ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS

AVALIAÇÃO DA VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA, PRODUZIDA EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS LACTENTES, NA IMUNIZAÇÃO DE MACACOS-PREGO (*Cebus apella,* LINNAEUS, 1758) MANTIDOS EM CATIVEIRO

Tese apresentada à Universidade de São Paulo - Faculdade de Saúde Pública para a obtenção do Título de Doutor.

São Paulo

1998

ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS

AVALIAÇÃO DA VACINA ANTI-RÁBICA INATIVADA, PRODUZIDA EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS LACTENTES, NA IMUNIZAÇÃO DE MACACOS-PREGO (*Cebus apella,* LINNAEUS, 1758) MANTIDOS EM CATIVEIRO

Tese apresentada à Universidade de São Paulo - Faculdade de Saúde Pública para a obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano

São Paulo

1998

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano, Prof. Titular da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, meu orientador, pela contribuição imprescindível à realização deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo profissional, minha total admiração e profundo respeito.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo, ao Diretor Prof. Dr. Adayr Mafuz Saliba, aos veterinários Dr. José Daniel Luzes Fedullo, Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães e Drª Sandra Helena Ramiro Correa, e funcionários da Divisão de Veterinária, pela colaboração na realização deste trabalho.

À Diretoria do Instituto Pasteur, aos Pesquisadores Científicos Cleide Aschembrenner Consales e Carlos Roberto Zanetti pelas sugestões e amizade, e aos funcionários pela colaboração.

Aos meus pais, irmãos e irmãs pelo incentivo.

À Margareth de Andrade Gonçalves, minha esposa, pela colaboração e estímulo constante na busca de aprimoramento.

À Maria Izabel Simões Germano pela amizade e sugestões.

À Maria Amélia Ramponi Magrini e família, pelo constante apoio.

Às Pesquisadoras Científicas Eliana De Stefano, do Instituto Biológico, e Neusa Maria Gallina, do Instituto Butantan, pela cooperação nas atividades laboratoriais.

Ao Serviço de Documentação da Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, em especial a bibliotecária Maria Lúcia Ferraz.

À VIRBAC do Brasil Ind. e Com. Ltda. pela doação dos anestésicos.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) pela doação das vacinas anti-rábicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Primate Information Center, Washington, USA, pela auxílio na obtenção de referências bibliográficas.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

PUBLIFOLHA CD-ROM

Meu profundo respeito aos macacos-prego, que foram os escolhidos para participarem ativamente deste trabalho, permitindo a realização dos experimentos.

Sumário

Introdução 1
Considerações Gerais 1
Características da Infecção Rábica em Primatas Não Humanos 3
Ocorrência da Raiva em Primatas Não Humanos 6
Primatas Não Humanos Como Reservatórios da Raiva 7
A Imunoprofilaxia da Raiva 8
Importância em Saúde Pública 11
Objetivos 16
Material e Métodos 17
Animais 17
Alimentação 17
Grupos experimentais 20
Gaiolas de contenção 20
Anestesia 20
Coleta de sangue 21
Tuberculinização 21
Vacina anti-rábica 22
Cultura Celular 23
Meio de Cultura 23
Soro Fetal Bovino 23
Cultura de Células 24
Solução de ATV (Associação Tripsina Versene) 25
Contagem Celular 26
Capela de Fluxo Laminar 26
Microscópio Óptico 27
Microscópio de Fluorescência 27
Pipetas 27
Reação de Soroneutralização 28
Microplacas 28
Vírus rábico 28
Titulação do Vírus Rábico 29
Conjugado Anti-nucleocapsídeo Rábico 31
Soros dos Animais 31
Soro Padrão Anti-Rábico 31
Teste simplificado da inibição da fluorescência para dosagem dos anticorpos anti-rábicos neutralizantes 33

Análise estatística 35
Resultados 37
Discussão 55
Conclusões 65
Referências 66
Apêndice – Preparo das Soluções 77
Abreviaturas utilizadas 79

Sumário de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da microplaca Corning ® utilizada para as reações de soroneutralização. 28

Figura 2 - Cinética da resposta imune humoral de macacos-prego (*Cebus apella*) primo vacinados contra a raiva com VARCCL, dois reforços a intervalos de 30 dias e revacinação anual com uma dose. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 39

Figura 3 - Cinética da resposta imune humoral de macacos-prego (*Cebus apella*) primo vacinados contra a raiva com VARCCL, dois reforços a intervalos de 30 dias e revacinação anual com uma dose. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 43

Figura 4 - Cinética da resposta imune humoral de macacos-prego (*Cebus apella*) primo vacinados contra a raiva com VARCCL, um reforço aos 210 dias, e revacinação anual com uma dose. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 47

Sumário de Quadros

Quadro 1. Macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, segundo o número de identificação, o sexo e o peso. Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 1998. 18

Quadro 2. Dieta alimentar diária de macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro. Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 1998. 19

Sumário de Tabelas

Tabela 1. Resposta imune humoral em macacos-prego (*Cebus apella*) imunizados com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, após a primo vacinação, duas doses de reforço a intervalos de 30 dias e revacinação anual com uma dose de vacina. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 38

Tabela 2. Resposta imune humoral em macacos-prego (*Cebus apella*) imunizados com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, após a primo vacinação, uma dose de reforço aos 30 dias, outra aos 210 dias e revacinação anual com uma dose de vacina. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 42

Tabela 3. Resposta imune humoral em macacos-prego (*Cebus apella*) imunizados com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, após a primo vacinação, uma dose de reforço aos 210 dias e revacinação anual com uma dose de vacina. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 46

Tabela 4. Macacos-prego (*Cebus apella*) submetidos a diferentes esquemas de imunização com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, segundo os grupos experimentais e o prazo (em dias) para o aparecimento da resposta imune humoral, após a vacinação inicial. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 52

Tabela 5. Macacos-prego (*Cebus apella*) submetidos a diferentes esquemas de imunização com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, segundo os grupos experimentais e a duração (em dias) da imunidade completada a vacinação inicial e respectivos reforços vacinais. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 53

Tabela 6. Macacos-prego (*Cebus apella*) submetidos a diferentes esquemas de imunização com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, segundo os grupos experimentais e a duração (em dias) da imunidade após doses de reforço aos 210 dias e revacinação anual aos 360. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998. 54

Autor: PASSOS, E.C. Avaliação da vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, na imunização de macacos-prego (*Cebus apella*, Linnaeus, 1758) mantidos em cativeiro. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo]

RESUMO

Foram imunizados 27 macacos-prego (*Cebus apella*), por via intramuscular, com vacina anti-rábica inativada, produzida a partir de cérebros de camundongos lactentes (VARCCL), empregada nas campanhas de prevenção da raiva animal de cães e gatos. Os animais permaneceram em cativeiro, durante o período de junho de 1995 a junho de 1997, sendo divididos em 3 grupos experimentais e vacinados conforme o esquema: grupo I, com 3 doses a intervalo de 30 dias; o II, com 2 doses a intervalo 30 dias e reforço aos 210 dias; e, o III com uma dose e reforço aos 210 dias. A revacinação anual foi realizada em todos os animais aos 365 dias. As amostras de soros foram obtidas aos 0, 30, 60, 90, 150, 210, 240, 300, 365, 395, 545 e 730 dias, e armazenadas à temperatura de -20ºC, e a dosagem dos anticorpos realizada através do teste simplificado da inibição da fluorescência. Verificou-se que os animais do grupo I apresentaram soroconversão mais duradoura (122±32 dias) do que os dos grupos II e III ($p<0,05$) após a vacinação inicial, e os animais do grupo I apresentaram soroconversão mais duradoura (183,6±120,6 dias) do que os dos grupos II ($p<0,05$), após a revacinação anual aos 365 dias. A VARCCL induziu a resposta imune nos macacos-prego, após vacinação e revacinação, respectivamente, em 81,4% e 76,0% dos animais; com produção de anticorpos neutralizantes, iguais ou superiores a 0,5 UI/ml, porém, de curta duração; não constituindo assim, imunógeno apropriado para ser utilizado na rotina de imunização destes animais de difícil lide, mantidos em cativeiro.

Author: PASSOS, E.C. Evaluation of inactivated suckling mouse brain rabies vaccine for immunization of capuchin monkeys (*Cebus apella*, Linnaeus, 1758) held confined. São Paulo, 1998. [Doctorate Thesis – University of São Paulo School of Public Health]

ABSTRACT

Twenty-seven capuchin monkeys (*Cebus apella*) were intramuscularly immunized with inactivated suckling mouse brain rabies vaccine (SMBV) employed in campaigns for animal rabies prevention in dogs and cats. The animals were kept confined from June, 1995 to June, 1997. They were divided into 3 experimental groups and vaccinated according to the following scheme: group I, with 3 doses within a 30-day interval; group II, with 2 doses within a 30-day interval and a booster dose at the 210th day; and, group III; with a single dose and a booster dose at the 210th day. All animals were given the annual re-vaccination at the 365th day. Sera samples were obtained at the 0th, 30 th, 60th, 90 th, 150 th, 210 th, 240 th, 300 th, 365 th, 395 th, 545 th e 730 th days and kept stored at –20ºC. The antibodies dosage was carried out through the simplified inhibition fluorescent test. The following results were observed: animals belonging to group I had longer humoral immune response (122±32 days) than the ones belonging either to group II or group III ($p<0.05$) after initial vaccination; animals of group I presented longer humoral immune response (183.6±120.6 days) than the ones of the group II ($p<0.05$) after the annual re-vaccination at the 365th day. The SMBV induced humoral immune response in capuchin monkeys after vaccination and re-vaccination in respectively 81.4% and 76.0% of the animals, producing neutralizing antibodies equal to or higher than 0.5 IU/ml; however, they were short-lasting, being therefore not appropriate as an immunogen to be used routinely in the immunization of these animals which are difficult both to be deal with and to be held confined.

INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os primatas não humanos ocupam lugar de destaque nas ciências biológicas em relação ao homem, dada a proximidade das características filogenéticas de ambas as espécies; ao lado da extraordinária semelhança física e comportamental, constatam-se inúmeras similaridades bioquímicas específicas (Zamecnik, 1977).

As maiores concentrações de primatas não humanos, fora dos ecótopos naturais, nas matas e florestas, são encontradas em cativeiro nos parques zoológicos, em todos os países do globo, independentemente das condições climáticas externas ao ambiente onde são mantidos. A capacidade de adaptação ao cativeiro, contudo, varia de acordo com a espécie considerada. Algumas espécies de primatas do Novo Mundo adaptam-se muito bem e conseguem reproduzir-se em cativeiro, como é o caso dos gêneros *Ateles, Cebus e Saimiri*; enquanto que outras, como *Alouatta e Cacajao*, reproduzem-se com muita dificuldade (Moro, 1977).

Deve-se destacar o relevante papel que estas instituições desempenham nas áreas de ensino e pesquisa pois, permitem o estudo comportamental e funcional de diferentes espécies de primatas, em condições ambientais próximas às dos ecótopos naturais e asseguram, por outro lado, a conservação da variabilidade natural e a diversidade do patrimônio genético.

Como animais de estimação, os primatas são muito apreciados, especialmente as espécies dos gêneros *Cebus*, *Saguinus e Saimiri*. Contudo, é importante salientar que estes animais podem adquirir enfermidades do homem, e posteriormente transformarem-se em fontes de infecção, transmitindo doenças como hepatite, tuberculose, raiva, salmoneloses, shigueloses, helmintoses e outras moléstias (Moro, 1977; Ott-Joslin, 1993; Renquist e Whitney, 1987; Tauraso, 1973; Whitney, 1979; Wilson et al., 1975).

Os primatas do Velho Mundo, como os macacos-verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) em particular, podem ser portadores de infecções de alta virulência para o homem. Dentre estas, destaca-se a enfermidade de Marburg (Anders, 1967; Anonymous, 1967), que provocou a morte de 7 pessoas entre as 27 que haviam lidado com esses macacos ou com culturas de suas células renais processadas em laboratório. Evidências os apontam como suspeitos de participarem, de algum modo, na cadeia de transmissão do vírus Ebola (Jahrling et al., 1990; Morell, 1995; Pearson et al., 1996) e HIV/AIDS - Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Phillips, 1998).

A Inglaterra instituiu, em 1962, uma legislação específica, que incluía o emprego de medidas de quarentena, visando controlar a importação de animais silvestres, particularmente os primatas não humanos, que seriam vendidos como animais de estimação ou utilizados em laboratórios de pesquisa. Com estas medidas procurou-se evitar que os animais introduzissem uma grande variedade de agentes infecciosos no país, com a possibilidade de ocorrência de surtos ocasionais de enfermidades exóticas (Anonymous, 1967).

No Brasil, apesar das restrições impostas pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) vem crescendo em todo o território nacional, o número de aficionados que insistem em manter em cativeiro domiciliar esses animais, principalmente nos grandes centros urbanos. É comum nas clínicas veterinárias, especializadas em pequenos animais, o atendimento de primatas não humanos, notadamente sagüis; macacos-prego também são atendidos, porém em menor número.

No campo da investigação científica, os primatas não humanos são utilizados, preferencialmente, em estudos comparativos, sobretudo, nas pesquisas sobre enfermidades do homem (Zamecnik, 1977), como tuberculose, malária, poliomielite, HIV/AIDS e câncer, entre outras moléstias (Brack, 1987; Meyer, 1977; Moro, 1977; Potkay, 1992). Complementarmente, utilizam-se estes animais nos ensaios com drogas e no controle de qualidade de

fármacos e de produtos biológicos, com a finalidade de aferir o grau de toxicidade e seus efeitos adversos; comprovar a ausência de neurovirulência de vacinas, como a de poliomielite e de febre amarela e, avaliar a inocuidade de imunógenos preparados a partir de vírus atenuados ou modificados, como a da rubéola, sarampo e caxumba (Meyer, 1977).

No caso particular da raiva, a utilização de primatas não humanos está relacionada, sobretudo, à necessidade de testar novos imunógenos, preparados a partir de procedimentos tecnológicos baseados em biologia molecular e engenharia genética. Constituem, também, sistema biológico sensível capaz de permitir a avaliação da eficácia de vacinas anti-rábicas, empregando-se esquemas de vacinação pré e pós-exposição ao vírus da raiva; além de servir como modelo experimental no estudo da patogenia da infecção rábica (Baer et al., 1975, 1977 e 1979; Baer, 1988; Barth et al., 1984; Bektemirova et al, 1983; Meyer, 1977; Nieves et al., 1996; Schell et al., 1980; Warrell et al.,1987; Wiktor & Koprowski, 1965; Wiktor et al., 1976).

CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO RÁBICA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

A ocorrência da raiva em primatas não humanos, em condições naturais, é desconhecida. Boulger (1966) sugeriu que a incidência da doença era ínfima, em razão de serem manuseados milhares de macacos anualmente e de haver sido encontrado um único caso de raiva natural confirmado em laboratório. No entanto, persiste o risco de adquirir a infecção, mediante contato com macaco raivoso, uma vez que o animal pode transmitir o vírus através de suas secreções (Kessler et al.,1982).

Os primatas não humanos do Novo Mundo apresentam hábitos arborícolas, o que dificulta a transmissão da enfermidade através da mordedura de carnívoros raivosos. Entretanto, os morcegos hematófagos podem representar um meio provável de exposição ao vírus (Richardson e Humphrey, 1971).

A manifestação da forma paralítica da doença foi descrita em macacos, naturalmente infectados, caracterizando-se o quadro clínico por intensa sialorréia, disfagia, excitação, auto-mutilação e paralisia, seguida de morte repentina. A forma furiosa, nestes animais, é de difícil avaliação, uma vez que a agressividade faz parte dos padrões de comportamento de todos os primatas não humanos (Brack, 1987; Kaplan, 1969).

Em 1966, a Inglaterra importou de várias regiões da Índia, um lote de 33 macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), que seriam utilizados em pesquisas e produção de vacinas (Boulger, 1966). Após desembarque no Aeroporto de Londres, os animais foram separados aos pares em uma sala de isolamento. No 47º dia da quarentena, uma fêmea adulta que se encontrava sozinha desde a chegada, deixou de se alimentar, permanecendo agachada no fundo da gaiola e mordendo os dedos e as mãos. Passados 4 dias, foi sacrificada em razão das lesões provocadas pela auto-mutilação; antes da morte não foram observados sinais de agressividade, recusa em beber água ou paralisia. No exame de laboratório, detectou-se a presença de vírus rábico no cérebro e nas glândulas salivares submandibulares do animal, mediante o emprego das técnicas de histopatologia, inoculação e titulação em camundongos, prova de soro neutralização com soro anti-rábico e teste de proteção cruzada.

Em Gana, Addy (1985) analisando a ocorrência de raiva, no período de 1970 a 1982, encontrou em 2 lotes de 10 macacos-verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) selvagens, comprados com a finalidade de serem utilizados em pesquisas com sarampo, dois animais raivosos, em diferentes períodos de tempo. Os métodos empregados para o diagnóstico da raiva foram imunofluorescência direta e inoculação em camundongos. Todos os animais foram capturados pelo mesmo caçador, em dias distintos e encontravam-se em gaiolas individuais. Durante a quarentena, na manhã do segundo dia de observação, um dos macacos apresentou-se apático, recusando o alimento e demonstrando incoordenação motora; no dia seguinte, manifestou um quadro de paralisia e, no quarto dia veio a óbito. No exame *post-mortem* foi diagnosticada raiva. O segundo macaco manteve-se dócil e em boas condições de saúde,

durante quase toda quarentena. Ao final deste período tornou-se, de súbito, extremamente excitado e agressivo aos latidos dos cães localizados em área próxima; ao ser alimentado, com um movimento rápido e brusco, conseguiu morder severamente a mão do tratador. O animal foi sacrificado, imediatamente após a agressão, tendo o exame laboratorial do cérebro e das glândulas salivares revelado corpúsculos de Negri. Os animais remanescentes não apresentaram sinais da enfermidade no período estabelecido entre 21 a 40 dias de observação.

No período de 1929 a 1970, nos Estados Unidos, foram descritos 8 casos de raiva, em primatas não humanos, cuja importação, destinava-se a instituições de pesquisas e comércio de animais de estimação. A grande maioria destes macacos era proveniente de regiões da Ásia e da América do Sul, onde a raiva ocorre de forma epizoótica ou enzoótica em outras espécies animais. Entre 1961 e 1970, registraram-se 4 casos em primatas neo-tropicais, 3 deles identificados como macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*). Destes casos, 2 manifestaram-se após aplicação de vacina anti-rábica preparada a partir de vírus atenuado e os outros 2 foram provenientes de lotes de macacos importados como animais de estimação (Richardson e Humphrey, 1971).

