

**JULIANA DO AMARAL MOREIRA CONFORTI VAZ**

**AValiação OFICIAL DA EFICÁCIA DE  
VACINAS ANTI-RÁBICAS PARA USO  
ANIMAL DE ORIGENS E PROCEDÊNCIAS  
DIFERENTES**

**UNICAMP  
MARÇO/1999**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL



JULIANA DO AMARAL MOREIRA CONFORTI VAZ

# AVALIAÇÃO OFICIAL DA EFICÁCIA DE VACINAS ANTI-RÁBICAS PARA USO ANIMAL DE ORIGENS E

## PROCEDÊNCIAS DIFERENTES

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Juliana do Amaral Moreira  
Conforti Vaz  
 e aprovada pela Comissão Julgadora. [Assinatura]  
 19/3/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro  
Co-Orientadora: Prof. Dra. Masaio Mizuno Ishizuka

658666  
9909859

NIDADE	BC		
N. CHAMADA:	21/01/20		
	14825		
	Es.		
SÍMBO BC/	37510		
PROG.	229/99		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO R.B.	11,00		
DATA	29/04/99		
N.º CPD			

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

M-00123076-8

V477a

**Vaz, Juliana do Amaral Moreira Conforti**

Avaliação oficial da eficácia de vacinas anti-rábicas para uso animal de origens e procedências diferentes/Juliana, do Amaral Moreira Conforti Vaz. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999. 97f. ilus.

Orientador: Antônio Fernando Pestana de Castro

Co-Orientadora: Masaio Mizuno Ishizuka

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vacinas anti-rabicas. 2. Controle de qualidade. 3. Vírus.  
I. Castro, Antônio Fernando Pestana de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Campinas, 19 de março de 1999**

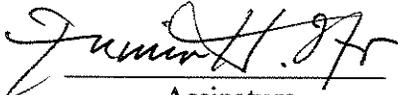
**Banca Examinadora**

**Titulares:**

Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro  
(Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Fumio Honma Ito

  
Assinatura

Profa. Dra. Clarice Weins Arns

  
Assinatura

**Suplentes:**

Prof. Dra. Lucilla Costallat Ricci

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*À minha mãe, Maria Júlia, sempre  
presente em meu coração, por  
ensinar-me a pensar positivamente  
e a lutar por meus ideais.  
Uma lembrança de força e alegria.*

*Ao meu marido, Júnior,  
verdadeiro companheiro, pelo  
apoio, compreensão e cumplicidade.*

*À minha filha, Gabriela, apesar de  
tão pequenina, nos surpreende com  
lições de vida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro, que proporcionou-me grande auxílio não apenas na execução deste trabalho, mas no Curso, estando sempre disposto a ensinar.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Masaio Misuno Ishizuka, que muito contribuiu para a realização deste trabalho. Muito obrigada pela excelente orientação, precisa e efetiva e por dar vida a este.

À minha sogra, Marilêusa, meus sinceros agradecimentos por estar sempre presente nos momentos em que mais precisei, sempre disposta a ajudar, com carinho e zêlo.

Ao meu pai, José Luiz, e aos meus irmãos Adriana, Márcia e Lauro Luís, pelo apoio e compreensão, principalmente nos momentos difíceis.

Agradeço aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração Microbiologia, em especial à Leila, Keila, Gérson, Adriana, Cristiane, Ângela, Mário Paulo, Daniel e Luciana.

Sinceros agradecimentos à Mirtis, pelos seus préstimos na solução de diversos problemas administrativos.

À Lourdes pela atenção e ajuda nos problemas burocráticos.

Ao Laboratório de Referência Animal/Campinas e principalmente aos funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Sinceros agradecimentos aos professores que participaram da Banca prévia, Dr. Fumio H. Ito, Dra. Lucilla C. Ricci e Dra. Clarice W. Arns, pela preciosa colaboração na correção deste trabalho.

À CAPES, pelo fornecimento de 6 meses de Bolsa de Estudos.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio que tem sido dado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração Microbiologia e, em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Antônio Pestana de Castro com auxílio para pesquisa e Bolsa de Produtividade em Pesquisa.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo apoio irrestrito.

# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1. MATERIAL .....	20
3.1.1. Amostras de vacinas .....	20
3.1.2. Animais .....	21
3.1.3. Vírus .....	21
3.1.4. Diluente.....	21
3.2. MÉTODOS .....	22
3.2.1. Teste de Inocuidade .....	22
3.2.1.1. Vacina Inativada .....	22
3.2.1.1.1. Teste de Vírus Residual .....	22
3.2.1.1.2. Teste de Toxicidade .....	23
3.2.1.2. Vacina Atenuada .....	23
3.2.1.2.1. Teste de Toxicidade .....	23
3.2.2. Teste de Esterilidade .....	24
3.2.2.1. Vacinas inativadas e atenuadas .....	24
3.2.3. Teste de Potência .....	24
3.2.3.1. Vacinas Inativadas .....	24
3.2.3.2. Vacinas Atenuadas .....	25
3.2.4. Titulação das Vacinas Atenuadas .....	25
3.2.5. Estatística .....	26

6. CONCLUSÕES .....	69
6.1. Vacina Inativada Nacional e Importada .....	69
6.2. Vacina Anti-Rábica Atenuada .....	69
6.3. Vacina Nacional e Importada .....	70
6.4. Imunogenicidade e Antigenicidade - Vacina Atenuada .....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Volume de vacinas anti-rábicas avaliadas no LARA, de 1988 a 1996, segundo o tipo e número de doses .....	18
Tabela 2. Número de partidas de vacinas anti-rábicas de uso animal examinadas segundo o tipo de vacina, origem e ano .....	20
Tabela 3. Vacina anti-rábica inativada de origem nacional e de uso animal avaliada quanto a aprovação segundo o ano de produção, número de partidas examinadas, número de partidas aprovadas, percentual de aprovação e limites de confiança .....	28
Tabela 4. Vacina anti-rábica inativada de produção nacional e de uso animal avaliada segundo o tipo de cultivo, ano de produção, número de partidas examinadas, aprovadas, percentual de aprovação e limites de confiança .....	29
Tabela 5. Vacina anti-rábica inativada importada e de uso animal avaliada quanto a aprovação segundo o ano de produção, número de partidas examinadas, número de aprovadas, percentual de aprovação e limites de confiança .....	31
Tabela 6. Vacina anti-rábica inativada importada e de uso animal avaliada segundo o tipo de cultivo, ano de produção, número de partidas examinadas, aprovadas, percentual de aprovação e limites de confiança .....	32
Tabela 7. Vacina anti-rábica atenuada e de uso animal avaliada quanto a aprovação segundo o ano de produção, número de partidas examinadas, número de aprovadas, percentual de aprovação e limites de confiança .....	34
Tabela 8. Vacina anti-rábica inativada, de uso animal, avaliada quanto a aprovação segundo as espécies animais a que se destinam, ano de produção, número de partidas examinadas, aprovadas e percentual de aprovação.....	36

Tabela 9. Vacina anti-rábica inativada, de uso animal, avaliada quanto ao limite de confiança de cada percentual de aprovação segundo as espécies animais a que se destinam e ano de produção.....	38
Tabela 10. Vacina anti-rábica atenuada e de uso animal, avaliada quanto a aprovação segundo as espécies animais a que se destinam, ano de produção, número de partidas examinadas, aprovadas, percentual de aprovação e limites de confiança.....	39
Tabela 11. Vacina anti-rábica inativada, de uso animal, avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas, percentual de reprovação e limites de confiança .....	41
Tabela 12. Vacina anti-rábica inativada de origem nacional para cães e gatos avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas, percentual de reprovação e limites de confiança .....	42
Tabela 13. Vacina anti-rábica inativada de origem importada para cães e gatos avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas, percentual de reprovação e limites de confiança .....	43
Tabela 14. Vacina anti-rábica inativada de origem nacional para bovinos avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas, percentual de reprovação e limites de confiança .....	44
Tabela 15. Vacina anti-rábica inativada de origem nacional para bovino, ovino, caprino, eqüino, cão e gato avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas, percentual de reprovação e limites de confiança .....	45

Tabela 16. Vacina anti-rábica inativada de origem nacional destinada a diferentes grupos de espécies animais avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas, percentual de reprovação e limites de confiança .....	46
Tabela 17. Vacina anti-rábica inativada de origem importada destinada a diferentes grupos de espécies animais avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas, percentual de reprovação e limites de confiança .....	47
Tabela 18. Vacina anti-rábica atenuada de origem nacional, de uso animal, avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas e percentual de reprovação .....	48
Tabela 19. Limite de confiança de cada percentual de reprovação de acordo com o teste da vacina anti-rábica atenuada de origem nacional, de uso animal .....	49
Tabela 20. Vacina anti-rábica atenuada de origem nacional destinada a cães avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas, percentual de reprovação e limites de confiança .....	50
Tabela 21. Vacina anti-rábica atenuada de origem nacional destinada a ruminantes, equinos e cães avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas e percentual de reprovação.....	51
Tabela 22. Limite de confiança de cada percentual de reprovação de acordo com o teste da vacina anti-rábica atenuada para ruminantes, equinos e cães .....	52
Tabela 23. Vacina anti-rábica atenuada de origem nacional destinada a ruminantes, equinos, cães e gatos avaliada quanto a reprovação segundo o teste, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas e percentual de reprovação.....	53

Tabela 24. Limite de confiança de cada percentual de reprovação de acordo com o teste da vacina anti-rábica atenuada para ruminantes, eqüinos, cães e gatos .....	54
Tabela 25. Vacina anti-rábica atenuada, de uso animal, avaliada quanto a reprovação segundo os testes de Titulação e Potência, ano de produção, número de partidas examinadas, reprovadas e percentual de reprovação .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Percentual de aprovação de vacina anti-rábica inativada nacional segundo o ano.....	28
Figura 2. Percentual de aprovação de vacina anti-rábica inativada nacional de uso animal segundo o ano e tipo de cultivo .....	30
Figura 3. Percentual de aprovação de vacina anti-rábica inativada de origem nacional e importada de uso animal segundo o ano .....	33
Figura 4. Percentual de aprovação de vacina anti-rábica inativada produzida em célula BHK-21 de origem nacional e importada de uso animal segundo o ano e tipo de cultivo .....	33
Figura 5. Percentual de aprovação de vacina anti-rábica atenuada nacional de uso animal segundo o ano .....	35
Figura 6. Percentual de aprovação de vacina anti-rábica inativada de origem nacional e atenuada nacional para uso animal segundo o ano .....	35
Figura 7. Percentual de aprovação de vacina anti-rábica inativada, de uso animal, segundo as espécies animais a que se destinam e ano de produção .....	37
Figura 8. Percentual de aprovação de vacina anti-rábica atenuada de uso animal segundo as espécies animais a que se destinam e ano de produção .....	40

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

OMS - Organización Mundial de la Salud

N.I.H. - National Institutes of Health

CVS - Challenge Virus Standard

SAD - Street - Alabama - Dufferin

ERA - Evelyn Rokitniki Abelseth

PM - Pitman - Moore

PAS - Louis Pasteur virus

PV - Pasteur Virus

DR-19 - *Desmodus rotundus*

EBL - European Bat Lyssavirus

ABLV - Australian Bat Lyssavirus

LEP - Low Egg Passage

IC - Intracerebral

SNC - Sistema Nervoso Central

SRD - Single Radial Immunodiffusion

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ABT - Antibody - Binding Test

GMP - Good Manufacture Production

célula BHK - célula Baby Hamster Kidney

célula NIL-2 - célula de embrião de hamster

CCL - Cérebro de Camundongos Lactentes

linfócitos Th - linfócitos T helpers

IL - Interleucina

IF - Interferon

NK - Natural Killers (células)

Ig - Imunoglobulinas

INPPAZ - Instituto Panamericano de Proteção de Alimentos e Zoonoses

CEPANZO - Centro Panamericano de Zoonoses

ND - Não Diluída

## RESUMO

Com a finalidade de se avaliar a eficácia das vacinas anti-rábicas de uso animal no Brasil de 1988 a 1996, foram examinadas 2442 partidas de vacinas, sendo 891 atenuadas e 1551 inativadas. Dentre as últimas, 1441 eram inativadas de origem nacional. Foram realizados testes de potência, inocuidade e esterilidade. Verificou-se que, no período estudado, 93,4 % (1346 partidas) das vacinas inativadas nacionais e 98,2 % (108 partidas) das inativadas importadas foram aprovadas. Ao serem avaliadas através do cálculo dos Limites de Confiança dos percentuais de aprovação, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de aprovação, apresentando homogeneidade no decorrer do tempo. Com relação às vacinas atenuadas, houve 92,1 % de aprovação, de 1988 a 1996, ou seja, foram aprovadas 821 partidas de vacinas. Comparando-se os Limites de Confiança, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa no decorrer do tempo. Ao se comparar a vacina inativada importada com a inativada e atenuada nacionais, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de aprovação, mostrando-se a inativada importada superior às nacionais. As vacinas também foram avaliadas quanto ao seu percentual de aprovação de acordo com a espécie animal a que eram destinadas e percentual de reprovação de acordo com o teste. Nas vacinas inativadas, a principal causa de reprovação foi em decorrência do teste de potência. Já, nas atenuadas, houve maior reprovação nos testes de potência, titulação e potência e titulação. Além disso, com relação às atenuadas, o teste de potência de Koprowski foi comparado com o teste de Titulação com a finalidade de se verificar a possibilidade de se retirar um ou outro teste do controle, mostrando-se de extrema necessidade a realização simultânea de ambos os testes.

## ABSTRACT

With the main purpose of evaluating rabies vaccines for animal immunization produced in Brazil from 1988 up to 1996, 2442 batches of vaccines, being 891 attenuated and 1551 inactivated ones, were examined. Among the latter, 1441 batches were produced in Brazil. Tests to check potency, safety and sterility were carried out. Within this period, 93.4 % (1346) lots of Brazilian inactivated vaccines and 98.2 % (108) lots of imported inactivated ones were approved. When evaluated by the calculation of 95 % confidence intervals it was observed no significant difference among the percentages of approval, showing homogeneity of the respective data throughout the period of study. With regard to the attenuated vaccines, during the same period 92.1 % (821) batches of vaccines were approved. Comparison of the 95 % confidence intervals showed statistically significant differences within the period of study. Comparison of imported inactivated vaccine with inactivated and attenuated Brazilian produced vaccines, showed significant differences among the percentages of approval showing that the imported inactivated vaccines were better than the Brazilian ones. The vaccines were also evaluated according to the animal species, which they were produced for as well as the percentage of non-approval as to the type of test. Among the inactivated vaccine higher percentages of non-approval were observed in the tests of potency, titration and potency plus titration. Furthermore, with regard to the attenuated vaccines, the Koprowski's potency test was compared with the titration test, with the objective of ascertain whether there was a possibility of working with only one control test.

## 1. INTRODUÇÃO

A raiva 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 (322 a.C.). Os povos do século I conheciam a infecciosidade da saliva de cães raivosos, chamando este material de “veneno” (“vírus” em latim). Numerosos fatos curiosos, relacionados principalmente com a doença no cão, permitem mostrar o grande temor que estes animais representavam para os povos antigos, principalmente se for levado em consideração o desconhecimento de medidas preventivas. Preconizava-se, numa mistura de sentimentos mágicos e religiosos, a crença de que o grande protetor desta zoonose era São Humberto (SCHLÖGEL, 1985, SCHNEIDER & BURGOA, 1994). Muitas tentativas profiláticas para evitar a raiva em pessoas expostas à infecção foram realizadas, tais como a cauterização, aplicação de ventosas para extrair o “veneno” e até os mais estranhos e empíricos procedimentos como beber vinho e tomar banho de mar (SCHNEIDER & BURGOA, 1994).

Porém, foi apenas no final do século XIX, com o descobrimento dos agentes microbianos, que Pasteur realizou a grande revolução científica em relação à prevenção da raiva, produzindo a primeira vacina anti-rábica (BAER, 1985). Esta era preparada por propagação de vírus fixo na medula espinhal de coelhos adultos, com administração de 13 doses consecutivas de preparados de vírus com virulência crescente. Porém, este esquema causava seqüelas neurológicas. A partir desta primeira vacina, numerosas modificações foram sendo introduzidas, objetivando melhoras da inocuidade das mesmas. (DELLEPIANE & DÍAZ, 1987, BUNN, 1988).

A vacinação em massa de cães, como um método de controle da raiva, só ocorreu em 1919, pelo emprego de uma vacina de macerado de cérebro e medula espinhal de coelho emulsionados em glicerina e parcialmente inativados pelo fenol. Em decorrência da presença de vírus residual nessas vacinas, este método de produção foi substituído pelo método de Semple, com inativação total do vírus através da associação do uso de fenol e temperatura (BUNN, 1988, DELLEPIANE & DÍAZ, 1987). HEMPT (1925), pouco tempo mais tarde, introduziu a vacina inativada com éter e fenol. Desde então, muitas outras modificações na produção das vacinas foram introduzidas e avaliadas, como o uso de tecido nervoso de diferentes espécies

animais utilizados na replicação do vírus, diminuição da concentração da suspensão viral e do volume da dose a ser aplicada além da utilização de métodos alternativos de inativação (luz ultravioleta, betapropiolactona) (DELLEPIANE & DÍAZ, 1987).

Porém, apesar destas modificações, a taxa de reações pós-vacinais ainda continuou sendo alta, ocorrendo tanto no homem como nos animais (DELLEPIANE & DÍAZ, 1987) e eram decorrentes da presença de um fator encefalitogênico associado a mielina, presente no sistema nervoso de animais adultos utilizados na produção das vacinas. Devido a isto, utilizou-se como substrato no preparo das vacinas anti-rábicas o encéfalo de animais jovens, uma vez que estes não apresentavam mielina ou a tinham em mínima proporção (BUNN, 1988). Além disso, nestes animais o vírus rábico se multiplicava com maior título do que nos adultos (DELLEPIANE & DÍAZ, 1987). De acordo com a ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 1984, para manter os fatores neuroparalíticos em concentrações muito baixas é necessário, no caso de camundongos lactentes, utilizar animais com menos de 9 dias de idade no momento da retirada do encéfalo.

Também, desde a época de Pasteur a comprovação experimental do valor imunogênico das vacinas anti-rábicas tem sido um aspecto abordado por numerosos pesquisadores. HABEL, em 1940, verificou que muitas das vacinas inativadas não eram suficientemente imunogênicas e com isso, desenvolveu um teste para avaliar a potência das mesmas, ou seja, a capacidade de estimularem o sistema imune, conduzido em camundongos e que apresentava boa reprodutibilidade, sendo portanto confiável. Este teste é usado ainda hoje em poucos países, como no Brasil para avaliação oficial das vacinas anti-rábicas destinadas ao uso animal (BAER, 1985, CUNHA, 1947). É uma prova quantitativa onde todos os animais recebem a mesma dose de vacina, porém a dose do vírus desafio em inoculações é variada (SIZARET, 1996).

Atualmente, o teste recomendado internacionalmente para determinar a capacidade imunogênica das vacinas e utilizado como controle oficial pela maioria dos países produtores de vacinas anti-rábicas é o teste de potência do “National Institutes of Health” (N.I.H.). Este é o melhor padronizado dos testes de potência “in vivo” e consiste basicamente na comparação de uma vacina de referência nacional (referendada por uma internacional) com a vacina que está sendo testada após inoculação de uma dose letal constante de vírus fixo (CVS) (WHO, 1994, SIZARET, 1996, WHO, 1992, WUNDERLI *et al.*, 1991).

Estes dois métodos “in vivo” (Habel e NIH) têm sido utilizados sem alterações há mais de 30 anos e há muitas desvantagens como a demanda de consideráveis quantidades de camundongos, duração de 28 dias para concluir o teste, falhas na reprodutibilidade dos resultados, variações na qualidade dos animais empregados, dentre outras. Além disso, o desafio intracerebral não reproduz a transmissão natural do vírus rábico, a via e o número de imunizações (intraperitoneal) não mimetizam a via de administração usual (intramuscular ou subcutânea), além das doses de reforço poderem permitir com que uma vacina com baixa capacidade imunógena pareça satisfatória no teste executado (BARTH, DIDERRICH, WEINMANN, 1988, REPKA *et al.*, 1990).

É importante ressaltar que estes testes mostram melhor desempenho com vacinas derivadas da mesma amostra parental de vírus daquela utilizada para o desafio intracerebral, ou seja, com desafio homólogo. Uma deficiência na indução de resposta imunológica principalmente pelas estirpes vacinais Flury LEP, LEP-C 26 e SAD B-19 tem ocorrido em decorrência do desafio heterólogo o qual pode vir a medir somente até 20% da potência de uma determinada vacina (CRICK *et al.*, 1981, BARTH, DIDERRICH, WEINMANN, 1988, BLANCOU *et al.*, 1989). Também vacinas recombinantes expressando a nucleoproteína do vírus rábico não conferem proteção contra um desafio intracerebral, mas induzem imunidade contra um desafio heterólogo periférico (TOLLIS *et al.*, 1991, SIZARET, 1996).

Além disso, no teste de potência N.I.H., os anticorpos neutralizantes são o principal fator de proteção dos camundongos após um desafio intracerebral. Portanto, a imunidade celular, apesar de importante na defesa imunológica contra o vírus rábico, não é amplamente medida neste teste e sim, a humoral. Entretanto, com o uso de outras vias de inoculação do vírus, a imunidade celular pode ser mais relevante na proteção contra o vírus rábico. A proteção que ocorre após um desafio intracerebral (IC) é devido ao trauma de inoculação permitir ao inóculo extravazar para a circulação sanguínea e aos anticorpos alcançarem o sistema nervoso central (SNC), além da imunoglobulina G ser capaz de atravessar a barreira hemato - encefálica. Portanto, o vírus inoculado é rapidamente neutralizado. Porém, após 24 horas, período em que o vírus inicia a replicação no SNC, mesmo altos títulos de anticorpos neutralizantes não conseguem neutralizá-lo. (WUNDERLI *et al.*, 1991).

