das vacinas inativadas, tanto as nacionais como as importadas. Segundo a autora, reprovações no teste de potência podem ser indício de que provavelmente esteja ocorrendo, na indústria produtora, problemas com relação à obtenção de um imunógeno realmente capaz de estimular o sistema imunológico a conferir proteção contra o vírus da raiva, ressaltando a importância de se utilizar antígenos bem caracterizados, métodos consistentes de produção, equipamentos validados e de se testar e documentar os procedimentos utilizados na fabricação da vacina (PERRIN *et al.*, 1990; SIZARET, 1996; GUPTA, 1997).

Dentre os testes de potência mais utilizados, citam-se: o teste de Habel, que é do tipo de ruptura de imunidade (HABEL, 1976), apresentando boa reprodutibilidade, sendo, portanto, confiável (BAER, 1985) e ainda utilizado no Brasil (BRASIL, 1988); e o NIH, que é basicamente um método de extinção de antígeno, no qual, a exemplo do primeiro, a imunização é feita pela via intraperitoneal (i.p.) e o desafio viral com o vírus padrão de prova – CVS - pela via intracerebral (i.c.) (BAER, 1985; DIAZ *et al.*, 1989; WILBUR & AUBERT, 1996).

Observando-se os parâmetros estatísticos calculados para os valores dos índices obtidos pela aplicação do teste de Habel às 210 partidas de vacinas anti-rábicas testadas nesses ensaios, nota-se que se trata de uma distribuição normal de resultados, conforme mostrada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($D=0,455$; $P>0,05$), com simetria, estando a média (5,09) e

a mediana (5,16) bastante próximas também no conjunto de vacinas aprovadas e reprovadas (Apêndice B, p. 128).

O percentual de aprovação observado para essas 210 partidas (82,3%) (Tab. 1), quando comparado aos valores encontrados por VAZ (1999) - 93,4% para vacinas de origem nacional e 98,2% em vacinas importadas - também, pela aplicação do teste de Habel, mostraram-se um pouco inferiores. Acredita-se que, embora, o mesmo tipo de vacina tenha sido utilizada nos dois estudos, essa pequena discrepância de resultados possa ser atribuída à grande diferença da amostragem, pois a referida autora trabalhou com 1551 partidas. Pode-se considerar ainda, que a vacina produzida em tecido cerebral (com 100% de aprovação em ambos os trabalhos) ensaiada pela autora, numa proporção em torno de 60% do total de amostras tenha influenciado na elevação dos resultados. No presente estudo, optou-se pela proporção de apenas 20%, para evitar uma freqüência muito alta desse tipo de vacina.

Comparando-se os percentuais de aprovação segundo o substrato utilizado na produção das vacinas (73% para as produzidas em células BHK e 100%, tanto para as produzidas em células NIL-2 como em tecido cerebral) com os obtidos por VAZ (1999) (76,3%, 98,5% e 100%, respectivamente), confirma-se a excelente imunogenicidade desses dois tipos de vacinas, em especial das produzidas em tecido cerebral. Observa-se uma grande aproximação entre os resultados, sendo que, nas vacinas produzidas em cérebro de camundongos, há total concordância tanto com os resultados observados por VAZ (1999) como com o trabalho de DIAZ *et al.* (1989). Em relação às vacinas produzidas em células NIL-2, provavelmente seja também possível considerar que há concordância, tendo em vista, a grande aproximação dos percentuais de aprovação encontrados nesse estudo e nos apresentados por VAZ (1999), que cita serem compatíveis com os resultados obtidos por SOULEBOT (1982), que também verificaram que vacinas produzidas nesse substrato conferiram igual proteção ou até mais alta do que as vacinas atenuadas.

Por outro lado, HAYASHI *et al.* (1984), testando uma vacina preparada em cérebros de camundongos, utilizada extensivamente para vacinação canina em massa, observaram que doses dessa vacina, a qual protegeu 100% de camundongos contra 10.000 DL 50% de CVS, conferiram níveis de proteção variáveis frente a 24 amostras de vírus rábico isoladas de diferentes animais silvestres, sendo que os mais baixos níveis de proteção (15% a 20%) foram observados quando se usaram as amostras de bovinos para desafio.

Diferentes graus de proteção, em camundongos, foram também relatados por ZANETTI *et al.* (1998), em testes com vacina produzida em cérebros de camundongos infectados com o vírus de produção PV, correntemente usado no Brasil para imunização humana. Esses autores, usando os testes de potência Habel e NIH, para avaliar a atividade de proteção da vacina, constataram que os camundongos vacinados apresentaram uma alta resistência ao desafio com o CVS, o que não aconteceu quando utilizaram amostras de rua para o desafio, sugerindo que a proteção é claramente dependente da amostra de vírus usada no desafio.

Além disso, apesar das vacinas anti-rábicas testadas nesse trabalho terem sido produzidas em culturas de células infectadas com amostras obtidas, na grande maioria, a partir da amostra PV (121), derivada da amostra original Pasteur, algumas foram produzidas com as amostras ERA (12), SAD (4) e Flury LEP (3), antigenicamente diferentes das amostras de Pasteur (CRICK & BROWN, 1978; SACRAMENTO *et al.*, 1992). É interessante notar que, das vacinas produzidas em células BHK frente às distintas amostras de vírus (PV, ERA, SAD e Flury LEP) utilizadas, aquela preparada pela infecção dessas células com o vírus de produção PV foi a que apresentou o mais baixo percentual de aprovação (71,03%). É importante salientar que o estudo, em pauta, não foi delineado para avaliar a significância das percentagens de aprovação das vacinas testadas, não sendo por isso aplicado teste estatístico sobre esse parâmetro para possibilitar a análise da influência do grau de proteção induzido pela variação do vírus de produção utilizado nessas vacinas.

Curiosamente, há relatos afirmando que o desafio heterólogo com o CVS pode medir apenas 20% da potência de uma vacina, não se observando uma correlação satisfatória, nesta situação (na qual ocorre vacinação pela via i.p. e desafio pela via i.c.), entre os valores antigênicos de uma vacina determinados por esse teste com a imunogenicidade desta vacina, no hospedeiro animal (BARTH *et al.*, 1988). Tais autores admitem que, na vacinação i.p., há mais atividade soroneutralizante contra uma amostra homóloga do que contra uma heteróloga, o que explica uma maior habilidade de vacinas derivadas da amostra Pasteur a protegerem contra o desafio com CVS (também derivada da amostra Pasteur).

ZANETTI *et al.* (1998), também trabalhando com a amostra PV, demonstraram que, ao testar a vacina produzida em cérebros de camundongos infectados com este vírus, somente encontraram uma potência relativa suficiente para liberação quando a amostra viral utilizada

no desafio foi o CVS, enquanto com as amostras de rua a potência foi sempre menor que a exigida, indicando claramente a falha de proteção induzida pela vacinação. Entretanto, LARGHI *et al.* (1979) observaram, com vacina produzida com o vírus PV em células BHK, inativada por etilenoimina e contendo hidróxido de alumínio como adjuvante, um nível de proteção (89%) um pouco acima do encontrado aqui (71,03%). SILVA *et al.* (2000) atribuíram também a obtenção de resultados conflitantes, na titulação de anticorpos, ao emprego de amostras de vírus, como antígeno, diferentes daquelas utilizadas na produção das vacinas testadas. Os mesmos autores referem-se a relato recente de que pessoas recebendo vacinas de culturas de células produzidas com a amostra PM apresentavam, significativamente, maiores títulos neutralizantes, quando os soros eram testados frente ao CVS, do que quando testados com o vírus PV.

Os percentuais de aprovação observados aqui, para as vacinas produzidas com a amostra ERA (91,66%), apesar de apenas 12 partidas terem sido testadas, foram compatíveis com os resultados de ERBOLATO *et al.* (1989) e CORDEIRO *et al.* (1990), que, utilizando também o teste de Habel, verificaram altos níveis de proteção induzidos pela vacina ERA inativada frente ao vírus padrão de prova - CVS - e também frente às variantes brasileiras do vírus rábico, selecionadas através de um painel de anticorpos monoclonais. Porém, os resultados foram incompatíveis com os de VAZ (1999), que encontrou maiores percentuais de reprovação (34,3%) em vacinas produzidas com essa amostra. Além disso, embora sem o suporte estatístico exigido, cujas razões foram mencionadas anteriormente, é importante considerar que o número discrepante entre as partidas de vacinas produzidas com cada amostra viral pode influenciar nos percentuais de aprovação das mesmas. No entanto, uma análise estatística se faz necessária para confirmar uma possível influência.

As variações no grau demonstrável de imunidade dos animais observadas pelo desafio com diferentes amostras de produção de vacinas têm sido minimizadas pelo uso do vírus padrão de prova (CVS), desenvolvido a partir da amostra original Pasteur (SIZARET, 1996), porém há relatos de que vacinas preparadas com vírus relacionados ao CVS apresentaram potência relativa mais alta que as vacinas preparadas com outros vírus de produção (BARTH *et al.*, 1988).

Considerando que o CVS utilizado nas provas de Habel foi ajustado para apresentar títulos variando entre $10^{6,0}$ e $10^{8,0}$ doses letais 50% camundongo/0,03 mL i.c. (DL 50), os

resultados obtidos nesses ensaios são aceitáveis. Verifica-se, pela análise dos resultados, que favoravelmente os títulos obtidos para esse vírus mostram média (7,309) e mediana (7,45) muito próximas e nas maiores classes de distribuição de frequência (3 e 4) estão localizados os valores de títulos entre 6,85 e 7,25, muito próximos de 7,0, que seria o valor ideal. Apesar disso, resulta numa distribuição assimétrica em torno do valor médio, não apresentando pontos discrepantes (Fig. 3). Nota-se ainda que os dados pertencem a uma distribuição normal, mostrada através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($D=0,064$; $p>0,05$) e confirmada pelo Qui-quadrado ($\chi^2=4,155$; $p=0,245$).

Com relação aos resultados obtidos no NIH quando aplicado às mesmas 210 partidas de vacinas, maiores variações foram encontradas nos parâmetros estatísticos (Fig. 4). Verifica-se pela distribuição de frequência dos resultados, expressos em valores antigênicos (VA), que os dados não pertencem a uma distribuição normal, demonstrado através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($D=0,151$; $p<0,01$) e do Qui-quadrado ($\chi^2=13,563$; $p=0,330$). Observa-se alta variabilidade na distribuição desses valores antigênicos (Fig. 4); o coeficiente de variação está em torno de 80% nas três situações analisadas e apresenta assimetria à direita, pois a mediana mostra-se sempre inferior à média (Apêndice C, p. 128). Considerando os dados gerais, observa-se uma grande amplitude de variação entre o valor máximo e mínimo (9,78) e que há uma maior probabilidade de obter-se valores baixos, 25% menores do que 0,98, 50% menores do que 1,98 e 75% menores de 3,77, isto é, o restante dos valores (25%) encontram-se distribuídos acima de 3,77 até 10,01, com uma amplitude que varia em torno de 6,24 (Apêndice C, p. 128). Isso mostra que a probabilidade de ocorrência dos valores antigênicos no teste NIH diminui conforme os seus valores vão crescendo. E isto parece ser um padrão próprio desses resultados.

Tal comportamento pode ser, provavelmente, devido ao fato de esse teste encontrar-se em fase de implantação, ao uso de diferentes vacinas de referência, em virtude de não haver disponibilidade de vacina de referência nacional, e outras variações relacionadas ao ajuste do vírus de desafio. Na prática atual do LARA/SP, o uso de CVS preparado em camundongos livres de patógenos específicos ("SPF") tem sido uma alternativa para melhorar o desempenho qualitativo dos testes de controle.

Acredita-se que a variabilidade observada, no NIH é compatível com as razões apontadas por vários autores (BARTH *et al.*, 1988; WUNDERLI *et al.*, 1991; SIZARET,

1996) os quais atribuem as diferenças nos resultados desses testes e a sua insatisfatória reprodutibilidade a uma seqüência de fatores, dentre os quais: os diferentes tipos de vacinas e diferentes amostras de vírus utilizadas na produção dessas vacinas; o uso de diferentes preparações de referência; a natureza do método, no que diz respeito à imunização i.p. e o desafio i.c., bem como o uso de diferentes níveis e número de passagens do CVS usado para o desafio. Esses autores relatam ainda, que a reatividade padrão com anticorpos monoclonais anti-glicoproteínas do vírus rábico em antisoros dos membros do grupo da amostra CVS não é uniforme.

Além disso, admite-se compatibilidade também com os resultados obtidos no NIH, por PIZA *et al.* (2002), que testando quatro lotes de vacinas, encontraram valores antigênicos variando entre 0,59 UI/mL e 12,1 UI/mL, não observando nenhuma correlação entre esse teste e os títulos de anticorpos induzidos em bovinos, quantificados através de vírus neutralização e nem com o conteúdo de glicoproteínas das referidas vacinas.

Outro aspecto importante está relacionado ao fato de os testes de Habel e o NIH apresentarem uma demanda de considerável quantidade de animais de laboratório, o alto custo na manutenção desses animais, o tempo de duração do teste e a variação entre a população e na qualidade dos animais empregados (BARTH *et al.*, 1988; WUNDERLI *et al.*, 1991; VAZ, 1999). Para a obtenção de bons resultados, os animais deverão estar em bom estado de saúde, na idade indicada, responder eficientemente frente à conhecida vacina ou antígeno e apresentar uniformidade de resposta (SIZARET, 1996).

Foi demonstrado por WUNDERLI *et al.* (1991) que houve correlação entre a neutralização viral e a mortalidade em duas linhagens de camundongos testadas, no entanto, segundo os mesmos autores, podem ocorrer exceções, mas não parecem ser marcadamente significativas. Estas observações foram compatíveis com as de outros pesquisadores, citados por WUNDERLI *et al.* (1991), que têm reportado, que embora os anticorpos sejam bons indicadores de proteção ao desafio com o vírus da raiva, podem não ser a absoluta evidência dessa proteção.

Quanto à relação entre os resultados obtidos pelo CVS (DL 50) e as doses efetivas 50% (DE 50) das vacinas de referência utilizadas, nos testes NIH, verifica-se que não apresentaram correlação ($r=0,088$), os valores são não significativos ($p=0,569$) e não há uma relação linear entre os parâmetros (Fig. 6), sendo então, aplicada uma transformação estatística

aos dados para que fossem linearizados. Somente desta forma se obteve uma regressão linear bem ajustada (Fig. 7), não permitindo, porém, que o modelo fosse utilizado para fazer previsões de dados.