Em julho de 1972, foi relatado, também nos Estados Unidos, o 1º caso de raiva furiosa em uma fêmea jovem de chimpanzé (*Pan troglodytes*), proveniente de Serra Leoa, na África. Após 28 dias do embarque marítimo, o animal apresentou comportamento extremamente agressivo, provocando um ferimento profundo no calcanhar da tratadora que o alimentava e arranhando outro tratador: ambos receberam tratamento completo pós-exposição. O chimpanzé morreu após 2 dias do início dos sintomas e o exame laboratorial revelou a presença do vírus rábico no cérebro, através das reações de imunofluorescência direta e inoculação em camundongos. A infecção rábica, provavelmente, havia sido adquirida através de mordedura de um animal raivoso, no seu próprio ecótopo, na África (Miot et al., 1973).

Em 1975, Aaron et al. relataram a ocorrência de raiva em sauim (*Saguinus nigricollis*), importado do Peru, onde o animal fora vacinado um

dia antes do embarque; após 13 dias da vacinação, o animal apresentou paralisia ascendente do membro pélvico direito. O exame clínico conduziu à suspeita de raiva, a qual foi confirmada laboratorialmente. O vírus isolado apresentava características compatíveis com a cepa vacinal adaptada em ovos embrionários, sugerindo que a infecção fora induzida pela vacinação.

OCORRÊNCIA DA RAIVA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

No continente africano, a raiva tem sido diagnosticada em várias espécies de mamíferos selvagens, inclusive em primatas não humanos. Na Etiópia, foram descritos 2 casos, no período de 1968 a 1969 (Fekadu, 1982). Em Zâmbia, estudou-se a raiva nos animais selvagens no período de 1928 a 1976, e constatou-se a ocorrência de um caso em primata de espécie desconhecida e outro em macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*); como este animal era domiciliado não foi considerado, para efeito do levantamento, como selvagem (Röttcher e Sawchuk, 1978).

Em Moçambique, no período de 1973 a 1982, foram encontrados 3 macacos-verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) raivosos sendo provável que as espécies selvagens, neste país, participem como reservatórios da infecção rábica (Dias et al., 1985). Na Nigéria, descreveu-se o isolamento do vírus rábico em diferentes animais selvagens, entre os quais o chimpanzé (*Pan troglodytes*), além de outras espécies de macacos (Tomori e David-West, 1985). No Sudão foram diagnosticados 8 macacos raivosos, entre 1931 e 1987 (Hameid, 1991); e, em Angola, de 1965 a 1973, a raiva foi diagnosticada em 4 macacos (Duarte et al., 1985).

No continente asiático, foi relatada a existência de casos de raiva em macacos na Indonésia, no período de 1978 a 1982 (Koesharyono et al., 1985).

Nas Américas, o isolamento do vírus rábico em macacos foi descrito, entre 1975 e 1982, no México, em Honduras, na Venezuela, no Peru, no Equador, no Brasil e no Paraguai (Acha, 1981; Acha e Arambulo, 1985).

No Brasil, em particular, são escassas as referências sobre a raiva em primatas não humanos. No Rio de Janeiro, Passos et al. (1974) diagnosticaram a raiva em 7 sagüis e 5 macacos mantidos em cativeiro e considerados como de estimação; alguns destes animais foram responsáveis por acidentes com seres humanos, no período de janeiro de 1965 a julho de 1974. Em São Paulo, Gambeta et al. (1979) relataram a ocorrência de raiva, diagnosticada no Instituto Pasteur, em 6 sagüis provenientes de zonas silvestres e em 8 macacos que apresentavam histórico de mordeduras por cães, no período de 1971 a 1978. Piccinini e Freitas (1985) descreveram outros 15 casos de raiva em macacos, no país, entre 1979 e 1982.

PRIMATAS NÃO HUMANOS COMO RESERVATÓRIOS DA RAIVA

Os casos de raiva no homem referidos na literatura, com origem no contato ou por agressões de primatas não humanos, são escassos. A sub-notificação pode ser apontada como uma das causas, uma vez que estes animais proliferam em regiões inóspitas de países pobres, principalmente da África, da Ásia e da América Latina, onde há deficiência crônica de recursos de saúde.

No Sri Lanka, Wilson et al. (1975), revisaram 23 casos de raiva humana e constataram que os macacos foram responsáveis por apenas um caso da doença, o qual apresentou o maior período de incubação da enfermidade em relação aos demais.

Na Austrália, em 1987, Faoagali et al. (1988) relataram o primeiro caso de raiva diagnosticado no continente, em uma criança que permanecera durante 8 meses viajando através da Índia, Singapura e Tailândia;

neste período fora mordida, nos dedos, por um macaco, o provável transmissor da enfermidade.

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos, Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (MS/FNS/CENEPI/CCZAP/PNPR), no período de 1980 a 1996, os macacos foram responsáveis pela transmissão de 11 casos notificados de raiva humana. Deve-se destacar ainda que, no mesmo período foram notificados 82 casos humanos de raiva, em que a espécie animal responsável pela transmissão da doença era de origem desconhecida, não se podendo descartar a possibilidade de alguns destes casos terem sido transmitidos por macacos.

Silva et al., 1974, realizaram na Bahia, em uma região com surtos de raiva dos herbívoros, estudo sobre a participação de sagüis (*Callithrix penicillata*), na manutenção da enfermidade. Examinaram 56 animais capturados naquela região, mas todos foram negativos quando submetidos a exames laboratoriais para diagnóstico da raiva e, também, não apresentaram anticorpos neutralizantes.

A IMUNOPROFILAXIA DA RAIVA

No que tange à raiva animal, a imunização dos suscetíveis se impõe como principal medida para o controle da doença (WHO, 1992), podendo ser realizada mediante o emprego de diferentes tipos de vacinas, de vírus rábico inativado ou modificado, produzidas em tecido nervoso ou em cultura celular.

No Brasil, utiliza-se oficialmente nas campanhas de vacinação em massa, para a prevenção da raiva canina e felina, a vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes (Germano et al., 1990). Esta vacina contém suficiente quantidade de massa antigênica, que lhe confere elevado poder imunogênico, apresenta alto grau de inocuidade e

proporciona níveis de imunidade satisfatórios, que são da máxima importância quando a vacinação é utilizada em campanhas de prevenção no âmbito populacional (Germano et al., 1990; WHO, 1992).

A imunização anti-rábica, particularmente em primatas não humanos mantidos em cativeiro, tem sido realizada como forma de prevenir a transmissão da doença entre os próprios animais e, destes, aos seres humanos expostos ao seu convívio, ou até mesmo a outras espécies animais. Inúmeros tipos de vacinas têm sido pesquisadas, no sentido de identificar o melhor imunógeno a ser utilizado na prevenção da raiva nestes espécimes.

Blancou et al. (1979) realizaram estudo sobre a imunidade humoral, após primo-vacinação, com uma vacina anti-rábica de cultura celular, inativada, adicionada de adjuvante (hidróxido de alumínio), administrada por via subcutânea, no homem, em cães, em bovinos, em raposas e em primatas não humanos. A pesquisa de anticorpos anti-rábicos, realizada 15 a 21 dias pós-vacinação, mediante a prova de soroneutralização em camundongos, revelou que dos 27 primatas avaliados, 7 (25,9%) apresentaram títulos menores ou iguais a 0,5 UI (Unidades Internacionais), enquanto que os outros 20 (74,1%) responderam com títulos superiores a 0,5 UI. Deve-se destacar que, o título considerado como protetor para os macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) deve ser igual ou superior a 0,6 UI (Tollis et al., 1991).

Haigh e Field (1981) vacinaram diferentes espécies de carnívoros, herbívoros e macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp), mantidos em coleções de zoológicos, com uma vacina anti-rábica inativada, preparada a partir de cérebros de camundongos lactentes, através da via intramuscular, com uma dose de 1 ml. Os títulos de anticorpos dos três macacos, determinados pela prova de soroneutralização em camundongos, 28 a 34 dias pós-vacinação, foram da ordem de 6, 32 e 75 UI/ml. No ano seguinte, somente dois dos três animais permaneciam na coleção, sendo que apenas um deles apresentava título maior que o mínimo preconizado.

Kessler et al. (1982) imunizaram um grupo de dez fêmeas adultas de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), sem anticorpos anti-rábicos, utilizando a vacina anti-rábica inativada preparada a partir de cérebros de camundongos lactentes, indicada para cães e gatos. Os anticorpos foram detectados através da técnica de inibição de focos fluorescentes. Após 30 dias da vacinação, 8 dos 10 animais responderam com títulos de anticorpos iguais a 0,5 UI/ml ou mais. Uma segunda dose de reforço foi aplicada no 30º dia, em todos os animais, os quais passaram a apresentar títulos de anticorpos que variaram de 0,84 UI/ml a 5,0 UI/ml. Não foi observada nenhuma reação adversa.

Smith et al. (1987) realizaram tratamento anti-rábico em 4 macacos gibões (*Hylobates lar*), em virtude dos animais terem manipulado um morcego raivoso morto dentro do recinto por eles ocupado. Em razão do valor econômico dos animais optou-se por tratá-los e mantê-los em observação, ao invés de sacrificá-los. Dadas as facilidades de isolamento, decidiu-se submetê-los ao seguinte esquema de vacinação: uma dose da vacina por semana, perfazendo um total de 3 doses, e aplicação de uma 4ª dose, como reforço, 4 meses após o início do tratamento. Os animais adultos foram vacinados com 1,0 ml da vacina e o jovem com 0,25 ml na 1ª dose; 0,50 ml na 2ª dose; e, 1,0 ml na 3ª e 4ª doses, devido ao seu peso e tamanho quando comparado aos animais adultos. Utilizou-se uma vacina inativada, preparada em células diplóides, indicada para cães e gatos, com proteção prevista para 3 anos; e, 1 ano para eqüinos, bovinos e ovinos. Os animais foram submetidos a coleta de sangue antes de iniciar o esquema de imunização, uma semana após terem recebidos as 1ª, 2ª e 3ª doses, imediatamente antes das aplicação da 4ª dose e duas semanas após o reforço, com a finalidade de comparação dos títulos de anticorpos antes e após o reforço vacinal. A vacina empregada sempre estimulou a resposta imune nos animais, pois, observou-se aumento no título de anticorpos desde a 1ª dose e nenhum deles veio a óbito, em conseqüência do contato com o morcego raivoso.

Cabrera et al. (1991) estudaram a resposta imune em macacos-prego (*Cebus apella*) e sagüis (*Callithrix* sp.), após a imunização com uma dose da vacina anti-rábica inativada preparada a partir de cérebros de

camundongos lactentes indicada para cães, administrada por via subcutânea ou intramuscular, e observaram que os macacos-prego não responderam ao imunógeno, enquanto que os sagüis apresentaram anticorpos detectáveis, a partir do 14º dia persistindo até o 60º dia; os anticorpos anti-rábicos foram determinados através da técnica de contraimunoeletroforese.

A utilização de vacinas anti-rábica com vírus vivo modificado na imunização de primatas não humanos nunca deve ser adotada, pois há o risco de provocar a raiva, tal como observado em macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), sauim (*Saguinus nigricollis*) e babuínos adultos (*Papio ursinus*) (Richardson e Humphrey, 1971; Aaron et al., 1975; Bingham et al., 1992).

No Sudão, durante o período de 1981 a 1983, foram vacinados contra a raiva no Hospital Veterinário de Khartoum, além de cães e gatos, macacos que foram exportados para países vizinhos (Ibrahim et al., 1985).

No Brasil em particular, embora não recomendado**,** os macacos criados em domicílios têm sido, usualmente, vacinados contra a raiva nas campanhas preventivas, organizadas pelos municípios, com a finalidade de controlar a raiva canina. Contudo, na literatura não existem dados disponíveis sobre a eficácia, em primatas não humanos, da vacina anti-rábica, indicada para cães. Na realidade, a adoção da vacina anti-rábica inativada, preparada em cérebros de camundongos lactentes, na profilaxia da raiva destes animais tem sido apoiada apenas em resultados empíricos, sem maiores fundamentos científicos.

IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

É importante destacar que, embora os primatas sejam mantidos nos zoológicos em recintos apropriados, outras espécies animais podem adentrar suas instalações, notadamente morcegos. Como estes podem transmitir a raiva, a imunização preventiva dos primatas faz-se necessária, uma vez que o vírus rábico já foi isolado em morcegos recolhidos mortos dentro desses recintos

(Smith et al., 1987), como também em morcegos capturados vivos, nos gramados dos parques zoológicos, devido a comportamento anômalo (Sedgwick et al., 1975).

Em áreas onde a raiva ocorre de forma endêmica, a vacinação anti-rábica dos animais pertencentes aos zoológicos deve ser considerada, sobretudo, quando as colônias têm alto risco de exposição ao vírus rábico (Haig e Field, 1981; Kessler et al.,1982).

A despeito da importância da utilização dos primatas em estudos sobre a patogenia e imunologia da raiva, deve-se levar em consideração o cuidado no manuseio destes animais em zoológicos, em instituições de pesquisa, bem como em outros locais. Vale ressaltar que sempre existe a possibilidade do animal ser transmissor do vírus rábico, mesmo sem manifestar os sintomas característicos da doença. Por outro lado, as agressões provocadas pelas mordeduras em veterinários, tratadores, proprietários e outras pessoas que tenham contato com esses animais, obriga que as mesmas sejam submetidas ao tratamento anti-rábico pós-exposição (Boulger, 1966; Fekadu, 1982; Kaplan, 1969; Klenerman et al., 1975; Lépine et al., 1967; Lery, 1972; Miot et al., 1973; Ott-Joslin, 1993; Richardson e Humphrey, 1971; Sivan, 1967, 1969 e 1972; Zaheer et al., 1970).

Segundo a Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (1996), o tratamento anti-rábico humano sempre é recomendado quando os animais agressores apresentam sinais clínicos da enfermidade; quando fogem após a agressão e desaparecem; quando não podem ser mantidos em observação domiciliar ou mesmo em canis públicos, ou ainda, não há condições de diagnóstico laboratorial. Em relação aos animais silvestres, os morcegos são considerados espécies de alto risco na transmissão, e a conduta profilática indicada é a soro vacinação ou esquema de reexposição; enquanto que, para as demais espécies de animais silvestres, a impossibilidade de realização do diagnóstico laboratorial tem o mesmo tratamento indicado para os morcegos. Desta forma, é imprescindível que as pessoas agredidas procurem os

serviços de atendimento médico, com maior brevidade, e, caso exista possibilidade, enviar os cérebros dos animais mortos para exame de imunofluorescência para diagnóstico laboratorial da raiva.

O atendimento ambulatorial do Instituto Pasteur de São Paulo, registrou no período de 1994 a 1997, um total de 339 pessoas agredidas por macacos. Estes animais ocuparam a 4ª colocação entre espécies agressoras, representando 1,5% da população que procurou o serviço médico, situando-se logo após cães, gatos e ratos. O Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de São Paulo registrou 1.088 acidentes por mordeduras de macacos no período de 1988 até agosto de 1997 (dados não publicados), onde, também, ocuparam a 4ª colocação representando 0,8% dos animais agressores. Gambeta et al. (1979) ao estudarem a raiva no Instituto Pasteur, no período de 1971 a 1978, observaram que os primatas não humanos contribuiram com 1,3% do total de amostras enviadas ao laboratório para diagnóstico da raiva animal, ocupando a 4ª posição com 174 amostras.

Em estudo realizado no município de Araguari, Minas Gerais, no período de janeiro de 1984 a dezembro de 1986, Almeida et al. (1986) observaram que 1,6% das pessoas atendidas no serviço anti-rábico foram agredidas por macacos e que estas agressões ocuparam o terceiro lugar, imediatamente atrás de cães e gatos.

Na India, Banerji et al. (1974) estudaram as agressões provocadas por mordeduras de animais em pessoas atendidas na Clínica Anti-rábica do Hospital da cidade de Agra, no período de dezembro de 1970 a maio de 1971, constatando que os acidentes com macacos atingiram 1,6%, ocupando o segundo lugar, em seguida aos cães; enquanto que, Zaheer et al. (1970) ao analisarem os casos de tratamento anti-rábico realizados no Hospital Distrital da cidade de Aligarh, durante o período de junho de 1966 a maio de 1968, haviam observado que as agressões provocadas por macacos nas zonas rural e urbana que ocupavam a quarta posição com apenas 0,15%, depois de cães, hienas e chacais. Ahuja et al. (1985) analisaram a epidemiologia da raiva e constataram

que no período de 1971 a 1981, os macacos foram responsáveis por 0,4% das agressões provocadas por mordeduras em humanos, que receberam tratamento anti-rábico. Ainda, de acordo com os mesmos autores, os acidentes envolvendo mordeduras provocadas por macacos aumentaram nos últimos anos.

Nas Filipinas, Dembert et al. (1985) constataram que os macacos ocupavam a terceira posição como animais agressores, a partir de levantamento das pessoas atendidas no Hospital Naval, localizado na base americana em Subic Bay em 1984, sendo que as mesmas tiveram de ser submetidas ao tratamento anti-rábico com soro hiperimune e vacinas, o que representou 25% do total de agressões por todas as espécies. O tratamento completo pós-exposição deve-se ao fato de na quase totalidade dos casos não ter sido possível capturar o macaco agressor.

Na Indonésia as pessoas agredidas por animais, entre eles os macacos, são submetidas ao tratamento anti-rábico (Koesharyono et al., 1985). Na Tailândia, os primatas não humanos estão incluídos dentro das espécies transmissoras da raiva humana de menor importância, contudo os agredidos são submetidos, na rotina, ao tratamento anti-rábico pós-exposição (Thongcharoen et al., 1985).

Na Etiópia, Fekadu (1982) verificou que no período de 1964 a 1975, todas as pessoas expostas a animais raivosos, domésticos e silvestres, aí compreendidos os primatas não humanos, foram submetidas ao tratamento anti-rábico pós-exposição. Do mesmo modo, em Moçambique, o tratamento profilático pós-exposição é recomendado, rotineiramente, em todas as vítimas mordidas por animais selvagens, raivosos ou suspeitos, e por aqueles que não são passíveis de observação (Dias et al., 1985).