Para a otimização do controle imunogênico da vacina contra a raiva, têm sido desenvolvidos testes alternativos “in vivo” como a prova de potência envolvendo desafio periférico, determinando-se a capacidade imunogênica da vacina e “in vitro” como o SRD (single radial immunodiffusion), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), ABT (modified antibody-binding test) e Contra-Imunoeletroforese utilizados para definir o conteúdo antigênico das vacinas anti-rábicas (FERGUSON, SEAGROATT, SCHILD, 1986, FITZGERALD, NEEDY, 1986, BARTH, DIDERRICH, WEINMANN, 1988, DÍAZ, NEBEL, MICELI, 1988, MICELI, TORROBA, DÍAZ, 1993, SIZARET, 1996).

Os testes de quantificação de antígeno (testes “in vitro”) são mais rápidos e mais econômicos para serem efetuados do que os testes do NIH e de Habel e têm sido utilizados com sucesso para o controle do processo de produção e para predizer valores de potência para a liberação das vacinas. É esperado que algum destes venham a substituir oficialmente as provas que envolvam desafio em animais após efetiva correlação com o teste de N.I.H., além da definição e monitoração regular das boas práticas de produção ou “good manufacture production”(GMP) para se garantir consistência no preparo do imunógeno, uma vez que estes testes medem o conteúdo antigênico e não a imunogenicidade. Porém, é ainda recomendada a determinação do índice de proteção induzido por uma vacina anti-rábica através de ensaios envolvendo desafio intracerebral em camundongos previamente imunizados, visto que consenso não tem sido alcançado em testes disponíveis baseados na determinação do conteúdo antigênico (WHO, 1992, WHO, 1994, SIZARET, 1996).

Apesar do considerável progresso na produção e uso de vacinas anti-rábicas durante a última década e dos recentes avanços em diagnóstico e no controle da raiva em cães e animais silvestres, este agente, por causar alta letalidade, ainda continua sendo um dos grandes riscos para a Saúde Pública em muitos países da África, América do Sul e Ásia sendo, também, economicamente importante para os países desenvolvidos e em desenvolvimento, no que tange à pecuária. A disponibilidade de vacinas de alta imunogenicidade e segurança ainda é um objetivo a ser alcançado em muitas áreas do mundo (WHO, 1992).

Para se ter uma idéia, em 1990, os países que mais notificaram casos de raiva no homem em números absolutos, foram o México e o Brasil com, respectivamente, 69 e 73 óbitos (SCHNEIDER & BURGOA, 1994). Em 1994, foram notificados 17.203 casos de raiva nos

animais, 51,0 % destes na América Latina, 48,2 % na América do Norte e no Caribe, 0,8 % (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1994).

No Brasil, os 4.452 casos de raiva registrados em animais em 1993 declinaram para 2.829 casos em 1994, sendo que já ocorreram registros de até 10.141 casos na década de 80 (BRASIL, 1998). A raiva urbana vem sendo controlada através de ações coordenadas do Ministério da Saúde com as Secretarias Municipais de Saúde. Quanto aos casos de raiva no homem e em cães domésticos estes vêm declinando significativamente. Já, o controle da raiva rural ainda está longe de alcançar os patamares das áreas urbanas. As regiões mais críticas correspondem ao Nordeste, seguida pelo Sudeste, com maior ocorrência entre os herbívoros (BRASIL, 1995). No Estado de São Paulo, as áreas críticas que apresentam alta endemicidade, onde a raiva parálitica ocorre com registro de focos continuados ou alternados, são representadas pelo Vale do Ribeira, Vale do Paraíba e ao longo do Rio Paraitinga. Além destas, algumas áreas esporádicas são notificadas nas regiões nordeste e central do Estado (TADEI *et al.*, 1991).

Sem dúvida, na América Latina, o principal reservatório do vírus rábico na área rural é o morcego hematófago (CORRÊA & CORRÊA, 1992). Este é o responsável pelo aparecimento de surtos em herbívoros com conseqüentes transtornos econômicos e sanitários na pecuária, traduzidos pela perda de grande número de animais (DELPRIETO & KONOLSAISEN, 1991). Para a prevenção destes casos, a WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 1992) recomenda a vacinação focal de bovinos, sendo que a vacinação em massa é indicada na dependência de fatores econômicos ou de Saúde Pública, de acordo com a política sanitária vigente no local.

Com relação à estrutura do vírus rábico, este possui um genoma RNA de fita simples, negativa, pertencente à família *Rhabdoviridae*, do gênero *Lyssavirus*. Apresenta simetria helicoidal, dispondo-se seu ácido nucleico no interior do envelope (TORDO, 1996, CORRÊA & CORRÊA, 1992). A partícula viral tem um diâmetro de 75 nm e um comprimento de 100-300 nm, sendo que variações no comprimento podem ser observadas entre as diferentes estirpes do vírus rábico. Como constituintes bioquímicos da sua estrutura são reconhecidas cinco proteínas, designadas L, G, N, M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>. As proteínas L (RNA polimerase RNA-dependente), M<sub>1</sub> e N estão associadas ao nucleocapsídeo que, juntamente com o RNA formam o complexo

ribonucleocapsídeo. Já a glicoproteína G é transmembranária e é o principal componente das espículas virais. A glicoproteína é o único antígeno capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, estando associada com a interação do vírus às superfícies celulares (KAPLAN, TURNER, WARREL, 1986, TORDO, 1996). Entretanto, o receptor específico do vírus rábico não está devidamente caracterizado e parece ser complexo e variar dependendo do tipo celular envolvido. Há trabalhos que sugerem, para células musculares e neuronais, que o receptor para o vírus rábico seria, respectivamente, a acetilcolina e os ácidos siálicos dos gangliosídeos (TORDO, 1996).

Os vírus que causam encefalite rábica foram originalmente classificados em quatro sorotipos com base em suas relações sorológicas e antigênicas. Porém, estudos genéticos têm confirmado e ampliado esta classificação, existindo atualmente seis genótipos. O genótipo 1 é constituído pelos vírus rábicos clássicos, como as estirpes vacinais e as de “rua”(estirpes selvagens isolados de animais ou do homem infectados). Os demais genótipos são constituídos pelos denominados “vírus relacionados à raiva”. Assim, há o genótipo 2 ou “Lagos Bat”, genótipo 3 ou “Mokola”, genótipo 4 ou “Duvenhage”, genótipo 5 ou “EBL 1” (European Bat Lyssaviruses 1), genótipo 6 ou “EBL 2” (European Bat Lyssaviruses 2) (BOURHY, KISSI, TORDO, 1993). Entretanto, um novo lyssavirus isolado de morcegos na Austrália (Australian Bat Lyssavirus, ABLV) foi recentemente caracterizado e através dos estudos da seqüência de genes da proteína N revelou-se que este representa um novo genótipo, o genótipo 7, estando estruturalmente, sorologicamente e geneticamente relacionado aos vírus rábicos clássicos (GOULD *et al.*, 1998).

É interessante ressaltar que os vírus Mokola, seguido pelos Lagos Bat, são os mais distantes filogeneticamente dos vírus rábicos clássicos e vacinais, pertencentes ao genótipo 1 (BOURHY, KISSI, TORDO, 1993, GOULD *et al.*, 1998), podendo-se traduzir esta diferença em deficiência na resposta imunológica a estes vírus após imunização com as estirpes vacinais, o que foi anteriormente demonstrado por DIETZSCHOLD *et al.* (1987 a), com relação ao vírus Mokola, após imunização com as vacinas constituídas por ERA, PM ou Duvenhage em camundongos e coelhos.

As estirpes utilizadas como semente na produção de vacinas ainda são as derivadas de isolados adquiridos há 50 a 100 anos, sendo a maioria obtida do original de Louis Pasteur de

1882, como PAS (Louis Pasteur Virus), PV (Pasteur Virus), PM (Pitman-Moore) e CVS (Challenge Virus Standard), com alterações no número de passagens e espécies animais utilizadas (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1984). Estudos de epidemiologia molecular do vírus rábico de “rua”, na Europa, através da amplificação e análise do seqüenciamento dos genes, mostraram uma marcada divergência com as amostras vacinais, apesar de pertencerem ao mesmo genotipo 1, o que poderia explicar falhas de proteção pós-vacinais observadas em muitos países, tanto no homem como nos animais. Em alguns países da Europa e África do Sul, onde ocorrem os outros genotipos, estas falhas também podem ser em decorrência de infecção por estes genotipos onde a proteção conferida pelas vacinas contituidas pelo vírus rábico clássico é incerta (SACRAMENTO *et al.*, 1992).

Após o processo de infecção, verifica-se que a resposta imune eficaz frente ao vírus rábico em animais e no homem é rara, sendo geralmente detectada apenas no ciclo final da doença. Normalmente, a dose infectante do vírus rábico é insuficiente para induzir uma resposta imune, sendo que a amplificação subsequente deste nas células musculares pode ser adequada para infectar os nervos terminais, mas não o suficiente para ser imunogênica. Além disso, a disseminação e replicação do vírus no tecido nervoso permite que este agente escape e se refugie das células efectoras do sistema imune do hospedeiro (TURNER, 1985). Conseqüentemente, a recuperação da raiva é extremamente rara no homem e demais espécies susceptíveis, embora infecção e recuperação sejam algumas vezes descritas em espécies selvagens e ocasionalmente, em cães (TURNER, 1985), macacos, cobaias, camundongos e até no homem (SMITH, 1981). Os aspectos da resposta imune envolvidos na recuperação ainda não foram determinados, embora se saiba que são dependentes da resposta humoral, uma vez que nestes casos, títulos altos de anticorpos são observados (SMITH, 1981, DELLEPIANE & DÍAZ, 1986).

Tem sido demonstrado, em experimentos “in vitro”, que o interferon  $\gamma$  (IF  $\gamma$ ) inibe a replicação do vírus rábico. É produzido por células T e é induzido “in vivo” tanto por cepas de rua quanto fixas, estando presente mais abundantemente, imediatamente antes da morte, no tecido cerebral de animais experimentalmente infectados (KING & TURNER, 1993). SMITH (1981) verificou que títulos de IF corresponderam a títulos virais no cérebro, contribuindo para a sobrevivência do animal após a infecção rábica. Além disso, a habilidade do IF de aumentar a

atividade citotóxica de linfócitos poderá ser benéfica para o hospedeiro contribuindo para a eliminação do vírus do sistema nervoso central, apesar deste poder surgir, para proteção, tardiamente na doença (KING & TURNER, 1993).

Já, após a imunização, o antígeno vacinal é captado pelas células apresentadoras, representadas principalmente pelos macrófagos, as quais vão apresentá-lo aos linfócitos “ T helpers - Th ” em associação ao Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (CMH-Classe II). As células apresentadoras secretarão mediadores como interleucina-I (IL-1), necessárias à ativação de células Th as quais irão liberar citocinas que agirão sobre os linfócitos B permitindo-se a expansão clonal e diferenciação destes em plasmócitos com conseqüente síntese de anticorpos capazes de neutralizar o vírus. Também ocorrerá a liberação de diferentes citocinas (IL-2, IF  $\gamma$ ) que ativarão diferentes células importantes para a eliminação do vírus das células infectadas (células T citotóxicas, “ natural killers - NK”, macrófagos, etc.) (PARSLOW, 1997a).

Vacinas produzidas por diferentes indústrias variam em sua habilidade de induzir IF. A produção de interferon é induzida em vacinas produzidas em cultura de células. Vacinas administradas 24 horas depois do desafio, podem estimular a produção de IF e proteção nos animais experimentais. Já, as vacinas mais antigas, produzidas em tecido cerebral, não induzem a sua produção, sendo que após doses repetidas da vacina, os níveis de IF declinam.

A função dos linfócitos é notadamente a de cooperar com a produção dos anticorpos contra o vírus rábico e de secretar citocinas (por exemplo, interleucina-2) capazes de ativar outras células do sistema imune (PARSLOW, 1997a). Portanto, ambos os componentes da resposta imune humoral e celular são vitais para a sobrevivência dos animais imunizados (SMITH, 1981).

Anticorpos neutralizantes, ativamente induzidos pela vacina, têm sido importante meio de proteção pós-exposição do homem. Acredita-se que os anticorpos dirijam-se à superfície glicoproteica do vírus rábico, neutralizando-o, além de provocar possível lise direta das partículas virais via complemento (MORGEAUX, 1992).

Com relação às classes de imunoglobulinas (Ig) produzidas em resposta à vacinação anti-rábica, a transição entre a resposta primária, onde a concentração de IgM é superior à da classe IgG, para a resposta secundária com concentrações mais elevadas de IgG, dependem da

pureza e qualidade do antígeno. Isto porque um antígeno purificado e imunogênico é capaz de possuir epítomos que poderão interagir com os macrófagos e os linfócitos T CD4, induzindo a produção de interleucinas (IL-10) capazes de estimular os linfócitos B a se transformarem em plasmócitos, produzindo altos níveis de IgG. Portanto, é importante o preparo adequado da vacina preservando-se os antígenos para substituir estimulação antigênica repetida pois a produção prolongada de IgM não é vantajosa, por apresentar atividade restrita à circulação. Vacinas anti-rábicas produzidas em cultura de células não prolongam a síntese de IgM. A persistência de anticorpos detectáveis depende da qualidade e quantidade do antígeno administrado (TURNER, 1985, PARSLOW, 1997b).

Por conseguinte, uma vacina ideal para a imunização de animais deverá ser segura, potente, fácil de administrar e econômica (ABESELTH, 1975, SOULEBOT, 1982).

Com relação à duração da imunidade, vários pesquisadores ao realizarem estudos com diferentes tipos de vacinas em bovinos verificaram que imunógenos preparados a partir de vírus vivo atenuado tipo ERA (Evelyn Rokitniki Abelseth) (WHO, 1992), foram os mais eficientes proporcionando um maior número de animais com títulos elevados de anticorpos neutralizantes e por períodos mais prolongados. Com a vacina de vírus fixo inativado obtido em cérebro de camundongo lactente e utilizado uma solução de hidróxido de alumínio como adjuvante foi observado comportamento semelhante ao da vacina ERA, apesar de apresentar título inferior. Estes dois tipos de vacinas proporcionaram proteção por mais de 100 dias após a vacinação (a vacina ERA até 365 dias após a imunização) (ATANASIU *et al.*, 1968, DREESEN, EUBANKS, BEHYMER, 1970, ABESELTH, 1975).

Uma vacina inativada pode ser tão efetiva quanto as produzidas com vírus vivo modificado, desde que se atendam certos requisitos de potência. LARGHI *et al.* (1979) observaram este fato ao estudarem a duração da imunidade da vacina produzida com vírus PV (Pasteur Vírus), em células BHK (Baby Hamster Kidney) e inativada com etilenoimina. Verificaram que a imunidade em cães era observada até 3 anos depois da vacinação. A vacina empregada neste estudo apresentou valor antigênico vinte vezes superior ao requisito mínimo da vacina de referência empregada para a prova de N.I.H. (National Institutes of Health) .

Com relação ao reforço vacinal, DÍAZ & LOMBARDO (1981), ao realizarem estudos com bezerros imunizados com vacina anti-rábica preparada em cérebro de camundongo lactente

adicionada com hidróxido de alumínio, concluíram que o reforço não era necessário até um ano após a imunização primária, visto que todos sobreviveram a um desafio realizado um ano após a vacinação. Além disso, um reforço com a vacina tipo ERA ou com a obtida em cérebros de camundongos lactentes aos 15 dias ou aos 30 dias pós vacinação inicial, não se justifica visto que não eleva o título de anticorpos neutralizantes. Estes, após atingirem as maiores concentrações, declinam rapidamente. (ATANASIU *et al.* 1968, DREESEN, EUBANKS, BEHYMER, 1970).

A respeito da hipótese de persistência da imunidade após a vacinação prejudicar a resposta imunológica decorrente de um reforço vacinal, ITO *et al.* (1991) constataram que não houve efeito do consumo do antígeno e a conseqüente diminuição nos títulos de anticorpos imediatamente após a revacinação.

As vacinas anti-rábicas que têm sido utilizadas para a imunização dos herbívoros podem ser aquelas constituídas por vírus vivo atenuado ou inativado (HUBBARD *et al.*, 1969). O mecanismo de imunização com vacinas de vírus vivo é baseado na replicação do vírus rábico nos tecidos do animal vacinado aumentando a concentração antigênica, conferindo resposta imune superior às vacinas de vírus inativado (ABESELTH, 1975).

Atualmente, existem dois tipos de vacinas para uso em animais domésticos: as produzidas em tecido cerebral (vacinas de primeira geração) e as produzidas em cultura celular (vacinas de segunda geração), sendo que significativo avanço tem sido obtido no desenvolvimento de vacinas anti-rábicas recombinantes visando principalmente a imunização por via oral de espécies selvagens, como raposas e lobos (WHO, 1992, DELLEPIANE & DÍAZ, 1987). A respeito destas últimas, os antígenos capazes de induzir imunidade contra infecção rábica letal (glicoproteína e nucleoproteína) têm sido expressados em uma variedade de vírus capazes de se recombinarem com genes rábicos os quais são responsáveis pela produção de tais proteínas, atuando assim, como vetores. A exemplo, têm sido utilizados os orthopoxvirus (FUJII *et al.*, 1994, MARTINI *et al.*, 1993, TAYLOR *et al.*, 1995), baculovirus (FU *et al.*, 1991), adenovirus (WHO, 1992) e herpesvirus (XUAN *et al.*, 1998).

As vacinas produzidas em tecido cerebral são inativadas e podem ser preparadas a partir de cérebros de camundongos recém nascidos ou de carneiros (Formidogel). São utilizadas

principalmente na América Latina, no Caribe e na África do Norte em programas de controle da raiva canina (WHO, 1992).

A vacina inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes (CCL), foi desenvolvida na América do Sul em 1955, por Fuenzalida & Palacios que utilizaram animais com 3 a 6 dias de idade, objetivando replicação viral e sua colheita antes do aparecimento da mielina (FUENZALIDA & PALACIOS, 1955). Esta vacina corresponde a uma suspensão a 1% de cérebro de camundongo lactente infectado com 3 estirpes de vírus rábico fixos: CVS, 51 e 91. A primeira é uma estirpe adaptada ao laboratório, descendente da cepa original de Pasteur e as outras são de origem canina e humana, respectivamente. São inativadas pela luz ultravioleta a qual altera o ácido ribonucleico viral, seguido de tratamento com fenol 1:1000 e timerosal 1:10000 (INPPAZ, 1994, DELLEPIANE & DÍAZ, 1987).

Com a finalidade de se conhecer a contribuição das estirpes CVS, 51 e 91 na imunogenicidade da vacina CCL e verificar se algumas dessas poderiam ser eliminadas da composição da vacina, DÍAZ, DELLEPIANE, PALOMO (1989) compararam a capacidade imunogênica da CCL trivalente original com a das vacinas experimentais bivalentes (CVS-51, CVS-91, 51-91) e monovalentes (CVS, 51, 91). Realizando provas de potência cruzada, de imunidade cruzada e sorológicas constataram que a vacina trivalente era a mais eficaz para a indução de resposta protetora às infecções por vírus rábico e para estimular a rápida resposta de títulos elevados de anticorpos neutralizantes.

Atualmente, o método de produção original desta vacina já foi modificado, sendo recomendado pela WHO (1992) o uso de camundongos de 1 dia de idade pois foram isoladas pequenas quantidades de mielina do tecido nervoso de camundongos com 9 dias de idade. Apesar disso, deve-se ainda manter a recomendação da OMS, de 1984, ou seja, centrifugar a suspensão cerebral a 17000 g por 10 minutos para reduzir ainda mais a quantidade de mielina contida sem comprometer a capacidade imunogênica da vacina. (OMS, 1984, WHO, 1992, DELLEPIANE & DÍAZ, 1987).

No Brasil, a vacina tipo Fuenzalida & Palacios é produzida com apenas uma estirpe (CVS ou PV) obtendo-se 2% de concentração de tecido nervoso (sendo a dose de 2 cc) a qual tem provocado alguns acidentes pós-vacinais. O tecido cerebral presente na vacina também induz o aparecimento de pequenas partículas responsáveis por obstrução da agulha no momento

da inoculação (GALLINA *et al.*, 1995). Com a finalidade de se reduzir a concentração de tecido cerebral, GALLINA *et al.* (1995) sugeriram que durante o processo de produção vacinal, após a sua diluição final, a vacina seja também filtrada. Este procedimento reduz o teor de nitrogênio proteico do produto final sem alterar a potência da vacina, tornando-a mais inócua e com menor quantidade de partículas.

A vacina tipo Fuenzalida tem a vantagem de conferir longa imunidade, de apresentar inocuidade em animais experimentais e na rotina de vacinação e ser eficiente na tecnologia de produção. 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. É a única vacina anti-rábica para uso humano, que se produz na América Latina (DELLEPIANE & DÍAZ, 1987).

Porém, se forem realizadas inoculações múltiplas ainda podem ocorrer, embora raramente, reações neuroalérgicas principalmente no homem (BLANCOU, 1986, DÍAZ, 1996).

Levando-se em consideração que o risco de reações pós-vacinais aumenta com o número de doses administradas, LARGHI, DÍAZ, ARROSI (1985) sugeriram reduzir de 10 para 6 doses o esquema de vacinação pós-exposição de humanos, visto que não houve diferença significativa nas respostas sorológicas de 2 grupos de pessoas que receberam vacina CRL com esquemas diferentes de vacinação (6 e 10 doses).

Já, a produção de vacinas em cultura celular exerce algumas vantagens sobre aquelas produzidas em tecido cerebral, como pureza, segurança e a possibilidade de se obter ricas preparações em uma escala industrial.

O produto final é totalmente livre de substâncias teciduais, contendo 40 a 500 vezes menos proteínas estranhas, o que favorece o possível uso de adjuvantes e suprime o risco de reação devido à presença de tecido nervoso sendo, portanto, mais seguro. Além disso, o vírus pode ser filtrado através de membranas, tornando a inativação mais fácil devido à eliminação de agregados. Também, há a facilidade de se avaliar a ausência de contaminantes (SOULEBOT *et al.*, 1982). As vacinas produzidas em cultura celular são constituídas por vírus inativado ou atenuado.