Segundo relato de alguns autores (BARTH *et al.*, 1988; WUNDERLI *et al.*, 1991), no NIH, a via de imunização, o número de doses de vacinas utilizadas e a dose de desafio viral podem permitir a aprovação de uma vacina pobremente imunogênica, possibilitando que um antígeno fraco possa parecer satisfatório; além disso, o teste mostra melhor eficácia com vacinas derivadas de mesma amostra parental do vírus-desafio. Entretanto, provavelmente, o NIH apresente um maior rigor na aprovação de partidas de vacinas anti-rábicas porque, ao comparar-se os resultados deste com os de Habel, verifica-se que o NIH, segundo os limites de 0,9 a 1,1, reprovou entre 22,38% e 28,1%, respectivamente, percentuais esses sempre superiores aos obtidos por aquele teste (17,62%) (Fig. 8 e Tab. 1). O rigor do NIH aumenta na medida que aumenta o limite do valor antigênico (VA) obtido (Tab. 1), podendo-se considerar que um bom resultado seria aquele que diminui o risco de aprovar uma partida de vacina por NIH, sendo que teria sido reprovada pelo teste de Habel.

A comparação entre o teste de Habel e o NIH, através do teste de Pearson revela que a correlação (45%) obtida entre os dois testes é baixa, porém, considerando o valor de $p < 0,001$, mostra que é muito significativa.

Ao verificar-se estatisticamente a igualdade entre as proporções de partidas de vacinas aprovadas por Habel e NIH (Tab. 1), observa-se que a partir do valor de corte 0,98 ($p = 0,041$) a percentagem estimada de partidas de vacinas reprovadas por NIH e aprovadas por Habel (68,42%) é significativamente maior do que a percentagem estimada de partidas aprovadas por NIH e reprovadas por Habel (58,58%), corroborando com a idéia de que o NIH apresenta, provavelmente, maior rigor na aprovação dessas vacinas.

Considerando que o valor de corte diferencia as proporções de aprovação por Habel e o NIH e encontra-se acima de 0,98, cujo $p = 0,041$ (baixa significância) está mais próximo do ponto crítico (5%) e muito próximo do valor recomendado (1 UI) pela OMS para aprovação das vacinas de uso veterinário (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1999), sugerindo o uso oficial de 1 UI para o limite de aprovação no referido teste.

A qualidade das vacinas anti-rábicas pode também ser avaliada pela aplicação de técnicas “in vitro”. Assim, vários métodos vêm sendo propostos para testar a qualidade das

vacinas inativadas. Dentre eles, os mais comumente utilizados para a detecção e quantificação de anticorpos são a soroneutralização (SN) em camundongos e o teste rápido de inibição de focos fluorescentes (IRFF), que são os métodos indicados pela OMS (ATANASIU *et al.*, 1978; BARTH *et al.*, 1988). A reação imunoenzimática ELISA vem se apresentando como um método alternativo à SN, permitindo avaliar a concentração de anticorpos pós-vacinação e, conseqüentemente, a qualidade das vacinas anti-rábicas (NICHOLSON & PRESTAGE, 1982; KAVAKLOVA *et al.*, 1984; PERRIN *et al.*, 1986; MEBATSION *et al.*, 1989; ELMGREN & WANDELER, 1996; PIZA, *et al.*, 1999).

A aplicabilidade do ELISA indireto ao controle de vacinas anti-rábicas foi avaliada, no presente estudo, comparativamente ao teste de Habel, sendo testadas pelos dois métodos, 70 partidas de vacinas inativadas comerciais, de uso animal, de origens e procedência diferentes, recebidas para os testes de controle oficial.

Nesta comparação, o teste de Habel, quando aplicado às 70 partidas de vacinas, apresentou diferentes níveis de índices frente a esse teste, mostrando uma distribuição de frequência normal de resultados (Fig. 9), com índices bem distribuídos em torno da média e com apresentação de simetria, estando a média (5,32) e a mediana (5,42) muito próximas entre si, indicando que os dados tendem a uma distribuição normal (Apêndice D, p. 129). Tal comportamento foi demonstrado pela aplicação do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($D= 0,073$; $p>0,05$) e confirmado pelo Qui-quadrado ($\chi^2=3,679$; $p=0,451$), usado como auxiliar a esse teste.

Apesar de um menor número de partidas de vacinas ter sido testado, observou-se um padrão de resultados muito semelhante ao observado anteriormente, quando foram testadas 210 outras partidas de vacinas por esse método (Fig. 2). A curva mostrou o mesmo padrão nos dois conjuntos de dados (Fig. 2 e Fig. 9). A estatística descritiva, do teste de Habel, apresentando no primeiro conjunto de dados, valores de média (5,09), mediana (5,16) e coeficiente de variação (21,25%) e no segundo, média (5,32), mediana (5,42) e coeficiente de variação (20,83%) muito próximos (Apêndice B, p. 128 e Apêndice D, p. 129, respectivamente), bem como, a grande proximidade nos percentuais de aprovação (82,38% no primeiro e 87,14% no segundo) são compatíveis com a aplicação do referido teste.

A introdução de técnicas “in vitro” no controle de qualidade das vacinas anti-rábicas representa um importante avanço que poderá reduzir a necessidade de testes em animais,

desde que os referidos testes sejam validados adequadamente, atendendo às exigências da OMS (BARTH, 1996). Os resultados da aplicabilidade do ELISA, obtidos por vários autores, mostraram boa correlação com o título neutralizante e a existência de linearidade entre a diluição dos anticorpos e os valores de absorbância encontrados. Desta forma, foi possível observar que, através da técnica imunoenzimática, os anticorpos poderiam ser detectados sete dias após a vacinação, enquanto na SN os títulos permaneceram baixos (ATANASIU *et al.*, 1978; NICHOLSON & PRESTAGE, 1982; KAVAKLOVA *et al.*, 1984; CLIQUET *et al.*, 2000).

A aplicação do ELISA indireto aos referidos soros de camundongos vacinados com cada uma das 70 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas, quando testados nas diluições (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800), permitiu detectar os anticorpos presentes nessas amostras. Os valores de absorbância mostraram que há proporcionalidade na distribuição de frequência, em todas as diluições testadas por esse método (Fig. 10). Observa-se que, favoravelmente ao método, nas diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800 as médias (0,774; 0,496; 0,330 e 0,212, respectivamente) e as medianas (0,697; 0,443; 0,307 e 0,195, respectivamente) estão muito próximas entre si (Apêndice E, p. 129). Quando considerados os soros de camundongos imunizados com vacinas aprovadas pelo teste de Habel (Apêndice F, p. 130) os índices obtidos nesse teste não estão correlacionados com os valores de \bar{A} ($p=0,45$), indicando que esses resultados são aleatórios em função dos índices do teste de Habel. Através do teste de Kolmogorov-Smirnov esses dados não apresentam uma distribuição normal de frequência para todas as diluições ($p<0,03$), porém pelo teorema do limite central, sendo o número de observações grande (acima de 30), os dados tendem para uma distribuição normal. Entretanto quando considerados os soros de camundongos imunizados com vacinas reprovadas pelo teste de Habel (Apêndice F, p. 130), os valores de \bar{A} , para todas as diluições (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800), seguem uma distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov), com o valor de p (variando de 0,08 a $>0,015$).

Os testes sorológicos não medem um espectro de anticorpos absolutamente idênticos, sendo de notável valor a habilidade que o ELISA mostra de detectar anticorpos da classe IgG (NICHOLSON & PRESTAGE, 1982; PIZA, 1997). Em experimentos de imunização por transferência passiva, somente os da classe IgG protegeram camundongos contra o desafio viral posterior (TURNER, 1985). Neste caso, pode-se supor que os resultados obtidos no

ELISA tenham grande correlação com a proteção, apesar de o ELISA medir, além de anticorpos neutralizantes anti-glicoproteína, anticorpos contra outras proteínas do vírus rábico, dentre as quais a ribonucleoproteína (PIZA, 1997; ZANETTI *et al.*, 1998), podendo-se admitir que a aplicação do ELISA poderia fornecer uma importante indicação da potência “in vivo” das vacinas (ROOIJAKKERS *et al.*, 1996a e 1996b).

Considerando que o controle de potência das vacinas anti-rábicas é rotineiramente realizado pelos testes de Habel e NIH, ambos com vacinação intraperitoneal (i.p.) e desafio intracerebral (i.c.), cujos mecanismos de indução de imunidade à raiva não são, ainda, totalmente esclarecidos, admite-se que essa relação forneça uma estimulação de anticorpos neutralizantes, que passe a se constituir na mais importante fonte de proteção dos camundongos (WUNDERLI *et al.*, 1991). BARTH *et al.* (1988), no entanto, admitem que os anticorpos vírus neutralizantes não estão envolvidos primariamente na resistência induzida contra o desafio i.c., sendo que dados da literatura mostram a participação de vários outros mecanismos imunológicos em processos de infecção e/ou de imunização pelo vírus rábico “in vivo” (JOFFRET *et al.*, 1991; TORDO, 1996). Considera-se então que, no NIH e provavelmente no teste de Habel, que empregam imunização pela via i.p. e desafio i.c., conforme discutido anteriormente, mede-se mais estritamente a imunidade humoral que a celular (BARTH *et al.*, 1988), possibilitando o uso de técnicas como o ELISA indireto na avaliação da qualidade das vacinas anti-rábicas.

Para o conhecimento do valor do ponto de corte, no ELISA indireto aplicado nesses ensaios, foram considerados os resultados das vacinas aprovadas e reprovadas por Habel, em função dos valores de \bar{A} obtidos nesse teste, de modo que limitasse os resultados falsos negativos, com confirmação pela ANOVA e pelo teste de médias (Apêndice G, p. 131). Favoravelmente à interpretação dos achados de aplicação do método, os limites mínimos de absorvância que correspondem aos pontos de corte $\geq 0,512$ (1/100); $\geq 0,341$ (1/200); $\geq 0,225$ (1/400) e $\geq 0,111$ (1/800 (Tab. 2), estão todos incluídos no intervalo de confiança $M \pm 3DP$ (Apêndice H, p. 131).

Além disso, os parâmetros de validação do ELISA indireto, com valores de sensibilidade (S) (acima de 91%, em todas as diluições), especificidade (E) (100%, em todas as diluições), valores preditivos de resultados positivos (VPRP) (100%, em todas as diluições) e negativos (VPRN) (78% nas diluições 1/400 e 1/800) são favoráveis à aplicação do ELISA

indireto, nas duas últimas diluições (1/400 e/ou 1/800), considerando as condições preconizadas, no presente estudo. Vale salientar que esses parâmetros apresentaram-se relativamente equilibrados nessas diluições (Tab. 3), com discrepâncias apenas no VPRN (=33%, na diluição 1/100 e 44%, na diluição 1/200) - relativamente às outras diluições.

Admite-se, comumente, que o valor de um teste de controle de qualidade de vacinas, isto é, a sua confiabilidade para distinguir entre um indivíduo protegido e outro não protegido, é baseado nas características de S e E, considerando que estas características são qualidades fixas e próprias para cada teste (TOMAN, 1981). No presente estudo, os valores de S (acima de 91%), E (100%) e VPRP (100%) foram elevados, em todas as diluições testadas (Tab. 3), compativelmente com os dados encontrados na literatura. Tal comportamento pode ser, provavelmente, atribuído ao forte esquema de imunização empregado (semelhante ao utilizado no teste de Habel).

Curiosamente, ZANETTI *et al.* (1998), ao testarem vacinas de uso veterinário, cuja liberação oficial se dá, ainda, pelo teste de Habel, através da inclusão da amostra DR 19 ou 26 V, além do CVS, no desafio experimental, demonstraram índices acima da exigência mínima oficial brasileira, admitindo a ocorrência de largo espectro de proteção induzida por esse teste. Também é possível que os diferentes adjuvantes presentes nas vacinas testadas, que têm efeito imunoestimulante, tenham exercido algum tipo de influência sobre as reações específicas, bem como sobre as inespecíficas, apesar de BARTH *et al.* (1988) admitir que a imunização pela via intraperitoneal apresenta menor efetividade que pela via intramuscular e não reflete a verdadeira capacidade imunogênica das vacinas com adjuvante.

Na aplicação do ensaio imunoenzimático ELISA, vários autores encontraram alta sensibilidade (ATANASIU *et al.*, 1978; NICHOLSON & PRESTAGE, 1982; KAVAKLOVA *et al.*, 1984; PERRIN *et al.*, 1986; MEBATSION *et al.*, 1989; ELMGREN & WANDELER, 1996; PERRIN *et al.*, 1996; PIZA *et al.*, 1999; CLIQUET *et al.*, 2000). O ELISA, desenvolvido por KAVAKLOVA *et al.* (1984) provou ainda, ser específico, apresentar uma excelente correlação com a soroneutralização e ser mais rápido, necessitando apenas de poucas horas para obtenção do resultado, quando comparado com outros métodos.

Com relação à especificidade, os valores de 100% encontrados, em todas as diluições, no presente estudo (Tab. 3), mostram-se compatíveis com os trabalhos de vários autores (NICHOLSON & PRESTAGE, 1982; KAVAKLOVA *et al.*, 1984; PERRIN *et al.*, 1986;

MEBATSION *et al.*, 1989; PIZA *et al.*, 1999; CLIQUET *et al.*, 2000), porém diferem de resultados obtidos por ELMGREN & WANDELER (1996) que, ao desenvolverem o ELISA competitivo (C-ELISA), observaram que algumas vezes a especificidade poderia ser limitada.

Esses autores (ELMGREN & WANDELER, 1996) admitiram que o alto grau de especificidade pode ser obtido pelo uso de um antígeno purificado. Quanto às vantagens do uso de glicoproteína purificada sobre o vírus completo para a titulação de anticorpos anti-rábicos foi demonstrado que a vacina de cultivo celular induziu significativamente maior síntese de anticorpos neutralizantes antiglicoproteína e a vacina preparada em tecido neural, que é conhecida por conter baixas quantidades de glicoproteínas (ZANETTI *et al.*, 1998), promoveu uma resposta imune diretamente contra a ribonucleoproteína, com alta síntese de anticorpos antinucleocapsídeo, anticorpos não neutralizantes e significativa síntese de anticorpos antiglicoproteína (PERRIN *et al.*, 1986).

A medida da resposta imune humoral através do ELISA indireto, nesses ensaios, utilizando como antígeno - vacina inativada comercial, de uso humano -, que contém partículas virais completas (PIZA, 1997), aliado ao forte esquema de imunização empregado frente às diferentes vacinas utilizadas, permitiu, provavelmente, obter os altos valores de sensibilidade e de especificidade (Tab. 3). Apesar, daqueles autores terem recomendado o uso de glicoproteínas purificadas, no ELISA indireto, para uma apreciação correta da potência imunizante de uma vacina anti-rábica e a eliminação da influência provocada pelo uso de partículas virais completas, especialmente em se tratando de vacina produzida em tecido cerebral (PERRIN *et al.*, 1986; 1990) ATANASIU *et al.* (1978) não observaram discordância entre os títulos obtidos pelo uso de partículas virais completas e contra a glicoproteína purificada.