A criação de primatas não humanos, como animais de estimação, com destaque especial para os macacos-prego, vem sendo realizada por um grande número de pessoas, a maioria das quais, não possui noção dos cuidados mínimos exigidos para a manutenção destes animais, em cativeiro. Vale

mencionar que a grande maioria desses animais é de origem ignorada e não passa por qualquer tipo de processo de quarentena antes de entrar no ambiente domiciliar.

Os macacos, embora possam acostumar-se com as pessoas que os alimentam, são extremamente agressivos, sobretudo após a maturidade sexual, com reações de defesa caracterizadas, principalmente, pelas mordeduras; seus grandes dentes caninos podem provocar profundas e extensas dilacerações teciduais, passíveis de cuidados cirúrgicos.

Com base nos aspectos mencionados, é de particular relevância em Saúde Pública, que os primatas não humanos, mantidos em cativeiro, sejam vacinados contra a raiva, com vacinas comprovadamente inócuas e de elevado poder imunogênico, evitando que as pessoas agredidas pelo animal sejam, diretamente, expostas ao risco de contrair a infecção rábica.

OBJETIVOS

Tendo em vista a problemática concernente à imunização de primatas não humanos em cativeiro e sua importância em Saúde Pública, o presente trabalho teve como objetivo:

- verificar o grau de imunidade humoral e a persistência dos anticorpos neutralizantes em macacos-prego (*Cebus apella*), mantidos em cativeiros pelo período de 24 meses, após a imunização com a vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, tipo Fuenzalida & Palacios, empregada nas campanhas de vacinação preventivas da raiva canina e felina, de acordo com 3 esquemas vacinais diferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram selecionados 27 macacos-prego (*Cebus apella*), sendo 6 fêmeas e 21 machos, com peso variando de 1,040 kg a 5,007 kg, mantidos na colônia da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, em recintos com área externa de 20 a 30 metros quadrados, incluindo o solário.

Os critérios utilizados para seleção da amostra consideraram: as boas condições de saúde dos animais, notadamente a não reação à prova de tuberculina e, a ausência de títulos de anticorpos anti-rábicos iguais ou superiores a 0,5 UI/ml.

Os animais foram identificados através de número tatuado na região interna dos membros pélvicos (Quadro 1).

Os animais permaneceram nos recintos durante 24 meses, com início em junho de 1995 e término em junho de 1997.

ALIMENTAÇÃO

Os animais foram alimentados 2 vezes ao dia às 9:00 e às 15:00 h, e a água administrada *ad libitum*. A alimentação de cada animal está descrita no Quadro 2.

Quadro 1. Macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, segundo o número de identificação, o sexo e o peso. Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 1998.

Identificação	Sexo	Peso (kg)
01	fêmea	1,930
07	fêmea	2,250
10	macho	3,250
11	macho	4,400
15	macho	1,570
16	macho	3,550
18	fêmea	2,360
19	macho	2,370
21	macho	3,202
22	macho	2,800
25	macho	3,007
26	macho	5,007
30	fêmea	2,145
34	macho	2,860
38	macho	3,720
43	macho	2,600
48	macho	2,070
54	macho	2,950
59	fêmea	2,070
61	macho	1,800
70	macho	3,230
71	macho	4,910
73	macho	1,880
97	macho	1,930
98	fêmea	1,250
100	macho	3,710
101	macho	1,040

Quadro 2. Dieta alimentar diária de macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro. Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 1998.

Tipo de alimento	Quantidade
Banana nanica	200 gramas pela manhã e 200 gramas à tarde
Mamão	20 gramas pela manhã e 20 gramas à tarde
Fruta da época	40 gramas pela manhã e 40 gramas à tarde
Angu composto	40 gramas pela manhã e 40 gramas à tarde
Repolho	60 gramas pela manhã e 60 gramas à tarde
Laranja	60 gramas ao dia
Batata doce cozida	60 gramas ao dia
Pescoço de frango moído	60 gramas pela manhã
Amendoim com casca	20 gramas à tarde
Ovo cozido	¼ ao dia

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 3 grupos experimentais, o grupo I foi constituído por 1 fêmea e 7 machos, o grupo II por 3 fêmeas e 6 machos e o grupo III por 2 fêmeas e 8 machos. O grupo I recebeu três doses de vacina anti-rábica nos meses de junho, julho e agosto de 1995; grupo II recebeu duas doses de vacina anti-rábica nos meses de junho e julho de 1995 e uma dose de reforço após 6 meses em janeiro de 1996; e, o grupo III recebeu uma dose de vacina anti-rábica no mês de junho de 1995 e uma dose de reforço após 7 meses, em janeiro de 1996. Os exemplares de todos os grupos foram revacinados, um ano após a primo vacinação, em junho de 1996.

GAIOLAS DE CONTENÇÃO

Para imobilizar os animais, foram utilizadas gaiolas de contenção de alumínio, com uma grade móvel sobre trilhos, a qual era deslocada no momento do uso, a fim de manter o animal imobilizado em um dos seus lados, permitindo assim a anestesia. Este procedimento permitiu a manipulação dos animais com total segurança, evitando dessa forma os possíveis acidentes, como mordeduras nas pessoas envolvidas e ferimentos nos animais.

As gaiolas pesavam aproximadamente 5,0 kg, medindo 1,0 x 1,0 x 1,0 m, com uma altura de 70 cm do chão.

ANESTESIA

Cada animal foi anestesiado com zolazepan associado com tiletamina [1], na dosagem de 4,4 mg/kg de peso, por via intramuscular, utilizando seringas estéreis descartáveis de insulina, com volume de 1 ml, e agulhas estéreis e descartáveis, de tamanho 20 x 5,5 mm. A anestesia foi

[1] Zoletil 50 da Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda.

aplicada nos animais para permitir tuberculinização, coleta de sangue, vacinação e cuidados veterinários.

COLETA DE SANGUE

Os animais foram sangrados nos meses de junho, julho, agosto, setembro e novembro de 1995; janeiro, fevereiro, abril, junho, julho e dezembro de 1996; e, junho de 1997. A coleta deu-se mediante punção da veia femural, utilizando seringas estéreis descartáveis, com 10 ml de volume, e agulhas, estéreis e descartáveis, 30 x 8 mm. O sangue colhido foi acondicionado em tubos de ensaio estéreis de vidro, tamanho 12 x 150 mm, colocados em estufa à temperatura de 37ºC durante 30 minutos, em seguida eram deixados em geladeira à temperatura de 4-8ºC, durante 30 minutos, para formação e retração do coágulo e liberação de soro. As amostras foram centrifugadas sob refrigeração a 2.000 rpm, durante 15 minutos, distribuídas em tubos “Eppendorf” e armazenadas em freezer à temperatura de -20ºC até o processamento no laboratório, para dosagem de anticorpos.

TUBERCULINIZAÇÃO

Todos os animais do experimento foram submetidos ao teste tuberculínico para diagnóstico da tuberculose, com o objetivo de eliminar possíveis reagentes. O teste foi realizado com tuberculina mamífera, também denominada de tuberculina O.T. (Old Tuberculin), partida nº 77 fabricada em outubro de 1993 com vencimento em outubro de 1995, produzida no Instituto Biológico de São Paulo, pertencente à Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

Os animais foram inoculados por via intradérmica na pálpebra direita, utilizando seringas de insulina estéreis com agulhas 20 x 5,5 mm, com 0,1 ml de antígeno, de modo a propiciar a formação de uma pápula no local da aplicação. Adotou-se a inoculação intra-palpebral por ser uma região de fácil observação nos primatas não humanos, não exigindo a aplicação de anestésicos

para a realização da leitura do teste tuberculínico. As leituras foram realizadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas pós inoculação (Johnson-Delaney, 1994).

Para a interpretação dos resultados da prova tuberculínica consideraram-se: como não reagentes, os animais que não apresentaram reação no local da inoculação; como reagentes, os que manifestaram edema pronunciado ou necrose no ponto de inoculação; e, como duvidosos, aqueles que revelaram edema discreto no ponto de aplicação do antígeno.

VACINA ANTI-RÁBICA

A imunização dos animais foi realizada com a vacina anti-rábica modificada, inativada, produzida a partir de cérebros de camundongos lactentes (VARCCL), tipo Fuenzalida & Palacios, suspensão a 2% de tecido cerebral, empregada nas campanhas de prevenção da raiva animal de cães e gatos, produzida no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

As vacinas foram acondicionadas até o momento de uso, em isopores contendo gelo reciclável, estocadas e mantidas sob refrigeração à temperatura de 4 a 8ºC.

Foram utilizados os lotes: 05/95 fabricado em março de 1995, apresentando ao teste de potência de Habel título de $10^{5,8}$ DP_{50}/0,03ml; e, 096/96 produzido em maio de 1996 com título protetor de $10^{6,2}$ DP_{50}/0,03ml. Ambas as vacinas eram válidas até 12 meses após a data de fabricação.

Todos os animais foram vacinados no membro pélvico, pela via intramuscular, no músculo *semitendinosus*, com dose de 1,0 ml, de acordo com os esquemas propostos.

CULTURA CELULAR

MEIO DE CULTURA

O meio de cultura empregado na rotina de manutenção das culturas celulares e na produção dos lotes de vírus rábico de trabalho, foi o meio de Eagle-MEM (Minimum Essential Medium), com sais de Earle e L-glutamina, sem bicarbonato, diluído em água bi-destilada e desmineralizada, e esterilizado por filtração em membrana Millipore ® 0,22 μ, marca Inlab, lote 10.938, com vencimento em maio de 1999, mantido à temperatura de 4-8ºC, acrescido de 10% de soro fetal bovino e sem adição de antibióticos.

Para as reações de soroneutralização, foi acrescido de 0,1% do antibiótico garamicina ® (sulfato de gentamicina) na concentração de 50 mg/1.000 ml.

SORO FETAL BOVINO

O soro fetal bovino, estéril, marca Laborclin ®, lote 60524, produzido em maio de 1996 e com vencimento em maio de 1998, foi inativado à temperatura de 56ºC em banho-maria, sendo utilizado na concentração de 10% e adicionado ao meio de cultura para a manutenção das culturas celulares, para a produção de vírus de trabalho e, também, nas reações de soroneutralização.

O soro fetal bovino utilizado foi distribuído em tubos cônicos estéreis, com tampa de rosca e volume de 50 ml, marca Corning ®, sendo armazenados no freezer à temperatura de -20ºC. Após serem descongelados, estes frascos permaneciam em geladeira à temperatura de 4-8ºC.

CULTURA DE CÉLULAS

A cultura de células, mantida através de passagens periódicas e utilizada em todas as etapas da produção e titulação de vírus rábico, da manutenção das culturas celulares e das células empregadas no teste para dosagem dos anticorpos, foi da linhagem celular BHK_{21} $Clone_{13}$ (Baby Hamster Kidney), proveniente da Seção de Raiva II do Instituto Butantan pertencente à Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

As células obtidas junto ao Instituto Butantan foram transportadas em meio de cultura de Eagle, contendo 10% de soro fetal bovino sem adição de antibióticos, e encontravam-se na passagem 54. No laboratório, foram realizadas 5 passagens sucessivas com objetivo de adaptar as células ao novo meio de cultura, ao soro fetal bovino e à solução de ATV (associação de tripsina-versene). Este procedimento sempre é utilizado quando se trabalha com culturas celulares porque, na maioria das vezes tanto os meios de cultura quanto o soro fetal bovino, além de outros reagentes, são de diferentes procedências e a mudança de qualquer um desses produtos pode interferir no bom desenvolvimento das células, principalmente nas primeiras passagens.

As garrafas de células mantidas em estufa à temperatura de 37ºC, foram repicadas a cada três ou quatro dias para a manutenção das culturas e produção de vírus rábico de trabalho, utilizando-se frascos estéreis com tampa de rosca, volume de 70 ml e área de crescimento celular de 25 cm^2, marca Corning ®.

Todos os procedimentos realizados para a manutenção das culturas celulares foram efetuados na capela de fluxo laminar, utilizando materiais esterilizados como pipetas volumétricas de vidro, béquer de volumes variados, frascos para dispensar meio de cultura, gazes com algodão, recortes de papel de alumínio e álcool 70º iodado.

O meio de cultura do frasco de células foi desprezado para outro recipiente, tomando-se antes o cuidado de invertê-lo, de forma a que o tapete celular permanecesse em posição superior ao meio utilizado.

Foi adicionado pela parede do frasco, livre de células, aproximadamente 2,0 ml da solução de ATV estéril, previamente aquecida a 37ºC em banho-maria, para que a camada de células, ficasse imersa na solução, possibilitando a realização de movimentos circulares suaves por poucos segundos, desprezando o sobrenadante em seguida, tomando-se cuidados para manter a integridade das células.

Após essa etapa, foi adicionado 5,0 ml da solução de ATV, nas mesmas condições citadas anteriormente, deixando o frasco em repouso por um minuto a fim de permitir que a matriz protéica fosse degradada de modo a liberar as células. Logo após a solução foi retirada, desprezada com cuidado e o frasco submetido a batidas delicadas em sua parede com a finalidade de liberar as células.

A seguir, as células foram suspensas em meio de cultura de rotina, previamente aquecido a 37ºC em banho-maria, e transferidas para novos frascos, sendo colocadas em estufa a 37ºC sob observação diária mediante microscopia óptica, até que as mesmas cobrissem toda a superfície do frasco. Dessa forma, as células poderiam ser repicadas novamente ou utilizadas na produção de vírus rábico fixo cepa PV (Pasteur Virus) ou na realização da reação de soroneutralização.

SOLUÇÃO DE ATV (ASSOCIAÇÃO DE TRIPSINA-VERSENE)

A solução de ATV (associação de 0,2% tripsina e 0,025% versene) utilizada nas etapas de tripsinização das células de linhagem BHK_{21} $Clone_{13}$, foram produzidas no Instituto Adolfo Lutz pertencente à Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

A solução foi distribuída em tubos cônicos estéreis, com tampa de rosca e volume de 50 ml, marca Corning ®, sendo armazenados no freezer à temperatura de -20ºC. Após o descongelamento, o tubo a ser utilizado permanecia em geladeira à temperatura de 4-8ºC.

CONTAGEM CELULAR

As células foram contadas em câmara de Neubauer, após a etapa de tripsinização. Para tanto, as células foram então suspensas em volume conhecido de meio de cultura; deste volume, era retirada uma alíquota de 0,5 ml a qual era adicionada 0,5 ml da solução de azul de Tripan (0,4%), marca Sigma ®.

Para a contagem, utilizaram-se os quatro quadriláteros grandes (1mm x 1mm x 0,1mm). Em seguida calculava-se o número médio de células existentes, multiplicando-se este valor pelo fator de diluição (igual a 2) e pelo fator de conversão da câmara de Neubauer (igual a 10.000) obtendo-se como resultado o número de células por mililitro.

$$nº\ de\ células / ml = \frac{nº\ de\ células\ vivas\ contadas}{nº\ de\ quadriláteros\ contados} \times fator\ de\ diluição \times fator\ de\ conversão\ da\ câmara$$

O número total de células foi obtido através da multiplicação do nº de células/ml pelo volume de meio em que as células foram ressuspendidas.

Para a reação de soroneutralização é necessária uma suspensão a $1x10^6$ células/ml.

CAPELA DE FLUXO LAMINAR

A capela de fluxo laminar vertical, marca VECO ®, com filtros absolutos HEPA (High Eficiency Particle) para partículas de 0,3 μ, foi

utilizada durante os procedimentos de manutenção das culturas celulares, da produção de vírus rábico, e em todas as demais etapas da reação de soroneutralização.

MICROSCÓPIO ÓPTICO

Foi utilizado o microscópio invertido, marca Carl Zeiss Jena ®, com ocular A 12,5 x e objetiva semiplan 3,2/0,10 e 160/- para observação dos frascos de cultura celular, contagem das células em câmara de Neubauer e na fase final da reação de soroneutralização, quando da observação das células em suspensão nos orifícios das microplacas.

MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA

Foi utilizado o microscópio de fluorescência, marca Carl Zeiss ®, de epi-iluminação, com ocular CPL W 10 x /18 e objetiva S 10/0,22 para a leitura das microplacas empregadas nas reações de soroneutralização.

PIPETAS

Para a realização da reação de soroneutralização foram utilizadas pipetas multicanais de 8 e 12 canais, com volume variável de 20 a 200 microlitros, marca Brinkmann Transferpette ®, e ponteiras estéreis para a distribuição do meio de cultura nas microplacas de soroneutralização, para as diluições dos soros dos animais e para adicionar a suspensão do vírus rábico de trabalho, a suspensão de células e o conjugado anti-rábico.

Do mesmo modo, foram utilizadas pipetas de volume variável de 200 e de 1.000 microlitros, marca Gilson ®, e ponteiras estéreis, para adicionar nas microplacas os soros testes e para titular o soro padrão e a suspensão de vírus rábico de trabalho.

REAÇÃO DE SORONEUTRALIZAÇÃO

MICROPLACAS

Foram utilizadas, em todas as etapas das reações de soroneutralização, microplacas estéreis, de fundo chato, com tampa e 96 orifícios, volume de 0,37 ml, área de crescimento celular de 0,32 cm^2, da marca Corning ®.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Figura 1 Representação esquemática da microplaca Corning ® utilizada para as reações de soroneutralização.

VÍRUS RÁBICO

Utilizou-se nas reações de soroneutralização o vírus rábico fixo cepa PV (Pasteur Virus), lote 16/95, produzido em cultura de células VERO (rim de macaco-verde), proveniente da Seção de Raiva II do Instituto Butantan, mantido em freezer à temperatura de -80ºC.

O frasco contendo a semente de vírus foi transportado em isopor contendo gelo seco, sendo armazenado no laboratório em freezer à temperatura de -80ºC.

A semente do vírus PV foi descongelada, distribuída em tubos cônicos estéreis com tampa de rosca e capacidade de 15 ml, em banho de gelo; sendo realizadas 8 passagens em células BHK_{21} $Clone_{13}$, procedendo-se então à titulação de cada passagem.