As vacinas inativadas preparadas em cultura celular conferem boa imunidade, são inócuas e se mantêm estáveis a temperaturas ambientes. Exigem porém tecnologia mais

avançada para sua produção, sendo que vacinas com estas características e associadas com adjuvantes têm a vantagem representada pela indução de imunidade semelhante a induzida para vacinas atenuadas (BLANCOU, 1986). Também são fáceis de serem associadas com outras vacinas (SOULEBOT *et al.*, 1982).

Muitos sistemas de cultura celular têm sido utilizados para a produção de vacinas inativadas, principalmente a cultura em células BHK (CÔRTEZ *et al.*, 1993). Várias estirpes de vírus rábico fixo têm sido utilizadas, sendo que a maioria é derivada da amostra original do Vírus Pasteur de Paris (PAS) (SACRAMENTO, 1992).

Vacinas inativadas conferem proteção semelhante, ou até mais elevada, quando comparadas com as atenuadas (LARGHI *et al.*, 1979, SOULEBOT *et al.*, 1982). SOULEBOT *et al.* (1982) verificaram que vacinas inativadas produzidas em células NIL-2 (embrião de hamster) conferiram proteção em cães, gatos, eqüinos, bovinos e ovinos ao desafio com várias estirpes de vírus rábico três anos após uma única vacinação.

Embora as vacinas com vírus vivo atenuado produzidas em cultura celular, tenham a característica de induzirem imunidade humoral e celular (PARSLOW, 1997 b), há o risco eventual de reversão da patogenicidade do vírus, ocasionando doença ao invés de imunoproteção. Além disso a estirpe rábica não se mantém atenuada na temperatura ambiente e a vacina exige tecnologia avançada para a sua produção (BLANCOU, 1986, TIZARD, 1990) e é difícil de ser associada a outros imunógenos (SOULEBOT *et al.*, 1982).

Quanto à vacina atenuada ERA, esta é preparada com vírus adaptados de cultura de células de rim de suíno, sendo grandemente utilizada nos animais de campo. Tem sido utilizada com sucesso nos bovinos, ovinos, caprinos, caninos e eqüídeos, sendo recomendado na dose de 2 ml (ATANASIU *et al.*, 1968).

Com relação aos animais silvestres, o uso de vacinas vivas não é recomendado (WHO, 1992).

A vacinação dos indivíduos jovens requer atenção especial pelo fato destes poderem carrear anticorpos maternos capazes de inibir a resposta imunológica frente à uma vacina (TIZARD, 1985). Estes devem ser vacinados apenas a partir de quatro a seis meses de idade se a mãe tiver sido imunizada (ABESELTH, 1975).

Para a seleção de uma vacina anti-rábica para uso em animais, primeiramente deve ser considerado que todas as partidas de vacinas que tenham sido aprovadas nas provas recomendadas de potência, pureza e inocuidade, e que tenham sido distribuídas, conservadas e administradas de acordo com as instruções podem induzir a imunidade adequada na espécie animal correspondente (OMS, 1984).

A vacina ideal para imunização deve, portanto, ser isenta de efeitos colaterais, ser pouco dispendiosa, estável e adaptável à vacinação em massa. Infelizmente, dois dos requisitos de uma vacina ideal, alta imunogenicidade e ausência de efeitos adversos, tendem a ser mutuamente incompatíveis.

As vacinas atenuadas estimulam melhor a resposta imunitária, sendo mais capazes de induzir imunidade mediada por células e a produção de interferon do que as inativadas. Porém, podem apresentar riscos de virulência residual a qual pode ocorrer não somente para a espécie específica, mas também para outras espécies. É possível sua reversão para um tipo totalmente virulento ou disseminação em animais não vacinados. Há também o risco de contaminação com microrganismos indesejados e exigem cuidados na preparação, armazenagem e manuseio para evitar a morte das cepas vacinais (TIZARD, 1985).

Já, as vacinas inativadas são imunógenos menos potentes que as atenuadas, mas são muito mais seguras e também há a facilidade de armazenagem. Porém, o uso de adjuvantes para aumentar a imunogenicidade pode provocar severas reações locais, enquanto as doses múltiplas ou as doses individuais elevadas de antígenos aumentam os riscos de provocar reações de hipersensibilidade, bem como interferir nos custos (TIZARD, 1985).

Ao selecionar uma vacina para ser utilizada em um programa de vacinação em massa, deve-se considerar a duração da imunidade e segurança que esta confere. Além disso, deve ser adequadamente administrada para promover a proteção desejada. (WHO, 1992). A WHO (1992) recomenda o uso de vacina anti-rábica inativada. O manejo no campo é mais fácil que da vacina atenuada, visto que é menos sensível a mudanças na temperatura. Adicionalmente, acidentes de inoculação não representam qualquer risco para o vacinador.

Além disso, a substituição de vacinas preparadas em tecido cerebral por vacinas produzidas em cultura celular é recomendado pela WHO (1992), sendo não aconselhado o uso de vacinas atenuadas até que a segurança e eficácia tenham sido bem determinadas. O uso de

vacinas atenuadas pode ser justificado em áreas onde a raiva é endêmica e, uma vez controlada a doença, deve-se preferir a imunização com vacinas inativadas (OMS, 1984). Maior frequência no uso de vacinas inativadas para a imunização dos animais tende a ser estimulado em decorrência de recentes avanços nas técnicas de sua produção (WHO, 1992).

Adicionalmente, não se pode deixar de considerar a influência do mercado na produção de uma vacina, sendo que além do controle de qualidade e biosegurança, ainda restam as questões de “marketing”. Uma vacina com considerável potencial pode não ser a ideal para ser comercializada, importante a análise da praticabilidade do produto, como a verificação do valor econômico da espécie alvo, o número de animais que serão imunizados, o tipo de produto (dose única ou múltipla). Além disso, certos países, por proibirem a importação de amostras estranhas, optam em não registrarem vacinas atenuadas. Isto requer que a vacina seja produzida no país interessado ou o desenvolvimento de uma vacina inativada pelo país exportador (SCHETTERS, 1995).

Considerando-se a vacinação como uma das principais medidas de controle da raiva, muitos estudos no sentido de se verificar o poder imunogênico das vacinas têm sido realizados, tanto no campo, como em laboratório. Isto demonstra a constante preocupação de diversos autores na avaliação da eficácia das vacinas recomendadas nos animais. Vacinas ineficazes ou com baixa concentração antigênica poderão levar ao comprometimento de todo um programa de controle.

Estudos realizados por CORDEIRO *et al.* (1990) em camundongos demonstraram que a vacina tipo vírus vivo atenuado, amostra ERA, protegeu os animais ao longo de 120 dias após a imunização e foi eficaz contra todas as variantes de rua e silváticas do vírus rábico, independentemente do esquema vacinal (1 ou 6 doses). ERBOLATO *et al.* (1989) também obtiveram resultados semelhantes, verificando proteção de 100% nos camundongos vacinados com este tipo de vacina.

Com relação às vacinas inativadas, também foram realizados diversos trabalhos para se verificar a eficácia, como os desenvolvidos por GERMANO *et al.* (1990a, 1990b), PRETO *et al.* (1991) e CÔRTEZ *et al.* (1993).

Além do exposto, não se pode omitir que contaminantes microbianos e/ou substâncias estranhas como proteínas, antibióticos, etc. presentes na vacina, podem ser tão prejudiciais

quanto à ausência de imunogenicidade, podendo levar a falhas de imunização e/ou predispor os vacinados à infecções pós-vacinais ou à reações indesejáveis (CALDAS, 1961, ADEYEMI, IKHELOA, OGUNDIPE, 1993).

Enfatizando a importância e necessidade de se realizar um controle de qualidade padronizado de todas as partidas de vacinas anti-rábicas produzidas, foram identificados, em 1990 na Nigéria, 4 microrganismos (*Penicillium*, *Rhizopus*, *Cryptococcus* e *Pseudomonas*) como contaminantes de vacinas do tipo Flury LEP (baixa passagem em ovo embrionado) (ADEYEMI, IKHELOA, OGUNDIPE, 1993).

Outros agentes exógenos contaminantes, como os parvovírus, foram detectados em vacinas com vírus vivo atenuados produzidas em cultura celular. Provavelmente, estes vírus sejam contaminantes da tripsina ou de soros de mamíferos utilizados na produção da vacina. Como são vírus pequenos e muito resistentes à inativação térmica, sobrevivem em medidas capazes de eliminar outros contaminantes menos resistentes (OMS, 1984).

É importante salientar a ocorrência de casos de raiva em animais com histórico de vacinação. Como exemplo, pode-se citar o aparecimento desta doença em 21 equinos dentre os quais, 05 haviam sido imunizados entre 4 a 24 meses antes do início dos sinais clínicos, o que demonstra a importância da utilização de vacinas de qualidade comprovada (GREEN *et al.*, 1992). Porém, não se deve esquecer que as causas de falhas na vacinação são várias e todas devem ser consideradas de importância equivalente àquelas inerentes à vacina (CALDAS, 1961). Atualmente, como já referido anteriormente, tem-se atribuído a ocorrência destas falhas pós-vacinais à possibilidade de existência de estirpes de vírus rábico antigenicamente diferentes, o que levou muitos pesquisadores a realizarem estudos sobre a eficácia de vacinas frente à várias estirpes de vírus rábico, assim como de vírus relacionados à raiva. A confirmação da existência de estirpes antigenicamente diferentes só foi possível após o advento da técnica de anticorpos monoclonais (OKOH, 1988, ERBOLATO *et al.*, 1989, CORDEIRO *et al.*, 1990, GERMANO *et al.*, 1990a, 1990b) e, atualmente, através da combinação da “polymerase chain reaction” (PCR) com a análise da seqüência de genes os estudos epidemiológicos e a avaliação da evolução do gênero *Lyssavirus* têm sido ampliados, contribuindo significativamente nos programas de controle da raiva, permitindo-se, no futuro, o desenvolvimento de vacinas com

estirpes cada vez mais relacionadas antigenicamente com a estrutura do vírus rábico persistente em determinada região (DAVIS, CASEY, WANDELER, 1994).

Enfatizando-se a importância do conhecimento sobre as vacinas anti-rábicas existentes em um determinado país e de sua eficácia, a literatura é carente de trabalhos que envolvam uma análise conjunta e geral das vacinas utilizadas mais freqüentemente no mercado nacional.

A avaliação da eficácia de uma vacina anti-rábica é conduzida com base nos testes de inocuidade, esterilidade e potência. O teste de inocuidade nas vacinas inativadas abrange as provas de vírus residual e de toxicidade, objetivando-se avaliar, respectivamente, a ausência de vírus ativo na vacina e de se detectar agentes estranhos que possam causar efeitos indesejáveis ao usuário. Nas vacinas atenuadas é realizado apenas o teste de toxicidade. Já, no teste de esterilidade objetiva-se isolar eventuais bactérias aeróbias, anaeróbias, microaerófilas e fungos. E o teste de potência é realizado para se verificar a capacidade imunogênica das vacinas (HABEL, 1976, NETTER & PERKINS, 1976, CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 1993). Adicionalmente, a literatura consultada é carente de trabalhos voltados para avaliação da eficácia das vacinas anti-rábicas segundo as espécies animais a que se destinam.

No Brasil, a avaliação da eficácia de todas as partidas de vacinas anti-rábicas produzidas no Brasil, bem como das importadas é realizada no Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura e Abastecimento/Brasil (LARA/Campinas). No período compreendido entre 1988 e 1996, foram analisadas quantidades de vacinas como ilustrado na tabela abaixo.

**TABELA 1 - VOLUME DE VACINAS ANTI-RÁBICAS AVALIADAS NO LARA, DE 1988 A 1996, SEGUNDO O TIPO E NÚMERO DE DOSES, CAMPINAS - 1999**

Tipo de vacina	Analisadas	Número de doses	
		Aprovadas	Reprovadas
Atenuada	54.361.684	50.132.412 (92,2 %)	4.229.272 (7,8 %)
Inativada	266.599.714	253.108.151 (94,9 %)	13.491.563 (5,1 %)
Total	320.961.398	303.240.563 (94,5%)	17.720.835 (5,5 %)

Estes dados revelam que o percentual de reprovação da vacina atenuada foi significativamente superior ao da vacina inativada ao nível de rejeição de 5%. Além disso, 5,5 % do total de doses analisadas, de 1988 a 1996, foram desprezados, ou seja, não foram comercializadas 17.720.835 doses de vacinas anti-rábicas.

Portanto, norteados pelos problemas acima citados, avaliou-se neste trabalho, de forma concreta e detalhada lotes de diferentes tipos de vacinas anti-rábicas destinadas ao uso animal, no Brasil no período de 1988 a 1996. Com isso, objetiva-se utilizar os dados obtidos na melhoria da qualidade destas vacinas e conseqüentemente, da profilaxia desta importante zoonose.

## **2. OBJETIVOS**

- 2.1. Pesquisar a eficácia das vacinas anti-rábicas destinadas ao uso animal e produzidas entre 1988 a 1996;
- 2.2. Avaliar a evolução da eficácia de vacinas anti-rábicas inativadas segundo a origem (nacional e importada) e espécies animais para as quais se destinam;
- 2.3. Avaliar a evolução da eficácia de vacinas anti-rábicas atenuadas nacionais e as espécies animais para as quais se destinam;
- 2.4. Estudo da relação entre os resultados da prova de imunogenicidade (Koprowski) e de antigenicidade (titulação de vacinas em camundongos) conferidos pelas vacinas atenuadas;
- 2.5. Identificar as mais freqüentes causas das reprovações.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS :

#### 3.1. MATERIAL:

##### 3.1.1. AMOSTRAS DE VACINAS:

No período de 1988 a 1996, foram avaliadas 2.442 partidas de vacinas anti-rábicas destinadas ao uso animal, sendo 1.551 inativadas e 891 atenuadas, pertencentes a 15 diferentes laboratórios. Dentre as primeiras, 1441 foram de produção nacional <sup>\*1</sup>. A distribuição de frequência de vacinas examinadas segundo a sua origem encontra-se na tabela abaixo:

**TABELA 2 - NÚMERO DE PARTIDAS DE VACINAS ANTI-RÁBICAS DE USO ANIMAL EXAMINADAS SEGUNDO O TIPO DE VACINA, ORIGEM E ANO, CAMPINAS - 1999**

ANO	VACINA INATIVADA			VACINA ATENUADA	TOTAL
	NACIONAL	IMPORTADA	TOTAL	NACIONAL	
1988	200	0	200	106	306
1989	196	0	196	48	244
1990	187	0	187	77	264
1991	204	1	205	91	296
1992	225	18	243	149	392
1993	154	10	164	124	288
1994	168	31	199	140	339
1995	32	5	37	15	52
1996	75	45	120	141	261
<b>TOTAL</b>	<b>1441</b>	<b>110</b>	<b>1551</b>	<b>891</b>	<b>2442</b>

As vacinas inativadas examinadas foram de 2 tipos: as que utilizavam como substrato biológico cérebros de camundongos lactentes (tipo Fuenzalida) infectados com vírus padronizado de desafio (CVS) e as que eram produzidas em linhagens celulares, com os substratos infectados pelo vírus Pasteur (PV), ERA e Flury LEP. Nestas vacinas, eram utilizados como inativantes a betapropiolactona, o bromoetilenoimina e a bromoetilenoamina. Os adjuvantes, quando utilizados, eram o hidróxido de alumínio, a saponina e a avridine. As

<sup>\*1</sup> No período de 1993 a 1996 as avaliações das vacinas foram realizadas no LARA por nós.

vacinas eram apresentadas sob forma líquida ou liofilizada.

Já, as vacinas anti-rábicas com vírus vivo atenuado foram preparadas em linhagens celulares originárias de rim de suíno, infectadas com as estirpes de vírus rábico ERA ou SAD e apresentadas apenas sob a forma liofilizada.

Eram recebidas no LARA/Campinas apenas as vacinas que estavam em condições apropriadas para a realização dos testes, ou seja, deviam apresentar temperatura adequada, estarem lacrados cada lote a ser testado e com os devidos protocolos da indústria produtora.

### **3.1.2. ANIMAIS:**

Foram utilizados diferentes lotes de camundongos albinos suíços e de cobaias oriundos do Biotério do LARA/Campinas nos testes de potência e inocuidade realizados para se avaliar a eficácia das vacinas anti-rábicas.

### **3.1.3. VÍRUS:**

Foram utilizadas duas cepas distintas de vírus rábico em suspensão a 20% em cérebros de camundongos cedidas pelo INPPAZ (Instituto Panamericano de Proteção de Alimentos e Zoonoses), antigo CEPANZO (Centro Panamericano de Zoonoses), a saber:

- estirpe DR-19 (“*Desmodus rotundus*”) adaptada às condições de laboratório, isolada a partir de morcego, mantida no LARA liofilizada e armazenada a -70 °C, sendo submetida a duas passagens sucessivas em camundongos, via IC. A partir da segunda passagem, a estirpe DR-19 era mantida por passagens sucessivas por via IC em camundongos, geralmente uma ou duas, e utilizada nas provas de controle de potência de Koprowski.

- estirpe CVS (“Challenge Virus Standard”). Mantida no LARA amostra viral liofilizada armazenada a -70 °C, sendo submetida a duas passagens sucessivas em camundongos, via IC. A partir da segunda passagem, a estirpe CVS era mantida por passagens sucessivas por via IC em camundongos, geralmente uma ou duas, e utilizada nas provas de controle de potência de Habel.

### **3.1.4. DILUENTES:**

O diluente empregado para o preparo das suspensões cerebrais, bem como na diluição dos vírus e vacinas atenuadas, foi constituído de uma solução de água destilada estéril,

adicionada de 2% de soro equino normal, previamente inativado a 56°C por 30 minutos, esterilizado por filtração e isento de anticorpos anti-rábiticos, acrescido de 0,1 ml. de uma solução de antibióticos contendo 200.000 UI de penicilina e 200 mg. de estreptomicina por mililitro.

Já, o diluente empregado na diluição das vacinas inativadas era a solução salina tamponada fosfatada pH 7,6.

### **3.2. MÉTODOS:**

A avaliação da eficácia das amostras foi realizada pelos testes de Inocuidade, Esterilidade e Potência, segundo técnicas estabelecidas pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal do MAA (BRASIL, 1988) descritos a seguir:

#### **3.2.1. TESTE DE INOCUIDADE:**

##### **3.2.1.1. Vacina Inativada:**

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

##### **3.2.1.1.1. Teste de Vírus Residual:**

Segundo técnicas estabelecidas pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal do MAA (BRASIL, 1988), realizou-se a inoculação de 0,01 ml. da vacina não diluída (ND) por via intracerebral (I.C.) em 16 camundongos lactentes de 4 a 6 dias de idade, divididos em 2 grupos de 8 e de 0,03 ml., por via I.C., da vacina ND em 2 grupos de 10 camundongos de 11 a 14 g de peso vivo. Foi realizada uma mistura de 3 frascos de vacina por partida. Após a inoculação, observava-se os camundongos inoculados durante 21 dias.

Deve-se ressaltar que vacinas com adjuvantes, como o hidróxido de alumínio e avridine, foram diluídas a 1:10 em água destilada estéril em decorrência do aparecimento de hidrocefalia em camundongos quando inoculados com vacinas ND (ALENCAR, comunicação pessoal \*<sup>1</sup>).

\*<sup>1</sup> ALENCAR, Cláudia. Comunicação Pessoal (Laboratório de Referência Animal / Recife - Ministério da Agricultura e Abastecimento).

Critério de aprovação: os animais devem permanecer normais, sem sintomas de raiva. Nos suspeitos, realizar o diagnóstico de confirmação de infecção rábica através da técnica de imunofluorescência direta e da prova biológica em camundongos (DEAN, ABELSELTH, ATANASIU, 1996, KOPROWSKI, 1996).

#### **3.2.1.1.2. Teste de Toxicidade:**

Segundo técnicas estabelecidas pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal do MAA (BRASIL, 1988), esta prova consistiu na inoculação de camundongos e cobaias. Em camundongos, inoculava-se 0,5 ml. de vacina (ND), por via intraperitoneal, com uma mistura de 03 frascos por partida, em 10 camundongos de 14-16 g. de peso vivo e também 0,5 ml. de vacina (ND), via subcutânea, em 05 cobaias com 300-400 g. de peso vivo. As cobaias foram pesadas no início da prova e ao término desta, não podendo apresentarem perdas de peso. Observava-se os camundongos durante 14 dias e as cobaias por 21 dias.

Critério de aprovação: nenhum óbito observado e/ou nenhuma reação local ou sistêmica. Em casos duvidosos, repetir a prova com o dobro do número de frascos utilizados anteriormente.

#### **3.2.1.2. Vacina Atenuada:**

##### **3.2.1.2.1. Teste de Toxicidade:**

Segundo técnicas estabelecidas pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal do MAA (BRASIL, 1988), esta prova consistiu na inoculação de camundongos e cobaias. Em camundongos, inoculava-se 0,5 ml. de vacina (ND), por via subcutânea, com uma mistura de 03 frascos por partida, em 10 camundongos de 14-16 g. de peso vivo e também 0,5 ml. de vacina (ND), via subcutânea, em 05 cobaias com 300-400 g. de peso vivo. As cobaias foram pesadas no início da prova e ao término desta, não podendo apresentarem perdas de peso. Observava-se os camundongos e as cobaias por 21 dias.

Critério de aprovação: nenhum óbito observado e/ou nenhuma reação local ou sistêmica. Em casos duvidosos, repetir a prova com o dobro do número de frascos utilizados anteriormente.

### **3.2.2. TESTE DE ESTERILIDADE:**

#### **3.2.2.1. Vacinas inativadas e atenuadas:**

Segundo técnicas estabelecidas pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal do MAA (BRASIL, 1988), semear em meios Caldo Casoy, Caldo Tioglicolato e Ágar Sabouraud. Utilizou-se 4 tubos de cada meio por partida. Inoculou-se 1,0 ml. de vacina de cada partida em cada tubo, mantendo-se a proporção de 1:10. Os meios Casoy e Tioglicolato foram incubados em estufa a  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e o Ágar Sabouraud a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 14 dias.