Vários outros autores relataram boa correlação entre resultados de soroneutralização e ELISA onde foram utilizados vírus completo (NICHOLSON & PRESTAGE, 1982; PERRIN *et al.*, 1986), também MEBATSION *et al.* (1989), executando o ELISA nessas condições e comparando com a soroneutralização em cultura de células, obtiveram além de alta correlação, concordância total, particularmente com soros de gatos e humanos. Porém, a utilização de partículas virais completas leva à possibilidade de detecção de anticorpos não neutralizantes, acarretando maior discrepância entre os testes sorológicos (PIZA, 1997) e parece ter ainda a desvantagem de o antígeno poder ser infeccioso (ELMGREN & WANDELER, 1996).

PIZA (1997) ao tentar substituir por vírus purificado, a vacina humana produzida em cultivo celular para sensibilização das placas, o mesmo antígeno utilizado nos ensaios aqui realizados, encontrou resultados idênticos, optando então em padronizar o ELISA com essas vacinas, considerando a maior praticidade na obtenção do antígeno, a disponibilidade comercial, a não apresentação de risco para o operador, e o não requerimento de instalações de segurança para os laboratórios. Esse antígeno (vacina inativada comercial, de uso humano), conforme informações do fabricante, é submetido a ultrafiltração e inativação, contém provavelmente partículas virais completas, não contém vírus vivo, oferecendo as vantagens de não demandar a necessidade de execução de procedimentos de purificação laboriosos em estruturas laboratoriais complexas. Além disso, propicia o processamento de um grande número de amostras, simultaneamente, em um curto período de tempo, com pequena experiência técnica. Estes fatores, aliados ao alto grau de reprodutibilidade, sugerem que o ELISA indireto poderá se tornar uma técnica extremamente útil para o sorodiagnóstico da raiva e para a medida da resposta imune humoral à vacinação anti-rábica (NICHOLSON & PRESTAGE, 1982), oferecendo uma alternativa para a técnica usualmente utilizada na detecção de anticorpos anti-rábicos (ATANASIU *et al.*, 1978).

O uso de anticorpos monoclonais neutralizantes (AcMN), que apresentam alta especificidade natural, também vem sendo indicado para superar muitas das desvantagens do ELISA indireto. O sistema ELISA ligante competitivo, desenvolvido para detectar anticorpos contra o vírus da raiva, é baseado na competição dos reagentes por uma quantidade limitada de antígeno ou por locais de ligação nos anticorpos e o uso de AcMN conjugados à enzima promove uma condição ideal para a sorologia de raiva, fazendo com que sejam detectados somente os anticorpos neutralizantes (AcN) presentes no soro, com a vantagem de não necessitar de antígeno altamente purificado (ELMGREN & WANDELER, 1996).

Deve-se considerar que a sensibilidade e a especificidade não são os únicos parâmetros determinantes da precisão de um teste. A precisão de um teste com sensibilidade e especificidade estáveis pode variar segundo o contato prévio ou não com um determinado antígeno (vacinação). Daí a importância do esquema de imunização empregado nesses ensaios e a provável influência dos diferentes adjuvantes presentes nas vacinas testadas, conforme mencionado anteriormente. Assim, o valor preditivo de positividade (VPRP) de um teste pode ser definido como a probabilidade de identificar os indivíduos protegidos em um grupo de

indivíduos considerados positivos e o valor preditivo de negatividade (VPRN) de um teste pode ser definido como a probabilidade de identificar os indivíduos não protegidos em um grupo de indivíduos considerados negativos (TOMAN, 1981). O ELISA indireto utilizado nesse trabalho apresentou resultado satisfatório quanto a esse aspecto, considerando o VPRP de 100% em todas as diluições e o VPRN de 78% nas diluições 1/400 e 1/800 (Tab. 3), sendo então, indicado o uso apenas dessas duas últimas diluições.

Visando, então, utilizar apenas uma diluição de soro em trabalhos subseqüentes, foi determinada a diluição mais adequada de uso dos soros para o ELISA indireto, através de avaliação estatística e pelo cálculo da razão entre as médias dos valores de absorbância (\bar{A}) obtidos nas diferentes diluições do soro controle positivo (SCP) e de uma mistura de soros de camundongos não vacinados (SCNV).

Quando comparados os valores de \bar{A} obtidos para o SCP com os obtidos para o SCNV verifica-se médias sempre maiores e maior variabilidade nos resultados obtidos para o primeiro soro, independente da diluição testada. Admite-se que esta variabilidade pode ser justificada pelo maior intervalo entre os valores máximos e mínimos observados nos valores de \bar{A} obtidos para o SCP (Apêndice I, p. 132).

Considerando que as curvas formadas por cada um desses soros (Fig. 13) não apresentam perfis paralelos ($p < 0,05$) e que todos os parâmetros estudados na comparação dos resultados obtidos entre os mesmos são significativamente diferentes embora, que pelo teste de Student-Newmann-Keuls ressalte-se que as médias das \bar{A} nas diluições 1/400 e 1/800 não apresentam diferença significativa entre si (0,02072 e 0,01518, respectivamente) (Apêndice I, p. 132), sugerindo o uso individual de uma das diluições (1/400 ou 1/800), no ELISA indireto, nas condições preconizadas no presente estudo.

No entanto, a maior razão encontrada entre as médias dos valores de \bar{A} obtidos nas diferentes diluições do soro controle positivo (SCP) e de uma mistura de soros de camundongos não vacinados (SCNV) foi 6,65 (1/400) (Fig. 13), indicando que seja essa a diluição mais adequada para uso no ELISA indireto, compativelmente com os resultados observados por PIZA *et al.* (1999), porém com pequena divergência em relação a outros autores, que utilizaram a diluição 1/200 (ATANASIU *et al.*, 1978), fato este que pode ter sido influenciado pelo esquema de imunização empregado para a produção do SCP.

Deve-se considerar, então, que os resultados obtidos na aplicação do ELISA indireto, nas condições preconizadas no presente estudo, sugerem que a aplicabilidade do método ao controle de qualidade de vacinas anti-rábicas é promissora, devendo ser executado na diluição 1/400 (valor discriminante 0,225 Å), que foi a diluição que apresentou maior razão entre os valores de Å entre o SCP e o SCNV e está entre as que apresentaram maiores percentuais e equilíbrio entre os parâmetros de validação (S=97, E=100, VPRP=100 e VPRN=78).

Vale ressaltar que o ELISA indireto, segundo os pontos de corte 0,512, 0,341, 0,225 e 0,111, aprovou 96% (1/100); 93% (1/200); 90% (1/400) e 90% (1/800) (Tab. 2), estando esses percentuais muito superiores aos obtidos no teste de Habel (87,14%). Tal comportamento deve merecer maior estudo dado o aumento da frequência e a importância da aplicação desse método na avaliação da qualidade das vacinas anti-rábicas.

Embora tenha sido possível, com a amostragem utilizada (70 partidas de vacinas), a aplicação dos testes estatísticos de maneira confiável, considerando a observação pela ANOVA (Apêndice F, p. 130) de que há diferença estatisticamente significativa entre o bloco de aprovados e reprovados por Habel (Fig. 11) é importante considerar ainda, que o ELISA não é um método completamente reconhecido pela OMS, apesar de estar sendo aplicado por muitos pesquisadores, conforme referido anteriormente. Portanto é recomendável a realização de estudos colaborativos, testes de validação complementares e outros para esclarecer vários aspectos levantados aqui e para garantir a total segurança na sua aplicabilidade, já que se deve considerar o ELISA indireto como um teste alternativo.

Além disso, a introdução do ELISA indireto, como prova de apoio e visando a substituição futura, pelo menos em parte, dos testes de potência “in vivo”, seria de grande valia, pois acarretaria imediata redução do tempo de expedição de resultados (em pelo menos 10 dias), diminuição significativa do número de animais utilizados e do uso de vírus vivo, permitiria a realização de testes com soros da espécie alvo de vacinação, além de trazer novas perspectivas de aplicação de testes “in vitro” indireta ou diretamente sobre o produto final, visando a melhoria do controle de qualidade das vacinas anti-rábicas no nosso país.

A inclusão de uma vacina de referência nacional, padronizada frente a uma de referência internacional – “International Standard for Rabies Vaccine”, em paralelo com as vacinas a serem testadas, é essencial para cada série de testes, na execução do NIH (HABEL, 1976; BARTH *et al.*, 1988; WUNDERLI *et al.*, 1991; WILBUR & AUBERT, 1996).

No Brasil, a potência das vacinas anti-rábicas, de uso animal, é ainda testada através do teste de Habel, em virtude de dificuldades que têm sido encontradas para a implantação do NIH, principalmente relacionadas à inexistência de uma vacina de referência nacional que atenda aos requisitos desse teste, conforme referido anteriormente.

Após o desenvolvimento de vacinas em cultura de células diplóides humanas (HDCV) o Comitê de Padrões Biológicos da OMS adotou, em seu terceiro informe, uma vacina preparada nestas células com atividade de 10 UI/ampola (DIAZ *et al.*, 1990). A introdução de vacina homóloga, como referência, poderia não somente proteger animais de laboratório nos testes de potência, mas também permitir o estudo da resposta imunogênica no homem (BARTH *et al.*, 1988). Esse Comitê preconiza que a composição ideal do componente biologicamente ativo de um material de referência deveria assemelhar-se o mais intimamente possível àquele das amostras às quais vai ser enfrentado ou testado (ESPESETH, 1996).

É sabido que em 14 países da América Latina e no Caribe são produzidos mais de cinco milhões de doses de vacinas anti-rábicas em cérebro de camundongos lactentes, para uso humano e mais de 20 milhões para uso veterinário. Os Laboratórios governamentais controladores de 12 países, dos 14 dessas regiões, inclusive o Brasil, usam a vacina de referência de raiva produzida pelo INPPAZ (VRI) para o ensaio de potência NIH (DIAZ *et al.*, 1990). Para atender a essa demanda, o INPPAZ, que inicialmente produzia apenas vacina de referência em cérebros de coelhos, passou a produzir a vacina de referência regional, em culturas de células BHK-21, C 13 (ARGENTINA, 1995a). Com base nessas informações e visando atender à necessidade do controle de vacinas anti-rábicas do nosso país, no presente estudo, foi produzida experimentalmente a vacina de referência nacional (VRN).

As células da linhagem BHK-21, C 13, que são amplamente empregadas na produção de vacinas anti-rábicas de uso animal (LARGHI *et al.*, 1976; LARGHI & NEBEL, 1980; CORTES *et al.*, 1993; ARGENTINA, 1995b; RECLARD, 1996; KOTAIT *et al.*, 1998), foram escolhidas para a produção experimental da vacina de referência nacional.

Para a utilização dos cultivos celulares na produção de vacinas anti-rábicas deverá ser definido previamente, através de procedimentos operacionais – padrão, o estoque de células mãe (ECM), a mais baixa e a mais alta passagem a ser utilizada nas inoculações do vírus (ESPESETH, 1996; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1999). Esses parâmetros, que já se encontravam definidos pela Central de Produção de Células do LARA/Campinas para

trabalhos com o vírus de febre aftosa (BARAHONA *et al.*, 1985), foram adotados de forma semelhante. Os resultados obtidos com o cultivo das células BHK-21, C 13, que se apresentaram qualitativamente e quantitativamente adequadas para uso, foram compatíveis com as observações de vários autores (LARGHI *et al.*, 1976; LARGHI & NEBEL, 1980; CORTES *et al.*, 1993; ARGENTINA, 1995b).

No caso da vacina de referência produzida em cultivos celulares de que trata o presente estudo, a amostra mais indicada é o vírus rábico fixo de produção, original Pasteur - PV (RECLARD, 1999). Os vírus empregados nas vacinas inativadas, diferentemente das vacinas atenuadas, geralmente devem proporcionar um material com alta virulência, visto que a quantidade de antígeno existente representa a totalidade do estímulo antigênico e não se conta com a multiplicação viral posterior, como nas vacinas vivas. O requerimento de virulência não só depende da amostra usada para produzir o vírus, mas também do substrato biológico utilizado para a obtenção da mesma; por isso, na elaboração de vacinas inativadas, deve-se controlar, de forma muito mais rigorosa, os requisitos dos quais depende a antigenicidade (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955). Exigem, porém, tecnologia mais avançada para a sua produção, e apresentam a vantagem de induzir imunidade semelhante à induzida pelas vacinas atenuadas (BLANCOU, 1986).

A amostra Pasteur (PV) mostrou boa condição de adaptação ao cultivo celular (BHK-21, C 13), com rendimento antigênico satisfatório e qualidade adequada para uso como antígeno na produção experimental da vacina de referência nacional, que também apresentou comportamento compatível com as observações de vários pesquisadores (LARGHI *et al.*, 1976; LARGHI & NEBEL, 1980; CORTES *et al.*, 1993; ARGENTINA, 1995b).

O acompanhamento das passagens virais (2^a, 3^a e 4^{as} passagens) no processo de produção experimental da vacina de referência nacional foi feito pela quantificação do conteúdo de glicoproteína total (cGT), através do ELISA de imunocaptura (Tab. 4). Houve uma evolução crescente dos valores do cGT, compatível com a seqüência de passagens realizadas. A aplicação desse método no acompanhamento do processo de produção e na seleção das amostras a serem incluídas nos lotes do produto final tem sido de grande importância para os profissionais envolvidos com a produção e/ou o controle de vacinas anti-rábicas inativadas (ESPESETH, 1996; PERRIN *et al.*, 1996; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1999; PIZA *et al.*, 2002). Através da análise estatística comparativa dos

resultados da quantificação do cGT dessas preparações (2^a, 3^a e 4^{as} passagens), verificou-se, pela aplicação do GLM, que há diferença entre as médias dos resultados das três passagens virais, confirmada pela ANOVA. Quando submetidos à avaliação pelo teste de Tukey, constatou-se que existe diferença entre o grupo das 2^a e 3^a passagens, que não apresentaram diferenças entre si, e o grupo das 4^{as} passagens, sugerindo que na 4^a passagem o vírus já estava adaptado ao cultivo celular utilizado.

Com base na orientação de que deverá ser preparada uma semente viral mãe (SVM), que constituirá a fonte de semente viral para a inoculação de todos os cultivos de produção, ou seja, todas as suspensões virais deverão ser preparadas a partir de subcultivos dessa SVM (ARGENTINA, 1995a; ESPESETH, 1996; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1999), aliado aos resultados obtidos pelas amostras de 4^a passagem, a partir da qual o vírus foi considerado adaptado à linhagem celular, procedeu-se à mistura das duas amostras, que foi congelada a -70°C para constituir a SVM, considerando que com um número limitado de passagens, pode-se conseguir maior uniformidade e consistência na produção (ESPESETH, 1996; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1999).