Para a produção da suspensão viral, foram utilizadas células BHK_{21} Clone $_{13}$, na concentração de 5 x 10^5 células/ml, cultivadas em garrafas e mantidas à temperatura de 37ºC em estufa, por 48 horas. A seguir foram infectadas com 1,0 ml da suspensão do vírus semente por uma hora à temperatura de 37ºC, quando 9,0 ml de meio de cultura foram adicionados por garrafa. Durante a replicação viral, o pH do meio de cultura foi mantido entre 7,4–7,6 através da adição de uma solução estéril de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) a 7,5%.

No 3º dia após a infecção, os sobrenadantes foram colhidos, centrifugados a 3.000 rpm durante 15 minutos em centrífuga refrigerada com temperatura entre 4-8ºC, distribuídos em alíquotas de 1,0 ml e mantidos à temperatura de –80ºC até o momento do uso.

A 8ª passagem do vírus em células BHK_{21} $Clone_{13}$, foi a que apresentou o título mais elevado, igual a 8. Os tubos cônicos contendo a suspensão viral da 8ª passagem, foram distribuídos em alíquotas de 1,0 ml em tubos “Eppendorf” estéreis, sendo então armazenados em freezer à temperatura de –80ºC. Para a execução das reações de soroneutralização, descongelava-se tubos “Eppendorfs” em quantidade suficiente para realizar o exame sorológico dos soros dos animais colhidos na mesma data.

TITULAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO

A titulação do vírus rábico, foi realizada em microplaca estéril, adicionando-se 100 microlitros de meio de cultura, nos orifícios “G1”, “F1”, “E1”, “D1”, “C1”, “B1” e “A1”, não sendo adicionado meio de cultura no orifício “H1”.

Nos orifícios “H1” e “G1”, foram adicionados 100 microlitros da suspensão de vírus rábico, sendo homogeneizado os 200 microlitros do orifício “G1”, obtendo-se desta forma diluição 1:2. Em seguida, foram transferidos 100 microlitros desta diluição para o orifício “F1”, sendo o mesmo procedimento realizado para os orifícios “F1”, “E1”, “D1”, “C1”, “B1” e “A1”, desprezando-se 100 microlitros do último orifício, de forma a obter-se as seguintes diluições 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128.

Em seguida, foram adicionados 50 microlitros de uma suspensão de 10^6 células BHK_{21} $Clone_{13}$ em todos os orifícios da microplaca. Finalmente a microplaca foi incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO_2, marca Forma Scientific ®, à temperatura de 37ºC durante 24 horas.

Após a incubação, o meio de cultura foi aspirado com extremo cuidado, e as células aderidas na microplaca foram fixadas adicionando-se, em todos os orifícios, 300 microlitros de uma solução de acetona em água a 80%, previamente estocada em freezer à temperatura de –20ºC, durante 15 minutos em banho de gelo.

A microplaca foi então esvaziada por inversão e seca à temperatura de 37ºC. As células foram coradas mediante a adição de 50 microlitros, em cada um dos orifícios da microplaca, do conjugado fluorescente anti-rábico diluído a 1:20, incubando-se por uma hora em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 à temperatura de 37ºC, quando então a microplaca foi lavada 3 vezes por imersão em solução tampão fosfatada (PBS), e em seguida, 3 vezes em água destilada.

A microplaca foi seca, adicionando-se a seguir 50 microlitros de glicerina tamponada pH 8,5 em todos os orifícios, em quantidade suficiente para cobrir as células. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência com aumento de 100 vezes.

Os resultados obtidos foram expressos na última diluição que apresentou 50% de diminuição da fluorescência nas células infectadas, quando comparado com o soro padrão. A 8ª passagem do vírus rábico apresentou o melhor resultado com título de trabalho igual a 8.

CONJUGADO ANTI-NUCLEOCAPSÍDEO RÁBICO

O conjugado utilizado na titulação do vírus e na reação de soroneutralização foi o anti-nucleocapsídeo rábico, o qual se apresentava na forma líquida concentrada de conjugado fluorescente, marca Diagnostics Pasteur ®, França, lote 6E022U, com prazo de validade até 15 de maio de 1998. A diluição utilizada foi de 1:20 em solução tampão fosfatos, pH 7,2 e adicionado de azul de Evans na diluição final de 1:2.000.

SOROS DOS ANIMAIS

Os soros armazenados em tubos “Eppendorf” e estocados no freezer à temperatura de -20ºC, foram inativados em banho-maria à temperatura de 56ºC, durante 30 minutos.

SORO PADRÃO ANTI-RÁBICO

O soro utilizado como padrão foi produzido no Instituto Vital Brasil, Rio de Janeiro, lote 960908, válido até setembro de 1999. Foi preparado a partir do soro de eqüídeos hiperimunizados com vacina anti-rábica e posteriormente desafiados com amostras de vírus rábico fixo.

Para determinação da potência deste soro em Unidades Internacionais por mililitro (UI/ml), foram realizadas cinco titulações pela técnica de soroneutralização em cultura celular (Favoretto et al., 1993) e em todas elas, titulou-se paralelamente o soro de referência internacional, fornecido pelo laboratório internacional de padrões biológicos, do Instituto Estatal de Soros da

Dinamarca (OMS, 1994), que apresentou os títulos de 750, 750, 750, 1.000 e 1.000.

Assim, o soro do Instituto Vital Brasil apresentou título de 8.000 enquanto o soro de referência título médio de 850. Sabendo-se que este último apresentava 30 UI/ml, ficou estabelecido que o soro padrão continha 282 UI/ml.

Em cada reação de soroneutralização, o soro produzido pelo Instituto Vital Brazil, foi utilizado como padrão, sempre empregando-se 2 diluições iniciais, 1:500 e 1:750. No orifício “H1” da primeira microplaca, foram adicionados 200 microlitros de meio de cultura, e nos orifícios “G1”, “F1”, “E1”, “D1”, “C1”, “B1” e “A1” 100 microlitros. Em seguida adicionou-se 50 microlitros do soro padrão, previamente diluído a 1:100 em meio de cultura, no orifício “H1”, de forma a obter-se diluição inicial de 1:500. O soro diluído foi homogeneizado transferindo-se 100 microlitros para o orifício “G1” de forma a obter-se a diluição 1:1.000. Este mesmo procedimento foi realizado para os orifícios “G1”, “F1”, “E1”, “D1”, “C1”, “B1” e “A1”, obtendo-se as seguintes diluições do soro padrão 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:8.000, 1:16.000, 1:32.000 e 1:64.000, desprezando-se dos orifícios “A1” 100 microlitros e do “H1” 50 microlitros para que todos os orifícios permanecessem com 100 microlitros do soro padrão diluído.

Na segunda microplaca, no orifício “H1” foram adicionados 200 microlitros de meio de cultura, e nos orifícios “G1”, “F1”, “E1”, “D1”, “C1”, “B1” e “A1” 100 microlitros. Em seguida, foi adicionado 50 microlitros do soro padrão previamente diluído a 1:100, no orifício “H1”, de forma a obter-se a diluição inicial de 1:500, desprezando-se 50 microlitros; em seguida, foram adicionados 100 microlitros de meio de cultura, para se obter a diluição inicial do soro padrão 1:750.

O soro diluído no orifício “H1” foi homogeneizado transferindo-se 100 microlitros para o orifício “G1” de forma a obter-se a diluição 1:1.500. Este mesmo procedimento foi realizado para os orifícios “G1”, “F1”, “E1”,

“D1”, “C1”, “B1” e “A1”, obtendo-se as seguintes diluições do soro padrão 1:750, 1:1.500, 1:3.000, 1:6.000, 1:12.000, 1:24.000, 1:48.000 e 1:96.000, desprezando-se dos orifício “A1” e “H1” 100 microlitros, para que todos os orifícios permanecessem com 100 microlitros do soro padrão diluído.

TESTE SIMPLIFICADO DA INIBIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA PARA DOSAGEM DOS ANTICORPOS ANTI-RÁBICOS NEUTRALIZANTES

Foi utilizado o teste simplificado da inibição da fluorescência (TSIF), em microplaca, para a pesquisa de anticorpos anti-rábicos nos soros dos animais (Favoretto et al., 1993). Os soros foram testados na razão 2 até a diluição final de 1:640.

Nos orifícios da microplaca foram adicionados inicialmente, 200 microlitros de meio de cultura, nas colunas “H2-H12” e 100 microlitros nas colunas “G2-G12”, “F2-F12”, “E2-E12”, “D2-D12”, “C2-C12”, “B2-B12” e “A2-A12”.

Nos orifícios “H2-H12” foram acrescentados 50 microlitros dos soros dos animais, obtendo-se uma diluição inicial igual a 1:5. Os soros foram homogeneizados e transferidos 100 microlitros para os orifícios “G2-G12” obtendo-se uma diluição de 1:10. Este mesmo procedimento foi repetido para os orifícios “F2-F12”, “E2-E12”, “D2-D12”, “C2-C12”, “B2-B12” e “A2-A12”, desprezando-se nesta última 100 microlitros, obtendo-se respectivamente diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Retornando aos orifícios “H2-H12”, desprezou-se 50 microlitros, para que todos os orifícios contivessem 100 microlitros dos soros diluídos.

Após a diluição dos soros testes e do soro padrão na microplaca, foram adicionados em todos os orifícios 50 microlitros da suspensão do vírus rábico, 8ª passagem em células BHK $_{21}$ Clone $_{13}$, diluída 1:8 em meio de cultura.

Como controle das reações, o vírus rábico de trabalho foi titulado novamente nas diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8. Para tanto, foram utilizados os orifícios “D12”, “C12”, “B12” e “A12” da microplaca: 100 microlitros da suspensão de vírus de trabalho foi adicionada no orifício “D12”; 50 microlitros nos orifícios “C12” e “B12”; e, nos orifícios “B12” e “A12” foram adicionados 50 microlitros de meio de cultura. O conteúdo do orifício “B12” foi homogeneizado transferindo-se 50 microlitros para o “A12”, repetindo-se o mesmo procedimento e desprezando-se 50 microlitros desta última diluição. Em seguida, foram adicionados no orifício “D12” 50 microlitros do meio de cultura, e nos orifícios “C12”, “B12” e “A12” 100 microlitros, de forma que o volume final completasse 150 microlitros.

A microplaca foi incubada à temperatura de 37ºC, em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 por um período de 60 minutos. Ao término, foram acrescentados 50 microlitros de uma suspensão de células $BHK_{21}C_{13}$, na concentração de $1x10^6$ células/ml em todos os orifícios, repetindo-se novamente a incubação nas mesmas condições anteriores por 24 horas.

Ao término deste período, o meio de cultura foi aspirado com extremo cuidado utilizando-se bomba a vácuo. As células aderidas na microplaca foram fixadas adicionando-se em todos os orifícios 300 microlitros de uma solução de acetona em água a 80%, previamente estocada em freezer à temperatura de -20º C, durante 15 minutos em banho com gelo. Em seguida, a microplaca foi esvaziada por inversão e seca à temperatura de 37ºC. As células foram coradas mediante a adição do conjugado fluorescente anti-rábico diluído a 1:20 em solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2 acrescido de Azul de Evans na concentração final de 1:2.000.

Em cada um dos orifícios da microplaca adicionou-se 50 microlitros do conjugado, incubando-se por 1 hora, à temperatura de 37ºC em estufa com atmosfera de 5% de CO_2, quando então a microplaca foi lavadas três vezes por imersão em solução salina tamponada com fosfatos e, em seguida, em água destilada por mais duas vezes.

A microplaca foi seca e em cada um dos orifícios adicionou-se 50 microlitros de glicerina tamponada pH 8,5.

As microplacas foram lidas em posição invertida em microscópio de fluorescência, de epi-iluminação, marca Carl Zeiss ®, sem “charriot”, com aumento de 100 vezes.

Os resultados foram expressos na diluição onde ocorreu decréscimo de 50% de infecção. A comparação dos resultados dos soros dos animais com o soro padrão utilizado serviu como base para obter os títulos em UI/ml. Através de regra de três, comparou-se os resultados obtidos com o soro padrão e o soro problema. Exemplificando: um soro com título 20, na prova na qual o soro padrão apresentava título 8.000, continha 0,71 UI/ml, calculado da seguinte forma:

8.000 .....282 UI/ml

20..... x UI/ml

$$x = \frac{282 \times 20}{8.000}$$

$$x = 0{,}71 UI / ml$$

De acordo com a WHO (1992), pessoas com títulos de no mínimo 0,5UI/ml são consideradas imunizadas, ou seja, demonstram soroconversão. Assim, para efeito deste experimento, adotou-se o mesmo critério para os primatas não humanos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a determinação do valor estimado pela curva do título de anticorpos anti-rábicos, nos meses em que os animais não foram manuseados, utilizou-se a fórmula da equação da reta com a união de dois pontos (Leithold, 1994), tendo sido empregada para os seguintes meses: em outubro e dezembro de 1995; março, maio, agosto, setembro, outubro e novembro de 1996; e, janeiro, fevereiro, março, abril e maio de 1997. Este método permitiu estimar, dia a dia, o título de anticorpos anti-rábicos de cada animal do experimento.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do coeficiente de variação de Pearson, e da distribuição t de Student, teste de duas médias independentes, para comparar os resultados dos diferentes grupos experimentais em relação ao início da resposta imune e à duração da imunidade após a primo vacinação e após os reforços aos 210 dias e revacinação aos 360 dias; fixou-se em 5% o valor do Z de alfa (Berquó, et al., 1980).

RESULTADOS

A partir da coleção de primatas não humanos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo foram selecionados 27 exemplares de macacos-prego (*Cebus apella*), sendo 6 fêmeas e 21 machos.

Os resultados obtidos ao longo do experimento encontram-se dispostos nas tabelas 1-6 e nas figuras 2-4.

A partir dos dados constantes nas tabelas 1-3, foram elaboradas as figuras 2-4, onde se apresenta a cinética dos anticorpos neutralizantes nos macacos-prego (*Cebus apella*), vacinados com a vacina anti-rábica VARCCL, imunizados com diferentes esquemas de vacinação e observados durante o período de 24 meses.

A tabela 1 e a figura 2 apresentam os títulos de anticorpos neutralizantes, obtidos na reação do TSIF, de macacos-prego do grupo I, vacinados com 3 doses da VARCCL, nos meses de junho, julho e agosto de 1995, com revacinação anual em junho de 1996.

Com base nesta tabela e na respectiva figura constata-se que por ocasião da 1ª dose da vacina (junho 1995), todos os animais do grupo (8/8) apresentavam títulos inferiores a 0,5 UI/ml; quando a 2ª dose da vacina foi aplicada, 30 dias após a primo vacinação, 62,5% (5/8) dos animais apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml (números 18, 19, 61, 100 e 101).

Aos 60 dias da primo vacinação e 30 dias após o reforço (julho 1995), 100% (8/8) dos animais apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml. Destaca-se que os títulos de anticorpos aumentaram nos animais de números 25, 34, 54, 61 e 101; permaneceram constantes nos de número 18 e 19; e diminuiu no animal de número 100. Vale ressaltar ainda que os títulos de anticorpos dos animais 25, 34 e 54 só alcançaram o nível satisfatório após o reforço

Tabela 1. Resposta imune humoral em macacos-prego (*Cebus apella*) imunizados com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, após a primo vacinação, duas doses de reforço a intervalos de 30 dias e revacinação anual com uma dose de vacina. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998.

animal	Jun/95(1)	Jul/95(2)	Ago/95(3)	set/95	nov/95	jan/96	fev/96	abr/96	Jun/96(4)	jul/96	dez/96	jun/97
18	0,35	0,53 *	0,53 **	1,06 ***	1,06	0,26	0,26	0,26	0,26	1,41 ****	0,26	0,18
19	0,18	0,53 *	0,53 **	0,53 ***	0,35	0,18	0,18	0,18	0,18	0,71 ****	0,18	0,18
25	0,18	0,26 *	0,53 **	4,23 ***	0,53	0,53	0,26	0,26	0,26	2,12 ****	2,12	0,71
34	0,18	0,26 *	0,71 **	0,53 ***	0,53	0,26	0,26	0,26	0,18	1,06 ****	0,35	0,18
54	0,18	0,26 *	1,06 **	1,06 ***	0,35	0,18	0,18	0,18	0,35	morreu		
61	0,18	0,71 *	1,06 **	0,71 ***	0,26	0,26	0,35	0,26	0,18	0,53 ****	0,35	0,18
100	0,18	0,71 *	0,53 **	0,71 ***	0,53	0,18	0,35	0,35	0,18	4,23 ****	0,71	0.35
101	0,18	0,71 *	1,41 **	1,41 ***	0,53	0,18	0,26	0,26	0,26	2,12 ****	0,71	0,26

(1) 1ª dose de VARCCL

(2) 2ª dose de VARCCL

(3) 3ª dose de VARCCL

(4) Reforço anual da VARCCL

* Título 30 dias após a primo vacinação

** Título 30 dias após a segunda vacinação e 60 dias pós primo vacinação

*** Título 30 dias após a terceira vacinação e 90 dias pós primo vacinação

**** Título 30 dias após o reforço anual e 395 dias após primo vacinação

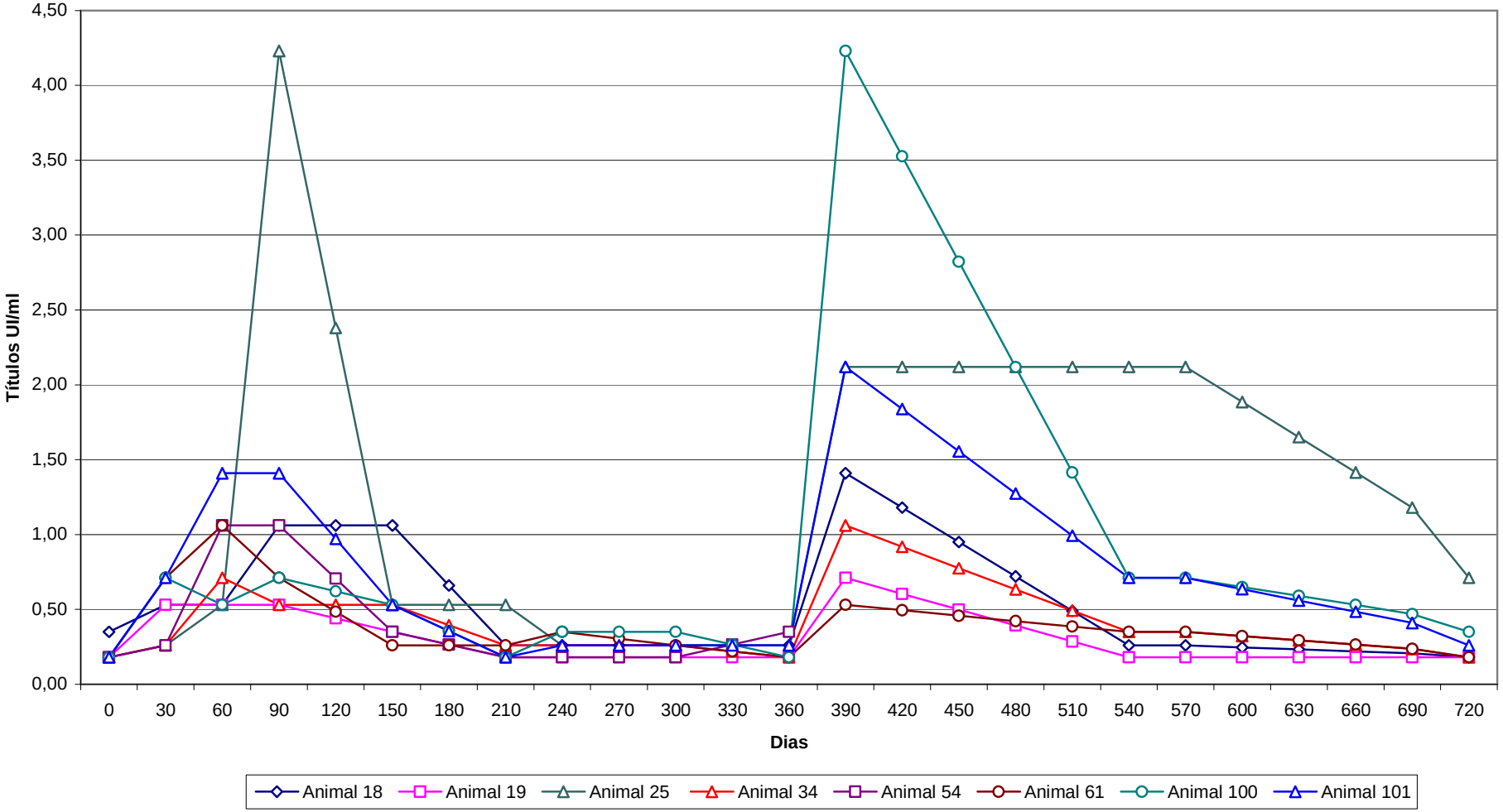

Figura 2 - Cinética da resposta imune humoral de macacos-prego (*Cebus apella*) primo vacinados contra a raiva com VARCCL, dois reforços a intervalos de 30 dias e revacinação anual com uma dose. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998.

vacinal. Nesta oportunidade foi aplicada a 3ª dose da vacina (agosto 1995).