Critério de aprovação: não apresentar crescimento bacteriano e/ou fúngico nos tubos inoculados. Quando ocorrer crescimento em apenas 1 tubo, a prova deve ser repetida com 8 tubos.

### **3.2.3. TESTE DE POTÊNCIA:**

#### **3.2.3.1. Vacinas Inativadas:**

A potência das vacinas inativadas foi testada pelo método de Habel. Este consistiu na imunização, em 6 dias alternados, de 60 camundongos com 11 a 14 g. de peso vivo com 0,25 ml. da vacina diluída em solução salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,6 por via intraperitoneal, e posterior desafio no 14º dia após a primeira imunização. Para os testes, as vacinas preparadas em tecido cerebral foram diluídas de forma a se obter, uma concentração final de 0,5% de tecido e as vacinas produzidas em cultura celular foram diluídas a 1:10.

O desafio viral foi realizado com CVS diluído em soro normal de equino a 2% nas diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-5}$  com inoculação de 0,03 ml. via I.C. em 10 camundongos vacinados por diluição. As diluições  $10^{-5}$  até  $10^{-8}$  foram inoculadas em 50 camundongos não imunizados (0,03 ml por via I.C.), sendo utilizados 10 camundongos para cada diluição. O cálculo da DL 50(%) foi feito pelo método de REED & MÜENCH (1938), sendo a proteção calculada pela diferença entre o logaritmo da DL 50(%) nos camundongos controle (não imunizados) e o logaritmo da DL 50(%) nos camundongos imunizados.

Critério de aprovação: induzir resposta protetora à inoculação de 10.000 doses letais 50% (DL 50%) do vírus padrão de prova CVS, em camundongos adultos jovens com 11 a 14 g. de peso vivo.

### **3.2.3.2. Vacinas Atenuadas:**

A eficácia das vacinas atenuadas foi demonstrada através do teste de Koprowski. A imunização das cobaias consistia na inoculação, em 10 cobaias, de 0,25 ml. por animal da vacina diluída a 1:10 em soro normal de equino a 2%, no músculo gastrocnêmio direito. Após 21 dias, estes animais e o grupo controle eram desafiados frente à inoculação de 0,30 ml. da estirpe DR-19 diluída de tal forma a provocar mortes em, no mínimo, 80% das cobaias não imunizadas. Observava-se os animais por 21 dias e determinava-se o percentual de sobreviventes.

Critério de aprovação: proteger pelo menos 70% das cobaias previamente imunizadas, frente à inoculação da estirpe de vírus DR-19, capaz de provocar mortes em, no mínimo, 80% do grupo controle (não imunizado).

A estirpe de vírus DR-19 foi mantida por passagens sucessivas por via IC em camundongos, porém não mais do que cinco passagens. Para que fosse considerada viável, esta estirpe era avaliada, preliminarmente à sua utilização no teste de potência, por uma titulação que deveria resultar em um título de  $10^{6,9}$  a  $10^{7,5}$ /0,03 ml. IC em camundongos e por uma titulação em cobaias. Em cobaias, o vírus DR-19 era titulado com diluições sucessivas em soro normal de equino a 2%, de 1:20 até 1:640. Utilizava-se 10 cobaias por diluição e inoculava-se, no músculo gastrocnêmio esquerdo destas, 0,3 ml. de cada diluição. Observava-se os animais por 21 dias e determinava-se o percentual de mortos. O título viral era aquele correspondente à diluição anterior à última diluição que matou 100% das cobaias. Portanto, uma determinada suspensão viral a 20% de cérebro de camundongos era sempre diluída de acordo com a determinação de seu título em cobaias.

### **3.2.4. TITULAÇÃO DAS VACINAS ATENUADAS:**

Também, com relação às vacinas atenuadas, foi realizada a titulação de todas as partidas nas diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-5}$  com posterior inoculação de 0,03 ml por via I.C. em 10 camundongos com 11 a 14 g. de peso vivo por diluição. Observava-se os camundongos durante 21 dias. O cálculo da DL 50% foi realizado pelo método de REED & MÜENCH (1938), sendo que exigiu-se um título mínimo de  $10^{3,3}$  / 0,03 ml / via I.C. para que uma partida fosse considerada aprovada.

### 3.2.5. ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do cálculo do limite de confiança para os valores dos percentuais das vacinas aprovadas e reprovadas, com posterior comparação entre estes para constatar a existência ou não de diferenças dos percentuais entre os anos estudados em um mesmo tipo de vacina ou entre os vários tipos de vacinas analisadas.

Adotou-se como nível de rejeição da hipótese de nulidade, alfa igual a 0,05. Para a construção do limite de confiança foi utilizada a seguinte fórmula (BERQUÓ, 1961):

$$p - z\alpha \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} \leq \mathbb{P} \leq p + z\alpha \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} = 95 \%, \text{ onde:}$$

$p$  = percentual de aprovação

$z = 1,96$  para  $\alpha = 0,05$

$q = 100 - p$

$n = n^\circ$  partidas analisadas e

$\mathbb{P}$  = percentagem populacional

## 4. RESULTADOS

Para fins de análise, as vacinas foram classificadas em “aprovadas” e “reprovadas”. Segundo a Portaria nº 228 de 1988 (BRASIL, 1988) classifica-se como:

### Aprovada:

- 1) Vacina inativada: quando aprovada nos testes de Inocuidade, Esterilidade e Potência.
- 2) Vacina atenuada: quando aprovada nos testes de Inocuidade, Esterilidade, Potência e Titulação de Vacina.

### Reprovada:

Quando for reprovada em pelo menos 1 teste.

### **4.1. Resultado global de aprovação:**

Para apresentação dos resultados, será seguida a seguinte seqüência:

- 4.1.1. Vacina Inativada de Produção Nacional
- 4.1.2. Vacina Inativada Importada
- 4.1.3. Vacina Atenuada Nacional

### **4.1.1. Vacina Inativada Nacional:**

Dentre as 1441 partidas de vacinas anti-rábicas examinadas no período entre 1988 - 1996, observou-se que 1346 foram aprovadas, ou seja, o percentual de aprovação foi de 93,4 %. Os resultados segundo o número de partidas examinadas, aprovadas, o percentual de aprovação e respectivos limites de confiança estão reunidos na tabela 3.

**TABELA 3 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM NACIONAL E DE USO ANIMAL AVALIADA QUANTO A APROVAÇÃO SEGUNDO O ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, NÚMERO DE PARTIDAS APROVADAS, PERCENTUAL DE APROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

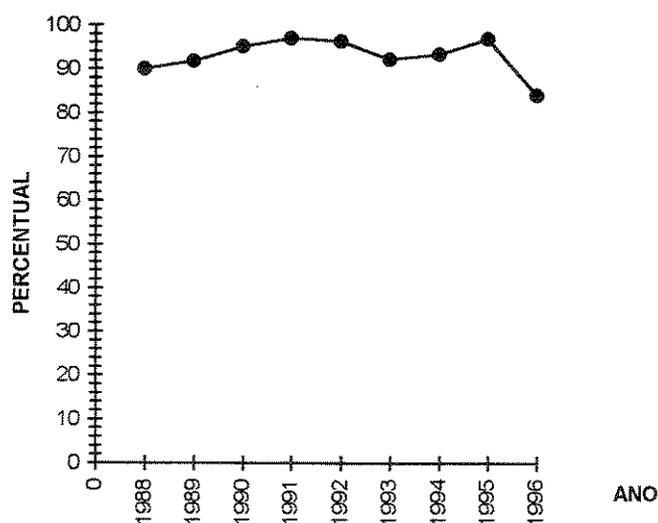
ANO	Nº Part. <sup>1</sup> Examinadas	Nº Part. Aprovadas	% Aprovação <sup>2</sup>	Limite de Confiança
1988	200	180	90,0	85,9  —  94,1
1989	196	180	91,8	87,9  —  95,7
1990	187	178	95,2	92,1  —  98,3
1991	204	198	97,0	94,6  —  99,4
1992	225	217	96,4	94,0  —  98,8
1993	154	142	92,2	87,9  —  96,5
1994	168	157	93,4	89,7  —  97,1
1995	32	31	96,8	90,7  —  100
1996	75	63	84,0	75,8  —  92,2
Total	1441	1346	93,4	92,2  —  94,6

<sup>1</sup> Nº Part. = Número de partidas

<sup>2</sup> % Aprovação = percentual de aprovação

Os dados da tabela 3 estão ilustrados na figura 1.

**FIGURA 1 - PERCENTUAL DE APROVAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA NACIONAL SEGUNDO O ANO, CAMPINAS - 1999**



Na tabela 4 estão apresentados os resultados de aprovação segundo o substrato biológico para preparo da vacina.

**TABELA 4 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE PRODUÇÃO NACIONAL E DE USO ANIMAL AVALIADA QUANTO A APROVAÇÃO SEGUNDO O TIPO DE CULTIVO, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, APROVADAS, PERCENTUAL DE APROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

Cultivo	CÉLULA BHK - 21 <sup>1</sup>				CÉLULA NIL - 2 <sup>2</sup>				CÉREBRO DE CAMUNDONGO LACTENTE <sup>3</sup>		
	Ano	Ex. <sup>4</sup>	Apr. <sup>5</sup>	%Apr. <sup>6</sup>	L.C. <sup>7</sup>	Ex.	Apr.	%Apr.	L.C.	Ex.	Apr.
1988	52	33	63,5	50,4  —  76,6	5	4	80,0	44,9  —  100	143	143	100
1989	59	43	72,8	61,5  —  84,1	5	5	100	100 <sup>8</sup>	132	132	100
1990	40	31	77,5	64,6  —  90,4	7	7	100	100	140	140	100
1991	34	28	79,4	65,9  —  92,9	8	8	100	100	162	162	100
1992	53	45	84,9	75,3  —  94,5	6	6	100	100	166	166	100
1993	63	51	80,9	71,2  —  90,6	7	7	100	100	84	84	100
1994	57	46	80,7	70,2  —  90,9	11	11	100	100	100	100	100
1995	7	6	85,7	59,8  —  100	3	3	100	100	22	22	100
1996	31	19	61,3	44,1  —  78,5	13	13	100	100	31	31	100
Total	396	302	76,3	72,2  —  80,4	65	64	98,5	95,6  —  100	980	980	100

<sup>1</sup> BHK -21 = célula originária de rim de hamster lactente; substrato para produção de vacina anti-rábica.

<sup>2</sup> NIL-2 = célula originária de embrião de hamster; substrato para produção de vacina anti-rábica.

<sup>3</sup> CÉREBRO DE CAMUNDONGO LACTENTE = substrato para produção de vacina anti-rábica.

<sup>4</sup> Ex. = número de partidas examinadas

<sup>5</sup> Apr. = número de partidas aprovadas

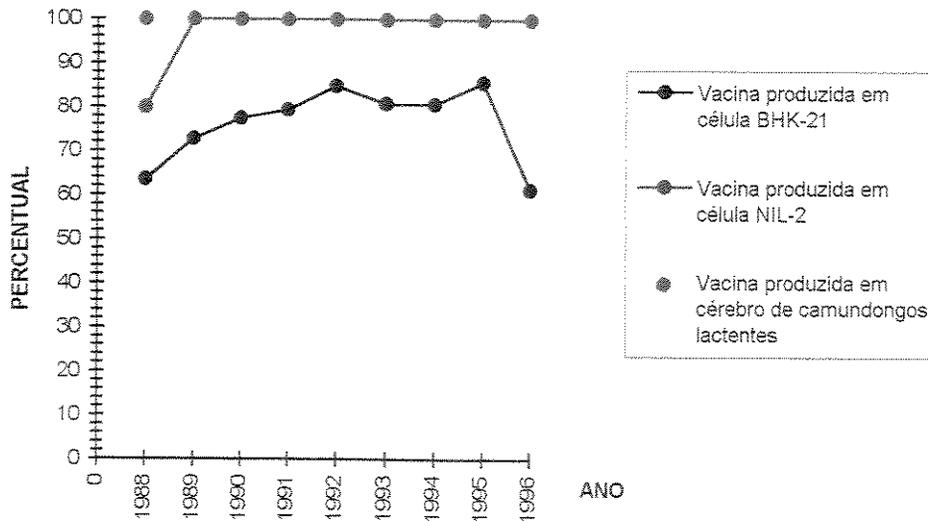
<sup>6</sup> %Apr. = percentual de aprovação

<sup>7</sup> L.C. = Limite de Confiança

<sup>8</sup> 100 = Limite superior

Os dados da tabela 4 estão ilustrados na figura 2.

**FIGURA 2 - PERCENTUAL DE APROVAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA NACIONAL DE USO ANIMAL SEGUNDO O ANO E TIPO DE CULTIVO, CAMPINAS - 1999**



#### **4.1.2. Vacina Inativada Importada:**

Dentre as 110 partidas de vacinas inativadas importadas, observou-se que 108 foram aprovadas, ou seja, o percentual de aprovação foi de 98,2 %. Os resultados segundo o número de partidas examinadas, aprovadas, percentual de aprovação e respectivos limites de confiança, estão reunidos na tabela 5.

**TABELA 5 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA IMPORTADA E DE USO ANIMAL AVALIADA QUANTO A APROVAÇÃO SEGUNDO O ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, NÚMERO DE APROVADAS, PERCENTUAL DE APROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Nº Part. <sup>1</sup> Examinadas	Nº Part. Aprovadas	% <sup>2</sup> Aprovação	Limites de Confiança
1991*	1	0	0	0 <sup>3</sup>
1992	18	17	94,4	83,8  —  100
1993	10	10	100	100 <sup>4</sup>
1994	31	31	100	100
1995	5	5	100	100
1996	45	45	100	100
Total	110	108	98,2	95,7  —  100

\* As importações, no Brasil, tiveram início em 1991.

<sup>1</sup> Nº Part. = número de partidas

<sup>2</sup> % = percentual

<sup>3</sup> 0 = limite inferior

<sup>4</sup> 100 = limite superior

Estão apresentados os resultados de aprovação na tabela 6, que se segue.

**TABELA 6 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA IMPORTADA E DE USO ANIMAL AVALIADA SEGUNDO O TIPO DE CULTIVO, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, APROVADAS, PERCENTUAL DE APROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

CULTIVO	CÉLULA BHK-21 <sup>1</sup>				CÉLULA NIL-2 <sup>2</sup>			CÉREBRO DE CAMUNDONGO LACTENTE <sup>3</sup>			
	ANO	Ex. <sup>4</sup>	Apr. <sup>5</sup>	%Apr. <sup>6</sup>	L.C. <sup>7</sup>	Ex.	Apr.	%Apr.	Ex.	Apr.	%Apr.
1991	1	0	0	0 <sup>8</sup>		—	—	—	—	—	—
1992	18	17	94,4	83,8	—  100	—	—	—	—	—	—
1993	10	10	100	100 <sup>9</sup>		—	—	—	—	—	—
1994	26	26	100	100		5	5	100	—	—	—
1995	1	1	100	100		1	1	100	3	3	100
1996	36	36	100	100		7	7	100	2	2	100
Total	92	90	97,8	94,9	—  100	13	13	100	5	5	100

<sup>1</sup> BHK -21 = célula originária de rim de hamster lactente; substrato para produção de vacina anti-rábica.

<sup>2</sup> NIL-2 = célula originária de embrião de hamster; substrato para produção de vacina anti-rábica.

<sup>3</sup> CÉREBRO DE CAMUNDONGO LACTENTE = substrato para produção de vacina anti-rábica.

<sup>4</sup> Ex. = número de partidas examinadas

<sup>5</sup> Apr. = número de partidas aprovadas

<sup>6</sup> %Apr. = percentual de aprovação

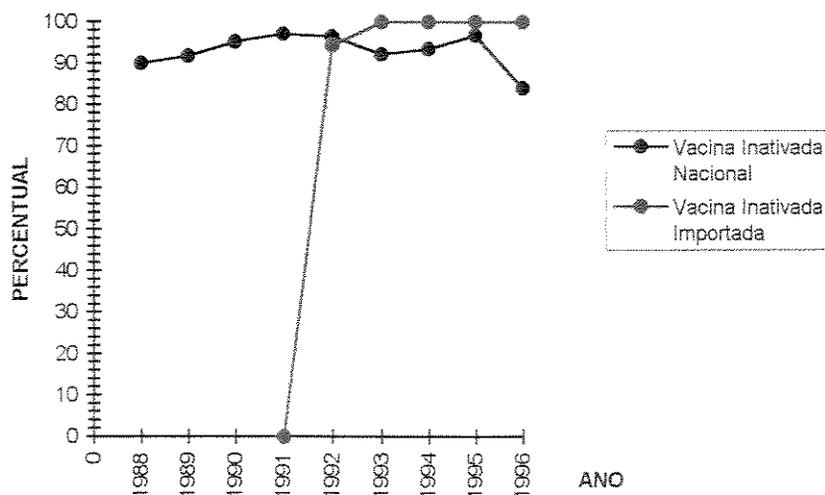
<sup>7</sup> L.C. = Limite de Confiança

<sup>8</sup> 0 = limite inferior

<sup>9</sup> 100 = limite superior

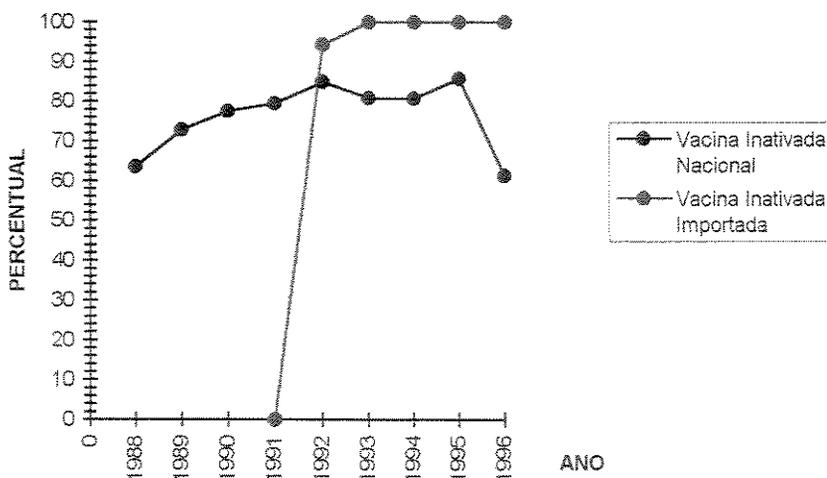
Os dados das tabelas 3 e 5 estão ilustrados na figura 3.

**FIGURA 3 - PERCENTUAL DE APROVAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM NACIONAL E IMPORTADA PARA USO ANIMAL SEGUNDO O ANO, CAMPINAS - 1999**



Na figura 4 estão apresentados simultaneamente os percentuais de aprovação de vacinas inativadas produzidas em células BHK-21 de origem nacional e importada.

**FIGURA 4 - PERCENTUAL DE APROVAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA PRODUZIDA EM CÉLULA BHK-21 DE ORIGEM NACIONAL E IMPORTADA DE USO ANIMAL SEGUNDO O ANO E TIPO DE CULTIVO, CAMPINAS - 1999**



#### 4.1.3. Vacina Atenuada Nacional:

Dentre as 891 partidas de vacinas atenuadas de origem nacional, observou-se que 821 foram aprovadas, ou seja, o percentual de aprovação foi de 92,1 %. Os resultados segundo o número de partidas examinadas, número de aprovadas, percentual de aprovação e respectivos limites de confiança, estão reunidos na tabela 7.

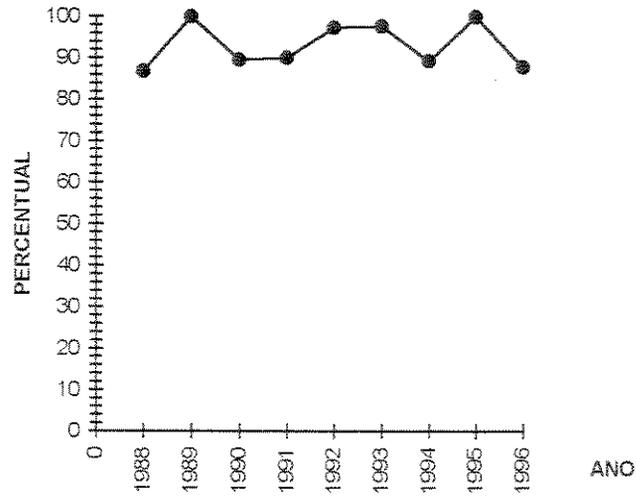
**TABELA 7 - VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA DE USO ANIMAL AVALIADA QUANTO A APROVAÇÃO SEGUNDO O ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, NÚMERO DE APROVADAS, PERCENTUAL DE APROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Número de Partidas Examinadas	Número de Partidas Aprovadas	Percentual de Aprovação	Limites de Confiança
1988	106	92	86,8	80,2  —  93,4
1989	48	48	100,0	100 <sup>1</sup>
1990	77	69	89,6	82,7  —  96,5
1991	91	82	90,1	84,0  —  96,2
1992	149	145	97,3	94,8  —  99,8
1993	124	121	97,6	94,9  —  100
1994	140	125	89,3	84,2  —  94,4
1995	15	15	100,0	100
1996	141	124	87,9	82,6  —  93,2
Total	891	821	92,1	90,3  —  93,9

<sup>1</sup> 100 = limite superior

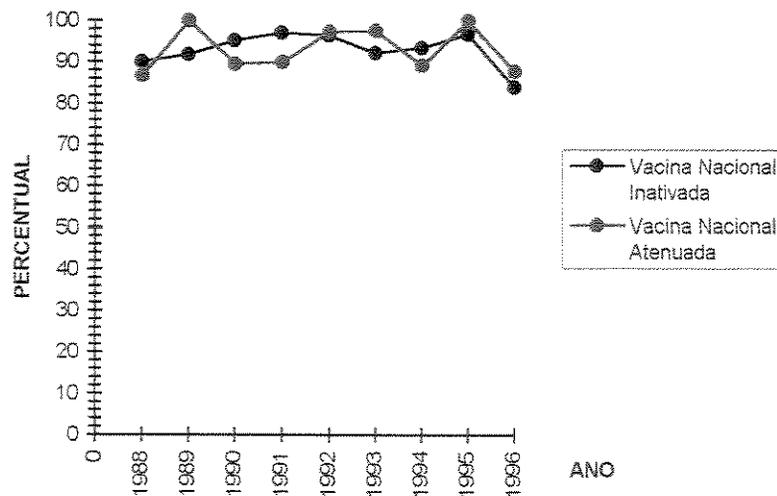
Os dados da tabela 7 estão ilustrados na figura 5.