A forma de preparação da suspensão mãe atende ao requisito de que: uma SVM pode ser constituída de uma única partida de suspensão viral ou de lote uniforme de semente formado por um lote ou por vários, que tenham sido misturados e colocados em um recipiente para constituir um lote único, que deverá ser conservado a temperaturas entre -40°C e -70°C ou liofilizado, ou ainda ser acondicionado em condições outras que mantenham a sua viabilidade. Atende também ao critério indicado por ESPESETH (1996) e à orientação contida na Farmacopéia Européia, que preconizam que a produção final não poderia ser mais que cinco passagens a partir da semente viral mãe (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955; ARGENTINA, 1995a; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1999).

A partir da SVM, foram então preparadas as suspensões virais, que correspondem à 5^a passagem nas células BHK. Essas suspensões virais (5^a BHK) apresentaram títulos mais elevados na titulação em camundongos lactentes, com 4 a 6 dias de idade (CL), quando comparados aos observados na titulação em camundongos adultos jovens, pesando de 11 a 14 gramas de peso vivo (CAJ).

Através da análise estatística comparativa dos resultados obtidos nessas titulações, pela aplicação do GLM, demonstrou-se que existe diferença entre o uso desses animais (F=21,66;

$p < 0,0001$; $R^2 = 0,764686$). Os resultados observados através da ANOVA sugerem uma maior sensibilidade dos CL ao vírus rábico. O comportamento observado nessas titulações em camundongos, pelos materiais provenientes das diferentes colheitas de suspensões virais (1ª e 2ª), também avaliadas através da ANOVA, mostra que há diferença entre as médias dessas colheitas ($F = 6,87$; $p = 0,0164$), visto que a 2ª colheita apresentou títulos sempre maiores (Tab. 5), sugerindo que o maior rendimento viral e, provavelmente, o material de melhor qualidade, foi proveniente desta colheita.

A diferença entre os resultados observados nas titulações frente às distintas idades e colheitas justifica a aplicação do teste de Tukey, mostrando que as médias dos títulos frente aos CL (a) foram diferentes das observadas frente aos CAJ (b) e nas colheitas, 1ª (a) e 2ª (b), que também apresentaram valores diferentes entre si. Entretanto, ao se analisar conjuntamente essas variáveis, verifica-se que não existe diferença entre a interação, possibilitando, então, a mistura dos materiais provenientes dessas colheitas.

Considerando-se que a glicoproteína do vírus rábico é o principal antígeno responsável pela indução de anticorpos neutralizantes e pela proteção contra o desafio intracerebral (i.c.), tem havido muitas sugestões para que a antigenicidade da vacina anti-rábica possa ser avaliada pela quantificação do conteúdo dessa glicoproteína (PERRIN *et al.*, 1990; ELMGREN & WANDELER, 1996). Sabe-se que, atualmente, os testes “in vitro” são predominantemente testes para determinação do conteúdo antigênico dessas vacinas; dentre eles encontram-se, principalmente, os vários modelos de ensaio imunoenzimático – ELISA (PERRIN *et al.*, 1990; 1996; ROOIJAKKERS *et al.*, 1996a e 1996b; SIZARET, 1996; THARENHART, 1996).

O ELISA de imunocaptura (IC) e o ELISA de cobertura da placa direto com o antígeno a ser testado (EC), usando anticorpos neutralizantes policlonais (AcP) e monoclonais (AcM), dentre outros ensaios de glicoproteínas, foram estudados por PERRIN *et al.* (1990, 1996). Na opinião desses autores, o método de imunocaptura, baseado no uso do anticorpo monoclonal anti-glicoproteína, parece ser um instrumento conveniente para utilização nos testes de acompanhamento das distintas etapas do processo de produção. Foi com base nos trabalhos desses autores que o método de quantificação de glicoproteínas foi empregado, neste estudo, visando quantificar o conteúdo de glicoproteínas totais (cGT) nas suspensões virais a serem utilizadas na fase intermediária do processo, até a adaptação da amostra viral, e na composição

final da vacina de referência nacional experimental, comparativamente à semente padrão de produção do vírus da raiva (PSRV).

A medida do cGT através desse método e quando associada à razão entre o AcP/AcM tem dado informações adicionais no acompanhamento e monitoramento do processo de produção de vacinas, sendo de grande aplicabilidade (PERRIN *et al.*, 1990; 1996).

Os testes de quantificação de antígeno (testes “in vitro”) são mais rápidos e mais econômicos que os testes envolvendo animais e têm sido utilizados com sucesso para o controle do processo de produção, principalmente quando aliados à aplicação e ao monitoramento regular através dos princípios das Boas Práticas de Fabricação (BPF – “GMP”) para garantir consistência no preparo do antígeno, uma vez que estes testes medem o conteúdo antigênico. São pouco utilizados, visto que não tem sido alcançado consenso em testes disponíveis baseados na determinação do conteúdo antigênico, especialmente no produto final (PERRIN *et al.*, 1990; SIZARET, 1996), mas podem ser de grande valia para o controle de produção das vacinas anti-rábicas.

A introdução dessa técnica no acompanhamento do controle de qualidade das suspensões virais a serem introduzidas nas vacinas representa um importante avanço. Em adição, o uso de uma técnica “in vitro”, no controle do processo de produção e na estimação da potência das vacinas anti-rábicas, poderá reduzir a necessidade de testes em animais, desde que o teste seja validado adequadamente, atendendo às exigências da OMS (BARTH, 1996).

Os resultados obtidos aqui para as mesmas suspensões virais (5^a BHK) provenientes da SVM, pela quantificação do cGT (Tab. 6), quando avaliados através da análise estatística dos valores de \bar{A} observados por diluição, para as diferentes colheitas, através do GLM ($F=202,84$; $p=0,0006$; $R^2=0,996316$) mostraram que existe diferença entre as médias obtidas na 1^a e na 2^a colheitas. Esses resultados, quando avaliados pela ANOVA evidenciaram diferença entre o cGT, nas suspensões virais, em 1^a e 2^a colheitas ($F=83,95$; $p=0,0027$), nas diluições (1/10; 1/20; 1/40 e 1/80) ($F=242,47$; $p<0,0004$) e tanto nas colheitas como nas diluições, quando analisadas conjuntamente. Considerando então, a diferença entre as colheitas e entre as diluições, a aplicação do teste de Tukey mostra a existência de diferença entre todas as diluições empregadas (1/10 (a), 1/20 (b), 1/40 (c) e 1/80 (d), reforçando a idéia de que o material proveniente da 2^a colheita pode ter diferente qualidade, quando comparado ao material originário da 1^a colheita.

Apesar do fato de que o ELISA de imunocaptura (IC) executado nesses ensaios ter utilizado anticorpos policlonais (AcP), com resultados satisfatórios, vale lembrar que PERRIN *et al.* (1990) avaliaram a importância do uso de anticorpos monoclonais (AcM) comparativamente aos AcP. Esses autores, testando a potência de sobrenadantes de células infectadas (após inativação) “in vivo” e “in vitro” encontraram a melhor correlação com os títulos do NIH, quando aplicaram o ELISA IC com AcM. Entretanto, quando utilizaram partículas purificadas observaram uma alta correlação (93%) também, com os AcP, tendo sugerido a possibilidade de determinação da potência “in vitro” utilizando partículas virais purificadas com AcP e o uso do AcMN, especialmente, em testes de sobrenadantes de células infectadas. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o ELISA de imunocaptura, mesmo quando executado com AcP, não apenas, pelas vantagens que oferece de rapidez no fornecimento de resultados, comparativamente às titulações em camundongo, é de grande utilidade para o acompanhamento da qualidade dos antígenos a serem incluídos nas vacinas anti-rábicas, constituindo um excelente instrumento de avaliação da qualidade desses antígenos.

Os resultados obtidos pela quantificação do cGT das suspensões virais, em 5ª passagem, pelo ELISA de imunocaptura, mostram grande variabilidade (Tab. 5), sendo, então, selecionadas para compor o antígeno, considerando a 1ª e a 2ª colheita, apenas suspensões, numa faixa delimitada de resultado nas titulações, em camundongos lactentes e camundongos adultos jovens (acima de $10^{6.0}$ DL 50) e na quantificação do cGT (no intervalo de 1,5 µg/mL a 3,0 µg/mL), para não acarretar prejuízo à qualidade da suspensão viral a ser utilizada na produção experimental da vacina de referência nacional. Após a mistura, independente da colheita, a amostra foi novamente submetida a titulações em camundongos e à quantificação do cGT, pelo ELISA de imunocaptura, conforme referido anteriormente, para avaliação final, sendo então submetida ao processo de ultrafiltração.

O uso do sistema de ultrafiltração clarificante seletiva em membrana com capacidade nominativa limitante de PM 50.000 nm, constituiu-se em um passo importante no processo de concentração e seleção do tamanho relativo das partículas virais presentes nas suspensões virais (ARGENTINA, 1995b). A produção de vacinas anti-rábicas em cultura de células já tem resultado em vacinas altamente purificadas, com grande melhoria na potência e segurança, possibilitando a obtenção de ricas preparações em escala industrial. O produto final é

totalmente livre de substâncias teciduais, contendo um número menor de proteínas estranhas, o que favorece o possível uso de adjuvantes (no caso de vacinas de uso veterinário) e suprime o risco de reações devido à presença de material estranho, sendo, portanto mais seguro (NICHOLSON, 1996; DREESEN, 1997). Em relação ao rendimento e à seleção das suspensões virais obtidas nesse trabalho, quando se utilizou o sistema de ultrafiltração seqüencial, em membranas de 25.000 nm, foram satisfatórios, favorecendo, provavelmente, além da concentração do conteúdo viral, a eliminação de componentes indesejáveis, com menor peso molecular e de partículas virais defectivas, eventualmente presentes, melhorando o grau de pureza da preparação antigênica. O vírus, quando filtrado seletivamente através de membranas torna a inativação mais fácil devido à eliminação de agregados, facilitando a associação com outras vacinas preparadas com bactérias ou com outros vírus, conforme relatado por SOULEBOT (1982), como é o caso da associação com vacinas contra a febre aftosa, que vem sendo proposta pela indústria e foi abandonada por dificuldades na aplicação dos testes de controle de qualidade empregados atualmente, no nosso país.

Além disso, a presença de um antígeno purificado e imunogênico é capaz de possuir epítopes que poderão interagir com os macrófagos e linfócitos T auxiliares (CD4+), induzindo a produção de interleucina 1 (IL-1) capaz de estimular os linfócitos B a se transformarem em plasmócitos, produzindo altos níveis de IgG. Por isso é importante o preparo adequado da vacina preservando-se os antígenos para estimulação antigênica repetida, pois a produção prolongada de IgM não é vantajosa, por apresentar atividade restrita à circulação. Vacinas anti-rábicas produzidas em culturas celulares não prolongam a síntese de IgM. A persistência de anticorpos detectáveis depende da qualidade e da quantidade de antígeno administrada. Com relação às imunoglobulinas (Ig) produzidas em resposta à vacinação anti-rábica, também a transição da resposta primária, onde a concentração de IgM é superior à da classe IgG para a resposta secundária com concentração mais elevada de IgG depende da pureza e da qualidade do antígeno utilizado nas vacinas (TURNER, 1985).

A fração antigênica da vacina deve ser composta de partículas virais completas, não degradadas, de modo a preencher todas as possibilidades antigênicas que apresenta a infecção natural. Isto se pode conseguir em vacinas inativadas, desde que na sua elaboração sejam utilizadas amostras virais com características antigênicas adequadas (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955; DIAZ *et al.*, 1990). O antígeno utilizado na produção experimental da

vacina de referência nacional, após mistura e concentração (2x), apresentou altos títulos ($10^{7.66}$ DL 50/mL, em CL) e ($10^{7.17}$ DL 50/mL, em CAJ) e conteúdo de GT (3,10 μ g/mL), sendo considerado um antígeno capaz de atender aos requisitos básicos de uma preparação viral a ser empregada na produção de vacinas inativadas, tendo sido, posteriormente, dividido em duas frações para ser submetido à inativação pela bromo etilenoimina binária (BEI) e pela betapropiolactona (BPL).

Com relação aos inativantes usados, a bromo etilenoimina binária (BEI), que contém o derivado etilenoimina da AEI, cujo mecanismo de ação no procedimento de inativação gera uma reação de primeira ordem, tem recebido uma atenção aumentada nos últimos anos, e está agora sendo usado extensivamente na produção experimental e industrial de vacinas contra a raiva (BAHNEMNN *et al.*, 1974; LARGHI *et al.*, 1976; LARGHI & NEBEL, 1980; CORTES *et al.*, 1993).

A dinâmica de inativação do vírus de produção PV pela BEI, as propriedades imunogênicas e a estabilidade de vacinas preparadas usando esse agente foram estudadas por LARGHI *et al.* (1976), que concluíram que a vacina inativada com a BEI, adsorvida em hidróxido de alumínio ou com adjuvante oleoso, em altas diluições, protegeu cobaias contra o desafio viral e que este procedimento de segurança de inativação do vírus da raiva empregado oferece a perspectiva de produção de uma vacina efetiva para a imunização de cães e de bovinos, dados esses corroborados por outros trabalhos do mesmo grupo (LARGHI & NEBEL, 1980). Desde então, este agente químico vem sendo usado extensivamente, em trabalhos de inativação do vírus rábico.

A atuação da BEI, no presente estudo, foi avaliada através do acompanhamento do processo da cinética de inativação da suspensão, vírus PV, através de titulação em camundongos lactentes (CL) e de quantificação do cGT. A medida da infectividade viral residual de amostras coletadas no decorrer do processo de inativação (12 h), quando determinada pela titulação em camundongos lactentes e mostrada através da equação de regressão linear estimada com 100% de explicação e parâmetros altamente significativos, indica uma redução rápida e progressiva da infectividade viral, com decréscimo de 0,583 DL 50/h, encontrando o valor zero antes das 10 h de exposição ao produto (Fig. 15 e 17), sugerindo que a inativação pela BEI ocorreu de forma efetiva e adequada. As mesmas amostras, quando submetidas à quantificação do cGT através do ELISA de imunocaptura,

mostram, através da equação de regressão linear estimada com 100% de explicação e parâmetros altamente significativos, uma linha com leve inclinação descendente (Fig. 15 e 18), com decréscimo de 0,035 µg/mL por hora (0,425 µg/mL, em 12 h), ou seja uma redução de 13,55% na integridade das partículas virais, sugerindo, provavelmente, que as partículas virais permaneceram estáveis.