Aos 90 dias da primo vacinação e 30 dias após o último reforço (setembro 1995), 100% (8/8) dos animais apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml, constatando-se uma elevação do título nos animais de números 18, 25 e 100; permanecendo constante nos de números 19, 54 e 101, e, diminuindo nos de números 34 e 61.

Aos 150 dias da primo vacinação (novembro 1995), 62,5% (5/8) dos animais apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml, permanecendo o título constante nos animais de números 18 e 34, e diminuindo nos de números 25, 100 e 101; em contrapartida, 37,5% (3/8) não apresentaram título mínimo indicativo de soroconversão, animais de números 19, 54 e 61, apesar de aos 90 dias terem apresentado títulos superiores a esse limite.

Aos 210 dias da primo vacinação (janeiro 1996), 87,5% (7/8) dos animais apresentaram títulos inferiores a 0,5 UI/ml; apenas um dos animais (12,5%) manteve título maior que o mínimo preconizado, o número 25.

Aos 240 dias da primo vacinação (fevereiro 1996), 100% dos animais apresentaram títulos inferiores a 0,5 UI/ml, permanecendo nesta condição até aos 365 dias do início do experimento, oportunidade em que todos os exemplares foram submetidos a revacinação com uma dose vacinal (junho 1996). Os títulos obtidos 30 dias após, ou seja, 395 dias depois da primo vacinação (julho 1996), foram superiores ao limite mínimo indicativo de soroconversão, em 100% do grupo (7/7). O animal de número 54 veio a óbito antes de completar 30 dias pós revacinação.

Aos 545 dias do início do experimento (dezembro 1996), ou seja, seis meses após a dose de revacinação anual, 42,8% (3/7) apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml, animais de números 25, 100 e 101.

Ao término do experimento, portanto, aos 730 dias da primo vacinação (junho 1997), apenas o animal de número 25 (14,3%) apresentou título maior que o mínimo preconizado, enquanto que os restantes 85,7% (6/7), mostraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml.

Na tabela 2 e figura 3 são apresentados os títulos de anticorpos neutralizantes, obtidos na reação do TSIF, de macacos-prego do grupo II, vacinados com 2 doses mensais e 1 dose de reforço após 7 meses da primo vacinação, utilizando a vacina VARCCL, nos meses de junho e julho de 1995 e janeiro de 1996, e revacinação anual em junho de 1996.

Quando da aplicação da 1ª dose de vacina (junho 1995), 100% dos animais do grupo (9/9) apresentavam títulos inferiores a 0,5 UI/ml; após 30 dias da primo vacinação (julho 1995), 44,4% (4/9) dos animais apresentaram títulos acima do limite maior que o mínimo preconizado, os de números 11, 21, 43 e 98; enquanto que 55,5% (5/9) não apresentaram elevação dos títulos de anticorpos neutralizantes, animais de números 1, 10, 15, 26 e 30. Nesta oportunidade, foi aplicada a 2ª dose de reforço vacinal.

Aos 60 dias da primo vacinação e 30 dias pós reforço vacinal (agosto 1995), 55,5% (5/9) dos animais apresentaram títulos mínimo indicativo de soroconversão, os de números 1, 10, 15, 21 e 98; e, 44,4% (4/9) títulos inferiores a 0,5 UI/ml os de números 11, 26, 30 e 43. É importante destacar que aos 30 dias pós vacinação os animais de números 1, 10 e 15 apresentaram títulos inferiores ao limite mínimo indicativo de soroconversão; o título do número 21 permaneceu constante; enquanto, o número 98 sofreu elevação do título maior que o mínimo preconizado. Por outro lado, os animais 11 e 43 haviam apresentado títulos superiores a 0,5 UI/ml nessa mesma ocasião.

Aos 90 dias da primo vacinação (setembro 1995), 44,4% (4/9) dos animais apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml, tendo-se constatado aumento no título do número 10, permanecendo constante o do 21, e

Tabela 2. Resposta imune humoral em macacos-prego (*Cebus apella*) imunizados com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, após a primo vacinação, uma dose de reforço aos 30 dias, outra aos 210 dias e revacinação anual com uma dose de vacina. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998.

animal	Jun/95[(1)]	Jul/95[(2)]	ago/95	set/95	nov/95	Jan/96[(3)]	fev/96	abr/96	Jun/96[(4)]	jul/96	dez/96	jun/97
1	0,18	0,35 *	0,53 **	0,35	0,18	0,18	1,06 ***	1,06	1,41	1,06 ****	0,71	morreu
10	0,18	0,35 *	0,71 **	1,06	0,53	0,26	1,06 ***	0,71	0,53	0,53 ****	0,26	0,26
11	0,18	0,53 *	0,26 **	0,18	0,35	0,26	0,53 ***	0,35	0,18	1,06 ****	morreu	
15	0,18	0,26 *	0,71 **	0,53	0,71	0,18	0,71 ***	0,53	0,35	0,71 ****	0,26	0,18
21	0,18	0,53 *	0,53 **	0,53	0,53	0,26	0,71 ***	0,71	morreu			
26	0,18	0,26 *	0,26 **	0,26	0,35	0,18	0,18 ***	0,18	0,18	0,53 ****	0,26	0,26
30	0,18	0,26 *	0,18 **	0,18	0,18	0,18	0,26 ***	0,18	0,18	0,26 ****	0,18	0,18
43	0,35	0,71 *	0,18 **	0,18	0,18	0,18	0,26 ***	0,26	0,26	0,53 ****	0,53	0,26
98	0,18	0,71 *	1,06 **	0,53	0,26	0,18	1,06 ***	0,35	0,18	1,41 ****	0,35	0,26

(1) 1ª dose de VARCCL

(2) 2ª dose de VARCCL

(3) 3ª dose de VARCCL

(4) Reforço anual da VARCCL

* Título 30 dias após a primo vacinação

** Título 30 dias após a segunda vacinação e 60 dias pós primo vacinação

*** Título 30 dias após a terceira vacinação e 210 dias pós primo vacinação

**** Título 30 dias após o reforço anual e 395 dias após primo vacinação

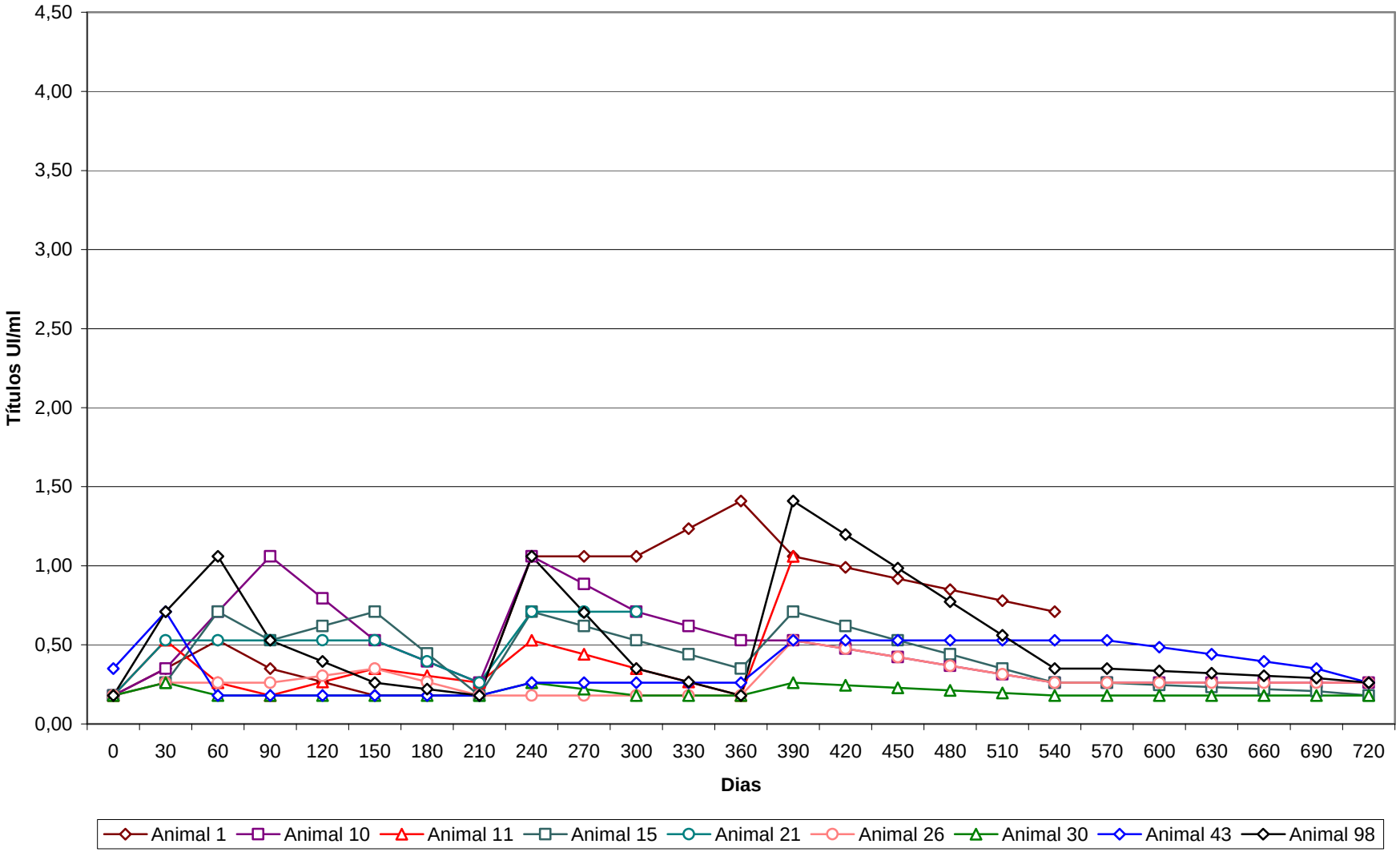

Figura 3 - Cinética da resposta imune humoral de macacos-prego (*Cebus apella*) primo vacinados contra a raiva com VARCCL, dois reforços a intervalos de 30 dias e revacinação anual com uma dose. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998.

diminuindo os dos números 15 e 98. Por outro lado, 55,5% (5/9) apresentaram títulos inferiores ao limite mínimo desejado, sendo que destes apenas o número 1 apresentara título superior a 0,50 UI/ml aos 60 dias.

Aos 150 dias da primo vacinação (novembro 1995), 33,3% (3/9) dos animais mantiveram títulos superiores a 0,5 UI/ml, havendo elevação no número 10 e diminuição no 15 e 21. Em contrapartida, 66,6% (6/9) registraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml, sendo que entre estes, o animal 98 apresentara título superior a 0,5 UI/ml aos 90 dias.

Aos 210 dias da primo vacinação (janeiro 1996), 100% (9/9) dos animais apresentavam títulos inferiores ao limite mínimo indicativo de soroconversão, embora 3 deles (animais 11, 15 e 21) apresentassem títulos de anticorpos superiores a 0,5 UI/ml aos 150 dias. Nesta data, todos os animais do grupo foram vacinados com uma 3ª dose de reforço semestral.

Aos 240 dias da primo vacinação (fevereiro 1996) e 30 dias após a 3ª dose de vacina, 66,6% (6/9) dos animais apresentavam títulos superiores a 0,5 UI/ml, números 1, 10, 11, 15 e 21; e, 33,3% (3/9) títulos inferiores a 0,5 UI/ml, os números 26, 30 e 43.

Aos 300 dias da primo vacinação (abril 1996), e 90 dias após a 3ª dose de vacina, 44,4% (4/9) dos animais apresentaram resposta, permanecendo constante nos de números 1 e 21 e diminuindo no 10 e no 15; 55,5% (5/9) registraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml, sendo que dentre estes, os animais 11 e 98 haviam apresentado títulos superiores a 0,5 UI/ml aos 240 dias.

Aos 365 dias do início do experimento (junho 1996), 25% (2/8) dos animais apresentaram títulos maiores que o mínimo preconizado, observando-se aumento no título do animal número 1 e diminuição no 10; em contrapartida, 75% (6/8) registraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml, oportunidade em

que os animais foram revacinados com uma dose vacinal, exceção feita ao animal de número 21 que veio a óbito antes da data prevista para a revacinação.

Aos 395 dias após a primo vacinação (julho 1996) e 30 dias pós revacinação anual, 87,5% (7/8) dos animais apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml, constatando-se elevação dos títulos nos números 11, 15, 26, 43 e 98, permanecendo constante no número 10 e diminuindo no 1; apenas um animal (12,5%) registrou título inferior a 0,5 UI/ml (número 30). Deve-se salientar que, neste animal não se detectou resposta anticórpica após as vacinações, enquanto que o animal de número 26 só apresentou resposta imune após a vacinação anual, ou seja um ano após o início do experimento.

Aos 545 dias do experimento (dezembro 1996), ou seja, seis meses após a dose de revacinação anual, apenas dois animais (28,5%) mantiveram títulos superiores a 0,5 UI/ml, permanecendo constante no número 43 e diminuindo no 1. O número 11 veio a óbito antes de completar 545 dias pós primo vacinação.

Ao término do experimento, aos 730 dias da primo vacinação (junho 1997), 100% (6/6) dos animais apresentaram títulos inferiores a 0,5 UI/ml, inclusive o de número 43 que havia apresentado título mínimo indicativo de soroconversão aos 545 dias pós primo vacinação. O animal número 1 veio a óbito antes de completar 730 dias.

Na tabela 3 e figura 4 constam os títulos de anticorpos neutralizantes, obtidos na reação do TSIF, de macacos-prego do grupo III, vacinados com 2 doses, com intervalo de 7 meses, com a vacina VARCCL, nos meses de junho de 1995 e janeiro de 1996, com revacinação anual em junho de 1996.