**FIGURA 5 - PERCENTUAL DE APROVAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA NACIONAL DE USO ANIMAL SEGUNDO O ANO, CAMPINAS - 1999**



Os dados das tabelas 3 e 7 estão ilustrados na figura 6.

**FIGURA 6 - PERCENTUAL DE APROVAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM NACIONAL E ATENUADA NACIONAL PARA USO ANIMAL SEGUNDO O ANO, CAMPINAS - 1999**



## 4.2. Avaliação da aprovação segundo a espécie animal a que se destina a vacina:

### 4.2.1. Vacina Anti-Rábica Inativada:

As vacinas anti-rábicas inativadas, tanto nacionais quanto importadas, são destinadas a diferentes grupos de espécies animais. A tabela 8 reúne o número de partidas examinadas e aprovadas de acordo com as espécies animais as quais se destinam, assim como o percentual de aprovação e ano de produção.

**TABELA 8 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA, DE USO ANIMAL, AVALIADA QUANTO A APROVAÇÃO SEGUNDO AS ESPÉCIES ANIMAIS A QUE SE DESTINAM, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, APROVADAS E PERCENTUAL DE APROVAÇÃO, CAMPINAS - 1999**

ESPECIE ANIMAL	Cão e Gato <sup>1</sup>		Bovino		Bovino, Ovino, Caprino, Equino, Cão e Gato		Outras <sup>2</sup>	
	ANO	Nº Part. Apr./Ex. <sup>3</sup>	% Apr. <sup>4</sup>	Nº Part. Apr./Ex.	% Apr.	Nº Part. Apr./Ex.	% Apr.	Nº Part. Apr./Ex.
1988	145/149	97,3	21/29	72,4	6/7	85,7	8/15	53,3
1989	137/145	94,5	20/26	76,9	17/17	100	6/8	75
1990	144/148	97,3	6/7	85,7	18/21	85,7	10/11	90,9
1991	175/177	98,9	9/9	100	5/7	71,4	9/12	75
1992	195/197	98,9	7/8	87,5	20/24	83,3	12/14	85,7
1993	107/112	95,5	5/5	100	24/27	89	16/20	80
1994	134/138	97,1	3/3	100	30/36	83,3	21/22	95,5
1995	26/26	100	4/4	100	2/3	66,6	4/4	100
1996	53/56	94,6	3/4	75	12/18	66,6	40/42	95,2
<b>Total</b>	<b>1116/1148</b>	<b>97,2</b>	<b>78/95</b>	<b>82,1</b>	<b>134/160</b>	<b>83,8</b>	<b>126/148</b>	<b>85,1</b>

<sup>1</sup> Agrupadas as vacinas que se destinam apenas para cães e para gatos separadamente e aquelas destinadas para ambos.

<sup>2</sup> Vacinas destinadas a diferentes grupos de espécies animais, como:

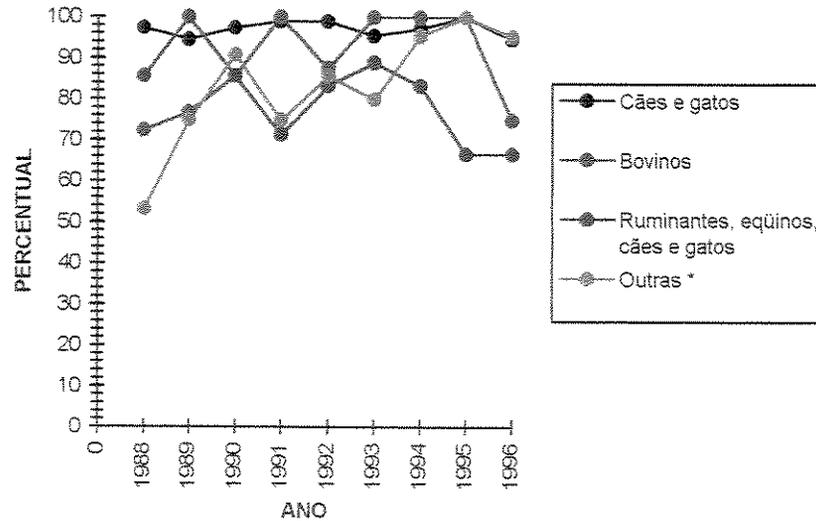
- para bovinos, ovinos e caprinos
- para bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos
- para bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e cães
- para bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos, cães e gatos
- para bovinos, ovinos, caprinos, cães e gatos
- para bovinos, ovinos, cães e gatos

<sup>3</sup> Nº. Part. Apr./Ex. = número de partidas aprovadas/ examinadas

<sup>4</sup>% Apr. = percentual de aprovação

Os dados da tabela 8 estão ilustrados na figura 7.

**FIGURA 7 - PERCENTUAL DE APROVAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA, DE USO ANIMAL, SEGUNDO AS ESPÉCIES ANIMAIS A QUE SE DESTINAM E ANO DE PRODUÇÃO, CAMPINAS - 1999**



\* Vacinas destinadas a diferentes grupos de espécies animais. como:

- para bovinos, ovinos e caprinos
- para bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos
- para bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e cães
- para bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos, cães e gatos
- para bovinos, ovinos, caprinos, cães e gatos
- para bovinos, ovinos, cães e gatos

Os Limites de Confiança para cada percentual de aprovação segundo as espécies animais a que se destinam das vacinas anti-rábicas inativadas estão reunidos na tabela 9.

**TABELA 9 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA, DE USO ANIMAL, AVALIADA QUANTO AO LIMITE DE CONFIANÇA DE CADA PERCENTUAL DE APROVAÇÃO SEGUNDO AS ESPÉCIES ANIMAIS A QUE SE DESTINAM E ANO DE PRODUÇÃO, CAMPINAS - 1999**

ESPÉCIE ANIMAL ANO	Cão e Gato <sup>1</sup> Limites de Confiança	Bovino Limites de Confiança	Bov., Ovino, Cap., Eq., Cão e Gato Limites de Confiança	Outras <sup>2</sup> Limites de Confiança
1988	94,7  —  99,9	56,1  —  88,7	59,8  —  100	28  —  78,6
1989	90,8  —  98,2	60,7  —  93,1	100	45  —  100
1990	94,7  —  99,9	59,8  —  100	70,8  —  100	73,8  —  100
1991	97,4  —  100	100	37,9  —  100	50,5  —  99,5
1992	97,5  —  100	64,6  —  100	68,4  —  98,2	67,3  —  100
1993	91,7  —  99,3	100	76,8  —  100	62,6  —  97,4
1994	94,3  —  99,9	100	71,1  —  95,5	87,5  —  100
1995	100 <sup>3</sup>	100	13,3  —  100	100
1996	88,7  —  100	32,6  —  100	44,8  —  88,4	89,4  —  100
Total	96,3  —  98,1	74,4  —  89,8	78,1  —  89,5	79,4  —  90,8

<sup>1</sup> Agrupadas as vacinas que se destinam apenas para cães e para gatos separadamente e aquelas destinadas para ambos.

<sup>2</sup> Vacinas destinadas a diferentes grupos de espécies animais, como:

- a) para bovinos, ovinos e caprinos
- b) para bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos
- c) para bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e cães
- d) para bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos, cães e gatos
- e) para bovinos, ovinos, caprinos, cães e gatos
- f) para bovinos, ovinos, cães e gatos

<sup>3</sup> 100 = limite superior

#### **4.2.2. Vacina Anti-Rábica Atenuada:**

As vacinas anti-rábicas atenuadas também são destinadas a diferentes grupos de espécies animais. A tabela 10 reúne o número de partidas examinadas e aprovadas de acordo com as espécies animais as quais se destinam, assim como o percentual de aprovação e ano de produção.

**TABELA 10 - VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA E DE USO ANIMAL AVALIADA QUANTO A APROVAÇÃO SEGUNDO AS ESPÉCIES ANIMAIS A QUE SE DESTINAM, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, APROVADAS, PERCENTUAL DE APROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Cão			Bovino, Ovino, Caprino, Equino e Cão			Bovino, Ovino, Caprino, Equino Cão e Gato		
	Nº Part. Apr./Ex. <sup>1</sup>	% Apr. <sup>2</sup>	L.C. <sup>3</sup>	Nº Part. Apr./Ex	% Apr.	L.C.	Nº Part. Apr./Ex.	% Apr.	L.C.
1988*	—	—	—	79/90	87,8	81,1  —  94,5	12/15	80	59,8  —  100
1989	—	—	—	37/37	100	100	11/11	100	100
1990	—	—	—	50/50	100	100	19/27	70,4	53,2  —  87,
1991	—	—	—	48/50	96	90,5  —  100	34/41	82,9	71,3  —  94,
1992	6/6	100	100 <sup>4</sup>	94/97	97	93,4  —  100	45/46	97,8	93,5  —  100
1993	8/8	100	100	72/72	100	100	41/44	93,2	85,8  —  100
1994	6/6	100	100	68/74	91,9	85,6  —  98,2	51/60	85	76  —  94,
1995	1/1	100	100	8/8	100	100	6/6	100	100
1996	8/12	66,6	40  —  93,2	85/88	96,6	92  —  100	31/41	75,6	62,5  —  88,
Total	29/33	87,9	76,8  —  99	541/566	95,6	93,9  —  97,3	250/291	85,9	82  —  89,8

\* Em 1988, houve também 1 partida de vacina destinada a ruminantes e eqüinos a qual foi aprovada.

<sup>1</sup> No. Part. Apr./Ex. = número de partidas aprovadas /examinadas

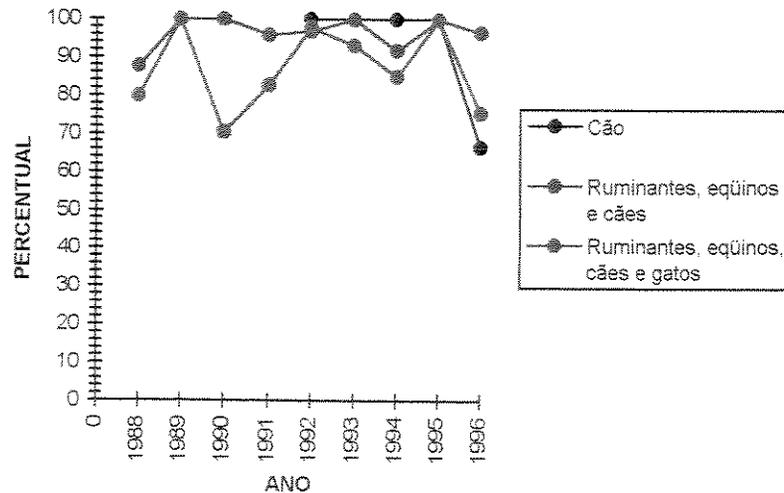
<sup>2</sup> % Apr. = percentual de aprovação

<sup>3</sup> L.C. = limite de confiança

<sup>4</sup> 100 = limite superior

Os dados da tabela 10 estão ilustrados na figura 8.

**FIGURA 8 - PERCENTUAL DE APROVAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA DE USO ANIMAL SEGUNDO AS ESPÉCIES ANIMAIS A QUE SE DESTINAM E ANO DE PRODUÇÃO, CAMPINAS - 1999**



#### **4.3. Avaliação do teste que forneceu resultado de reprovação:**

##### **4.3.1. Vacina Anti-Rábica Inativada:**

Dentre as 1481 partidas de vacinas anti-rábicas inativadas (nacionais e importadas) examinadas no período entre 1988 a 1996, observou-se que 1384 foram aprovadas em todos os testes, ou seja, nos testes de Inocuidade, Esterilidade e Potência, com um percentual de aprovação de 93,5 % e 95 partidas (6,4%) foram reprovadas pelo teste de potência, 1 (0,1%) pelo teste de inocuidade e 1 (0,1%) pelo teste de esterilidade. Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste, o percentual de reprovação e o limite de confiança (L.C.) estão reunidos na tabela 11.

**TABELA 11 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA, DE USO ANIMAL, AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS, PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovação por Teste								
	Potência <sup>1</sup>		L.C. <sup>6</sup>	Inocuidade <sup>2</sup>			Esterilidade <sup>3</sup>		
	Nº Repr./Ex. <sup>4</sup>	% Repr. <sup>5</sup>		Nº Repr./Ex.	% Repr.	L.C.	Nº Repr./Ex.	% Repr.	L.C.
1988	20/200	10	5,9  —  14,1	0/200	0	0 <sup>7</sup>	0/200	0	0
1989	16/196	8,3	4,4  —  11,8	0/196	0	0	0/196	0	0
1990	9/117	7,7	3,0  —  12,4	0/117	0	0	0/117	0	0
1991	6/205*	2,9	0,6  —  5,2	1/205	0,5	0  —  1,5	0/205	0	0
1992	9/243*	3,7	1,4  —  6,0	0/243	0	0	0/243	0	0
1993	12/164	7,3	3,4  —  11,2	0/164	0	0	0/164	0	0
1994	11/199	5,5	2,4  —  8,6	0/199	0	0	0/199	0	0
1995	1/37	2,7	0  —  7,8	0/37	0	0	0/37	0	0
1996	11/120	9,2	4,1  —  14,3	0/120	0	0	1/120	0,8	0  —  2,4
<b>Total</b>	<b>95/1481</b>	<b>6,4</b>	<b>5,2  —  7,6</b>	<b>1/1481</b>	<b>0,06</b>	<b>0  —  0,2</b>	<b>1/1481</b>	<b>0,06</b>	<b>0  —  0,2</b>

\* Inclui 1 vacina importada reprovada.

<sup>1</sup> Potência = determinação quantitativa da capacidade imunógena da vacina anti-rábica através do método de Habel, devendo esta apresentar, no mínimo, proteção contra o desafio de 10.000 DL50% do vírus padronizado de desafio (CVS) / 0,03 ml. por via intracerebral em camundongos com 11-14 g.

<sup>2</sup> Inocuidade = teste de toxicidade realizado em camundongos e cobaias para se confirmar a ausência de efeitos indesejáveis conferidos pelas vacinas anti-rábicas.

<sup>3</sup> Esterilidade = realizado com os meios Casoy, Tioglicolato e Sabouraud.

<sup>4</sup> Nº Repr./Ex. = número de partidas reprovadas/examinadas

<sup>5</sup> % Repr. = percentual de reprovação

<sup>6</sup> L.C. = Limites de Confiança

<sup>7</sup> 0 = limite inferior

Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste, o percentual de reprovação e o limite de confiança das vacinas anti-rábicas inativadas destinadas a cães e gatos estão reunidos nas tabelas 12 e 13.

**TABELA 12 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM NACIONAL PARA CÃES E GATOS AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS, PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovadas pelo Teste de Potência <sup>1</sup>		
	Número de Partidas Reprovadas/ Examinadas	Percentual de Reprovação	Limites de Confiança
1988	4/149	2,7	0,2  —  5,2
1989	8/145	5,5	1,8  —  9,2
1990	4/148	2,7	0,2  —  5,2
1991	1/176	0,6	0  —  1,8
1992	1/179	0,6	0  —  1,8
1993	5/102	4,9	0,7  —  9,1
1994	4/111	3,6	0,1  —  7,1
1995	0/22	0	0 <sup>2</sup>
1996	3/34	8,8	0  —  18,3
Total	30/1066	2,8	1,9  —  3,7

<sup>1</sup> Potência = determinação quantitativa da capacidade imunógena da vacina através do método de Habel, devendo apresentar, no mínimo, proteção contra o desafio de 10.000 DL50% do vírus padronizado de desafio (CVS) / 0,03 ml. por via intracerebral em camundongos com 11-14 g.

<sup>2</sup> 0 = limite inferior

**TABELA 13 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM IMPORTADA PARA CÃES E GATOS AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS, PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovadas pelo Teste de Potência <sup>1</sup>		
	Número de Partidas Reprovadas/ Examinadas	Percentual de Reprovação	Limites de Confiança
1991	1/1	100	100 <sup>2</sup>
1992	1/18	5,5	0  —  16
1993	0/10	0	0 <sup>3</sup>
1994	0/27	0	0
1995	0/4	0	0
1996	0/22	0	0
<b>Total</b>	<b>2/82</b>	<b>2,4</b>	<b>0  —  5,7</b>

<sup>1</sup> Potência = determinação quantitativa da capacidade imunógena da vacina através do método de Habel, devendo apresentar, no mínimo, proteção contra o desafio de 10.000 DL50% do vírus padronizado de desafio (CVS) / 0,03 ml. por via intracerebral em camundongos com 11-14 g.

<sup>2</sup> 100 = limite superior

<sup>3</sup> 0 = limite inferior

Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste, o percentual de reprovação e o limite de confiança das vacinas anti-rábicas inativadas destinadas a bovinos estão reunidos na tabela 14. Não houve vacina inativada importada destinada para esta espécie.

**TABELA 14 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM NACIONAL PARA BOVINOS AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS, PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovadas pelo Número de Partidas Reprovadas/ Examinadas	Teste de Potência <sup>1</sup>	
		Percentual de Reprovação	Limites de Confiança
1988	8/29	27,6	11,3  —  43,9
1989	6/26	23,1	6,9  —  39,3
1990	1/7	14,3	0  —  40,2
1991	0/9	0	0 <sup>2</sup>
1992	1/8	12,5	0  —  35,4
1993	0/5	0	0
1994	0/3	0	0
1995	0/4	0	0
1996	1/4	25	0  —  67,4
<b>Total</b>	<b>17/95</b>	<b>17,9</b>	<b>10,2  —  25,6</b>

<sup>1</sup> Potência = determinação quantitativa da capacidade imunógena da vacina através do método de Habel, devendo apresentar, no mínimo, proteção contra o desafio de 10.000 DL50% do vírus padronizado de desafio (CVS) / 0,03 ml. por via intracerebral em camundongos com 11-14 g.

<sup>2</sup> 0 = limite inferior

Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste, o percentual de reprovação e o limite de confiança das vacinas anti-rábicas inativadas nacionais destinadas a bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, cães e gatos estão reunidos na tabela 15. Não houve vacina importada destinada a estas espécies.

**TABELA 15 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM NACIONAL PARA BOVINO, OVINO, CAPRINO, EQUÍNO, CÃO E GATO AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS, PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovação por Teste			Inocuidade <sup>2</sup>		L.C.
	Repr./ Ex. <sup>3</sup>	Potência <sup>1</sup> % Repr. <sup>4</sup>	L.C. <sup>5</sup>	Repr./ Ex.	% Repr	
1988	1/7	14,3	0  —  40,2	0/7	0	0
1989	0/17	0	0 <sup>6</sup>	0/17	0	0
1990	3/21	14,3	0  —  29,2	0/21	0	0
1991	1/7	14,3	0  —  40,2	1/7	14,3	0  —  40,2
1992	4/24	16,7	1,8  —  31,6	0/24	0	0
1993	3/27	11,1	0  —  22,9	0/27	0	0
1994	6/36	16,7	4,5  —  28,9	0/36	0	0
1995	1/3	33,3	0  —  86,6	0/3	0	0
1996	6/18	33,3	11,6  —  55	0/18	0	0
Total	42/160	26,2	19,4  —  33	1/160	0,6	0  —  1,8

<sup>1</sup> Potência = determinação quantitativa da capacidade imunógena da vacina através do método de Habel, devendo apresentar, no mínimo, proteção contra o desafio de 10.000 DL50% do vírus padronizado de desafio (CVS) / 0,03 ml. por via intracerebral em camundongos com 11-14 g.

<sup>2</sup> Inocuidade = teste de toxicidade realizado em camundongos e cobaias para se confirmar a ausência de efeitos indesejáveis conferidos pelas vacinas anti-rábicas.

<sup>3</sup> No. Part. Repr./Ex. = número de partidas reprovadas/examinadas

<sup>4</sup> % Repr. = percentual de reprovação

<sup>5</sup> L.C. = Limites de Confiança

<sup>6</sup> 0 = limite inferior

Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste, o percentual de reprovação e o limite de confiança das vacinas anti-rábicas inativadas nacionais e importadas destinadas a diferentes grupos de espécies animais estão reunidos nas tabelas 16 e 17, respectivamente.

**TABELA 16 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM NACIONAL DESTINADA A DIFERENTES GRUPOS DE ESPÉCIES ANIMAIS\* AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS, PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovação por			Teste		
	Repr./ Ex. <sup>3</sup>	Potência <sup>1</sup> % Repr. <sup>4</sup>	L.C. <sup>5</sup>	Repr./ Ex.	Esterilidade <sup>2</sup> % Repr.	L.C.
1988	7/15	46,7	21,5  —  71,9	0/15	0	0
1989	2/8	25	0  —  55	0/8	0	0
1990	1/11	9,1	0  —  26	0/11	0	0
1991	3/12	25	0,5  —  49,5	0/12	0	0
1992	2/14	14,3	0  —  32,6	0/14	0	0
1993	4/20	20	2,5  —  37,5	0/20	0	0
1994	1/18	5,5	0  —  16	0/18	0	0
1995	0/3	0	0 <sup>6</sup>	0/3	0	0
1996	1/19	5,3	0  —  15,3	1/19	5,3	0  —  15,3
Total	21/120	17,5	10,7  —  24,3	1/120	0,8	0  —  2,4

\* Vacinas destinadas a diferentes grupos de espécies animais, a saber:

- a) para bovinos, ovinos e caprinos
- b) para bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos
- c) para bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e cães
- d) para bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos, cães e gatos
- e) para bovinos, ovinos, caprinos, cães e gatos
- f) para bovinos, ovinos, cães e gatos

<sup>1</sup> Potência = determinação quantitativa da capacidade imunógena da vacina através do método de Habel, devendo apresentar, no mínimo, proteção contra o desafio de 10.000 DL50% do vírus padronizado de desafio (CVS) / 0,03 ml. por via intracerebral em camundongos com 11-14 g.