Estudos de imunogenicidade com vacinas inativadas pela BEI, realizados por LARGHI *et al.* (1976), mostraram que a vacina anti-rábica produzida experimentalmente por esses pesquisadores, em células BHK-21, C 13, inativada com BEI e contendo o hidróxido de alumínio como adjuvante, foi potente e capaz de conferir imunidade persistente em bovinos. CORTES *et al.* (1993) conseguiram, com vacina também preparada em células BHK e inativada pela BEI, contendo o avridine como adjuvante, promover alta resposta de anticorpos e proteção contra o desafio viral, em bovinos. Também estudos de imunogenicidade com vacinas contra a febre aftosa inativadas pela BEI, em comparação com vacinas inativadas pela AEI, foram realizados em bovinos por BAHNEMANN *et al.* (1974), que observaram resultados comparáveis entre os dois inativantes, justificando a inclusão desse inativante na produção experimental da vacina de referência nacional.

O outro inativante utilizado, a betapropiolactona (BPL), é o inativante mais amplamente utilizado na inativação do vírus da raiva, em vacinas para uso animal e principalmente em vacinas para uso humano. A BPL foi utilizada de forma convencional, sendo a sua atuação também avaliada através do acompanhamento da cinética de inativação da suspensão, vírus PV, através de titulações em camundongos lactentes (CL) e da quantificação do cGT. A medida da infectividade viral residual de amostras coletadas no decorrer do processo de inativação (6 h), quando determinada pela titulação em camundongos lactentes e mostrada também através da equação de regressão linear estimada com 100% de explicação e parâmetros altamente significativos, indica uma redução rápida e progressiva da infectividade viral, com decréscimo de 1,179 DL 50/h, encontrando o valor zero entre 5 e 6 horas de exposição ao produto (Fig. 16 e 17), sugerindo que a inativação pela BPL também ocorreu de forma efetiva e adequada. As mesmas amostras, quando submetidas à quantificação do cGT através do ELISA de imunocaptura mostram, através da equação de regressão linear estimada com 100% de explicação e parâmetros altamente significativos, uma linha com leve inclinação descendente (Fig. 16 e 18), com decréscimo de 0,59 µg/mL por hora (0,456 µg/mL, em 6 h),

ou seja, uma redução de 12,80% na integridade das partículas virais, sugerindo, provavelmente, que as partículas virais também permaneceram estáveis.

De acordo com dados da literatura, partículas de vírus rábico podem ser parcialmente alteradas após o processo de inativação pela BPL. A alteração parcial do arranjo molecular pode induzir uma diminuição da acessibilidade de um epítopo envolvido na produção dos anticorpos neutralizantes. Tal fato foi constatado por PERRIN *et al.* (1990), através da comparação da medida do conteúdo de glicoproteína pelo ELISA de imunocaptura, mas não no teste com o ELISA de cobertura com antígeno, usando AcM e AcP anti-glicoproteína, em um experimento no qual a suspensão viral foi submetida à inativação, seguido pela quantificação do cGT. Tais informações e ainda considerando que a aplicação do ELISA de imunocaptura com AcP, no acompanhamento do processo de inativação pela BPL, no presente estudo, mostrando pequena redução do conteúdo de glicoproteínas após inativação, corroboram com a indicação de que as partículas virais permaneceram estáveis.

Os inativantes utilizados (BEI e BPL), quando relacionados através das curvas de cinética de inativação, representadas pelas equações lineares estimadas para os resultados das titulações em camundongos lactentes (CL), com base no percentual de redução da infectividade viral, no tempo de exposição ao respectivo inativante, sugere, provavelmente, que a mesma tenha ocorrido de forma mais efetiva pela ação da BPL (21,50%/h) que pela ação da BEI (10,48%/h) (Fig. 17).

Quando a relação entre os dois inativantes (BEI e BPL) foi determinada sobre os resultados da quantificação do cGT ($\mu\text{g/mL}$), que mede a degradação viral durante o tempo de exposição aos respectivos inativantes, também através da análise das equações de regressão linear estimadas, verifica-se pela observação da diferença nas inclinações das respectivas equações (nível de probabilidade de 5%), que as mesmas não podem ser expressas por uma única equação (Fig. 18). Pela atuação da BEI o cGT da suspensão viral decresceu 0,035 $\mu\text{g/mL}$ por hora, enquanto sob ação da BPL o decréscimo foi de 0,058 $\mu\text{g/mL}$. Quanto aos dois interceptos esses também apresentam diferenças significativas (probabilidade de 5%). Esses resultados ressaltam, provavelmente, as diferenças de atuação dos dois inativantes sobre o vírus rábico, quando medida através da quantificação do cGT pelo ELISA de imunocaptura. Verifica-se que o tratamento pela BEI levou a maior redução da integridade das partículas virais (13,55%), comparativamente ao da BPL (12,80%), indicando, provavelmente, que tal

resultado pode ter sido ocasionado pelo dobro de tempo de exposição da suspensão viral à BEI (Fig. 18).

Quando se analisam detalhadamente os valores da quantificação do cGT obtidos pela BEI, antes (3,1 µg/mL) e depois (2,41 µg/mL) e pela BPL, antes (3,1 µg/mL) e depois (2,42 µg/mL) da inativação, observa-se que sob efeito de ambos os inativantes ocorreram pequenas diferenças entre os valores do cGT, que foram também detectados no conteúdo de glicoproteína insolúvel depois da inativação (BEI=1,92 µg/mL e BPL=2,02 µg/mL) (Fig. 19), sendo que os menores valores obtidos no material submetido a BEI podem ser também atribuídos ao dobro do tempo de exposição à mesma. Apesar dessa pequena diferença encontrada, admite-se que a glicoproteína viral permaneceu estável, provavelmente não degradada, no decorrer do tempo, frente aos dois inativantes utilizados, permitindo inferir que, se houveram alterações estruturais na conformação das partículas virais presentes nas suspensões inativadas, estas foram, provavelmente, em pequena escala, considerando o nível de detecção permitido pela técnica aplicada.

Cabe novamente ressaltar que a aplicabilidade do ELISA de imunocaptura, na produção experimental da vacina de referência nacional, foi de grande utilidade, tornando-se um valioso instrumento auxiliar, através do qual foi possível controlar a qualidade de todas as suspensões virais envolvidas no processo de produção experimental da referida vacina. O teste contribuiu para definir a condição de adaptação do vírus na 4ª passagem e a composição da suspensão viral mãe (SVM); nas suspensões, em 5ª passagem, selecionar (conjuntamente com os resultados obtidos nas titulações em CL e CAJ) as suspensões virais para compor a preparação antigênica a ser inativada; no acompanhamento da cinética da inativação viral pela BEI e BPL e no teste das amostras finais BEI (12 h) e BPL (6 h), que após a liofilização passaram a constituir as vacinas experimentais A e B, respectivamente, que foram testadas pela quantificação do cGT e do cGI, visando avaliar a estabilidade e a degradação das partículas virais presentes.

Por essas constatações seria interessante considerar a possibilidade de adoção de um teste com estas características no acompanhamento rotineiro da produção das vacinas, e também, na avaliação da qualidade final das vacinas anti-rábicas para garantir a qualidade antigênica das mesmas.

PIZA *et al.* (2002) ao aplicarem o ELISA de imunocaptura para testar o efeito do conteúdo e forma de apresentação da glicoproteína do vírus da raiva, na avaliação da potência de vacinas anti-rábicas encontraram forte correlação entre a glicoproteína (G) ligada ao vírus (G insolúvel), mas não entre a glicoproteína total (GT) e a G solúvel com títulos de anticorpos induzidos por vacinação em bovinos, medidos através da soroneutralização, que também não correlacionaram bem com o NIH, daí a importância da quantificação da G insolúvel, no presente estudo, tendo em vista a utilização do antígeno na produção experimental da vacina de referência nacional para uso no NIH.

Além disso, a necessidade de implantação de técnicas mais modernas no controle das vacinas anti-rábicas inativadas, tendo em vista principalmente a possibilidade de uma futura comercialização de vacinas recombinantes, no mercado nacional, particularmente as constituídas por nucleoproteína, já que sua capacidade imunogênica é subestimada nos testes de potência realizados atualmente e os problemas no controle de vacinas anti-rábicas, de uso animal, no Brasil, apontados por VAZ (1999), reforçam essa idéia.

As preparações antigênicas inativadas, respectivamente, pela BEI (vacina experimental A) e pela BPL (vacina experimental B), que apresentaram rendimento satisfatório e qualidade antigênica adequada para compor a vacina de referência nacional produzida experimentalmente, foram submetidas aos testes rotineiros de controle, compreendendo a inocuidade, representada pelos testes de vírus residual e o teste de toxicidade, e a esterilidade, apresentando, em todos, resultados satisfatórios, de acordo com os requisitos exigidos pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 1988).

Após a hidratação relativa, foram submetidas aos testes de potência, Habel e NIH, sob a denominação de A₁ e A₂ (inativadas pela BEI), B₁ e B₂ (inativadas pela BPL). Quando submetidas aos testes de Habel e ao NIH (Tab. 7) as vacinas experimentais A₂ e B₂ (10x concentradas), comparativamente a A₁ e B₁ (5x concentradas), apresentaram resultados mais altos, mostrando-se compatíveis com o grau de concentração apresentado. No teste de Habel, todas as vacinas experimentais alcançaram o índice de aprovação exigido pela legislação vigente, sendo portanto, aprovadas (BRASIL, 1988) e, no NIH, apresentaram resultados compatíveis com o da vacina de referência regional produzida pelo INPPAZ (ARGENTINA, 1995c).

Quando avaliada a resposta imune humoral induzida em camundongos inoculados com as vacinas experimentais - A₁, A₂, B₁ e B₂ -, comparativamente à VRI (Tab. 8), através do ELISA indireto, na diluição 1/400, observa-se que, pela quantificação dos anticorpos IgG, os valores de absorvância (Å) são função da concentração antigênica, em uma dada diluição da vacina utilizada na imunização, apresentando proporcionalidade entre A₁ e B₁ (amostras 10x concentradas) e entre A₂ e B₂ (amostras 5x concentradas) relativamente à VRI, provavelmente semelhante à observada nos testes de Habel e no NIH.

A avaliação da proteção conferida a camundongos imunizados com as vacinas experimentais A₁, A₂, B₁ e B₂, comparativamente à vacina de referência do INPPAZ (VRI), através de probitos, indicam que os dados apresentam uma distribuição normal de resultados, confirmados pelo teste do Qui-quadrado (Apêndice L, p. 133), bem como a estimativa da probabilidade de proteção (epp) (Apêndice J, p. 133) segue também uma função normal de probabilidade acumulada. Ao analisar-se os valores 50% verifica-se que há também uma proporcionalidade entre A₁ e B₁ (amostras 10x concentradas) e entre A₂ e B₂ (amostras 5x concentradas) relativamente à VRI, semelhante a observada nos testes referidos anteriormente, embora ao verificar-se os limites, inferior e principalmente o superior, observa-se, na amplitude do intervalo, uma variabilidade muito alta, atribuída, provavelmente, ao pequeno número de experimentos realizados.

Os resultados obtidos sugerem que a vacina de referência nacional produzida experimentalmente apresentou bom desempenho nos testes de controle de qualidade e foi capaz de estimular resposta imune em camundongos, manifestada tanto pela quantificação de anticorpos IgG através do teste sorológico (ELISA indireto) como, pela proteção ao desafio viral. Estas constatações indicam que a metodologia mostrou-se adequada e apresentou resultados compatíveis com a vacina de referência regional produzida pelo INPPAZ, podendo ser ampliada para atender à demanda do laboratório oficial e da indústria produtora, para uso no NIH.

Com base nesses resultados pode-se chegar às seguintes conclusões:

6 CONCLUSÕES

- 1 - Os percentuais de aprovação das vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil, pelo NIH, nos limites entre 0,9 a 1,1 UI/mL, foram sempre inferiores aos obtidos pelo teste de Habel ($10^{4,0}$ DL 50), indicando que o NIH representa um maior rigor no controle de vacinas;
- 2 - A comparação entre os testes de Habel e NIH, através do teste de Pearson mostra uma baixa correlação (45%) entre os dois testes, porém, demonstra que é muito significativa ($p < 0,001$);
- 3 - O valor discriminante para o NIH, aplicado ao controle de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil, encontra-se acima de 0,98 UI, sendo então, indicado o uso oficial de 1 UI, recomendado pela OMS, para o limite de aprovação no referido teste;
- 4 - O ELISA indireto, quando comparado ao teste de Habel ($10^{4,0}$ DL 50), apresentou valor discriminante, por diluição, de 0,512 (1/100), 0,341 (1/200), 0,225 (1/400) e 0,111 (1/800);
- 5 - O ELISA indireto apresentou altos valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos de resultado positivo e negativo nas diluições 1/400 e 1/800, sendo promissora a sua aplicação no controle de vacinas anti-rábicas, indicando a diluição 1/400 como a mais adequada para uso no teste;
- 6 - O teste de Habel, executado rotineiramente apenas, no Brasil, mostrou comportamento estável, com distribuição de frequência normal de resultados, nos dois conjuntos de dados empregados;
- 7 - A amostra viral de produção (PV) adaptou-se facilmente às células BHK – 21, C 13, com rendimento antigênico satisfatório e qualidade adequados para uso como antígeno na produção experimental da vacina de referência nacional;
- 8 - Os inativantes (BEI e BPL) mostraram-se adequados à inativação do vírus rábico, amostra PV, utilizada na produção experimental da vacina de referência nacional, tendo em vista o tempo de inativação e a manutenção da integridade antigênica, representada pela conservação do conteúdo da GT, dosada pelo ELISA de imunocaptura;
- 9 - A vacina de referência nacional, produzida experimentalmente, nesse estudo, apresentou resultados compatíveis com os da vacina de referência do INPPAZ, sugerindo que a metodologia empregada poderá ser ampliada para atender à demanda nacional, quanto ao controle de vacinas, de uso animal, pelo NIH.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N. A review of rabies prevention and control in the Américas, 1970 – 1980. Overall status of rabies. **Bull. Off. Int. Epiz.**, **93**: 9 – 52, 1981.

AKRO, R. J.; WIKTOR, T. J. & SIKES, R. K.. Prueba de fijacion de los anticuerpos para determinar la potencia de una vacuna. In: _____ **LA RABIA técnicas de laboratorio**. (Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 3th ed. Geneva: Organizacion Mundial de la Salud (OMS Série de Monografias n° 23), 1976. cap. 35, p. 308 – 310.

ALAN, C. J. Pathogenesis. In: _____ **Rabies**. (Alan, C. J.; Willian, H. W. ed.) 1^a ed. Ontario: Academic press, 2002. cap.7, p. 244 – 282.