Na 1^{a} dose de vacina (junho 1995), 100% dos animais do grupo (10/10) apresentavam títulos menores que 0,5 UI/ml; aos 30 dias pós primo vacinação (julho 1995), metade dos animais apresentou títulos mínimo indicativo

Tabela 3. Resposta imune humoral em macacos-prego (*Cebus apella*) imunizados com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, após a primo vacinação, uma dose de reforço aos 210 dias e revacinação anual com uma dose de vacina. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998.

animal	Jun/95[(1)]	jul/95	ago/95	set/95	nov/95	Jan/96[(2)]	fev/96	abr/96	Jun/96[(3)]	jul/96	dez/96	jun/97
7	0,18	0,35 *	0,53	1,41	1,41	1,06	1,41 **	1,06	1,06	1,06 ***	morreu	
16	0,18	0,71 *	NR	0,18	0,35	0,18	1,06 **	0,71	0,18	1,06 ***	0,18	0,18
22	0,18	0,53 *	0,35	0,26	0,35	0,26	4,23 **	1,41	1,06	2,12 ***	1,41	1,41
38	0,18	0,26 *	0,18	0,26	0,35	0,18	1,41 **	0,53	0,18	1,41 ***	0,35	0,18
48	0,18	0,26 *	0,18	0,35	0,18	0,18	0,35 **	0,18	0,18	0,26 ***	0,18	0,18
59	0,18	0,53 *	0,26	0,35	0,26	0,18	4,23 **	0,53	0,18	1,06 ***	1,06	0,53
70	0,18	0,26 *	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18 **	0,18	0,18	0,18 ***	0,18	0,18
71	0,35	0,35 *	0,53	0,18	0,26	0,18	0,71 **	0,35	0,18	0,53 ***	0,26	0,18
73	0,18	0,53 *	0,35	0,18	0,18	0,18	1,06 **	0,18	0,18	2,12 ***	0,35	0,18
97	0,35	0,71 *	0,53	0,71	0,53	0,18	1,06 **	0,71	0,53	1,06 ***	0,71	0,53

(1) 1ª dose de VARCCL

(2) 2ª dose de VARCCL

(3) Reforço anual da VARCCL

* Título 30 dias após a primo vacinação

** Título 30 dias após a segunda vacinação e 210 dias após primo vacinação

*** Título 30 dias após o reforço anual e 395 dias após a primo vacinação

NR Não Realizado

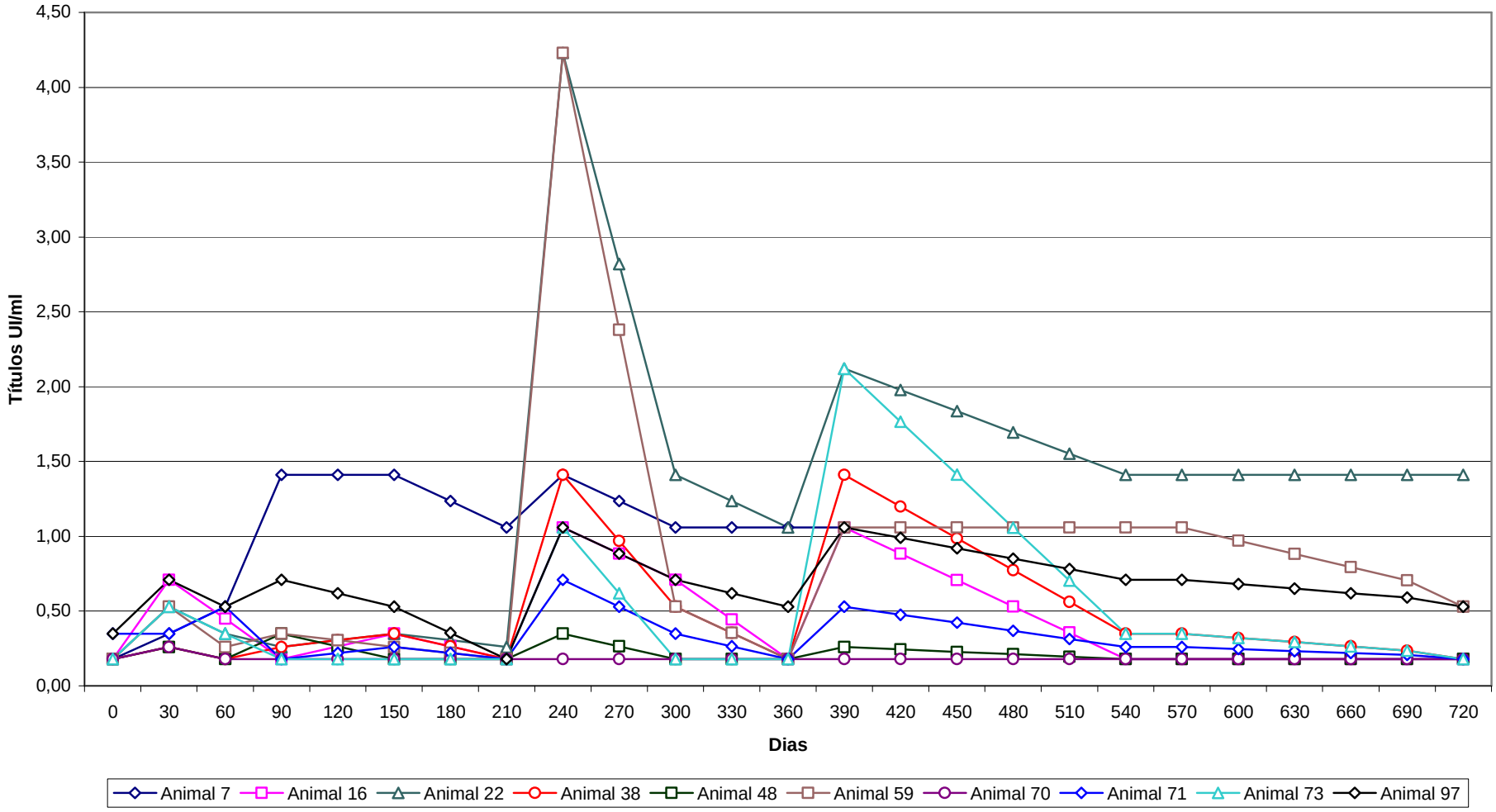

Figura 4 - Cinética da resposta imune humoral de macacos-prego (*Cebus apella*) primo vacinados contra a raiva com VARCCL, um reforço aos 210 dias, e revacinação anual com uma dose. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998.

de soroconversão, números 16, 22, 59, 73 e 97.

Aos 60 dias da primo vacinação (agosto 1995), 3 animais (33,3%) apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml, observando-se elevação desses títulos nos animais 7 e 71 e diminuição no 97; os demais (66,6%) não apresentaram títulos de anticorpos detectáveis, inclusive os animais 22, 59 e 73 que haviam apresentado títulos acima do limite mínimo desejado aos 30 dias. Nesta oportunidade, não foi possível colher amostra de sangue do animal 16.

Aos 90 dias da primo vacinação (setembro 1995), dois animais (20%) mantiveram a resposta imune humoral, observando-se elevação dos títulos naqueles de números 7 e 97; enquanto que 80% (8/10) registraram títulos inferiores ao limite mínimo desejado, sendo que o animal 71 apresentara título superior a 0,5 UI/ml aos 60 dias.

Aos 150 dias da primo vacinação (novembro 1995) os animais apresentaram o mesmo comportamento, exceção do número 97 cujo título sofreu ligeira diminuição, permanecendo, porém, acima do limite mínimo desejado.

Aos 210 dias da primo vacinação (janeiro 1996), apenas um animal (10%) o de número 7, apresentava resposta imune, embora menor do que a verificada aos 90 e 150 dias. A maioria dos animais (90%) não apresentou títulos satisfatórios, inclusive o animal 97 que havia apresentado título superior a 0,5 UI/ml aos 150 dias. Nesta ocasião, todos os animais do grupo receberam uma 2ª dose vacinal.

Aos 240 dias da primo vacinação (fevereiro 1996), 30 dias após o reforço vacinal, 80% (8/10) dos animais apresentaram títulos maiores que o mínimo preconizado, verificando-se aumento nos títulos dos animais 7, 16, 22, 38, 59, 71, 73 e 97; apenas dois (20%) registraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml,

aliás, estes animais (números 48 e 70) também não haviam respondido à 1ª dose vacinal.

Aos 300 dias da primo vacinação (abril 1996), e 90 dias após o reforço vacinal, 60% (6/10) dos animais apresentaram títulos superiores ao limite mínimo desejado, verificando-se diminuição nos animais 7, 16, 22, 38, 59 e 97; enquanto que 40% (4/10) registraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml, sendo que dentre estes encontravam-se os de números 71 e 73 que aos 240 dias haviam apresentado títulos de anticorpos detectáveis.

Aos 365 dias do início do experimento (junho 1996), três animais (30%) apresentaram títulos mínimo indicativo de soroconversão, permanecendo constante o do número 7 e diminuindo o do 22 e do 97; e, os outros 70% (7/10) registraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml, sendo que os animais 16, 38 e 59 haviam apresentado títulos acima do limite mínimo desejado aos 300 dias. Nesta data, todos os animais foram revacinados com uma dose.

Aos 395 dias após a primo vacinação (julho 1996), e 30 dias pós revacinação anual, 80% (8/10) dos animais apresentaram títulos maiores que o mínimo desejado, constatando-se elevação nos de números 16, 22, 38, 59, 71, 73 e 97 e permanecendo inalterado no 7; e, 20% (2/10) títulos inferiores a 0,5 UI/m, observados nos animais 48 e 70 que desde o início do experimento nunca apresentaram títulos de anticorpos detectáveis.

Aos 545 dias do início do experimento (dezembro 1996), ou seja, seis meses após a dose de revacinação anual, três animais (33,3%) apresentaram títulos satisfatórios, permanecendo constante no animal 59 e diminuindo no 22 e no 97; títulos inferiores a 0,5 UI/ml, foram encontrados em 66,6% (6/9), animais de números 16, 38, 71 e 73, os quais haviam apresentado títulos de anticorpos acima do limite mínimo desejado aos 395 dias. O animal de número 7 veio a óbito, no decorrer deste período.

Ao término do experimento, aos 730 dias da primo vacinação (junho 1997), 33,3% (3/9) dos animais apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml, permanecendo constante o do animal 22 e diminuindo o dos animais 59 e 97; títulos inferiores abaixo do limite mínimo desejado constataram-se em 66,6% (6/9), sendo que dentre estes encontravam-se os animais de número 48 e 70 que haviam mostrado comportamento anérgico durante o período experimental.

Ao observar as figuras de 2 a 4, constata-se que alguns animais após a primo vacinação apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes próximos do limite mínimo indicativo de soroconversão: no grupo I animal 19; no grupo II animais 1, 11 e 21; e, no grupo III os exemplares 22, 59, 71 e 73. Durante o reforço administrado aos 210 dias, somente o animal 11 do grupo II apresentou este comportamento. Na revacinação anual aos 360 dias do início do experimento, também foram observados animais com o mesmo tipo de resposta imune: no grupo I foi encontrado o animal 61; no grupo II os animais 10, 26 e 43; e, finalmente, no grupo III o exemplar 71.

As tabelas 4, 5 e 6 originaram-se da análise das figuras de 2 a 4, e representam o início e a duração da imunidade em dias, nos Grupos I, II e III de macacos-prego após a primo vacinação, bem como referem-se aos valores das médias, desvios-padrão e variância após primo vacinação, reforço aos 210 dias e revacinação anual aos 360 dias.

De acordo com a tabela 4, verifica-se que as médias correspondentes aos prazos para estabelecimento dos títulos maiores que o mínimo preconizado (desenvolvimento de imunidade), mantiveram-se muito próximas não havendo diferença estatisticamente significante entre os mesmos ($p>0,05$).

Com base na tabela 5 constata-se que os animais do Grupo I, apresentaram-se todos (100% - 8/8) com imunidade pós vacinal e a duração desta imunidade perdurou por 122±32 dias. Dos animais do Grupo II, 7

apresentaram imunidade pós vacinal (77,7% - 7/9) sendo que a duração média da imunidade foi de 54±57 dias, evidenciando grande variabilidade de resultados. O mesmo se verificou com o Grupo III, onde 7 animais responderam (70% - 7/10) e a média da duração da imunidade foi de 36±60 dias, quando se verificou a maior variabilidade de resultados entre os três grupos.

Com base nos resultados obtidos na primo vacinação, compararam-se as médias dos dias de imunidade conferidos pelos imunógenos, Assim, os animais do Grupo I apresentaram imunidade mais duradoura (122±32 dias) do que os dos Grupos II e III ($p<0,05$). Por outro lado, não houve diferença significante entre os resultados dos Grupos II e III ($p>0,05$)

A tabela 6, do mesmo modo apresenta a duração da imunidade após os reforços aos 210 dias (Grupos II e III) e revacinação aos 360 dias (Grupos I, II e III) onde se constata a não existência de diferença significante entre os resultados dos Grupos II e III ($p>0,05$) após os reforços aos 210 dias. Após a revacinação anual, aos 360 dias da primo vacinação, os animais do Grupo I apresentaram imunidade mais duradoura (183,6±120,6 dias) do que os dos Grupos II ($p<0,05$). Não houve, por outro lado, diferença significante entre os resultados dos Grupos I e III e, II e III ($p>0,05$).

Tabela 4. Macacos-prego (*Cebus apella*) submetidos a diferentes esquemas de imunização com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, segundo os grupos experimentais e o prazo (em dias) para o aparecimento da resposta imune humoral, após a vacinação inicial. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998.

Grupo I		Grupo II		Grupo III	
Animal	I. Imunid	Animal	I. Imunid	Animal	I. Imunid
18	25	1	55	7	55
19	28	10	43	16	19
25	57	11	28	22	28
34	46	15	46	38	
54	39	21	28	48	
61	19	26		59	28
100	19	30		70	
101	19	43	13	71	55
		98	19	73	28
				97	13
Parâmetros estatísticos					
Média	31,5	-	33,1	-	32,3
D.Padr.	14,3	-	15,3	-	16,5
Var	205,7	-	233,1	-	272,6

I. Imunid: Início da Imunidade

D.Padr: Desvio-Padrão

Var: Variância

Tabela 5. Macacos-prego (*Cebus apella*) submetidos a diferentes esquemas de imunização com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, segundo os grupos experimentais e a duração (em dias) da imunidade completada a vacinação inicial e respectivos reforços vacinais. Instituto Pasteur de São Paulo, 1998.

Grupo I		Grupo II		Grupo III	
Animal	dias	Animal	dias	Animal	dias
18	167	1	10	7	155
19	72	10	114	16	36
25	157	11	6	22	7
34	111	15	128	38	0
54	98	21	129	48	0
61	99	26	0	59	6
100	137	30	0	70	0
101	137	43	29	71	8
		98	78	73	7
				97	142
Parâmetros estatísticos					
Média	122,3	-	54,9	-	36,1
D.Padr.	32,6	-	57,0	-	60,2
Var	1060,8	-	3245,9	-	3627,9

D.Padr: Desvio-Padrão

Var: Variância

Tabela 6. Macacos-prego (*Cebus apella*) submetidos a diferentes esquemas de imunização com vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, segundo os grupos experimentais e a duração (em dias) da imunidade após doses de reforço aos 210 dias e revacinação anual aos 360. Instituto Pasteur, 1998.

Grupo I		Grupo II			Grupo III		
Animal	Rev.360	Animal	Ref.210	Rev.360	Animal	Ref.210	Rev.360
18	146	1	152		7	150	
19	71	10	188	45	16	103	115
25	360	11	13		22	148	360
34	137	15	82	88	38	87	115
54		21			48	0	0
61	28	26	0	19	59	93	349
100	283	30	0	0	70	0	0
101	260	43	0	173	71	47	19
		98	66	151	73	57	162
					97	179	360
Parâmetros estatísticos							
Média	183,6	-	62,6	79,3	-	86,4	164,4
D.Padr.	120,6	-	74,0	70,8	-	61,5	154,4
Var	14551,6	-	5474,6	5019,5	-	3786,7	23834,8

Ref.: Reforço

Rev.: Revacinação

I. Imunid: Início da Imunidade

D.Padr: Desvio-Padrão

Var: Variância

DISCUSSÃO

A vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes (Fuenzalida & Palacios) e indicada para cães e gatos, quando administrada em macacos-prego (*Cebus apella*) submetidos aos diferentes esquemas de imunização, apresentou ao longo do período experimental, um comportamento irregular na resposta imunológica destes animais, como pode ser observado pela análise das figuras de 2-4.

No grupo I (tabela 1 e figura 2), verificou-se em 100% dos primatas, nos primeiros 4 meses da vacinação, que as três doses de vacinas foram suficientes para promover uma elevação no título dos anticorpos superior ao limite mínimo desejado (maior ou igual a 0,5 UI/ml), porém, com imunidade efêmera e duração média de 122,3±32,6 dias. O protocolo de vacinação adotado, assemelhou-se ao esquema de imunização preventivo humano, com intervalos diferentes entre as doses. Deste modo, constata-se que os resultados obtidos foram satisfatórios, evidenciando-se, a resposta imune dos animais. Por ocasião da revacinação anual todos os animais (8/8) apresentavam títulos de anticorpos neutralizantes abaixo do limite de 0,5 UI/ml. Após a revacinação anual, ocorreu a indução da resposta imunológica secundária com elevação nos títulos, acima do limite indicativo de soroconversão e com duração média de 183,6±120,6 dias, em 100% (7/7) dos animais, sendo que dentre estes, três animais apresentaram duração dos níveis de anticorpos acima dos 260 dias.

A necessidade da aplicação de doses de reforço vacinal para estimular a resposta imune em primatas não humanos, foi observada por Andrade (1997) em sagüis (*Callithrix* sp.) imunizados com quatro doses de VARCCL, que apresentaram 100% de proteção aos 37 dias. O mesmo comportamento foi observado por Kessler et al. (1982) em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) submetidos a uma dose de reforço de VARCCL, aplicada 30 dias após a primo vacinação, a qual estimulou a resposta imune em 100% dos exemplares, com títulos de anticorpos iguais a 0,5 UI/ml ou superiores. Nota-se

que a resposta imune destes animais pode ser induzida com vacina de tecido cerebral quando se adotam esquemas com reforços periódicos ou revacinação anual. Assim Lavender (1973), em macacos Rhesus (*Macaca mulata*) imunizados com diferentes tipos de vacinas anti-rábicas de cultura de tecido constataram que 100% dos animais apresentavam aumento no título de anticorpos decorridos 30 dias do reforço vacinal. O mesmo resultado foi obtido por Taylor et al. (1995) em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) e chimpanzés (*Pan troglodites*), quando do reforço da vacina recombinante de vírus aviário (canarypox), contendo glicoproteína rábica ALVAC-RG, responsável pelo aumento significativo dos níveis de anticorpos.

Considerando o esquema adotado para o grupo I, verifica-se que a resposta imune, ao longo do tempo foi muito irregular. A duração dos níveis de anticorpos foi efêmera, pois, ao término da aplicação das três doses do imunógeno, a imunidade persistiu por apenas 60 dias, enquanto que seria mais desejável que permanecesse por um período maior, por exemplo 180 dias.

O comportamento do grupo II (tabela 2 e figura 3) foi semelhante ao do grupo I, pois após a vacinação, com duas doses iniciais de vacinas, observou-se que em 77,7% (7/9) dos animais a produção dos anticorpos foi superior ao limite mínimo indicativo de soroconversão. O reforço semestral, também, provocou uma resposta imunológica secundária, elevando os títulos de anticorpos acima do limite de 0,5 UI/ml, em 66,6% (6/9) dos animais.

Pelos resultados obtidos, percebe-se que apenas duas doses na primo vacinação não foram suficientes e que o reforço semestral, também, não foi capaz de induzir a resposta em todos os animais do grupo.

A revacinação anual, estimulou a resposta imune em 62,5% (5/8) dos macacos, atingindo níveis superiores ao limite mínimo desejado; embora dois animais estivessem com títulos superiores a 0,5 UI/ml, sendo que, os mesmos não apresentaram elevação da resposta imunológica e um outro animal não respondeu a qualquer estímulo vacinal.