<sup>2</sup> Esterilidade = realizado com os meios Casoy, Tioglicolato e Sabouraud.

<sup>3</sup> Repr./Ex. = número de partidas reprovadas/examinadas

<sup>4</sup> % Repr. = percentual de reprovação

<sup>5</sup> L.C. = Limites de Confiança

<sup>6</sup> 0 = limite inferior

**TABELA 17 - VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA DE ORIGEM IMPORTADA DESTINADA A DIFERENTES GRUPOS DE ESPÉCIES ANIMAIS AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS, PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovadas pelo Teste de Potência	
	Número de Partidas Reprovadas/Examinadas	% Reprovação
1994	0/4	0
1995	0/1	0
1996	0/23	0
Total	0/28	0

<sup>1</sup> Potência = determinação quantitativa da capacidade imunógena da vacina através do método de Habel, devendo apresentar, no mínimo, proteção contra o desafio de 10.000 DL50% do vírus padronizado de desafio (CVS) / 0,03 ml. por via intracerebral em camundongos com 11-14 g.

#### **4.3.2. Vacina Anti-Rábica Atenuada:**

Dentre as 891 partidas de vacinas anti-rábicas atenuadas examinadas no período entre 1988 a 1996, observou-se que 821 foram aprovadas em todos os testes, ou seja, nos testes de Inocuidade, Esterilidade e Potência, com um percentual de aprovação de 92,1 %. De 1988 a 1996, 70 partidas foram reprovadas por um ou dois testes. Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste e o percentual de reprovação estão reunidos na tabela 18.

**TABELA 18 - VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA DE ORIGEM NACIONAL, DE USO ANIMAL, AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS E PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovadas por Teste											
	Potência <sup>1</sup>		Titulação <sup>2</sup>		Inocuidade <sup>3</sup>		Esterilidade <sup>4</sup>		Pot. + Tit. <sup>5</sup>		Pot. + Est. <sup>6</sup>	
	Nº Repr./Ex. <sup>7</sup>	% Repr. <sup>8</sup>	Nº Repr./Ex.	% Repr.	Nº Repr./Ex.	% Repr.	Nº Repr./Ex.	% Repr.	Nº Repr./Ex.	% Repr.	Nº Repr./Ex.	% Repr.
1988	7/106	6,6	1/106	0,9	0/106	0	0/106	0	5/106	4,7	1/106	0
1989	0/48	0	0/48	0	0/48	0	0/48	0	0/48	0	0/48	
1990	2/77	2,6	0/77	0	2/77	2,6	1/77	1,3	3/77	3,9	0/77	
1991	3/91	3,3	2/91	2,2	1/91	1,1	0/91	0	3/91	3,3	0/91	
1992	3/149	2,0	0/149	0	0/149	0	0/149	0	1/149	0,7	0/149	
1993	0/124	0	1/124	0,8	0/124	0	0/124	0	2/124	1,6	0/124	
1994	3/140	2,1	10/140	7,1	0/140	0	1/140	0,7	1/140	0,7	0/140	
1995	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	
1996	4/141	2,8	5/141	3,6	0/141	0	1/141	0,7	6/141	4,3	1/141	0
<b>Total</b>	<b>22/891</b>	<b>2,5</b>	<b>19/891</b>	<b>2,1</b>	<b>3/891</b>	<b>0,3</b>	<b>3/891</b>	<b>0,3</b>	<b>21/891</b>	<b>2,4</b>	<b>2/891</b>	<b>0</b>

<sup>1</sup> Potência = determinação da capacidade imunógena da vacina anti-rábica atenuada pelo método de Koprowski, devendo esta proteger, no mínimo, 70% das cobaias inoculadas para ser aprovada.

<sup>2</sup> Titulação = título da vacina anti-rábica atenuada. Título mínimo para não ser reprovada =  $10^{3,3}$  / 0,03 ml. IC em camundongos com 11-14 g.

<sup>3</sup> Inocuidade = teste de toxicidade realizado em camundongos e cobaias para se confirmar a ausência de efeitos indesejáveis conferidos pelas vacinas anti-rábicas.

<sup>4</sup> Esterilidade = realizado com os meios Casoy, Tioglicolato e Sabouraud.

<sup>5</sup> Pot + Tit. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Titulação.

<sup>6</sup> Pot. + Est. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Esterilidade.

<sup>7</sup> Nº Repr/Ex. = número de partidas reprovadas/examinadas

<sup>8</sup> % Repr. = percentual de reprovação

Os Limites de Confiança para cada percentual de reprovação de acordo com o teste estão reunidos na tabela 19.

**TABELA 19 - LIMITE DE CONFIANÇA DE CADA PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO DE ACORDO COM O TESTE DE VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA DE ORIGEM NACIONAL, PARA USO ANIMAL, CAMPINAS - 1999**

ANO	Potência <sup>1</sup> Limite de Confiança	Titulação <sup>2</sup> Limite de Confiança	Inocuidade <sup>3</sup> Limite de Confiança	Esterilidade <sup>4</sup> Limite de Confiança	Pot. + Tit. <sup>5</sup> Limite de Confiança	Pot. + Est. <sup>6</sup> Limite de Confiança
1988	1,9  —  11,3	0  —  2,6	0	0	0,6  —  8,8	0  —  2,6
1989	0 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
1990	0  —  6,1	0	0  —  6,1	0  —  3,8	0  —  8,2	0
1991	0  —  7,0	1,4  —  3,0	0  —  3,24	0	0  —  7,0	0
1992	0  —  4,2	0	0	0	0  —  2,1	0
1993	0	0  —  2,4	0	0	0  —  3,8	0
1994	0  —  4,5	2,8  —  11,4	0	0  —  2,1	0  —  2,1	0
1995	0	0	0	0	0	0
1996	0,1  —  5,5	0,5  —  6,7	0	0  —  2,1	1,0  —  7,6	0  —  2,1
Total	1,5  —  3,5	1,2  —  3,0	0  —  0,7	0  —  0,7	1,4  —  3,4	0  —  0,5

<sup>1</sup> Potência = determinação da capacidade imunógena da vacina anti-rábica atenuada pelo método de Koprowski, devendo esta proteger, no mínimo, 70% das cobaias inoculadas para ser aprovada.

<sup>2</sup> Titulação = título da vacina anti-rábica atenuada. Título mínimo para não ser reprovada =  $10^{3,3} / 0,03$  mL. IC em camundongos com 11-14 g.

<sup>3</sup> Inocuidade = teste de toxicidade realizado em camundongos e cobaias para se confirmar a ausência de efeitos indesejáveis conferidos pelas vacinas anti-rábicas.

<sup>4</sup> Esterilidade = realizado com os meios Casoy, Tioglicolato e Sabouraud.

<sup>5</sup> Pot + Tit. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Titulação.

<sup>6</sup> Pot. + Est. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Esterilidade

<sup>7</sup> 0 = limite inferior

Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste e o percentual de reprovação das vacinas anti-rábicas atenuadas destinadas a cães estão reunidos na tabela 20.

**TABELA 20 - VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA DE ORIGEM NACIONAL DESTINADA A CÃES AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS, PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO E LIMITES DE CONFIANÇA, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovadas/ Examinadas	Reprovação por Teste		Reprovadas/ Examinadas	Pot. + Tit. <sup>2</sup>	
		Reprovação Titulação <sup>1</sup> Percentual de Reprovação	L.C.		Percentual de Reprovação	L.C.
1992	0/6	0	0 <sup>3</sup>	0/6	0	0
1993	0/8	0	0	0/8	0	0
1994	0/6	0	0	0/6	0	0
1995	0/1	0	0	0/1	0	0
1996	3/12	25	0,5  —  49,5	1/12	8,3	0  —  23,9
<b>Total</b>	<b>3/33</b>	<b>9,1</b>	<b>0  —  18,9</b>	<b>1/33</b>	<b>3,0</b>	<b>0  —  8,8</b>

<sup>1</sup> Titulação = título da vacina anti-rábica atenuada. Título mínimo para não ser reprovada =  $10^{3,3}$  / 0,03 mL. IC em camundongos com 11-14 g.

<sup>2</sup> Pot + Tit. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Titulação.

<sup>3</sup> 0 = limite inferior

Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste e o percentual de reprovação das vacinas anti-rábicas atenuadas destinadas a ruminantes, eqüinos e cães estão reunidos na tabela 21.

**TABELA 21 - VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA DESTINADA A RUMINANTES, EQUÍNOS E CÃES AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS E PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO, CAMPINAS - 1999**

ANO	Potência <sup>1</sup>		Reprovadas Titulação <sup>2</sup>		por Inocuidade <sup>3</sup>		Teste Pot. + Tit. <sup>4</sup>		Pot. + Est. <sup>5</sup>	
	Nº Repr./ Ex. <sup>6</sup>	% Repr. <sup>7</sup>	Nº Repr./ Ex.	% Repr.	Nº Repr./ Ex.	% Repr.	Nº Repr./ Ex.	% Repr.	Nº Repr./ Ex.	% Repr.
1988	6/90	6,7	1/90	1,1	0/90	0	3/90	3,3	1/90	1,1
1989	0/37	0	0/37	0	0/37	0	0/37	0	0/37	0
1990	0/50	0	0/50	0	0/50	0	0/50	0	0/50	0
1991	0/50	0	1/50	2,0	1/50	2,0	0/50	0	0/50	0
1992	3/97	3,1	0/97	0	0/97	0	0/97	0	0/97	0
1993	0/72	0	0/72	0	0/72	0	0/72	0	0/72	0
1994	1/74	1,3	4/74	5,4	0/74	0	1/74	1,3	0/74	0
1995	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0
1996	1/88	1,1	0/88	0	0/88	0	2/88	2,3	0/88	0
Total	11/566	1,9	6/566	1,1	1/566	0,2	6/566	1,1	1/566	0,2

<sup>1</sup> Potência = determinação da capacidade imunógena da vacina anti-rábica atenuada pelo método de Koprowski, devendo esta proteger, no mínimo, 70% das cobaias inoculadas para ser aprovada.

<sup>2</sup> Titulação = título da vacina anti-rábica atenuada. Título mínimo para não ser reprovada =  $10^{3,3} / 0,03$  mL. IC em camundongos com 11-14 g.

<sup>3</sup> Inocuidade = teste de toxicidade realizado em camundongos e cobaias para se confirmar a ausência de efeitos indesejáveis conferidos pelas vacinas anti-rábicas.

<sup>4</sup> Pot + Tit. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Titulação.

<sup>5</sup> Pot. + Est. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Esterilidade

<sup>6</sup> Nº Repr/Ex. = número de partidas reprovadas/examinadas

<sup>7</sup> % Repr. = percentual de reprovação

Os Limites de Confiança para cada percentual de reprovação de acordo com o teste das vacinas anti-rábicas atenuadas destinadas a ruminantes, equínos e cães estão reunidos na tabela 22.

**TABELA 22 - LIMITE DE CONFIANÇA DE CADA PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO DE ACORDO COM O TESTE DA VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA PARA RUMINANTES, EQUÍNOS E CÃES, CAMPINAS - 1999**

ANO	Potência <sup>1</sup> Limite de Confiança	Titulação <sup>2</sup> Limite de Confiança	Inocuidade <sup>3</sup> Limite de Confiança	Pot. + Tit. <sup>4</sup> Limite de Confiança	Pot. + Est <sup>5</sup> Limite de Confiança
1988	1,5  —  11,9	0  —  3,3	0	0  —  7,0	0  —  3,3
1989	0 <sup>6</sup>	0	0	0	0
1990	0	0	0	0	0
1991	0	0  —  5,9	0  —  5,9	0	0
1992	0  —  6,6	0	0	0	0
1993	0	0	0	0	0
1994	0  —  3,8	0,3  —  10,5	0	0  —  3,8	0
1995	0	0	0	0	0
1996	0  —  3,3	0	0	0  —  5,4	0
Total	0,8  —  3,0	0,3  —  1,9	0  —  0,6	0,3  —  1,9	0  —  3,3

<sup>1</sup> Potência = determinação da capacidade imunógena da vacina anti-rábica atenuada pelo método de Koprowski, devendo esta proteger, no mínimo, 70% das cobaias inoculadas para ser aprovada.

<sup>2</sup> Titulação = título da vacina anti-rábica atenuada. Título mínimo para não ser reprovada =  $10^{3,3} / 0,03$  mL. IC em camundongos com 11-14 g.

<sup>3</sup> Inocuidade = teste de toxicidade realizado em camundongos e cobaias para se confirmar a ausência de efeitos indesejáveis conferidos pelas vacinas anti-rábicas.

<sup>4</sup> Pot + Tit. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Titulação.

<sup>5</sup> Pot. + Est. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Esterilidade

<sup>6</sup> 0 = limite inferior

Os resultados segundo o número de partidas examinadas, reprovadas por teste e o percentual de reprovação das vacinas anti-rábicas atenuadas destinadas a ruminantes, equínos, cães e gatos estão reunidos na tabela 23.

**TABELA 23 - VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA DE ORIGEM NACIONAL DESTINADA A RUMINANTES, EQÜINOS, CÃES E GATOS AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO O TESTE, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS E PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO, CAMPINAS - 1999**

ANO	Potência <sup>1</sup>		Reprovadas Titulação <sup>2</sup>		por Inocuidade <sup>3</sup>		Teste Esterilidade <sup>4</sup>		Pot. + Tit. <sup>5</sup>		Pot. + Es	
	Nº Repr./ Ex. <sup>7</sup>	% Repr. <sup>8</sup>	Nº Repr./ Ex.	% Repr.	Nº Repr./ Ex.	% Repr.	Nº Repr./ Ex.	% Repr.	Nº Repr./ Ex.	% Repr.	Nº Repr./ Ex.	R
1988	1/15	6,6	0/15	0	0/15	0	0/15	0	2/15	13,3	0/15	
1989	0/11	0	0/11	0	0/11	0	0/11	0	0/11	0	0/11	
1990	2/27	7,4	0/27	0	2/27	7,4	1/27	3,7	3/27	11,1	0/27	
1991	3/41	7,3	1/41	2,4	0/41	0	0/41	0	3/41	7,3	0/41	
1992	0/46	0	0/46	0	0/46	0	0/46	0	1/46	2,2	0/46	
1993	0/44	0	1/44	2,3	0/44	0	0/44	0	2/44	4,5	0/44	
1994	2/60	3,3	6/60	10	0/60	0	1/60	1,6	0/60	0	0/60	
1995	0/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6	
1996	3/41	7,3	2/41	4,9	0/41	0	1/41	2,4	3/41	7,3	1/41	
Total	11/291	3,8	10/291	3,4	2/291	0,7	3/291	1,0	14/291	4,8	1/291	

<sup>1</sup> Potência = determinação da capacidade imunógena da vacina anti-rábica atenuada pelo método de Koprowski, devendo esta proteger, no mínimo, 70% das cobaias inoculadas para ser aprovada.

<sup>2</sup> Titulação = título da vacina anti-rábica atenuada. Título mínimo para não ser reprovada =  $10^{3,3} / 0,03$  mL. IC em camundongos com 11-14 g.

<sup>3</sup> Inocuidade = teste de toxicidade realizado em camundongos e cobaias para se confirmar a ausência de efeitos indesejáveis conferidos pelas vacinas anti-rábicas.

<sup>4</sup> Esterilidade = realizado com os meios Casoy, Tioglicolato e Sabouraud.

<sup>5</sup> Pot + Tit. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Titulação.

<sup>6</sup> Pot. + Est. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Esterilidade.

<sup>7</sup> Nº Repr/Ex. = número de partidas reprovadas/examinadas

<sup>8</sup> % Repr. = percentual de reprovação

Os Limites de Confiança para cada percentual de reprovação de acordo com o teste das vacinas anti-rábicas atenuadas destinadas a ruminantes, eqüinos, cães e gatos estão reunidos na tabela 24.

**TABELA 24 - LIMITE DE CONFIANÇA DE CADA PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO DE ACORDO COM O TESTE DA VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA PARA RUMINANTES, EQÜINOS, CÃES E GATOS, CAMPINAS - 1999**

ANO	Potência <sup>1</sup> Limite de Confiança	Titulação <sup>2</sup> Limite de Confiança	Inocuidade <sup>3</sup> Limite de Confiança	Esterilidade <sup>4</sup> Limite de Confiança	Pot. + Tit. <sup>5</sup> Limite de Confiança	Pot. + Est <sup>6</sup> Limite de Confiança
1988	0  —  19,1	0	0	0	0  —  30,5	0
1989	0 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0
1990	0  —  17,2	0	0  —  17,2	0  —  10,8	0,9  —  21,3	0
1991	0  —  15,3	0  —  7,1	0	0	0  —  15,3	0
1992	0	0	0	0	0  —  6,5	0
1993	0	0  —  6,8	0	0	0  —  10,6	0
1994	0  —  7,8	2,4  —  17,6	0	0  —  7,2	0	0
1995	0	0	0	0	0	0
1996	0  —  15,3	0  —  11,6	0	0  —  7,1	0  —  15,3	0  —  7,1
Total	1,6  —  6,0	1,3  —  5,5	0  —  1,6	0  —  2,1	2,4  —  7,2	0  —  0,9

<sup>1</sup> Potência = determinação da capacidade imunógena da vacina anti-rábica atenuada pelo método de Koprowski, devendo esta proteger, no mínimo, 70% das cobaias inoculadas para ser aprovada.

<sup>2</sup> Titulação = título da vacina anti-rábica atenuada. Título mínimo para não ser reprovada =  $10^{3,3} / 0,03$  mL. IC em camundongos com 11-14 g.

<sup>3</sup> Inocuidade = teste de toxicidade realizado em camundongos e cobaias para se confirmar a ausência de efeitos indesejáveis conferidos pelas vacinas anti-rábicas.

<sup>4</sup> Esterilidade = realizado com os meios Casoy, Tioglicolato e Sabouraud.

<sup>5</sup> Pot + Tit. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Titulação.

<sup>6</sup> Pot. + Est. = vacina reprovada pelos testes de Potência e Esterilidade

<sup>7</sup> 0 = limite inferior

#### **4.4. Comparação entre os testes de Imunogenicidade e Antigenicidade:**

Os resultados das vacinas anti-rábicas atenuadas reprovadas apenas pelo teste de imunogenicidade (teste de Potência de Koprowski), das reprovadas apenas pelo teste de antigenicidade (teste de Titulação de Vacina) e das reprovadas em ambos os testes estão na tabela 25.

**TABELA 25 - VACINA ANTI-RÁBICA ATENUADA, DE USO ANIMAL, AVALIADA QUANTO A REPROVAÇÃO SEGUNDO OS TESTES DE TITULAÇÃO E POTÊNCIA, ANO DE PRODUÇÃO, NÚMERO DE PARTIDAS EXAMINADAS, REPROVADAS E PERCENTUAL DE REPROVAÇÃO, CAMPINAS - 1999**

ANO	Reprovada		no		Teste	
	Titulação <sup>1</sup>		Potência <sup>2</sup>		Titulação e Potência <sup>3</sup>	
	(Antigenicidade)		(Imunogenicidade)			
Nº. Part.	%	Nº. Part.	% Repr.	Nº. Part.	% Repr.	
Repr./Ex. <sup>4</sup>	Repr. <sup>5</sup>	Repr./Ex.		Repr./Ex		
1988	1/106	0,9	7/106	6,6	5/106	4,7
1989	0/48	0	0/48	0	0/48	0
1990	0/77	0	2/77	2,6	3/77	3,9
1991	2/91	2,2	3/91	3,3	3/91	3,3
1992	0/149	0	3/149	2,0	1/149	0,7
1993	1/124	0,8	0/124	0	2/124	1,6
1994	10/140	7,1	3/140	2,1	1/140	0,7
1995	0/15	0	0/15	0	0/15	0
1996	5/141	3,5	4/141	2,8	6/141	4,3
Total	19/891	2,1	22/891	2,5	21/891	2,4

<sup>1</sup> Titulação = título da vacina anti-rábica atenuada. Título mínimo para não ser reprovada =  $10^{3,3} / 0,03$  mL. IC em camundongos com 11-14 g.

<sup>2</sup> Potência = determinação da capacidade imunógena da vacina anti-rábica atenuada pelo método de Koprowski, devendo esta proteger, no mínimo, 70% das cobaias inoculadas para ser aprovada.

<sup>3</sup> Tit. + Pot. = vacina reprovada pelos testes de Titulação e Potência.

<sup>4</sup> Nº. Part. Repr./Ex. = número de partidas reprovadas/examinadas

<sup>5</sup> % Repr. = percentual de reprovação

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Discussão do resultado global de aprovação

Como já mencionado anteriormente, a vacinação é um dos métodos mais efetivos na prevenção da raiva nos animais. Vacinas ineficazes ou com baixa concentração antigênica poderão levar ao comprometimento de todo um programa profilático. Em decorrência do controle de vacinas ser essencial para se garantir a qualidade do produto final, este tem sido alvo de incessantes questionamentos quanto a eficácia das provas de controle, sendo a incorporação de técnicas mais avançadas uma preocupação constante de diversos pesquisadores (FERGUSON, SEAGROATT, SCHILD, 1986, MICELI, TORROBA, DÍAZ, 1993, ROOIJAKKERS *et al.*, 1996, SIZARET, 1996), principalmente com relação aos testes de potência. Porém, apesar de suas limitações e controvérsias, estes têm sido úteis ao propósito de assegurar o uso de vacinas potentes no campo (GUPTA, 1997).