ARGENTINA. Instituto Panamericano de Proteção Alimentária e Zoonoses (INPPAZ). SOP 004. In: _____ **“RABIA: Técnica Estandar para Producción de Virus Semilla en Celulas BHK-21, clone 13”**. Martinez, 1995a.

ARGENTINA. Instituto Panamericano de Proteção Alimentária e Zoonoses (INPPAZ). SOP 011. In: _____ **“RABIA: Concentración de virus por ultrafiltración (Equipo Pellicon)”**. Martinez, 1995b.

ARGENTINA. Instituto Panamericano de Proteção Alimentária e Zoonoses (INPPAZ). SOP 052. In: _____ **“RABIA: Técnica Estandar para Producción de Vacuna Antirrábica de Referência en Celulas BHK-21, clone 13”**. Martinez, 1995c.

ATANASIU, P.; SAVY, V. & GIBERT, C. Rapid immunoenzymatic technique for titration of rabies antibodies IgG and IgM results. **Med. Microbiol. Immunol.**, **166**: 201 – 8, 1978.

ATANASIU, D. P. & SUREAU, P. Maladies Infectieuses. In: **Encycl. Méd. Chir. 8065 C¹⁰**, 7. Paris – France, 1987. 18p.

AUBERT, M. F. A. Methods for the calculation of titres. In: _____ **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. appendix 3, p. 445 – 449.

AUBERT, M. F. & ANDRAL, L. Potency testing of inactivated rabies vaccine: problems posed by the use of the Habel test. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, **1** (4): 341-349, 1979.

BAER, G. M. Rabies virus. In: Fields, B. N. *et al.* **Virology**. New York: Raven, 1985. p. 1133 – 1156.

BAER, G. M. Evaluation of an animal rabies vaccine by use of two types of potency tests. **Am. J. vet. Res.**, **58** (8): 837 – 840, 1997.

BAHNEMANN, H. G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABARACON, D. & GOMES, I. Immunogenicity in cattle of Foot-and-Mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. **Bull Off. int. Epiz.**, **81** (11-12): 1335 – 1343, 1974.

BAHNEMANN, H. G. Binary Ethylenimine as an Inactivant for foot-and-Mouth Disease Virus and Its Application for Vaccine Production. **Arch. Virol.**, **47**: 47-56, 1975.

BARAHONA, H. J.; GAGGERO, A. C. & MESQUITA, J. A. Produção de vacina antiaftosa com adjuvante oleoso. In: **Manual de Métodos – Centro Panamericano de Febre Aftosa – LARA/Campinas**. São Paulo. Organização Panamericana de Saúde – Organização Mundial da Saúde, 1985. 122p.

BARTH, R.; DIDERRICH, G. & WEINMANN, E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. **Vaccine**, **6**: 369 – 377, 1988.

BARTH, R. The modified antibody-binding test for “in vitro” quantification of rabies virus antigen in inactivated rabies vaccine. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 43, p. 394 – 397.

BARTH, R. & FRANKE, V. Purified chick-embryo cell vaccine for humans. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996a. cap. 27, p. 290 – 296.

BARTH, R. & FRANKE, V. Fetal rhesus monkey lung diploid cell vaccine for humans. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996b. cap. 28, p. 297 – 300.

BERAN, G. W. & CROWLEY, A. J. Toward worldwide rabies control. **WHO Chronicle**, **37** (6): 192 – 196, 1983.

BIER, O. G.; MOTA, I.; SILVA, W. D. da & VAZ, N. M. A. Mecanismo de reatividade imunológica. p. 72 – 99. In: **Imunologia Básica e Aplicada**. (Guanabara Koogan, ed.), 3^a ed. Rio de Janeiro, 1982. 465p.

BLANCOU, J. La vaccination antirabique des animaux domestiques. In: **Colloque International, - Institut Pasteur de Paris. Vaccins et Vaccinations**. p 167 – 174. Paris: E. Éditions Scientifiques Elsevier, 1986, 441p.

BOURHY, H.; SUREAU, P. & TORDO, N. From rabies to rabies-related viruses. **Vet. Microb.**, **23**: 115 - 128, 1990.

BRANCHE, R. Vaccine for humans prepared in humans diploid cells. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 25, p. 280 – 284.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (MAARA). Portaria nº 228. In: _____ **Diário Oficial**, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa 005. In: _____ **Diário Oficial**, 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica – Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos, cap. 5.26. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em: 18 de março de 2002b.

CECCALDI, P. E., GILLET, J. P. & TSIANG, H. Inhibition of the transport of rabies virus in the central nervous system. **J. Neurophathol. Exp. Neurol.**, **48**: 620-630, 1993.

CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA (CPFA). Vacinas anti-rábicas: uso oral. Disponível em: <http://www.panaftosa.org.br/novo/texto.vacinas.htm>. Acesso em: 30 de março de 2002.

CLIQUET, F; SAGNÉ, L.; SCHEREFFER, J. L. & AUBERT, M. F. A. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxed samples in the fields. **Vaccine**, **18**: 3272 – 3279, 2000.

CORDEIRO, C. C.; SILVA, E. V. da; MIGUEL, O & GERMANO, P. M. L. Avaliação da vacina anti-rábica ERA, frente a variantes antigênicas do vírus rábico, em diferentes períodos pós imunização. **Rev. Saúde pública S. Paulo** **24**: 512-517, 1990.

CORTES, J. de A.; RWEYEMAMU, M. M.; ITO, F. H.; UMEHARA, O.; NETO, R. M.; NETO, D. de L.; BALTAZAR, M. C.; VASCONCELOS, S. A. & VASCONCELOS, M. E. P. Immune response in cattle induced by inactivated rabies vaccine adjuvanted with aluminium hydroxide either alone or in combination with avridine. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, **12** (3): 941 - 955, 1993.

COSTA, W. A. da; ÁVILA, C. A. de; VALENTINE, E. J. G.; REICHMANN, M. de L. A. B.; CUNHA, R. S.; GUIDOLIN, R.; PANACHÃO, M. R. I.; OMOTO, T. M. & BOLZAN, V. L. Profilaxia da raiva humana. In: **2ª ed. São Paulo, Instituto Pasteur**, 2000 (Manuais, 4). 33p.

CRICK, J. & BROWN, F. Questions concerning the potency of rabies vaccine. **Rev. Scitech Offint. Epiz.**, **12**: 941 – 955, 1978.

CUNHA, R. Comprovação do poder imunizante das vacinas anti-rábicas para uso veterinário. **Bol. Soc. Bras. Med. Vet.**, **16** (6 – 7): 1 – 22, 1947.

CUNHA, R. G.; SILVA, R. A. da & SILVA, N. M. da. Influência de um estabilizador na manutenção do poder imunizante de vacina anti-rábica inativada. **Rev. Brasil. Biol.**, **37** (2): 345 – 349, 1977.

DACHS, J. N. In: _____ **Análise de dados e regressão.** (IMECC-UNICAMP), Campinas, 1978. 125p.

DELLEPIANE, N. I. & DIAZ, A. M. La Rabia. I. Principales características del agente etiológico y de la enfermedad. **Rev. Argentina de Microbiología**, **18**: 83 –95, 1986.

DIAZ, A. M.; DELLEPIANE, N. & PALOMO, L. F. Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante: composición antigénica y capacidad inmunógena. **Bol. Of. Sanit. Panam.** **107** (3): 185 – 193, 1989.

DIAZ, A. M. Suckling-mouse brain vaccine. In: _____ **Laboratory techniques in rabies.** (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 21 , p. 243 - 250.

DIAZ, A. M.; MILLER, R. A.; CORTÉS, M. A.; DELLEPIANE, N.; ELBERGER, D.; FÁBREGA, F.; MICELI, G.; MENDOZA, G.; OBARRIO, M. E.; OCHOA, M. T.; BECCO, O. & PERDOMO, G. Rabies Reference Vaccine for Use as a Regional Standard for Latin America and the Caribbean Countries. **Biologicals**, **18** (Nº 4): 281 - 287, Oct., 1990.

DOHERT, P. C. T cels and viral infections. **Brit. Med. Bull.**, **41**: 7 –14, 1985.

DRAPER, N. R. & SMITH, H. In: _____ **Applied Regression Analysis.** (Ralph A. Bradley, J. Stuart Hunter, David G. Kendall and Geoffrey S. Watson ed.) 2th. New York, 1981. 701p.

DREESSEN, D. W. A global review of rabies vaccines for human use. **Vaccine**, **15** (Suppl. S): 2 - 6, 1997.

ELMGREN, L. D. & WANDELER, A. I. Competitive ELISA for the detection of rabies virus-neutralizing antibodies. In: _____ **Laboratory techniques in rabies.** (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 17, p. 200 - 208.

ERBOLATO, E. B; SILVA, E. V. da; MIGUEL, O.; SUREAU, P. & GERMANO, P. M. L. Eficácia da vacina anti-rábica ERA em camundongos, frente a quatro diferentes variantes do vírus rábico. **Rev. Saúde pública S. Paulo** **23**: 447-454, 1989.

ESPESETH, D.A. Production of veterinary vaccines. In: **OIE Manual Office International of Epizootie.** p. 1 - 10, 1996.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, **Supplement** 1999, p.829-833.

FAMILY RHABDOVIRIDAE. p. 563 – 571. In: **Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses.** Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (Regenmortel, M.H.V.van; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.), ed. USA, 2000, 1162 p.

FAVORETTO, R. S.; CARRIERI, M. L.; TINO, M. S.; ZANETTI, C. R. & PEREIRA, O. A. C. Simplified fluorescent inhibition microtest for titration of rabies neutralizing antibodies. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** **35**: 171 – 175, 1993.

FERGUSON, M. Single radial immunodiffusion test for the determination of the glycoprotein content of inactivated rabies vaccines. In: _____ **Laboratory techniques in rabies.** (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 40, p. 378 – 382.

FINNEY, D. J. In: _____ **Statistical method in biological assay.** (Charles Griffin, ed.), 2^a ed. London, 1971.

FLORENCE, J. B. Mycobacterium chelonae: avaluation of the polar glycopeptide. Disponível em: (<http://www.mondialvet99.com>). Acesso em: 24 de setembro de 2000.

FUENZALIDA, E. L. & PALÁCIOS, R. V. H. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirábica. **Bol. Inst. Bact. Chile,** **8**: 3 – 10, 1955.

GERMANO, P. M. L.; SILVA, E. V. da; SILVA, E. V. da; MIGUEL, O.; PRETO, A. A. & CORDEIRO, C. F. Avaliação em camundongos de vacinas anti-rábicas inativadas frente a variantes antigênicas do vírus rábico. **Arq. Biol. Tecnol.,** **33** (3): 551 – 560, Out. 1990.

GUPTA, R. K. A need to review regulations for production and control of vaccines. **Vaccine,** **15**: 1-2, 1997.

HABEL, K. Prueba de potencia de Habel. In: _____ **LA RABIA técnicas de laboratorio.** (Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 3th ed. Geneva: Organizacion Mundial de la Salud (OMS Série de Monografias nº 23), 1976. cap. 31, p. 290 – 291.

HAYASHI, Y; MORA, E.; CHANDELIER, E. L.; MONTANÕ, J. A. & OHIO, M. Estudos de proteção cruzada de 24 cepas de vírus rábico isoladas de diferentes espécimes animais do Brasil. **Arq. Biol. Tecnol.,** **27**: 27-35, 1984.

JOFFRET, M. L.; ZANETTI, C.; MORGEAUX, S.; LECRERC, C.; SUREAU, P. & PERRIN, P. Appraisal of Rabies Vaccine Potency by Determination of “In vivo”, Specific Interleuckin-2 Production. **Biologicals,** **19**: 113 - 123, 1991.

JOHNSON, D. E. In: _____ **Applied multivariate methods for data analysts.** (Pacific Grove: Brooks/Cole and Duxbury Press), 1th ed. Kansas city (USA), 1998. 565p.

JOHNSON, R. A & WICHERN, D. W. In: _____ **Applied multivariate statistical analysis.** (Prentice Hall edit.), 4^a ed. New Jersey, 1998. 816p.

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: _____ **Laboratory techniques in rabies.** (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 1, p. 3 – 8.

KAVAKLOVA, L.; ESKENAVY, M.; GANCHEVA, T. & VACHEVA, V. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of rabies antibodies in human sera. **Acta. Virol.**, **28**: 422 - 427, 1984.

KING, A. A. & TURNER, G. S. Rabies: a review. **J. Comp. Path**, **108**: 1 - 39, 1993

KOTAIT, I; GONÇALVES, C. A.; PERES, N. F.; SOUZA, M. C. A. M. & TARQUETA, M. C. Profilaxia da raiva dos herbívoros. In: **1ª ed. São Paulo, Instituto Pasteur**, 1998 (Manuais, 1). 15p.

LAFON, M. Immunology. In: _____ **Rabies** (Alan, C. J.; Willian, H. W. ed.) 1ª ed. Ontario: Academic press, 2002. cap.10, p. 351 - 365.

LARGHI, O. P.; SAVY, V. I.; NEBEL, A. E. & RODRIGUEZ, A. Ethylenimine - inactivated rabies vaccine of tissue culture origin. **J. clin. Microbiol.**, **3** (1): 26 - 33, 1976.

LARGHI, O. P.; NEBEL, A. E. & RODRIGUEZ, A. Vacuna antirrabica inactivada com etilenimina. Duracion de inmunidad en perros. **Rev. Argentina de Microbiologia**, **11**: 102 - 107, 1979.

LARGHI, O. P. & NEBEL, A. E. Rabies virus inactivation by binary ethylenimine: new method for inactivated vaccine production. **J. clin. Microbiol.**, **11** (2): 120 - 122, 1980.

LODMELL, D. I.; ESPOSITO, J. J. & EWALT, L. C. Rabies virus antinucleoprotein antibodies protect against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro. **J. Virol.**, **63**: 6080 - 6086, 1993.

MackPHERSON, I. & STOKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones: an investigation of genetic factors affecting cell competence. **Virology**, **16** (2): 147 - 151, 1962.

MARTIN, S. J., JAMISON, D. & BURKE, K. Bottle-rolling apparatus for tissue culture production. **Lab. Pract.**, **20** (12): 61, 1971.

MEBATION, T.; FROST, J. W. AND KRAUSS, H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using Staphylococcal Protein A for the Measurement of Rabies Antibody in Various Species. **J. Vet. Med. B**, **36**: 532 - 536, 1989.

MESLIN, F.-X. & KAPLAN, M. M. General considerations in the production and use of brain-tissue and purified chicken-embryo rabies vaccine for human use. p. In: _____ **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 19, p. 223 - 233.

MONTAGNON, B. & FRANGET, B. Purified VERO cell vaccine for humans. In: _____ **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 26, p. 285 - 289.