O grupo III (tabela 3 e figura 4) apresentou um comportamento semelhante ao grupo II, após a primo vacinação com uma dose inicial de vacina: observou-se nos três primeiros meses uma elevação dos títulos de anticorpos superiores ao limite mínimo indicativo de soroconversão, em 70% (7/10) dos animais. Neste grupo, evidencia-se mais intensamente a necessidade de vacinar os animais com mais de uma dose, pois o nível de imunidade da população diminuiu em relação à população do grupo II, que havia recebido uma dose de reforço após a primo vacinação.

O reforço semestral, também provocou uma resposta imunológica secundária em 80% (8/10) dos animais, elevando os títulos dos anticorpos neutralizantes acima do limite de 0,5 UI/ml. Embora o comportamento dos animais frente ao reforço semestral tenha sido superior, em termos percentuais ao do grupo II; do ponto de vista estatístico, estes valores se equivaleram ($p>0,05$).

A revacinação anual do grupo III estimulou a resposta secundária em 70% (7/10) dos animais. Do mesmo modo que, no grupo II, a revacinação anual não foi suficiente para estimular a resposta imune de todo o grupo.

Com base nos resultados obtidos, constata-se que o esquema utilizado nos animais do grupo I, foi ligeiramente superior ao dos exemplares dos grupos II e III, no que se refere à resposta imune imediatamente pós vacinal. Ao longo do tempo, os macacos do grupo I apresentaram-se com imunidade efêmera; ainda que, com níveis mais elevados de anticorpos. Quando da revacinação anual, estes animais, em termos de população, responderam intensamente e atingiram 100%, com elevação dos títulos de anticorpos neutralizantes maiores que o mínimo preconizado, evidenciando a resposta anamnéstica.

Em se tratando de animais de difícil lide, esperar-se-ia uma resposta imune humoral mais prolongada, como já mencionado, no mínimo de 180 dias após a última dose vacinal, quando da primo vacinação.

Pode-se considerar alguns aspectos importantes relacionados ao trabalho experimental, durante os 24 meses de observação, ao analisar o conjunto de 27 macacos-prego. O sistema imune destes animais quando estimulado com a VARCCL, independentemente do esquema vacinal adotado, respondeu com a produção de anticorpos neutralizantes em 88,8% (24/27) dos espécimes. Após a vacinação inicial dos três grupos, 81,4% (22/27) apresentaram resposta imune; depois do reforço aos 210 dias nos grupos II e III 73,6% (14/19) dos animais apresentaram títulos maiores que o mínimo preconizado; e, finalmente após a revacinação anual nos grupos I, II e III, 76% (19/25) dos animais responderam com produção de anticorpos.

Apesar desta constatação, que a priori poderia indicar um bom desempenho do imunógeno utilizado, o tempo da duração dos níveis de anticorpos acima do limite mínimo desejado foi insatisfatório, pois após completada a vacinação inicial, 81,4% (22/27) dos exemplares apresentaram títulos mínimo indicativo de soroconversão por período igual ou superior a 67,9±62,4 dias.

A presença de animais não respondedores, ou por falta de estímulo antigênico ou por serem anérgicos, foi constatada durante o período experimental, já na fase de primo vacinação, após as doses de reforço aos 210 dias, bem como depois do reforço anual, em apenas 11,1% (3/27) dos exemplares, que pertenciam aos grupos II e III. Saliente-se ainda que, um animal do grupo II apresentou a resposta ao estímulo antigênico da vacina, somente, após o revacinação anual, ou seja, após a 4^{a} dose, podendo ser considerado animal mau respondedor.

A ausência de resposta imunológica após a vacinação anti-rábica utilizando diferentes tipos de vacinas, em primatas não humanos,

também foi observada por Sikes et al. (1971) em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) imunizados com vacina anti-rábica de cérebros de camundongos lactentes; Lawson et al. (1976) com macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) com uma vacina anti-rábica de vírus vivo modificado, cepa ERA, administrada pela via oral; Blancou et al. (1979) em primatas não humanos imunizados com vacina anti-rábica de cultura celular, inativada, adicionada de adjuvante (hidróxido de alumínio), administrada por via subcutânea; Rupprecht et al. (1992) em chimpanzés (*Pan troglodytes*) imunizados oralmente com vacina recombinante de glicoproteína do vírus rábico e vaccinia; Cabrera et al. (1991) em macacos-prego (*Cebus apella*) imunizados com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios; e, Andrade (1997) em sagüis (*Callithrix* sp.) imunizados com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, por via subcutânea.

De acordo com estes aspectos, evidencia-se que os primatas não humanos, frente a vacinas anti-rábicas, apresentam respostas variáveis; na dependência de fatores como tipo de imunógeno, esquemas de vacinação e, fundamentalmente, espécies de macacos consideradas nos experimentos.

A imunização anti-rábica em primatas não humanos é, também, realizada com a finalidade de estudar diferentes tipos de vacinas anti-rábicas de uso humano, esquemas de tratamento pré ou pós-exposição ao vírus rábico, produção de interferon e outros. Em relação à medicina veterinária, os trabalhos que estudam a imunidade humoral e celular dos primatas não humanos são escassos, e por esta razão as análises comparativas tornam-se difíceis.

Sikes et al. (1971), ao estudarem o efeito protetor das vacinas anti-rábicas em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), desafiados com vírus selvagem, 30 dias após a vacinação, observados durante 3 meses, verificaram que 80% (4/5) dos macacos imunizados com uma dose da VARCCL, apresentaram títulos de anticorpos, enquanto que 20% (1/5) não apresentaram resposta imunológica durante todo o experimento. Este animais apresentaram os menores níveis de anticorpos neutralizantes quando comparados com grupos

vacinados com outros tipos de imunógenos. Os resultados destes autores demonstram que os animais foram capazes de responder ao imunógeno; porém, com títulos protetores de pouca intensidade, o que leva a crer que a proteção ao longo do tempo, também deveria ser efêmera, o que poderia ter sido observado caso os mesmos tivessem sido acompanhados por um prazo maior. Nesse experimento, observou-se ainda, um macaco anérgico, fato que pode ter tido origem em inúmeros fatores, dentre os quais se inclui a dificuldade de resposta imune diante de vacinas com poder imunogênico débil.

No experimento de Haigh e Field (1981) com três macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp), imunizados com uma dose de VARCCL, um ano depois os títulos de anticorpos anti-rábicos haviam diminuído drasticamente. Apesar do número reduzido de animais, constata-se que a VARCCL não foi capaz de propiciar título maior que o mínimo preconizado de longa duração.

Kessler et al. (1982) observaram, em fêmeas adultas de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), primo vacinadas com VARCCL, indicada para cães e gatos, a resposta imune em 100% dos exemplares, somente depois do reforço aplicado 30 dias após a primo vacinação. Estes resultados, também permitem constatar que os primatas não humanos, de modo geral, podem ser bons respondedores à vacinação anti-rábica; contudo, mais uma vez evidencia-se a necessidade da aplicação de doses de reforço para aumentar a resposta imune da população. Como os animais foram observados por apenas 60 dias, não há condições de predizer a duração dos níveis de anticorpos ao longo do tempo.

Cabrera et al. (1991) verificaram que uma única dose de VARCCL, indicada para cães, quando administrada em macacos-prego não induziu a produção de anticorpos detectáveis, enquanto que em primatas do gênero *Callithrix*, 57% dos animais apresentaram soroconversão, aos 14 dias, e 100%, aos 60 dias, o que demonstra a variabilidade de resultados passíveis de serem encontrados quando da realização destes estudos. No trabalho em apreço não há maiores informações sobre a via de administração das vacinas, o que poderia permitir a comparação dos experimentos. De qualquer modo,

considerando macacos-prego, os resultados obtidos na presente pesquisa foram superiores, quando 81,4% (22/27) dos exemplares responderam à primeira dose vacinal.

Andrade (1997) utilizou 30 sagüis (*Callithrix* sp.) divididos em 3 grupos experimentais com 6 indivíduos, imunizados com VARCCL, por via subcutânea, de uso veterinário. A vacina foi administrada em 3 grupos no seguinte esquema: dose única, duas doses (uma dose e reforço aos 28 dias) e quatro doses (três doses em dias alternados e reforço aos 30 dias). Verificou-se que os grupos experimentais vacinados com dose única e duas doses, apresentaram respectivamente 16,6% e 33,3% dos animais com sorologia positiva, enquanto que o grupo vacinado com quatro doses apresentou 100%, aos 37 dias. Com base neste experimento, reforça-se a necessidade de, no mínimo, três doses de vacinas, para que se desenvolva soroconversão no âmbito populacional.

Estes resultados, em relação à vacina inativada, aproximam-se dos obtidos no presente experimento, evidenciando baixo poder imunogênico desses antígenos de um lado, ou a dificuldade de resposta do sistema biológico particular estudado. Considerando que o objetivo de uma vacina anti-rábica é estimular a produção de anticorpos neutralizantes nas espécies alvo (Germano et al., 1990), em relação à VARCCL existem relatos que comprovam, em humanos e animais, que este imunógeno não induz a produção de anticorpos neutralizantes (Chanthavanich et al., 1987; Zanetti et al., 1995; Eng et al., 1994; Almeida et al., 1997). Deve-se salientar contudo, que a VARCCL tem sido submetida a sucessivas melhorias técnicas ao longo dos anos, destacando-se entre elas o aumento da massa antigênica, com a finalidade de elevar o poder imunogênico e a adição de substâncias adjuvantes, para assegurar melhor qualidade de resposta imune (Germano et al., 1990).

Díaz et al. (1989) imunizaram camundongos com VARCCL experimentais trivalente, bivalentes e monovalente, produzidas com três cepas de vírus fixo (CVS, 91 e 51). Estes autores observaram que a vacina trivalente foi a que induziu a melhor resposta imune, atingindo no 7º dia a

produção máxima de anticorpos, mas diminuindo gradativamente até o 70º dia, sendo que esta resposta foi superior à das demais vacinas. Percebe-se desse modo que, o estímulo antigênico induzido pelas vacinas experimentais, não foi suficiente para que os títulos de anticorpos dos camundongos se mantivessem em patamares elevados, pois, no 30º dia, foi observado uma considerável diminuição nos valores dos títulos, reforçando assim a necessidade da aplicação de reforços vacinais.

Na população experimental do presente estudo foram encontrados animais anérgicos e maus respondedores após a vacinação tal como referido na literatura, onde se constatou ausência de resposta imune após a aplicação da VARCCL em humanos e outras espécies animais. Chanthavanich et al. (1987) ao empregarem este imunógeno, suspensão a 2%, produzida na Tailândia, e administrada em pacientes que tiveram contato com animais suspeitos, observaram que 13% não apresentaram qualquer resposta imunológica, com títulos abaixo de 0,1 UI/ml, durante o período de observação; ao final de 3 meses, 86,6% (13/15) dos pacientes apresentaram-se soro negativos ao teste. Zanetti et al. (1995) realizaram um estudo sobre imunização anti-rábica pré-exposição em humanos, utilizando a VARCCL e observaram que 19,5% (50/256) não responderam com produção de anticorpos neutralizantes. Eng et al. (1994) estudaram a imunogenicidade de vacinas anti-rábicas utilizadas na epizootia da raiva urbana no México, observando que as VARCCL eram imunógenos pobres e que apenas 1/3 dos cães imunizados com vacina de tecido cerebral apresentaram anticorpos em 5 semanas.

Almeida et al. (1997) estudaram a resposta imune humoral em cães vacinados contra a raiva com a VARCCL utilizadas no Brasil e observaram que no grupo dos animais primo vacinados, apenas 27,6% (8/29) apresentaram anticorpos neutralizantes, 30 dias após a vacinação. A vacina anti-rábica não conferiu imunidade prolongada aos animais, pois a maioria dos vacinados com uma ou mais doses de vacina, não apresentava títulos de anticorpos iguais a 0,5 UI/ml, 12 meses após a vacinação, mas quando submetidos à revacinação anual, os cães, em sua maioria, responderam ao

estímulo vacinal, 30 dias após o reforço. O número de doses aplicadas nos cães interferiram com a resposta imune humoral, pois os animais imunizados nos anos anteriores, com mais de três doses, responderam melhor à vacinação, 81,9% (59/72).

Com base nos trabalhos mencionados constata-se que os primatas não humanos, de modo geral, podem ser considerados bons respondedores aos imunógenos rábicos. As dificuldades maiores de resposta, contudo, permanecem quando os animais são vacinados com imunógenos preparados em tecido nervoso de camundongo a partir de vírus inativado. Mesmo adicionadas com adjuvantes, nem sempre os resultados são satisfatórios. Em relação às vacinas modernas, preparadas a partir de frações proteicas virais, os resultados são promissores, embora alguns deles, insatisfatórios, possam ter sido determinados pelo tipo de via de administração adotado.

De qualquer modo, os trabalhos referidos apresentam grande variação nos delineamentos experimentais, seja em relação às espécies de primatas utilizados como sistema biológico, seja no que se refere aos esquemas de imunização. Por outro lado, há uma diversidade muito grande de tipos de imunógenos.

Nestas circunstâncias, torna-se difícil a comparabilidade de resultados entre estas pesquisas e, entre elas e os resultados obtidos neste experimento. Mesmo assim, é possível constatar que os resultados dos três grupos experimentais não se distanciam do perfil de comportamento observado nas referidas pesquisas. Evidencia-se portanto, que a VARCCL para produzir o efeito desejado necessita de repetidas doses e a intervalos curtos de tempo, o que determina dificuldades de ordem técnica quanto à sua utilização na prática dos serviços que mantêm macacos-prego em cativeiro. O esquema ideal a ser empregado na imunização destes animais deve preconizar a administração de três doses aos 0, 30 e 60 dias, reforço aos 210 e revacinação anual aos 360 dias, e posteriormente a cada 6 meses. Para certificar-se da imunidade, análises sorológicas deverão ser efetuadas periodicamente. Este esquema é o resultado

da fusão do grupo I com os grupos II e III, onde o reforço vacinal aos 210 dias era preconizado.

Os primatas não humanos apresentam uma resposta imune de difícil avaliação após a vacinação contra agentes infecciosos, uma vez que o comportamento do sistema imunológico depende das características do imunógeno, da espécie de primata utilizado, bem como do número de animais disponíveis nos diferentes ensaios.

A relação custo-benefício, da imunização anti-rábica de macacos-prego mantidos em cativeiro, com uma vacina produzida em cérebros de camundongos lactentes, deverá ser analisada com base: no grau de imunidade que irá conferir aos animais; no risco da ocorrência de acidentes com veterinários e tratadores e dos próprios animais durante os procedimentos de contenção para a vacinação; e, no dispêndio com anestésicos para sedação e imobilização dos animais.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente experimento permitem as seguintes conclusões:

1. Os macacos-prego, independentemente do esquema vacinal preconizado, responderam com produção de anticorpos neutralizantes, iguais ou superiores a 0,5 UI/ml, quando completada a da vacinação inicial, com a VARCCL de uso veterinário, na proporção de 81,4%; quando da revacinação anual a proporção atingiu 76,0%.

2. Os animais do grupo I, após vacinação com 3 doses da VARCCL, a intervalos de 30 dias, apresentaram-se com títulos maiores que o mínimo preconizado, em média por 122±32 dias, estando o verdadeiro valor desta média, para uma estimativa por intervalo, fixada em 95%, contido entre 95 e 150 dias; após a revacinação anual, a duração média da resposta imune humoral atingiu 184±121 dias, estando o verdadeiro valor desta média, para o mesmo tipo de estimativa, contido entre 72 e 292 dias.

3. Os animais do grupo I, apresentaram melhor desempenho em relação ao período da resposta imune humoral (em dias), quando da vacinação inicial, do que aqueles dos demais grupos ($p<0,05$); no que concerne à revacinação anual, o desempenho foi superior, apenas aos do grupo II ($p<0,05$).

4. A VARCCL foi capaz de induzir resposta imune nos macacos-prego, inclusive do tipo anamnéstica, porém a duração da soroconversão foi efêmera, independentemente do esquema vacinal preconizado.

5. A VARCCL não constitui imunógeno apropriado para ser utilizado na rotina de imunização de macacos-prego, animais de difícil lide, mantidos em cativeiro.

REFERÊNCIAS [1]

AARON, E.; KAMEI, I.; BAYER, E.V.; EMMONS, R.W.; CHIN, J. Probable vaccine-induced rabies in a pet marmoset, California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 24*:99, 1975.

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

ACHA, P.N. & ARAMBULO, P.V. Rabies in the tropics: history and curret status. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.343-59.

ADDY, P.A.K. Epidemiology of rabies in Ghana. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.497-515.

AHUJA, S.; TRIPATHI, K.K.; SAHA, S.M.; SAXENA, S.N. Epidemiology of rabies in India. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.571-82.

ALMEIDA, L.P.; FRANCIS, D.G.; LOPES, E.V. Raiva; aspectos epidemiológicos das agressões por animais e procura ao serviço anti-rábico humano em Araguari, Minas Gerais. *R. Cent. Cienc. Bioméd. Univ. Fed. Uberlândia*, *2*:71-6, 1986.

ALMEIDA, M.F.; AGUIAR, E.A.C.; MARTORELLI, L.A.F.; PRESOTTO, D.; BRANDÃO, M.M.; PEREIRA, O.A.C. Resposta imune humoral de cães à vacina inativada, de cérebros de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. *Rev. Saúde Pública, 31*:502-7, 1997.

[1] De acordo com:

NORONHA, D.P. & ANDRADE, M.T.D. Norma de referências bibliográficas aplicadas à Saúde Pública. 2ª ed. São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação/FSP-USP, 1990. (Série Orientação Bibliográfica, 2).

ANDERS, W. Obscure disease related to african monkeys. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 16*:301-2, 1967.

ANDRADE, M.C.R. Avaliação da resposta imunológica produzida por vacinas anti-rábicas em primatas não humanos (*Callitrichidae*). Rio de Janeiro, 1997. (Dissertação de Mestrado Instituto Oswaldo Cruz). 128 p.

[Anonymous] Disease from monkeys *Br. Med. J.*, *4*:758-9, 1967.

BAER, G.M.; SHADDOCK, J.H.; WILLIAMS, L.W. Prolonging morbidity in rabid dogs by intrathecal injection of attenuated rabies vaccine. *Infect. Immun.*, *12*:98-103, 1975.

BAER, G.M.; SHADDOCK, J.H.; MOORE, S.A.; YAGER, P.A.; BARON, S.S.; LEVY, H.B. Successful prophylaxis agaisnt rabies in mice and Rhesus monkeys: the interferon system and vaccine. *J. Infect. Dis.*, *136*:286-91, 1977.