Os resultados obtidos neste trabalho de análise da vacina inativada nacional permitiram verificar que, desde 1988 até 1996, a quase totalidade dos percentuais de aprovação não diferiram estatisticamente entre si. Somente o resultado de 1996 apresentou percentual de aprovação inferior aos dos anos anteriores mas que foi estatisticamente detectado apenas quando comparado aos anos de 1991 e 1992 (tabela 3).

Ao se analisar a vacina inativada nacional segundo o substrato verificou-se que, desde 1988 até 1996, os percentuais de aprovação de acordo com todos os tipos de cultivo (célula BHK-21, célula NIL-2 e cérebro de camundongo lactente) não diferiram estatisticamente ao nível de rejeição de 5%. Note-se que, nas vacinas produzidas em células NIL-2, as aprovações foram na quase totalidade igual a 100% e, nas vacinas produzidas em cérebro de camundongo lactente houve 100% de aprovação em todos os anos (tabela 4).

O resultado de aprovação da vacina produzida em cérebro de camundongo lactente confirma sua excelente imunogenicidade concordando com as observações de DELLEPIANE & DÍAZ (1987). Porém, no Brasil, esta é monovalente, ou seja, preparada com apenas uma estirpe do vírus rábico, CVS ou PV, e não trivalente o que, de acordo com DÍAZ, DELLEPIANE, PALOMO (1989), a monovalente é menos eficaz para a proteção contra a infecção pelo vírus

rábico. Além disso, é interessante notar que, apesar das citações de trabalhos sobre uma eventual ocorrência de reação neuroalérgica (BLANCOU, 1986, GALLINA *et al.*, 1995, DÍAZ, 1996), esta vacina, desde 1988 até 1996, não apresentou nenhuma alteração no teste de inocuidade, portanto, pode-se dizer que esta é segura, como também foi demonstrado por DELLEPIANE e DÍAZ (1987). Ao contrário de GALLINA *et al.* (1995), não foram observadas partículas na vacina as quais seriam responsáveis pela obstrução de agulhas. Por ser protetora e segura, justifica-se a não purificação das proteínas imunogênicas, como a glicoproteína, pois aumentaria o custo de produção, como foi descrito por SCHETTERS (1995).

Com relação aos percentuais de aprovação da vacina inativada importada, verificou-se que desde 1992 até 1996, estes também não diferiram estatisticamente. O mesmo ocorreu quando as vacinas importadas foram analisadas segundo o substrato (tabela 6).

Note-se que, a maioria das vacinas foi produzida em célula BHK-21 onde as aprovações foram na quase totalidade igual a 100%. A importação de vacinas produzidas em células NIL-2 começou apenas em 1994 e, as produzidas em cérebro de camundongo lactente, em 1995, ambas com 100% de aprovação em todos os anos. Como estas vacinas foram controladas e aprovadas no teste de potência N.I.H. nos países de origem, pode-se dizer que não houve alterações entre os resultados dos testes N.I.H. e Habel, ou seja, contradições de aprovação e reprovação entre os laboratórios e entre diferentes testes de potência não ocorreram, apesar de citações de que há grande variabilidade nos resultados de testes realizados em diferentes laboratórios e até mesmo em um único laboratório, principalmente com relação ao N.I.H. (BARTH, DIDERRICH, WEINMANN, 1988).

Ao se comparar os limites de confiança da vacina inativada nacional com os da inativada importada verificou-se que, desde 1991 até 1996, os percentuais de aprovação desta foram superiores aos da nacional, com exceção dos percentuais de aprovação dos anos de 1992 e 1995 os quais não diferiram (tabelas 3 e 5).

Já, com relação à vacina atenuada nacional, demonstrou-se pela comparação dos limites de confiança que os percentuais de aprovação dos anos de 1988, 1992 e 1993 diferiram estatisticamente dos demais anos. Assim, o percentual de aprovação de 1988 diferiu dos anos de 1989, 1992, 1993 e 1995. O percentual de aprovação de 1992 diferiu dos anos de 1989, 1994, 1995 e 1996. E o percentual de aprovação de 1993 diferiu dos anos de 1994 e 1996. Note-se

que os anos dos maiores percentuais de aprovação foram 1989, 1992, 1993 e 1995 (tabela 7). Portanto, os percentuais de aprovação variaram no tempo, mas não para uma melhora crescente.

É interessante notar que não existem vacinas atenuadas importadas. De acordo com SCHETTERS (1995), vacinas atenuadas podem não ser registradas em certos países quando a importação de amostras estranhas àqueles países é proibida. Quando isto ocorre, a indústria deverá produzir a vacina atenuada no país onde esta será comercializada ou desenvolver uma vacina inativada no país de origem. Também um maior uso de vacinas inativadas para a imunização dos animais tende a ser estimulado em decorrência de recentes avanços nas técnicas de produção das vacinas (OMS, 1984, WHO, 1992), sendo o uso de vacinas atenuadas justificado apenas em áreas onde a raiva é freqüente (OMS, 1984).

Através da comparação entre a vacina inativada nacional e a atenuada nacional verificou-se que, desde 1988 até 1996, os percentuais de aprovação entre estas não diferiram estatisticamente, com exceção do percentual de aprovação do ano de 1989 o qual diferiu (tabelas 3 e 7).

Estes resultados são compatíveis com os obtidos por vários autores os quais também verificaram que uma boa vacina inativada pode ser tão efetiva quanto uma atenuada, com a vantagem de ser mais segura e estável.

LARGHI *et al.* (1979) verificaram que a vacina produzida com vírus PV em célula BHK e inativada com etilenoimina protegeu 89% (8/9) dos cães quando desafiados 3 anos depois de vacinados, como as vacinas atenuadas.

Já, ATANASIU *et al.* (1968) verificaram comportamento semelhante da vacina produzida em cérebro de camundongo lactente, com adjuvante de hidróxido de alumínio, com a vacina tipo ERA (atenuada), apesar da primeira apresentar resultado um pouco inferior à última.

Com relação às vacinas produzidas em células NIL-2 SOULEBOT *et al.* (1982) também verificaram que estas conferiam igual proteção, ou até mais alta, do que as vacinas atenuadas.

Verifica-se, portanto, que as vacinas inativada e atenuada nacionais apresentaram igual eficácia quanto à aprovação nos testes de controle realizados neste trabalho.

## **5.2. Discussão da aprovação segundo a espécie animal a que se destina a vacina**

### **5.2.1. Vacina Inativada Nacional e Importada**

**Cão e Gato:** A análise destas vacinas permitiu verificar, pela comparação dos limites de confiança, que desde 1988 até 1996, quase todos os percentuais de aprovação não diferiram estatisticamente ao nível de rejeição adotado de 5%. O ano de 1995 foi o único que apresentou 100% de aprovação (tabelas 8 e 9).

**Bovino:** De 1988 até 1996, quase todos os percentuais de aprovação não diferiram estatisticamente. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os percentuais de aprovação dos anos de 1988 e 1989 quando confrontados com os anos em que houve 100% de aprovação, ou seja, 1991, 1993, 1994 e 1995 (tabelas 8 e 9).

Ao se comparar a vacina destinada apenas para bovinos com as vacinas destinadas a ruminantes, eqüinos, cães e gatos bem como com as destinadas a diferentes grupos de espécies animais, desde 1988 até 1996, verificou-se que estas apresentaram comportamento semelhante, com exceção dos anos de 1989, 1991, 1993 e 1994.

**Ruminante, Eqüino, Cão e Gato:** Verificou-se que quase todos os percentuais de aprovação não diferiram. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o percentual de aprovação de 1989, ano em que não houve reprovação, quando confrontado com os anos de 1994 e 1996 e 1992 (tabelas 8 e 9).

Ao se comparar a vacina destinada para ruminante, eqüino, cão e gato com as vacinas destinadas a diferentes grupos de espécies animais, desde 1988 até 1996, verificou-se que estas apresentaram comportamento semelhante, com exceção do ano de 1996.

**Vacinas destinadas a diferentes grupos de espécies animais:** Verificou-se que também quase todos os percentuais de aprovação não diferiram. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o percentual de aprovação do ano de 1988 quando confrontado com os anos de 1994, 1995 e 1996 e o do ano de 1993 quando comparado com o de 1995.

### **5.2.2. Vacina Anti-Rábica Atenuada**

**Cão:** Verificou-se que, desde 1992 até 1995, todos os percentuais de aprovação não diferiram. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o percentual de aprovação do ano de

1996 quando confrontado com os demais anos. Note-se que a produção da vacina atenuada destinada a cães teve início em 1992 (tabela 10).

Ao se comparar a vacina destinada para cães com as duas posteriores desde 1992 até 1996, verificou-se que estas apresentaram comportamento semelhante, diferindo apenas no ano de 1994.

**Bovino, Ovino, Caprino, Equino e Cão:** Demonstrou-se que vários percentuais de aprovação não diferiram. Porém, houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de aprovação dos anos de 1988 e 1994 quando confrontados com os anos de 1989, 1990, 1993 e 1995, visto que nestes últimos houve 100% de aprovação (tabela 10).

Ao se comparar a vacina destinada para bovino, ovino, caprino, equino e cão com a vacina destinada a bovino, ovino, caprino, equino, cão e gato desde 1988 até 1996, verificou-se que estas apresentaram comportamento semelhante, diferindo apenas nos anos de 1990 e 1996.

**Bovino, Ovino, Caprino, Equino, Cão e Gato:** Houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de aprovação dos anos de 1989 e 1995 quando confrontados com os anos de 1990, 1991, 1994 e 1996. Além disso, o percentual de aprovação do ano de 1992 diferiu dos anos de 1990 e 1996.

### **5.3. Discussão do teste que forneceu resultado de reprovação:**

A avaliação da eficácia das vacinas anti-rábicas testadas no presente trabalho foi relevante para a obtenção de dados que mostraram alguns pontos onde a indústria produtora e o laboratório de controle oficial deverão reter maiores cuidados e/ou melhorias em sua linha de produção e nos métodos de controle.

Apesar dos recentes avanços em imunologia, vacinas em geral, não são consideradas bem caracterizadas baseadas apenas em suas propriedades físico-químicas devido ao escasso entendimento da relação entre as características antigênicas e imunogenicidade (GUPTA, 1997). Portanto, ênfase tem sido colocada no processo de produção e no controle de qualidade do produto final, principalmente para os testes de segurança e potência em animais.

### 5.3.1. Vacina Anti-Rábica Inativada:

Como demonstrado nos resultados, as vacinas inativadas foram reprovadas, de 1988 até 1996, por três testes: potência (6,4%), inocuidade (0,06%) e esterilidade (0,06%). Pela comparação dos limites de confiança, observou-se que todos os percentuais de reprovação de cada teste não diferiram estatisticamente entre si, com exceção do percentual de reprovação do ano de 1988 quando confrontado com o ano de 1991, no teste de potência (tabela 11).

Porém, através da comparação do teste de potência com os demais testes (inocuidade e esterilidade), verificou-se que os percentuais de reprovação diferiram, havendo maior reprovação pelo teste de potência.

Reprovações no teste de potência podem ser indicio de que poderá estar ocorrendo, na indústria produtora, maiores problemas com relação à obtenção de um imunógeno realmente capaz de induzir o sistema imunológico a conferir proteção contra o vírus rábico. Isto ressalta 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 (GUPTA, 1997).

---

Além disso, apesar da maioria das vacinas anti-rábicas para uso animal testadas neste trabalho serem produzidas com estirpes obtidas da amostra original de Pasteur, houve algumas produzidas com as estirpes ERA e Flury LEP as quais são antígenicamente diferentes das amostras de Pasteur (CRICK *et al.*, 1981). Das vacinas ERA inativadas, 12 partidas (34,3%) foram reprovadas no teste de potência de Habel e 23 (65,7%) foram aprovadas. Já, na vacina Flury LEP (importada) não houve reprovação, mas foram apenas 3 partidas analisadas pois a importação desta começou em 1996, apesar de que em 1998, esta apresentou dificuldades para ser aprovada no teste de potência (dados não apresentados nos resultados). Acredita-se que talvez algumas destas reprovações tenham sido em decorrência de um desafio heterólogo, onde a estirpe vacinal é antígenicamente diferente da estirpe desafio, como ocorre com o teste de potência N.I.H. (BARTH R., DIDERRICH G., WEINMANN E., 1988, BLANCOU *et al.*, 1989) visto que na prova de Habel o desafio e a vacinação também são IC e IP, respectivamente. Após vacinação intraperitoneal, verifica-se que há mais atividade soro neutralizante contra uma amostra homóloga do que uma heteróloga, o que explica uma maior habilidade de vacinas derivadas da amostra Pasteur a protegerem contra um desafio com CVS

(também derivado da amostra Pasteur) (CRICK *et al.*, 1981). Como no teste N.I.H. mede-se mais estritamente a imunidade humoral do que a celular, em decorrência da imunização intraperitoneal e desafio intracerebral, os anticorpos neutralizantes específicos são a fonte principal de proteção em camundongos (WUNDERLI *et al.*, 1991), explicando-se a diversidade nos resultados de estirpes vacinais diferentes antigenicamente das de desafio. Também, adjuvantes presentes na vacina têm efeito imunoestimulante quando administrados intramuscularmente, mas não intraperitonealmente, portanto, a vacinação IP não reflete a verdadeira capacidade imunógena de vacinas com adjuvantes. No teste N.I.H., um desafio heterólogo pode medir apenas 20% da potência de uma vacina, não havendo uma satisfatória correlação, nesta situação de desafio, entre os valores antigênicos de uma vacina determinados por este teste com a imunogenicidade desta no hospedeiro animal (BARTH R., DIDERRICH G., WEINMANN E., 1988). Além disso, no N.I.H., a vacina que está sendo testada (desafio heterólogo) é comparada com uma de referência produzida com estirpe derivada da de Pasteur (desafio homólogo).

Os resultados obtidos no teste de potência da vacina ERA inativada (34,3 % de reprovação) refletem a necessidade de estudos mais específicos da relação das estirpes vacinais e de desafio na indução de proteção, verificando se tal fato realmente está ocorrendo no teste de Habel ou se é devido a outros fatores diretamente relacionados com a produção deste tipo de vacina.

Portanto, diante dos problemas citados acima, no Brasil, há a necessidade de serem implantadas técnicas mais modernas para o controle da potência das vacinas inativadas, principalmente se for considerar a probabilidade de uma futura comercialização de vacinas recombinantes no mercado nacional, particularmente a constituída por nucleoproteína visto que sua capacidade imunogênica é subestimada nos testes de potência realizados atualmente com as vacinas anti-rábicas de uso animal a nível nacional. Testes “in vitro” como o ELISA têm mostrado uma satisfatória correlação do conteúdo de glicoproteína com os valores de potência obtidos no N.I.H., mas não com o conteúdo de nucleoproteína (ROOIJAKKERS *et al.*, 1996).

O mecanismo de proteção conferido pela proteína N tem sido explicado pela indução por esta de células T CD 4<sup>+</sup> as quais aumentariam a produção de anticorpos neutralizantes anti - glicoproteína após uma infecção com desafio periférico (DIETZSCHOLD *et al.*, 1987 b).

Porém, atualmente, tem sido demonstrado que a proteína N é um superantígeno específico para linfócitos T V $\beta$  8 o que permite uma ativação maciça de células T, com a liberação de grandes quantidades de linfocinas. Além disso, os próprios anticorpos anti-N têm conferido proteção por disparar a lise de células infectadas via complemento ou citotoxicidade dependente de anticorpo (SONODA *et al.*, 1993).

Com relação ao teste de esterilidade, as poucas reprovações (0,06%) neste podem refletir uma maior assepsia e controle de contaminantes durante o processamento. Porém, é importante salientar que um efetivo controle de esterilidade deve basear-se mais na aplicação de técnicas e procedimentos corretos de produção do que nos resultados das provas de esterilidade praticadas em certo número de amostras do lote final, visto que com apenas a realização desta prova no produto final, uma determinada partida contaminada poderá não ser identificada. É claro que as chances de se detectar uma partida não estéril são maiores quando se aumentam o número de amostras daquela partida a serem examinadas. Mas, se houver uma baixa taxa de contaminação de determinado lote, sempre existirá o risco de não se detectar tal contaminação (OMS, 1973). Portanto, não apenas o controle do produto final é de extrema importância, mas os regulamentos de boas práticas de produção (GMP) devem ser seguidos rigorosamente a fim de se conseguir vacinas seguras e também potentes (GUPTA, 1997).

Ao avaliar a reprovação das vacinas inativadas segundo a espécie animal, verificou-se que no teste de potência de Habel houve reprovação naquelas destinadas a cão e gato; a bovino; a ruminantes, equino, cão e gato e a diferentes grupos de espécies animais (tabelas 12, 13, 14, 15 e 16). Os percentuais de reprovação destas vacinas não diferiram estatisticamente no período estudado. Somente os anos em que não houve reprovação divergiram de alguns onde existiram reprovações, sendo que a diferença estatística dos limites de confiança entre estes anos foi, obviamente, a mesma da avaliação da aprovação segundo a espécie animal, assim, por exemplo, na vacina destinada a cão e gato, o percentual de reprovação de 1995 (0%) diferiu dos percentuais de reprovação dos anos de 1988, 1989, 1990, 1993 e 1994, como na avaliação do percentual de aprovação em que 1995 (100% de aprovação) também diferiu destes anos.

Já, com relação ao teste de inocuidade, verificou-se que apenas a vacina destinada a ruminante, equino, cão e gato foi reprovada por este em 1991, mas não diferiu estatisticamente dos demais anos em que não houve reprovação.

No teste de esterilidade, houve reprovação apenas em 1996 na vacina destinada a ruminantes, cão e gato (pertencente a diferentes grupos de espécies animais), sendo que não houve diferença estatisticamente significativa ao ser comparada com os demais anos nos quais não houve reprovação.

### **5.3.2. Vacina Anti-Rábica Atenuada:**

Como demonstrado nos resultados, as vacinas atenuadas foram reprovadas pelos testes de: potência (2,5%), titulação (2,1%), inocuidade (0,3%), esterilidade (0,3%), potência e titulação (2,4%) e potência e esterilidade (0,2%) demonstrando que, diferente das vacinas inativadas, nas atenuadas várias partidas foram reprovadas por mais de um teste em quase todos os anos (tabelas 18 e 19).

As maiores taxas de reprovação foram em decorrência dos testes de potência e/ou titulação cujos percentuais, ao serem comparados, foram estatisticamente iguais no período estudado, apresentando praticamente os mesmos valores de reprovação em potência e titulação. Isto confirma a necessidade do uso de métodos mais consistentes na produção para a obtenção de estirpes vacinais bem caracterizadas, em quantidades apropriadas e que sejam capazes de induzir adequadamente o sistema imunológico do indivíduo para conferir proteção contra um desafio com vírus rábico (TIZARD, 1985, GUPTA, 1997). Na reprovação pelo teste de potência, através da comparação dos limites de confiança, observou-se que não houve diferença significativa entre seus percentuais, com exceção dos percentuais de 1988 e 1996 os quais diferiram estatisticamente de 1989, 1993 e 1995 cujos anos não houve reprovação.

Na reprovação pelo teste de titulação, os percentuais de 1991 e 1994 também diferiram estatisticamente dos anos em que não houve reprovação, ou seja, 1989, 1990, 1992 e 1995. Além disso, o percentual de reprovação de 1988 diferiu estatisticamente do percentual de 1994.

Já, na reprovação pelos demais testes, isto é, inocuidade, esterilidade, potência e esterilidade observou-se que todos os percentuais não diferiram estatisticamente desde 1988 até 1996. Apesar do teste de esterilidade realizado não ter pesquisado a presença de vírus contaminantes, os parvovírus podem ser encontrados em vacinas atenuadas produzidas em cultivo celular (OMS, 1984). É interessante salientar que as reprovações nos testes de inocuidade e esterilidade das vacinas atenuadas foram superiores (0,3%) às das inativadas (0,06%), apesar da inexistência de diferenças estatísticas entre estes valores. Inocuidade

insatisfatória em vacinas atenuadas pode ser indicio de que determinadas indústrias têm dificuldades em se determinar a segurança da estirpe vacinal, levando à possibilidade de ocorrência de patogenicidade residual na espécie específica. Para se certificar de que não há o perigo de reversão da patogenicidade, testes de inocuidade na espécie específica deveriam ser realizados tanto pela indústria produtora como pelo órgão controlador em cada partida ou pelo menos no período em que a estirpe ou a vacina serão registrados (WHO, 1992). Além disso, 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 (GUPTA, 1997) também são de importância para se evitar comprometimento de inocuidade.

Ao avaliar as reprovações das vacinas atenuadas segundo a espécie animal, verificou-se que na destinada a cães houve reprovações apenas em 1996 pelo teste de titulação (3 partidas) e pelos testes de potência e titulação, associadamente (1 partida), sendo que, estatisticamente, seus percentuais de reprovação não divergiram dos demais anos (tabela 20).

Já, a vacina anti-rábica atenuada destinada a ruminante, eqüino e cão foi reprovada, de 1988 até 1996, pelos testes de potência; titulação; inocuidade; potência e titulação e potência e esterilidade, sendo que seus percentuais de reprovação não diferiram estatisticamente ao serem comparados durante os anos. Apenas alguns percentuais no teste de potência e também na titulação diferiram dos anos em que não houve reprovação (tabelas 21 e 22).

A vacina anti-rábica atenuada destinada a ruminante, eqüino, cão e gato foi a que apresentou maior número de reprovações nos anos estudados e em todos os testes, apesar de muitos percentuais serem estatisticamente iguais às duas vacinas anteriores. Ao serem comparados os percentuais de reprovação em cada teste, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os anos. Apenas no teste de titulação o percentual de 1994 diferiu estatisticamente dos anos em que não houve reprovação por este teste, ou seja, 1988, 1989, 1992 e 1995 (tabelas 23 e 24).

#### **5.4 Discussão da comparação entre os testes de Imunogenicidade e Antigenicidade:**

Através da comparação dos testes de Imunogenicidade (teste de Potência) e Antigenicidade (teste de Titulação), verificou-se que a realização de ambos é necessária para a aprovação, no Brasil, de uma vacina anti-rábica atenuada. Isto porque, se for efetuado apenas um destes, potência ou titulação, a vacina poderá ser aprovada quando, na realidade, seria reprovada pelo teste não realizado (tabela 25) (BRASIL, 1988).