MORGEAUX, S. **Controle des vaccins rabiques: Utilisation des techniques de biologie moléculaire et d'immunologie cellulaire.** 1992. 192 p. Tese de (Doutorado – Microbiologia) - Université Paris VII, Paris/France.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. & PFALLOR, M. A. Rabdovirus p. 405 – 408. In: _____ **Microbiologia Médica.** (Editora Guanabara Koogan), 3^a. ed. Rio de Janeiro, 2000, 604p.

NICHOLSON, K. G. Cell-culture vaccine for human use : general considerations. In: _____ **Laboratory techniques in rabies.** (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 24, p. 271 – 279.

NICHOLSON, K. G. & PRESTAGE, H. Enzyme-linked immunosorbent assay: a rapid reproducible test for the measurement of rabies antibody. **J. Med. Virol.**, **9**: 43 - 49, 1982.

PERRIN, P.; VERSMISSE, P.; DELAGNEAU, J. F.; LUCAS, G.; ROLLIN, P. E. & SUREAU, P. The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA; advantages of purified glycoprotein over whole virus. **J. Biol. Stand.**, **14**: 95 -102, 1986.

PERRIN, P.; MORGEAUX, S. & SUREAU, P. In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody. **Biologicals**, **18**: 321 - 330, 1990.

PERRIN, P.; LAFON, M. & SUREAU, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of the glycoprotein content of rabies vaccines. In: _____ **Laboratory techniques in rabies.** (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 41, p. 383 – 393.

PETERMANN, H. G.; SOULEBOT, J. P. LANGE, R. & BRANCHE, R. La saponine, adjuvante d'immunité pour la vaccination des bovines contre la rage. **C. R. Acad. Sc. Paris**, **270**: 234-236, janvier 1970

PIZA, A. S. de T. **Adaptação do método imunoenzimático (ELISA) para detecção de Ac anti-rábicos neutralizantes em soros humanos, comparação com a prova de soroneutralização em cultura celular.** 1997, 108 p. Tese (Mestrado em Saúde Pública – Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

PIZA, A. S. de T.; SANTOS, J. L. F.; CHAVES, L. B. & ZANETTI, C. R. An ELISA suitable for the detection of rabies virus antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell-culture vaccine or suckling-mouse-brain vaccine. **Rev. Inst. Méd. trop. S. Paulo**, **41**: 39 - 41, 1999.

PIZA, A. S. de T.; PIERI, K.M. S.; LUSA, G. M.; CAPORALE, G. M. M.; TERRERAN, M. T.; MACHADO, L. A. & ZANETTI, C. R. Effect of the contents and form of rabies

glycoprotein on potency of rabies vaccination in cattle. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **97** (2): 265-268, March 2002.

RECLARD, P. Cell-culture vaccines for veterinary use. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 32, p. 314 - 323.

REED, L. J. & MÜENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end points. **Am. J. Hyg.**, **27**: 493 – 497, 1938.

REICHMANN, M. de L. A. B.; PINTO, H. DE B. F. & NUNES, V. DE F. P. Vacinação contra a raiva de cães e gatos. In: 1^a ed. **São Paulo, Instituto Pasteur**, 1999 (Manuais, 3) 32p.

ROOIJAKKERS, E. J. M.; GROEN, J.; UITTENBOGAARD, J. P.; VAN HERWIJNEM, J. & OSTERHAUS, A. D. M. E. Development and evaluation of alternative testing methods for the in vivo NIH potency test used for the quality control of inactivated rabies vaccine. **Dev. Biol. Stand. Basel Karger**, **86**: 137 – 145, 1996a.

ROOIJAKKERS, E. J. M.; UITTENBOGAARD, J. P.; GROEN, J. & OSTERHAUS, A. D. M. E. Rabies vaccine potency control: comparison of ELISA systems for antigenicity testing. **J. Virol. Meth.**, **58**: 111 – 119, 1996b.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A. & HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infect Dis**, **2**: 327 – 343, 2002.

SACRAMENTO, D.; BADRANE, H.; BOURHY, H. & TORDO, N. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. **J. gen. Virol.**, **73**: 1149 - 1158, 1992.

SAKAMOTO, S.; IDE, T.; TOKIYOSHI, S.; NAKAO, J.; HAMADA, F.; YAMAMOTO, M.; GROSBY, J. A.; NI, Y. & KAWAI, A. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. **Vaccine**, **17** (3): 205-218, 1999.

SAS/STAT. Statistical Analysis Systems – **User's Guide**, v. 1 e v. 2. (SAS Institute Inc.) version 6. North Caroline, 1993.

SELIGMANN, E. B. Jr. Prueba de potencia NIH. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1976. cap. 33, p. 294 – 302.

SILVA, R. A. da & CUNHA, R. G. Vacinas anti-rábicas com hidróxido de alumínio e provas para controle de sua eficiência. **Rev. Brasil. Biol.**, **33** (1): 127 – 134, 1973.

SILVA, A. de C. R. da; CAPORALE, G. M. M.; GONÇALVES, C. A.; TARQUETA, M. C.; COMIN, F.; ZANETTI, C. R. & KOTAIT, I. Antibody response in cattle after vaccination

with inactivated and attenuated rabies vaccines. **Rev. Inst. Med. Trop., S. Paulo**, 42 (2): 95 - 98, March-April, 2000.

SINGH, H. Beta-propiolactone-inactivated sheep brain vaccine. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 20, p. 234 - 242.

SISSONS, J. G. P. & OLDSTONE, M. B. A. Killing of virus-infected cells: The role of antiviral antibody and complement in limiting virus infection. **J. Infect. Dis.**, 142: 442 - 448, 1980.

SIZARET, P. General considerations in testing the safety and potency of rabies vaccines. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 36, p. 355 - 359.

SMITH, J. S. Mouse model for abortive rabies infection of the central nervous system. **Inf. Immunol.**, 31: 297 - 308, 1981.

SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. C. In: **Statistical Methods**. (Wiley editors) 7^a ed. Iowa State/USA: University Press, 1976, 507p.

SOULEBOT, J. P. Medical prophylaxis of animal rabies: choice of an inactivated vaccine. **Annales de Virologie** (Inst. Pasteur), v. 133, p. 163-169, 1982.

STEEL, R. G. D. & TORRIE, J. H. In: **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. (MacGraw-Hill edit.) 2^a ed. New York, 1980. 340p.

THARENHART, O. The Essen-ELISA for the determination of the content of inactivated cell-culture rabies vaccines. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 42, p. 389 - 393.

TIZAR, I. Apreensão e processamento de material estranho. p. 14 - 27. In: **Introdução a Imunologia Veterinária**. (Roca, ed.). 3^a ed. São Paulo, 2000. 329p.

TOMAN, K. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los test diagnosticos. **Bol. Un. Int. Cont. la Tub.**, 56 (1-2): 19 - 30, 1981.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of rabies virus. In: **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 3, p. 28-51.

TRIOLA, M. F. In: **Introdução a estatística**. (Livros Técnicos e Científicos Editora S/A) 7^a ed., 1999, 410p.

TURNER, G. S. Immune response after rabies vaccination basic aspects. *Annales del' Institut Pasteur. Virology*, **136**: 453 – 460, 1985.

VAZ, J. do A. M. C. **Avaliação oficial da eficácia de vacinas anti-rábicas para uso animal de origens e procedências diferentes**. 1999. 81 p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

WANDROP, R. L. In: _____ **Statistics: Learning in the Presence of Variation**. (Dubuque) Iowa: Wm. C. Brown, Oxford, England, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO Expert Committee on Rabies. **8th Report**. Geneva, 1992 (WHO – Technical Report Series, 824).

WILBUR, L. A. & AUBERT, M. F. A. The NIH test for potency. In: _____ **Laboratory techniques in rabies**. (Meslin, F.-X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, ed.), 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. , p. 360 – 368.

WUNDERLI, P. S.; SHADDOCK, J. H.; SCHMID, D. S.; MILLER, T. J. & BAER, G. M. The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccines. *Vaccine*, **9**: 638 - 642, 1991.

ZALAN, E.; WILSON, C. & PUKITIS, D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Stand.*, **7**: 213 - 220, 1979.

ZANETTI, C. R.; FRANCO, M. T. de; VASSÃO, R. C.; PEREIRA, C. A. & PEREIRA, O. A. Failure of protection induced by a Brazilian vaccine against Brazilian wild rabies viruses. *Arch Virol*, **143**: 1745 – 1756, 1998.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A: Metodologia aplicada na avaliação estatística do estudo comparativo entre testes de controle de qualidade de vacinas anti-rábicas inativadas e na produção experimental da vacina de referência nacional

A.1 Análise de resultados relativos à aplicação dos testes de Habel e o NIH

A comparação entre os resultados do teste de Habel e o NIH foi realizada, primeiro, pela estimativa inicial do valor crítico para aprovação de vacinas por NIH. Foi montada uma amostragem piloto de 42 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas, que foram testadas em paralelo pelos dois testes. Sobre os valores das recíprocas dos índices obtidos no teste de Habel, considerando o parâmetro de aprovação (índice $\geq 10^{4,0}$) determinado pela legislação em vigor, foi aplicada a análise estatística discriminante (JOHNSON, 1998) com o objetivo de calcular um valor de corte para os valores antigênicos obtidos no NIH, considerando-se, em princípio, a probabilidade de aprovação de vacina e, a estimativa das proporções de aprovações obtidas por Habel (76%). A partir dessa premissa foi determinado o tamanho da amostra, considerando-se a hipótese de nulidade ($H_0: p_{AH} = p_{AN}^1$), para experimentos comparativos em amostras pareadas (SNEDECOR & COCHRAN, 1976). Foi considerada ainda a probabilidade de confiança $P(|p_{AH} - p_{AN}|^2 < 0,07) = 0,80$ e o nível de significância $\alpha = 5\%$, sendo avaliada então, a amostra final dos resultados observados nos dois testes.

Após a determinação da amostragem, foi realizada então, análise dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel e do NIH a 210 diferentes partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais para uso animal, no Brasil, através de estatística descritiva (DACHS, 1978), com cálculo de média, mediana, 1º(Q_1) e 3º(Q_3) quartís, desvio padrão, amplitude interquartilica ($d=Q_3-Q_1$), valores mínimos e máximos, limites extremo inferior ($Q_1-d/2$) e superior ($Q_3+d/2$) da distribuição, teste de normalidade pela estatística de Kolmogorov-Smirnov (D), nível mínimo de significância para D, $\text{prob}(D < D_c)$ (STEEL & TORRIE, 1980) e aplicado o teste Qui-quadrado (SNEDECOR & COCHRAN, 1976).

A relação entre os resultados dos testes de Habel e NIH foi analisada através da correlação linear de Pearson (SNEDECOR & COCHRAN, 1976) e da estimativa do valor de corte para aprovação de partidas de vacinas por NIH (hipótese de nulidade $H_0: p_{RHAN} = p_{RNAH}^3$) pela aplicação do teste de proporções para amostras pareadas de McNemar (SNEDECOR & COCHRAN, 1976), ao nível de significância de $\alpha=5\%$ para os valores críticos de índice 0,90, 0,97, 0,98, 0,99, 1,0 e 1,1. O valor crítico escolhido foi aquele para o

¹ p_{AH} =proporção de vacinas aprovadas por Habel e p_{AN} =proporção de vacinas aprovadas por NIH.

² precisão relativa na diferença $p_{AH} - p_{AN}$

³ p_{RHAN} =proporção de vacinas reprovadas por Habel e p_{RNAH} =reprovadas por NIH e aprovadas por Habel

qual a H_0 é rejeitada ($p_{RNAH} > p_{RHAN}$), que significa formular uma hipótese de que o NIH é mais rigoroso do que o teste de Habel, representando-se um gráfico de dispersão em função do valor de corte estimado.

As doses letais 50% camundondo/0,003/mL (DL50) do vírus padrão de prova (CVS) e as doses efetivas 50% (DE 50) das vacinas de referência utilizadas nos testes NIH foram relacionadas através de gráfico de dispersão e de ajuste de uma equação linear entre as respectivas DL 50 e DE 50 (DRAPER & SMITH, 1981).

A.2 Análise de resultados da aplicação dos testes de Habel e do ELISA indireto

Os resultados obtidos no teste de Habel aplicado a 70 partidas de diferentes vacinas anti-rábicas inativadas e os resultados da aplicação do ELISA indireto a soros de camundongos vacinados com as mesmas 70 partidas de vacinas, considerando os resultados de aprovação e reprovação pelo teste de Habel, foram analisados através de estatística descritiva (DACHS, 1978), sendo calculados os parâmetros indicados no item A.1 desse apêndice, do teste de normalidade pela estatística de Kolmogorov-Smirnov (D), nível mínimo de significância para D, $\text{prob}(D < D_c)$ (STEEL & TORRIE, 1980) e do teste do Qui-quadrado (SNEDECOR & COCHRAN, 1976).

A relação entre os testes de Habel e o ELISA indireto foi determinada pela análise de variância através do modelo linear generalizado dos valores das absorbâncias (\hat{A}), considerando os soros de camundongos vacinados com as 70 diferentes partidas de vacinas, nas diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800 (JOHNSON, 1998), aplicando-se o teste de Student-Newmann-Keuls (STEEL & TORRIE, 1980) para comparações múltiplas entre diluições e entre os parâmetros de aprovação e reprovação dessas vacinas pelo teste de Habel. Foi determinada a estimativa do valor de corte para verificação da proteção conferida pela vacina segundo o teste ELISA indireto com base no limite de confiança de 99%, $M+3DP$, dos valores de absorbância observados entre os soros de animais imunizados com vacinas verdadeiramente aprovadas pelo teste de Habel e calculada ainda, a sensibilidade, especificidade e valores preditivos de resultados positivos e negativos por diluição (TOMAN, 1981).

A.2.1 Determinação da diluição de uso dos soros no ELISA indireto

A diluição de uso foi determinada através da análise dos resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto ao soro de camundongos não vacinados (SCNV) e ao soro controle positivo (SCP) nas diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800. Foi verificado, através da análise de perfil, o paralelismo entre as curvas do SCNV e do SCP, com base nas médias das

absorbâncias (\AA) sobre todas as diluições (JOHNSON & WICHERN, 1998). Além disso, esses resultados foram analisados através da estatística descritiva (STEEL & TORRIE, 1980) e sob o modelo linear generalizado, para testar as médias dentre as diluições, dentre o SCP e o SCNV, e dentre as diluições e os referidos soros (JOHNSON & WICHERN, 1998). Aplicou-se o teste de Student-Newmann-Keuls (STEEL & TORRIE, 1980) para comparações múltiplas entre diluições dentro do SCNV e do SCP e foi calculada a razão entre o SCP e o SCNV.