BAER, G.M.; MOORE, S.A.; SHADDOCK, J.H.; LEVY, H.B. An effective rabies treatment in exposed monkeys: a single dose of interferon inducer and vaccine. *Bull. World Health Organ.*, *57*:807-13, 1979.

BAER, G.M. Animal models in the pathogenesis and treatment of rabies. *Rev.Infect.Dis., 10*(Suppl. 4):s739-s750, 1988.

BANERJI, S.C.; KISHORE, B.; GUPTA,. R.D.; MAHESHWARI, B.B.. Animal bite. *J. Indian Med. Assoc.*, *62*:173-5, 1974.

BARTH, R.; GRUSCHKAU, H.; BIJOK, U.; HILFENHAUS, J.; HINZ, J.; MILCKE, L.; MOSER, H.; JAEGER, O.; RONNEBERGER, H.; WEINMANN, E. A new inactivated tissue culture rabies vaccine for use in man. Evaluation of PCEC-vaccine by laboratory tests. *J. Biol. Stand.*, *12*:29-46, 1984.

BEKTEMIROVA, M.S.; PILLE, E.R.; MATEVOSYAN, S.H.; NAGIEVA, F.G. Rabies vaccine prepared from the virus grown in japanese quail embryo cell cultures. *Acta Virol.*, *27*:59-64, 1983.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. Bioestatística. São Paulo, E.P.U. 1980. (Coleção Ciências Médicas).

BINGHAM, J.; FOGGIN, C.M.; GERBER, H.; HILL, F.W.G.; KAPELLER, A.; KING, A.A.; PERRY, B.D.; WANDELER, A.I. Pathogenicity of SAD rabies vaccine given orally in chacma baboons (*Papio ursinus*). *Vet. Rec.*, *131*:55-6, 1992.

BLANCOU, J.; AUBERT, M.F.A.; ANDRAL, L. Immunité humorale après vaccination contre la rage. *Bull.Acad.Vét.France, 52*:491-7, 1979.

BOULGER, L.R. Natural rabies in a laboratory monkey. *Lancet, 1*:941-3, 1966.

BRACK, M. *Agents transmissibles from simians to man.* New York, Springer-Verlag, 1987.

CABRERA, M.A.A.; FIGUEIREDO, M.J.; SILVA, W.C.; FERRER, D.; TEIXEIRA, R.H.; CAVALHEIRO, M.L.J.; ANDRADE, M.C.R.; FERNANDES, R.C.; MOURA, W.C. Antibody response to a inactivated rabies vaccine in some species of Brazilian monkeys. In: World Veterinary Congress, 24th, Rio de Janeiro, 1991. *Abstracts*. p.322.

CHANTHAVANICH, P.; SUNTHARASAMAI, P.; WARREL, M.J.; VIRAVAN, C.; LOOAREESUWAN, S.; SUPANARANOND, W.; KARBWANG, J.; WARREL, D. A.; PHILLIPS, R.E.; SINHASENI, A.; BOONYARATAPHAN, P.; SUREAU, P. Antibody response to suckling mouse brain rabies vaccines for post exposure treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 81*:260-3, 1987.

COMITE DE EXPERTOS DE LA OMS EN PATRONES BIOLOGICOS, Ginebra, 1993. 44º informe. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1994. (OMS – Série de Informes Técnicos, 848)

DEMBERT, M.L.; LAWRENCE, W.B.; WEINBERG, W.G.; GRANGER, D.D., SANDERSON, R.D.; GARST, P.D.; EIGHMY, J.J.; WELLS, T.E. Epidemiology of human rabies post-exposure prophylaxis at the US Naval Facility, Subic Bay, Philipines. *Am. J. Public Health*, *75*:1440-1, 1985.

DIAS, P.T.; NÓVOA, A.M.; CLIFF, J.L. Rabies in Mozambique. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.406-14.

DÍAZ, A.M.O.; DELLEPIANE, N.; PALOMO, L.F. Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante: composición antigénica y capacidad inmuonógena. *Bol. Oficina Sanit. Panam., 107*:185-94, 1989.

DUARTE, V.M.S.; ROSLIACOV, A.A.; NSALAMBI, D.; GOMES, A.F. Epidémiologie et diagnostic de la rage en Angola. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.536-40.

ENG, T.R.; FISHBEIN, D.B.; TALAMANTE, H.E.; FEKADU, M.; CHAVEZ, G.F.; MURO, F.J.; BAER, G.M. Immunogenicity of rabies vaccines used during na urban epizootic of rabies in Mexico. *Vaccine, 12*:1259-64, 1994.

FAOAGALI, J.L.; BUSE, P.D.; STRUTTON, G.M.; SAMARATUNGA, H. A case of rabies. *Med. J. Aust.*, *149*:702-7, 1988.

FAVORETTO, S.R.; CARRIERI, M.L.; TINO, M.S.; ZANETTI, C.R.; PEREIRA, O.A.C. Simplified fluorescent inhibition microtest for the titration of rabies neutralizing antibodies. *Rev. Inst. Med. Trop.São Paulo, 35*:171-5, 1993.

FEKADU, M. Rabies in Ethiopia. *Am.J.Epidemiol.,115*:266-73, 1982.

GAMBETA, W.R.; CHAMELET, E.L.B.; SOUZA, L.T.M.; AZEVEDO, M.P. Instituto Pasteur de São Paulo, 75 anos de atividade (1903-1978): análise histórica de sua atuação técnica e científica na profilaxia da raiva. São Paulo, Instituto Pasteur/Coordenadoria de Serviços Técnicos Especializados da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1979.

GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V.; SILVA, E.V.; PRETO, A.A.; CORDEIRO, C.F. Avaliação em camundongos de vacinas anti-rábicas inativadas frente a variantes antigênicas do vírus da raiva. *Arq. Biol. Tecnol., 33*:551-60, 1990.

HAIGH, J.C. & FIELD, M.F. Rabies vaccination in a small zoo: antibody titers studies. *J. Zoo Anim. Med., 12*:17-20, 1981.

HAMEID, O.A. Rabies in Sudan: an epidemiolgical review. *Vet. Rec.*, *128*:61-2, 1991.

IBRAHIM, A.E.; ELTIGANI, A.; ALI, A.A. Epidemiology of rabies in the Sudan. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.465-72.

JAHRLING, P.B.; GEISBERT, T.W.; DALGARD, D.W.; JOHNSON, E.D.; KSIAZEK, T.G.; HALL, W.C.; PETERS, C.J. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet, 335*:502-5, 1990.

JOHNSON-DELANEY, C. A. Primates. *Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice, 24*:121-56, 1994.

KAPLAN, C. Rabies in non-human primates. *Lab. Anim. Handb., 4*:117-8, 1969.

KESSLER, M.J.; SUMMER, J.W.; BAER, G.M. Evaluation of killed rabies vaccine for Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J. Zoo Anim. Med.,13*:74-7, 1982.

KLENERMAN, L.; COID, C.R.; AOKI, F.Y. Treatment of wounds from animals suspected of carrying neurotropic viruses. *Br. Med. J., 3*:740-1, 1975.

KOESHARYONO, C.; THEOS, R.J.; SIMANJUNTAK, G. The epidemiology of rabies in Indonesia. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.545-55.

LAVENDER, J.F. Immune response in primates vaccinated with duck embryo cell culture rabies vaccine. *Appl. Microbiol.*, *25*:327-31, 1973.

LAWSON, K.F.; WALCROFT, M.J.; CRAWLEY, J.F. ERA strain rabies vaccine: oral vaccination of nonhuman primates. *Can. Vet. J.*, *17*:255-8, 1976.

LEITHOLD, L. *O cálculo com geometria analítica*. 3ª ed. São Paulo, Harbra, 1994. v. 1.

LÉPINE, P.; ATANASIU, P.; GAMET, A.; VIEU, J.F.; VIALAT, C. Les vaccinations antirabiques a L´Institut Pasteur en 1966. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, *113*:239-44, 1967.

LERY, L. II - Les vaccinations antirabiques a L´Institut Pasteur de Lyon. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, *123*:450-3, 1972.

MEYER JR., H.M. La utilización de primates en el ensayo y control de productos biologicos y drogas. In: Conferencia Interamericana sobre la Conservación y Utilización de Primates Americanos no Humanos en las Investigaciones Biomédicas, 1ª, Lima, 1975. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud, 1977. p. 210-3. (OPS-Publicación Científica, 317).

MIOT, M.R.; SIKES, R.K.; SILBERMAN, M.S. Rabies in a chimpanzee. *Lab. Primate Newsl., 12*:6, 1973.

MORELL, V. Chimpanzee outbrek heats up search for Ebola origin. *Science, 268*:974-5, 1995.

MORO, M. Los primates no humanos como fuente de recursos naturales.In: Conferencia Interamericana sobre la Conservación y Utilización de Primates Americanos no Humanos en las Investigaciones Biomédicas, 1ª, Lima, 1975. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud, 1977. p. 217-27. (OPS-Publicación Científica, 317).

NIEVES, P.; RODRIGUEZ, J.F.; KESSLER, M.J.; BERCOVITCH, F. Subcutaneous rabies vaccination of pigtail macaques. *J. Med. Primatol., 25*:14-6, 1996.

OTT-JOSLIN, J.E. Zoonotic diseases of nonhuman primates. In: Fowler, M. E. ed. *Zoo and wild animal medicine: current therapy.* Philadelphia, W. P. Saunders, 1993. p. 358-73.

PASSOS, J.J.; CAMPELLO, I.B.; FIGUEIREDO, M.J.; MARMORI, Z.; BASTOS, C.S.P. Raiva em animais silvestres. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14º, São Paulo, 1974. *Resumos*. p.103.

PEARSON, S.; COTTINGHAM, M.; PUCAK, G.; HENDRICKS, K.; TAYLOR, J.; FEARNYHOUGH, G.; VELA, L.; SIMPSON, D.; GEISBERT, T.W.; JAHRLING, P.B. Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates, Texas, 1996. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 45*:314-6, 1996.

PHILLIPS, H. Nature Science Update article: Medicine: the first day of HIV-1. *Nature* [on line] 1998 Febr. 12. Available http://www.nature.com/Nature2/serve?SID=4...7&CAT=Corner&PG=Update/update485.htlm [cited in 08/04/98].

PICCININI, R.S. & FREITAS, C.E.A. Experiences with rabies control in Brazil. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.737-41.

POTKAY, S. Diseases of the Callitrichidae: a review. *J. Med. Primatol.*, *21*:189-236, 1992.

RENQUIST, D.M. & WHITNEY JR, R.A. Zoonoses acquired from pet primates. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, *17*:219-40, 1987.

RICHARDSON, J.H. & HUMPHREY, G.L. Rabies in imported nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci., 21*:1082-3, 1971.

RÖTTCHER, D. & SAWCHUK, A.M. Wildlife rabies in Zambia. *J. Wildl. Dis., 14*:513-7, 1978.

RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; CUMMINS, L.B.; KOPROWSKI, H. Primate responses to a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Vaccine*, *10*:368-74, 1992.

SCHELL, K.R.; FÜRST, M.; HABERSTICH, H.U.; MISCHLER, R.; HOSKINS, J.M.; WEGMANN, A. A highly purified and concentrated duck embryo rabies vaccine: a preliminary report. *J. Biol. Stand.*, *8*:97-106, 1980.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Centro de Vigilância Epidemiológica Profº Alexandre Vranjac. *Raiva: manual de normas técnicas - profilaxia da raiva em humanos.* 2ª ed. São Paulo, 1996.

SEDGWICK, C.J.; ROBINSON, P.T.; LOCHNER, F.K. Zoonoses: a zoo's concern. *J. Am. Vet .Med. Assoc., 167*:828-9, 1975.

SIKES, R.K.; CLEARY, W.F.; KOPROWSKI, H.; WIKTOR, T.J.; KAPLAN, M.M. Effective protection of monkeys against death from street virus by post-exposure administration of tissue-culture rabies vaccine. *Bull. World Health Organ.*, *45*:1-11, 1971.

SILVA, A. G.; COSTA, A.R.; FREIRE, M.C.U.L.; ANDRADE NETO, J.V. Epidemiologia da raiva dos herbívoros no Estado da Bahia: estudo sobre a participação dos sagüis. *Bol. Inst. Biol. Bahia*, *13*:146-7, 1974.

SIVAN, J. Les vaccinations antirabiques au Centre Pasteur de Marseille en 1966. *Ann.Inst.Pasteur Paris*, *113*:251-2, 1967.

SIVAN, J. Les vaccinations antirabiques au Centre Pasteur de Marseille en 1968. *Ann.Inst.Pasteur Paris*, *117*:289-90, 1969.

SIVAN, J. IV - Les vaccinations antirabiques au Centre Pasteur de Marseille. *Ann.Inst.Pasteur Paris*, *123*:455-7, 1972.

SMITH, R.E.; PIRIE, G.J.; ENGLAND, J.J. Rabies vaccination of captive white-handed gibbons potentially exposed to wild rabies virus. *Lab. Anim. Sci.*, *37*:668-9, 1987.

TAURASO, N.M. Review of recent epizootics in nonhuman primate colonies and their relation to man. *Lab. Anim. Sci., 23*:201-10, 1973.

TAYLOR, J.; MEIGNIER, B.; TARTAGLIA, J.; LANGUET, B.; VANDERHOEVEN, J.; FRANCHINI, G.; TRIMARCHI, C.; PAOLETTI, E. Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non avian species. *Vaccine*, *13*:539-49, 1995.

THONGCHAROEN, P.; WASI, Ch.; PUTHAVATHANA, P.; CHAVANICH, L. Rabies in Thailand. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.556-66.

TOLLIS, M.; DIETZSCHOLD, B.; VOLIA, C.B.; KOPROWSKI, H. Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. *Vaccine, 9*:134-6, 1991.

TOMORI, O. & DAVID-WEST, K.B. Epidemiology of rabies in Nigeria. In: Kuwert, E.; Mérieux, C.; Koprowski, H.; Bögel, K., ed. *Rabies in the Tropics*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.485-90.

WARRELL, M.J.; WARD, G.S.; ELWELL, M.R.; TINGPALAPONG, M. An attempt to treat rabies encephalitis in monkeys with intrathecal live rabies virus RV 675. *Arch. Virol.*, *96*:271-3, 1987.

WHITNEY JR, R.A. Primate medicine and husbandry. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, *9*:429-45, 1979.

WILSON, J.M.; HETTIARACHCHI, J.; WIJESURIYA, L.M. Presenting features and diagnosis of rabies. *Lancet*, *2*:1139-40, 1975.

WITKOR, T.J. & KOPROWSKI, H. Sucessful immunization of primates with rabies vaccine prepared in human diploid cell strain WI-38. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *118*:1069-73, 1965.

WITKOR, T.J.; KOPROWSKI, H.; MITCHELL, J.R.; MERIGAN, T. Role of interferon in prophylaxis of rabies after exposure. *J. Infect. Dis.*, *133*(Suppl.):A260-A265, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Rabies; Geneva, 1992. 8th report. (WHO-Technical Report Series, 824).

ZAHEER, M.; ZAIDI, S.A.H.; SINHA, S.N. A clinico epidemiological study of animal bites with reference to rabies. *Indian J. Public Health, 14*:122-8, 1970.

ZAMECNIK, P.C. Importancia de los primates americanos no humanos para la salud humana y las investigaciones biomedicas. In: Conferencia Interamericana sobre la Conservación y Utilización de Primates Americanos no Humanos en las Investigaciones Biomédicas, 1ª, Lima, 1975. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud, 1977. p.vii-x.(OPS-Publicación Científica, 317).

ZANETTI, C.R.; CHAVES, L.B.; SILVA, A.C.R.; LEE, L.M.; PEREIRA, O.A.C. Studies on human anti-rabies immunization in Brazil. I - Evaluation of time 3 + 1 pre-exposure vaccination schedule under filed conditions. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 37*:349-52, 1995.

APÊNDICE

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Acetona 80% em água

Acetona comercial.....80 ml

Água destilada.....20 ml

Manter gelada em freezer à temperatura de -20º C.

Álcool 70% iodado

Álcool anidro .....700 ml

Água destilada .....300 ml

Iodo.....2%

Solução salina tamponada com fosfatos - 0,01M pH 7,2 (PBS)

$Na_2HPO_4.12H_2O$.....2,65 g

$NaH_2PO_4.H_2O$.....0,36 g

NaCl.....8,17 g

H_2O destilada (q.s.p.).....1 litro

Tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,5M

Solução A: carbonato de sódio 0,5M

Na_2CO_3, anidro .....5,3 g

H_2O destilada (q.s.p.).....100 ml

Solução B: bicarbonato de sódio 0,5M

$NaHCO_3$.....4,2 g

H_2O destilada (q.s.p.).....100 ml

pH 8,5: misturar 0,4 ml da solução A e 10 ml da solução B

Glicerina tamponada

Misturar 9 partes de glicerina comercial e uma parte de solução tampão carbonato bicarbonato 0,5M, pH 8,5.

Solução estoque de azul de Evans

Dissolver 10 mg de azul de Evans em 100 ml de PBS 0,01M pH 7,2.

Para uso, diluir 1 parte da solução estoque em 9 partes de PBS e utilizar esta solução para diluir o conjugado.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

ATV: Associação de Tripsina-Versene.

BHK: Baby Hamster Kidney.

cm: Centímetros.

CO_2: Dióxido de Carbono.

DP_{50}: Dose Protetora 50%.

ºC: Graus Celsius.

HEPA: High Eficiency Particle.

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana.

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis.

Kg: quilograma.

MEM: Minimum Essential Medium.

µ: Micra.

m: Metro.

mg: Miligramas.

ml: Mililitro.

mm: Milímetros.

O.T.: Old Tuberculin.

PBS: Solução Tampão Fosfatada.

pH: Potencial Hidrogênio-Iônico.

PV: Pasteur Virus.

rpm.: Rotações por Minuto.

VARCCL: Vacina Anti-Rábica Inativada Preparada em Cérebros de Camundongos Lactentes.

VERO: Rim de macaco-verde.

TECPAR: Instituto de Tecnologia do Paraná.

TSIF: Teste Simplificado da Inibição da Flourescência.

UI: Unidades Internacionais.

WHO: World Health Organization.