No presente caso, através da análise do total de partidas examinadas desde 1988 até 1996, verificou-se que 62 partidas (6,9%) de vacinas atenuadas foram reprovadas por um dos testes citados acima ou por ambos. Se apenas o teste de titulação tivesse sido realizado, apenas 40 partidas (4,5%) seriam reprovadas, restando 22 partidas (2,5%) aprovadas que, na realidade, não seriam satisfatórias para entrarem no mercado visto que foram reprovadas apenas pelo teste de potência. Além disso, não se pode deixar de observar que destas 40 partidas reprovadas, 21 (2,3%) também seriam reprovadas pelo teste de potência. O mesmo acontece quando realizado apenas o teste de potência.

A necessidade de não se excluir o teste de potência para o controle das vacinas atenuadas deve-se ao fato do antígeno presente em uma vacina não refletir a capacidade de estimular adequadamente o sistema imunológico. Isto porque nem todos os antígenos são imunogênicos, ou seja, nem toda substância química que tenha a habilidade de se ligar a uma imunoglobulina ou receptor de célula T é capaz por si própria de induzir uma resposta imune. A imunogenicidade dependerá do tamanho molecular, complexidade química e a substância deverá ser estranha ao organismo (PARSLOW, 1997 b). Apenas a determinação do conteúdo de antígeno, apesar de importante, não indicará qual substância estará presente na vacina, assim, neste teste, não há como saber se nesta as proteínas imunogênicas estarão intactas e presentes em maior ou menor quantidade, se serão reconhecidas pelas imunoglobulinas (epítomos da célula B) e se serão processadas adequadamente pelas células apresentadoras de antígeno, com apresentação de epítomos específicos aos linfócitos T. Além disso, a habilidade de se estimular uma resposta imune e a natureza e intensidade desta resposta também dependem da constituição genética do indivíduo, a via de contato e dos métodos utilizados para se detectar a resposta

(PARSLOW, 1997 b), justificando-se ainda mais o uso do teste de potência realizado em cobaias, apesar deste não ser específico para as espécies a qual se destina a vacina.

### **5.5. Considerações finais**

A realização dos testes de controle das vacinas anti-rábicas para uso animal é de extrema importância para a saúde pública e também econômica. Uma vacina anti-rábica efetivamente controlada garantirá uma boa indução da resposta imune no rebanho animal e, conseqüentemente, contribuirá para o sucesso em um programa de profilaxia da raiva.

Todas as partidas de vacinas anti-rábicas comercializadas no Brasil são controladas com a finalidade de se garantir a eficácia destas. Portanto, no mercado nacional, há somente vacinas que foram aprovadas em todos os testes de controle.

A avaliação da eficácia das vacinas anti-rábicas comercializadas no Brasil será relevante para o laboratório onde é realizado o controle oficial das vacinas no cumprimento de sua missão fiscalizadora (LARA/Campinas) e para a indústria produtora pois fornecerá dados que mostrarão os pontos críticos merecedores de maiores cuidados e/ou melhorias no controle ou na linha de produção. Assim, poder-se-á obter produtos com qualidade cada vez melhor, reduzindo, no futuro, as reprovações das vacinas submetidas ao controle.

O número de doses reprovadas poderá ser inferior ao dos anos estudados, permitindo-se menos prejuízos econômicos à indústria e a comercialização de maior número de doses de vacinas. Como já demonstrado anteriormente, de 1988 a 1996, foram reprovadas 5,5 % do número total de doses, o que equivale a 17.720.835 doses de vacinas desprezadas, ou seja, não comercializadas, representando incalculável prejuízo às indústrias.

É importante ressaltar que, embora as vacinas nacionais, inativadas e atenuadas, tenham apresentado percentuais de aprovação altos (93,4% e 92,1%, respectivamente), ainda necessitam aprimoramento da qualidade de produção, visto que a eficácia destas foi inferior quando comparada com as vacinas importadas.

Como não foram avaliados os laboratórios e sim as vacinas por eles produzidas, compete a estes examinarem a necessidade ou não de melhoria na qualidade de produção. Em caso afirmativo, identificar os principais pontos críticos de controle na produção. Isto demonstra a

importância da comunicação, pelo Ministério da Agricultura, do teste em que determinada partida foi reprovada.

Portanto, com a produção e controle agindo associadamente, a eficácia das vacinas anti-rábicas nacionais tende a ser cada vez mais alta e até podendo, em um futuro próximo, vir a superar as vacinas importadas.

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. Vacina Inativada Nacional e Importada

- As vacinas inativadas nacionais e importadas apresentaram taxas de aprovação com flutuações não significantes ao longo do tempo de estudo (comportamento homogêneo);
- A vacina inativada importada apresentou comportamento de aprovação superior ao da inativada nacional;
- Quanto à aprovação segundo o substrato (célula BHK-21, NIL-2 e cérebro de camundongo lactente), vacinas inativadas nacionais e importadas apresentaram igual comportamento nos períodos examinados;
- Quanto à aprovação segundo a espécie animal, a vacina inativada nacional apresentou, ao longo do tempo de observação, flutuação nos percentuais de aprovação. A destinada para cães e gatos apresentou maior número de aprovações em comparação com as demais. A inativada importada não apresentou, desde 1992 até 1996, tal flutuação.
- A razão da reprovação da vacina inativada nacional foi principalmente o teste de potência;
- A razão da reprovação da vacina inativada importada foi o teste de potência;
- A vacina inativada nacional apresentou, quanto à reprovação, comportamento homogêneo em cada teste no período estudado, porém não apresentou igual comportamento quando analisada separadamente de acordo com a espécie animal a qual se destina, com melhor desempenho as vacinas para cães e gatos.

### 6.2. Vacina Anti-Rábica Atenuada

- A vacina atenuada não apresentou, de 1988 a 1996, comportamento homogêneo quanto à aprovação;
- A vacina atenuada apresentou taxa de aprovação igual ao da inativada nacional;
- A vacina atenuada não apresentou comportamento homogêneo no período examinado quanto à aprovação segundo a espécie animal a que se destina a vacina, visto que sempre o percentual de aprovação de um ou mais anos diferiam dos demais;
- A razão da reprovação da vacina atenuada foi principalmente devido aos testes de potência, potência e titulação; e titulação;

- A vacina atenuada apresentou, desde 1988 até 1996, comportamento homogêneo na reprovação pelo teste de inocuidade e de esterilidade. Porém, não apresentou igual comportamento, no período estudado, na reprovação pelos testes de potência, titulação e potência e titulação;
- A vacina atenuada não apresentou comportamento homogêneo quanto à reprovação de acordo com a espécie animal nos testes de potência e titulação, com exceção da destinada a cães. Nos demais testes apresentou comportamento homogêneo;

### **6.3. Vacinas Nacional e Importada**

As vacinas anti-rábicas nacionais, inativada e atenuada, embora tenham apresentado igual eficácia, mostraram-se inferiores à vacina inativada importada.

### **6.4. Imunogenicidade e Antigenicidade - Vacina Atenuada**

- A realização simultânea dos testes de Imunogenicidade (Potência) e de Antigenicidade (Titulação) para a aprovação de uma vacina anti-rábica atenuada revelou-se ser de extrema importância.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABESELTH, M. K. Bovine vaccines - past and present. In: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**. London: Academic, 1975. p. 203 - 219.
- ADEYEMI, I. G, IKHELOA, J.O., OGUNDIPE, G. A. T. Microbial contaminant found in low egg passage rabies vaccine used in Nigeria. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 40, p. 676 - 680, 1993.
- ATANASIU, D. P. et al. Inmunidad antirrabica en bovinos vacunados. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 64, p. 431 - 439, 1968.
- BAER, G. M. Rabies Virus. In: Fields, B. N. et al. **Virology**. New York: Raven, 1985, p. 1133 - 1156.
- BARTH, R., DIDERRICH, G., WEINMANN, E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. **Vaccine**, v. 6, p. 369 - 377, 1988.
- BERQUÓ, E. Apostila de Bioestatística: curso de bioestatística I e II. **Faculdade de Higiene e Saúde Pública**, USP, 1961, 2 v. em 1.
- BLANCOU, J. La Vaccination antirabique des animaux domestiques. In: Colloque International Organisé par L'Institut Pasteur. **Vaccins et Vaccinations**. Paris: Elsevier, 1986. 437 p. p. 167 - 174.
- BLANCOU, J. et al. Effect of strain differences on the potency testing of rabies vaccines in mice. **Journal of Biological Standardization**, v. 17, p. 259 - 266, 1989.
- BOURHY, H., KISSI, B., TORDO, N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. **Virology**, v. 194, p. 70 - 81, 1993.

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

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (MAARA). Departamento de Defesa Animal. **Boletim de Defesa Sanitária**, v. 24, p. 59 - 63, 1995.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, v. 27, p. 57 - 61, 1998.

BUNN, T. O. Vaccines and vaccination of domestic animals. In: CAMPBELL, J.B., CHARLTON, K.M. **Rabies**, Massachusetts: Kluwer, 1988. 431 p. p. 323 - 333.

CALDAS, A. D. Por que falham as vacinas? **O Biológico**, v. 27, p. 171-181, 1961.

**CODE OF FEDERAL REGULATIONS.** Animals and Plant Health Inspection Service, USDA. Ed. National Archives and Records Administration. Parts 1 to 199, 1993 (113.206 e 113.312).

CRICK, J. et al. Antigenic variation between rabies virus strains and its relevance in vaccine production and potency testing. In: BISHOP, D. H. L., COMPANS, R. W. **The replication of negative strand viruses**, North Holland: Elsevier, 1981. p. 937 - 941.

CORDEIRO, C. C. et al. Avaliação da vacina anti-rábica ERA frente a variantes antigênicas do vírus da raiva em diferentes períodos pós-imunização. **Revista da Saúde Pública**, v. 24, p. 512-517, 1990.

CORRÊA, W. M., CORRÊA, C. N. M. Raiva. In: \_\_\_\_\_. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**, Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843 p. p. 609 - 628.

- CÔRTEZ, J. A. et al. Immune response in cattle induced by inactivated rabies vaccine adjuvanted with aluminium hydroxide either alone or in combination with avridine. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 12, p. 941-955, 1993.
- CUNHA, R. Comprovação do poder imunizante das vacinas anti-rábicas para uso veterinário. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 1 - 21, 1947.
- DAVIS, S. A., CASEY, G. A., WANDELER, A. I. A molecular epidemiological study of rabies in central Ontario and western Quebec. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 2575 - 2583, 1994.
- DEAN, D. J., ABELSETH, M. K., ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4ª. ed., Geneva: E. World Health Organization, 1996, 476 p. p. 88 - 95.
- DELLEPIANE, N. I., DÍAZ, A. M. La Rabia. I. Principales características del agente etiológico y de la enfermedad. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 18, p. 83-95, 1986.
- \_\_\_\_\_. La Rabia. II. Situación epidemiológica en las Américas. Vacunas e Inmunidad. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 19, p.125 - 138, 1987.
- DELPRIETO, H. A., KONOLSAISEN, J. F. Dinâmica da raiva em uma população de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) no Nordeste Argentino, e sua relação com a raiva paralítica dos herbívoros. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 34, p. 381 - 391, 1991.
- DÍAZ, A. M. O, LOMBARDO, R. A. Inmunización de terneros com vacuna antirrábica de cérebro de raton lactante. **Revista Argentina de Microbiología**, v.13, p. 45 - 48, 1981.

- DÍAZ, A. M. O, DELLEPIANE, N., PALOMO, L. F. Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante: composición antigénica y capacidad inmunógena. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 107, p. 185 - 193, 1989.
- DÍAZ, A. M. O, NEBEL A. E., MICELI, G. S. A counter-immunoelectrophoresis technique for "in vitro" detection of antigens in rabies vaccines. In: TRAENHART, O et al. **Progress in Rabies Control**. England: E. Wells, 1988, p. 305 - 310.
- DÍAZ, A. M. O. Suckling-mouse brain vaccine. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup>. ed., Geneva: E. World Health Organization, 1996, 476 p. p. 243 - 251.
- DIETZSCHOLD, B. et al. Antigenic variation in rabies and rabies-related viruses: cross-protection independent of glycoprotein-mediated virus-neutralizing antibody. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 156, p. 815 - 822, 1987 a.
- \_\_\_\_\_. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 84, p. 9165 - 9169, 1987 b.
- DREESEN, D.W., EUBANKS, J. F., BEHYMER, D.E. Antibody responses in cattle vaccinated with various rabies vaccines. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, p. 826 - 830, 1970.
- ERBOLATO, E. B. et al. Eficácia da vacina anti-rábica ERA em camundongos, frente a quatro diferentes variantes antigênicas do vírus da raiva. **Revista da Saúde Pública**, v. 23, p. 447 - 454, 1989.

- FERGUSON, M., SEAGROATT, V., SCHILD, G. C. Single radial immunodiffusion assays for the standardization of the antigenic content of rabies vaccines. **Development Biological Standardization**, v. 64, p. 81 - 86, 1986.
- FITZGERALD, E. A., NEEDY, C. F. Use of the single radial immunodiffusion test as a replacement for the NIH mouse potency test for rabies vaccine. **Development Biological Standardization**, v. 64, p. 73 - 79, 1986.
- FU, F. Z. et al. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. **Proceedings of National Academy Sciences of the USA**, v. 88 p. 2001 - 2005, 1991.
- FUENZALIDA E., PALACIOS R. Un método para la preparación de la vacuna antirrábica. **Boletín de Instituto Bacteriológico de Chile**, v. 8, p. 3 - 10, 1955.
- FUJII, H. et al. Protective efficacy in mice of post-exposure vaccination with vaccinia virus recombinant expressing either rabies virus glycoprotein or nucleoprotein. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1339 - 1344, 1994.
- GALLINA, N. M. F. et al. Estudo da estabilidade da vacina contra raiva, tipo Fuenzalida & Palacios, uso humano, após processo de filtração. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, p. 429 - 439, 1995.
- GERMANO, P. M. L. et al. Vacina anti-rábica PV/ BHK com avridine como adjuvante. Avaliação da eficácia em camundongos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.33, p. 865 - 878, 1990 a.
- \_\_\_\_\_. Avaliação em camundongos de vacinas anti-rábicas inativadas frente a variantes antigênicas do vírus da raiva. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, p. 551 - 560, 1990 b.

- GOULD, A. R. et al. Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. **Virus Research**, v. 54, p. 165 - 187, 1998.
- GREEN, S. L. et al. Rabies in horses: 21 cases (1970-1990). **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 1133 - 1137, 1992.
- GUPTA, R. K. A need to review regulations for production and control of vaccines. **Vaccine**, v. 15, p. 1 - 2, 1997.
- HABEL, K. Evaluation of a mouse test for the standardization of the immunizing power of antirabies vaccines. **Public Health Reports**, v. 55, p. 1473 - 1487, 1945
- \_\_\_\_\_. Consideraciones generales sobre las pruebas inocuidad y potencia. In: KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. **La Rabia - Técnicas de Laboratorio**, Ginebra: E. Organización Mundial de la Salud, 1976, 389 p.
- HEMPT A. Sur une méthode rapide de traitement antirabique. **Annales de l' Institut Pasteur**, v. 39, p. 632 - 640, 1925.
- HUBBARD, H. B. et al. Rabies immunity in vaccinated cattle. In: **Annual Meeting U.S. Animal Health Association**, 73 rd., Washington, p. 307-322, 1969.
- INPPAZ - INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE ALIMENTOS Y ZONOSIS. **Guía para el Tratamiento de la Rabia en el Hombre**. Argentina, 1994. (Publicación Técnica, 2).
- ITO, F. H. et al. Course of secondary humoral immune response shortly after revaccination with BHK-21 cell culture inactivated rabies vaccine adjuvanted with aluminum hydroxide. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 28, p. 51 - 57, 1991.

- KAPLAN, C., TURNER, G. S., WARRELL, D. A. Rabies vaccines and immunity to rabies. In: KAPLAN, C., TURNER, G.S., WARRELL, D.A. **Rabies: The Facts**, New York: Oxford, 1986, 126 p. p. 8 - 20.
- KING, A . A ., TURNER, G. S. Rabies: a review. **Journal of Comparative Pathology** 108: 1-39, 1993.
- KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup>. ed., Geneva: E. World Health Organization, 1996, 476 p. p. 80 - 87.
- LARGHI, O .P., DÍAZ, A M.O., ARROSI, J. C. Comparison of the immunological response of humans to suckling mouse brain and human diploid cell vaccines. **Rabies in the Tropics**. p.189-194, 1985.
- LARGHI, O. P. et al. Vacuna antirrabica inactivada com etilenimina. Duracion de inmunidad en perros. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 11, p. 102 - 107, 1979.
- MARTINI, J. C. et al. Raccon poxvirus rabies virus glycoprotein recombinant vaccine in sheep. **Archives of Virology**, v. 133, p. 211 - 222, 1993.
- MICELI, G., TORROBA, J. E., DÍAZ, A. M. Evaluacion de la tecnica de imunolectroforesis para determinar la potencia antigenica de las vacunas antirrabicas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p. 543 - 550, 1993.
- MORGEAUX, S. **Controle des vaccins rabiques: Utilisation des techniques de biologie moléculaire et d'immunologie cellulaire**. 1992. 192 p. Tese de (Doutorado - Microbiologia), Universite Paris VII.

- NETTER, R., PERKINS, F. T. Pruebas de inocuidad propuestas para la vacuna antirrábica inactivada preparada en cultivos celulares. In: KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. **La Rabia - Técnicas de Laboratorio**, 3ª. ed., Ginebra: E. Organización Mundial de la Salud, 1976, 389 p.
- OKOH, A. E. Vaccination challenge studies with variants of street rabies virus isolated in Nigeria. **Vaccine**, v. 6, p. 19 - 24, 1988.
- OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. **25º. informe**. Ginebra, 1973 (Informes técnicos, 530).
- \_\_\_\_\_. Comité de Expertos de la OMS sobre Rabia. **7º. informe**. Ginebra, 1984 (Informes técnicos, 709).
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological surveillance of rabies in the Americas**. Buenos Aires, 1994 v. 25 p.1 - 26.
- PARSLOW, T. G. The immune response. In: STITES D. P., TERR, A. I., PARSLOW, T. G. **Medical Immunology**, Stamford: Appleton & Lange, 1997 a 900 p. p. 63 - 73.
- \_\_\_\_\_. Immunogens, Antigens & Vaccines. In: STITES D. P., TERR, A. I., PARSLOW, T. G. **Medical Immunology**, Stamford: Appleton & Lange, 1997 b 900 p. p. 74 - 82.
- PRETO, A. A. et al. Preparação da vacina anti-rábica PV/BHK em emulsão oleosa e avaliação do poder imunogênico em bovinos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 34, p. 609 - 616, 1991.
- REED, L. J., MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

- REPKA, J. C. D. et al. Comparação entre ELISA com anticorpos policlonais e monoclonais para avaliação do conteúdo de glicoproteína em vacina contra a raiva tipo "Fuenzalida & Palacios". **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, p. 241 - 245, 1990.
- ROOIJAKKERS, E. J. M. et al. Potency of veterinary rabies vaccines in the Netherlands: a case for continued vigilance. **The Veterinary Quartely**, v. 18, p. 146 - 150, 1996.
- SACRAMENTO, D. et al. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1149 -1158, 1992.
- SCHETTERS, T. Vaccine development from a commercial point of view. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 267 - 275, 1995.
- SCHLÖGEL, F. Breve histórico da raiva. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 28, p. 277 - 289, 1985.
- SCHNEIDER, M. C., BURGOA, C. S. Tratamiento contra la rabia humana: un poco de su historia. **Revista da Saúde Pública**, v. 28, p. 454 - 463, 1994.
- SIZARET, P. General considerations in testing the safety and potency of rabies vaccines. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup>. ed., Geneva: E. World Health Organization, 1996, 476 p. p. 355 - 359.
- SMITH, J. S. Mouse model for abortive rabies infection of the central nervous system. **Infection and Immunity**, v. 31, p. 297 - 308, 1981.
- SONODA, T. Y. et al. Resistance of mice vaccinated with rabies virus internal structural proteins to lethal infection. **Archives of Virology**, v.132, p. 51 - 65, 1993.

- SOULEBOT, J. P. et al. Medical prophylaxis of animal rabies: choice of an inactivated vaccine. **Annales de Virologie (Inst. Pasteur)**, v. 133, p. 163 - 169, 1982.
- TADEI, V. A. et al. **Distribuição do morcego vampiro Desmodus rotundus (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos.** Campinas, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1991, 101 p.
- TAYLOR, J. et al. Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species. **Vaccine**, v. 13, p. 539 - 549, 1995.
- TIZARD, I. Imunoprofilaxia: Princípios gerais de vacinação e vacinas. In: \_\_\_\_\_. **Introdução à Imunologia Veterinária.** São Paulo: Roca, 1985. 329 p. p. 167 - 179.
- \_\_\_\_\_. Risks associated with use of live vaccines. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 1851 - 1858, 1990.
- TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup>. ed., Geneva: E. World Health Organization, 1996, 476 p. p. 28 - 51.
- TOLLIS, M. et al. Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. **Vaccine**, v. 9, p. 134 - 136, 1991.
- TURNER, G. S. Immune response after rabies vaccination: basic aspects. **Annales de l'Institut Pasteur Virology**, v. 136, p. 453 - 460, 1985.
- XUAN, X. et al. Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector. **Vaccine**, v. 16, p. 969 - 976, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZACION: WHO Expert Committee on Rabies. **8<sup>th</sup> Report.** Geneva, 1992 (WHO - Technical Report Series, 824).

\_\_\_\_\_ : WHO Expert Committee on Biological Standardization. **43<sup>th</sup> Report.** Geneva, 1994 (WHO - Technical Report Series 840).

WUNDERLI P. S. et al. The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccines. **Vaccine**, v. 9, p. 638-642, 1991.