A.3 Análise dos dados obtidos na produção experimental da vacina de referência nacional

Na produção experimental da vacina de referência nacional foram feitas comparações entre as médias dos resultados da quantificação das glicoproteínas totais nas suspensões virais em 2^a, 3^a e 4^a passagens em células BHK, entre os resultados das titulações em camundongos lactentes e adultos jovens e da quantificação das glicoproteínas totais das 1^a e 2^a colheitas das suspensões virais em 5^a passagem em células BHK, com 6 repetições, através da aplicação do teste de modelos generalizados (GLM), da análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey (WANDROP, 1995). As curvas da cinética de inativação das suspensões virais pela bromoetilenoimina e pela betapropiolactona foram ajustadas pela equação de regressão linear simples, com 100% de explicação e parâmetros altamente significativos (DRAPER & SMITH, 1981).

A relação entre a inativação pela BEI e pela BPL foi avaliada através dos parâmetros de inclinação das respectivas equações lineares, sendo verificada a inclinação e a igualdade entre os interceptos (DRAPER & SMITH, 1981), visando mostrar a diferença estatística entre os resultados obtidos frente aos dois inativantes. Os testes de controle e o teste de imunogenicidade foram avaliados individualmente. A proteção conferida a camundongos pelas vacinas experimentais A₁, A₂, B₁, B₂ frente à vacina de referência do INPPAZ (VRI) foi estimada através da análise de probito (FINNEY, 1971) e pelo teste do Qui-quadrado (SNEDECOR & COCHRAN, 1976).

APÊNDICE B: Estatística descritiva de resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 210 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas para uso animal, no Brasil

	Habel		
	Total	≥ 4,0	< 4,0
Número de observações	210 (100,00)	173 (82,38%)	37 (17,62%)
Limite inferior	3,45	4,05	2,78
Valor mínimo	2,62	4,01	2,62
1° quartil	4,28	4,74	3,10
Mediana	5,16	5,48	3,58
Média	5,09	5,44	3,44
3° quartil	5,93	6,12	3,74
Valor máximo	7,08	7,08	3,97
Limite superior	6,76	6,81	6,44
Desvio padrão	1,08	0,83	0,40
Coefficiente de variação (%)	21,22	15,26	11,63
Moda	6,50	6,50	2,72
Amplitude interquartilica	0,83	0,69	0,32
D	0,455	-	-
Prob(D<Dc)	p>0,05	-	-

APÊNDICE C: Estatística descritiva de resultados obtidos pela aplicação do teste NIH a 210 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas para uso animal, no Brasil, considerando os parâmetros de aprovação do teste de Habel

	NIH		
	Total	Habel ≥ 4,0	Habel < 4,0
Número de observações	210 (100,00)	173 (82,38%)	37 (17,62%)
Limite inferior	-0,42	-0,69	0,00
Valor mínimo	0,23	0,39	0,23
1° quartil	0,98	1,23	0,54
Mediana	1,98	2,23	0,91
Média	2,69	2,99	1,26
3° quartil	3,77	3,99	1,62
Valor máximo	10,01	10,01	5,23
Limite superior	5,17	5,37	2,16
Desvio padrão	2,27	2,34	1,12
Coefficiente de variação (%)	84,39	78,26	88,89
Moda	0,70	1,23	0,41
Amplitude interquartilica	2,79	2,76	1,08
D	0,151	-	-
Prob(D<Dc)	P<0,001	-	-

APÊNDICE D: Estatística descritiva dos resultados obtidos pela aplicação do teste de Habel a 70 partidas de diferentes vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil

	Habel total	Habel $\geq 10^{4,00}$	Habel $< 10^{4,00}$
Número de observações	70	61	9
Limite inferior	3,69	4,04	2,86
Valor mínimo	3,10	4,01	3,10
1º quartil	4,52	4,79	3,19
Mediana	5,42	5,56	3,63
Média	5,32	5,59	3,51
3º quartil	6,19	6,30	3,86
Valor máximo	7,08	7,08	3,89
Limite superior	7,03	7,06	4,20
Desvio padrão	1,11	0,91	0,34
Coefficiente de variação(%)	20,83	16,33	9,83
Amplitude interquartilica	1,67	1,51	0,67
Moda	4,79	4,79	3,19
D	0,103	0,073	0,215
Prob(D<Dc)	0,068	>0,05	>0,15
	ns	ns	ns

APÊNDICE E: Estatística descritiva dos resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto a 70 partidas de diferentes vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, para uso animal, no Brasil

	Diluições			
	1/100	1/200	1/400	1/800
Número de observações	70	70	70	70
limite inferior	0,429	0,287	0,217	0,124
valor mínimo	0,450	0,290	0,170	0,075
1o quartil	0,588	0,380	0,263	0,167
Mediana	0,697	0,443	0,307	0,195
Média	0,774	0,496	0,330	0,212
3o. Quartil	0,907	0,566	0,356	0,254
valor máximo	1,521	1,113	0,679	0,422
limite superior	1,067	0,659	0,403	0,298
desvio padrão	0,250	0,170	0,099	0,070
coeficiente de variação(%)	32,28	34,20	29,86	32,98
amplitude interquartilica	0,319	0,186	0,093	0,087
Moda	0,784	0,374	0,251	0,185
D	0,145	0,153	0,151	0,115
prob(D<Dc)	<0,01	<0,01	<0,01	0,03
	*	*	*	*

APÊNDICE F: Estatística descritiva dos resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto (Å) a soros de camundongos vacinados com 70 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas comerciais, de uso animal, no Brasil, considerando o parâmetro de aprovação para o teste de Habel

Valores da Absorbância (Å) para resultados de Habel $\geq 10^{4,00}$				
	Diluições			
	1/100	1/200	1/400	1/800
Número de observações	61	61	61	61
Limite inferior	0,420	0,289	0,226	0,130
Valor mínimo	0,512	0,341	0,225	0,111
1° Quartil	0,596	0,386	0,273	0,172
Mediana	0,744	0,470	0,317	0,215
Média	0,803	0,514	0,342	0,221
3° Quartil	0,948	0,581	0,368	0,257
Valor máximo	1,521	1,113	0,679	0,422
Limite superior	1,124	0,679	0,416	0,300
Desvio padrão	0,251	0,172	0,099	0,068
coeficiente de variação(%)	31,236	33,452	28,859	31,020
Amplitude interquartilica	0,352	0,195	0,095	0,085
Moda	0,784	0,374	0,251	0,141
D	0,145	0,153	0,151	0,115
Prob(D<Dc)	<0,01	<0,01	<0,01	0,03
	*	*	*	*
Valores da Absorbância (Å) para resultados de Habel $< 10^{4,00}$				
	Diluições			
	1/100	1/200	1/400	1/800
Número de observações	9	9	9	9
Limite inferior	0,386	0,255	0,222	0,097
Valor mínimo	0,450	0,290	0,170	0,075
1° Quartil	0,489	0,316	0,238	0,126
Mediana	0,524	0,338	0,246	0,146
Média	0,572	0,370	0,250	0,152
3° Quartil	0,696	0,438	0,271	0,185
Valor máximo	0,740	0,501	0,345	0,238
Limite superior	0,800	0,499	0,288	0,215
Desvio padrão	0,116	0,075	0,049	0,048
coeficiente de variação(%)	20,194	20,226	19,779	31,836
Amplitude interquartilica	0,207	0,122	0,033	0,059
Moda	0,450	0,290	0,170	0,075
D	0,259	0,222	0,181	0,130
Prob(D<Dc)	0,08	>0,15	>0,15	>0,15
	ns	ns	ns	ns

APÊNDICE G: ANOVA para valores de absorvâncias obtidas pelo ELISA indireto a soros (diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800) de animais imunizados com 70 partids de vacinas anti-rábicas inativadas reprovadas e aprovadas pelo teste de Habel.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	P
Tratamentos ⁽¹⁾	1	0,563	0,563	7,82	0,0067
Camundongo/ tratamento	68	4,896	0,072	8,60	0,0001
Diluição	3	4,420	1,473	176,06	0,0001
Diluição x Tratamentos	3	0,122	0,041	4,85	0,0028
Erro(Diluição)	204	1,707	0,008		
Tratamentos d. diluição	4	0,687			
Tratamento d. dil=1/100	1	0,418	0,418	60,53	0,0001
Tratamento d. dil=1/200	1	0,163	0,163	23,56	0,0001
Tratamento d. dil=1/400	1	0,067	0,067	9,63	0,0001
Tratamento d. dil=1/800	1	0,039	0,039	5,345	0,0001
Erro	247 ⁽²⁾	1,707	0,001		

⁽¹⁾soro de animal imunizado com vacinas aprovadas e reprovadas pelo teste de Habel

⁽²⁾graus de liberdade do erro

$$= [qme(\text{tratamentos}) + 3qme(\text{diluição})]^2 / \{ [(qme(\text{tratamentos}))^2 / 68] + [(3qme(\text{diluição}))^2 / 204] \}$$

APÊNDICE H: Estatística descritiva para os verdadeiros valores de absorvância em soros de animais vacinados com vacinas reprovadas e aprovadas pelo teste de Habel.

Soro de animais imunizados com vacinas reprovadas pelo teste de Habel				
	Diluição			
	1/100	1/200	1/400	1/800
Mínimo	0,450	0,290	0,170	0,075
m _{vnp} -3s	0,457	0,295	0,201	0,104
m _{vnp}	0,572 b	0,370 b	0,250 b	0,152 b
m _{vnp} +3s	0,688	0,445	0,300	0,200
Máximo	0,740	0,501	0,345	0,238
S	0,040	0,025	0,016	0,016
Soro de animais imunizados com vacinas aprovadas pelo teste de Habel				
	Diluição			
	1/100	1/200	1/400	1/800
Mínimo	0,512	0,341	0,225	0,111
m _{vp} -3s	0,759	0,485	0,323	0,202
m _{vp}	0,803 a	0,514 a	0,342 a	0,221 a
m _{vp} +3s	0,848	0,543	0,361	0,239
Máximo	1,124	0,679	0,416	0,300
S	0,010	0,010	0,006	0,006

s=erro padrão da média; mesmas letras são não significantes ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Student-Newmann-Keuls

APÊNDICE I: Estatística descritiva dos resultados obtidos pela aplicação do ELISA indireto, expresso em absorbância a 492 nm (Å), a soros de camundongos não vacinados e ao soro controle positivo

Soro de camundongos não vacinados				
	Diluições			
	1/100	1/200	1/400	1/800
Número de observações	6	6	6	6
limite inferior	0,071	0,029	0,010	0,007
valor mínimo	0,072	0,029	0,013	0,006
1° Quartil	0,080	0,035	0,015	0,008
Mediana	0,106	0,047	0,018	0,013
Média	0,103	0,047	0,021	0,015
3° Quartil	0,124	0,059	0,028	0,015
valor máximo	0,127	0,062	0,032	0,037
Limite superior	1,124	0,679	0,416	0,300
desvio padrão	0,022	0,013	0,008	0,011
coeficiente de variação(%)	21,76	28,34	37,46	72,63
amplitude interquartílica	0,018	0,012	0,010	0,002
D	0,9119	0,9452	0,8940	0,7658
prob(D<Dc)	0,4325	0,7208	0,3338	0,0282
	ns	ns	ns	*
Soro controle positivo				
	Diluições			
	1/100	1/200	1/400	1/800
Número de observações	6	6	6	6
limite inferior	0,297	0,187	0,121	0,053
valor mínimo	0,216	0,107	0,052	0,030
1° Quartil	0,318	0,205	0,129	0,061
Mediana	0,348	0,231	0,150	0,079
Média	0,338	0,222	0,138	0,075
3° Quartil	0,391	0,267	0,165	0,095
valor máximo	0,407	0,291	0,181	0,103
limite superior	1,124	0,679	0,416	0,300
desvio padrão	0,069	0,064	0,046	0,026
coeficiente de variação(%)	20,49	28,83	33,56	35,30
amplitude interquartílica	0,042	0,036	0,016	0,016
D	0,9016	0,9067	0,8515	0,9425
prob(D<Dc)	0,3713	0,3983	0,1535	0,6988
	ns	ns	ns	ns
Razão	3,29	4,77	6,65	4,91

APÊNDICE J: Número de animais inoculados (nai), protegidos (nap), estimativa da probabilidade de proteção (epp) para a VRI, A₁, A₂, B₁ e B₂ nas diluições (Dil. 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 e 1/3125)

Dil.	VRI			A ₁			A ₂			B ₁			B ₂		
	Nai	Nap	epp	nai	nap	epp	nai	nap	epp	nai	nap	epp	nai	nap	Epp
5	10	10	1,00	12	11	0,92	12	12	1,00	11	9	0,82	12	12	1,00
25	10	9	0,90	12	10	0,83	12	10	0,83	12	9	0,75	12	9	0,75
125	11	7	0,64	10	6	0,60	11	8	0,73	12	7	0,58	12	7	0,58
625	12	0	0,00	11	6	0,54	11	5	0,45	11	7	0,63	12	6	0,50
3125	12	0	0,00	12	1	0,08	12	3	0,25	12	2	0,17	11	4	0,36

Fonte: dados da pesquisa

APÊNDICE L: Valores estimados e seus desvios padrão, entre parênteses, dos parâmetros da equação $LD=a+b\log_{10}(\text{diluição})$ para a estimativa dos probitos, os valores do Qui-quadrado (χ^2) para o teste de bom ajustamento da curva normal de probabilidade acumulada com seus níveis de significância p, valores das LD50 e os limites fiduciais de 95% de confiança para o verdadeiro valor da LD50 para a VRI, A₁, A₂, B₁ e B₂

Vaci- nas	Estimativa de a	Estimativa de b	χ^2	Probit o/para a LD50	DP	limite fiducial de 95% de confiança para o verdadeiro valor do probito para a DL 50		Dilui- ção 10^{LD50}	limite fiducial de 95% de confiança para o verdadeiro valor da diluição	
						inferio r	superior		inferior	superior
VRI	5,10564	-2,43546	2,1127	2,10	0,41	1,83	2,38	125	67	239
	(1,37073)	(0,64403)	p=0,549 4							
A1	2,18728	-0,8904	2,1490	2,46	1,12	2,02	3,02	286	105	1043
	(0,51718)	(0,21446)	p=0,542 1							
A2	2,51069	-0,92745	0,7792	2,71	1,08	2,29	3,31	509	194	2047
	(0,58800)	(0,230087)	p=0,854 4							
B1	1,46872	-0,57908	2,7421	2,54	1,73	1,92	3,63	344	83	4303
	(0,445921)	(0,181721)	p=0,433 1							
B2	1,87672	-0,68292	2,0888	2,75	1,46	2,23	3,74	560	168	5490
	(0,501231)	(0,203606)	p=0,554							

Fonte: dados da pesquisa