

AValiação DA VACINA ANTI-RÁBICA ERA, FRENTE A VARIANTES ANTIGÊNICAS DO VÍRUS DA RAIVA, EM DIFERENTES PERÍODOS PÓS-IMUNIZAÇÃO*

Cláudia C. Cordeiro**
Egon V. Silva**
Omar Miguel***
Pedro M. L. Germano****

CORDEIRO, C.C. et al. Avaliação da vacina anti-rábica ERA, frente a variantes antigênicas do vírus da raiva, em diferentes períodos pós-imunização. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 24: 512-7, 1990.

RESUMO: Avaliou-se, em camundongos, os níveis de proteção conferidos por uma vacina anti-rábica atenuada, preparada em cultura de tecido renal a partir da amostra ERA, frente a diferentes variantes antigênicas dos vírus da raiva. Utilizaram-se dois esquemas de vacinação, representados por uma única dose e por 6 doses aplicadas em dias alternados. Os diferentes camundongos dos grupos experimentais foram desafiados, em diversos períodos pós-imunização (15, 30, 60 e 120 dias), com variantes procedentes de cães (São Paulo e Nigéria), de morcego (DR-19 e Pernambuco), de raposa (Rio Grande do Norte) e CVS "Challenge Virus Standard". Os resultados obtidos permitiram constatar que a vacina ERA foi eficaz contra todas as variantes de rua e silváticas do vírus rábico, independentemente do esquema vacinal. Contra as cepas adaptadas no laboratório DR-19 e CVS, quando aplicada em uma única dose, sua eficácia foi menor do que quando aplicada em 6 doses.

DESCRITORES: Vacina anti-rábica. Eficácia. Raiva, prevenção.

INTRODUÇÃO

A utilização dos anticorpos monoclonais no estudo da raiva (Koprowski e Wiktor¹⁹, 1980) permitiu diferenciar as cepas de vírus fixo das de vírus de rua, ambas pertencentes ao sorotipo 1 do gênero *Lyssavirus* (Atanasiu e Sureau⁴, 1987; Larghi²⁰, 1989). Deste modo foi possível identificar, sobretudo, as cepas de vírus rábico predominantes nas mais diversas regiões da Europa, África, Ásia (Sureau e Rollin²⁷, 1982) e Américas (Webster e col.²⁹, 1985; Smith e col.²⁵, 1986; Germano e col.^{13,15}, 1988, 1990).

A partir da comprovação da existência de diferentes cepas ou variantes antigênicas do vírus rábico, tornou-se de fundamental importância, para a história natural da raiva, conhecer o comportamento dessas variantes, sobretudo em relação às vacinas utilizadas na prática de campo (Wiktor³⁰, 1985; Dietzschold e col.¹⁰, 1988; Germano e col.¹⁴, 1988; Larghi²⁰, 1989).

A ocorrência de surtos de raiva originados em falhas de vacinação frente a variantes antigênicas,

por enquanto, não foi comprovada (Dietzschold e col.¹⁰, 1988), contudo, sabe-se que os graus de virulência das cepas rábicas são de intensidade variável (Andral e Blancou³, 1985; Germano e col.¹⁴, 1988; Erbolato e col.¹¹, 1989). Por outro lado, modificações na estrutura antigênica do vírus, tal como são detectadas pelos anticorpos anti-rábicos monoclonais, não permitem prever se uma determinada vacina será eficaz contra uma variante em particular (Dietzschold e col.¹⁰, 1988).

Das vacinas anti-rábicas mais consagradas, na prática de campo, destaca-se a ERA (Ellen-Rokitnic-Abelseth), vacina atenuada preparada em cultivo de células renais de porco (Erbolato e col.¹¹, 1989). Inúmeras pesquisas comprovaram sua eficácia em seis espécies animais: caninos, felinos, bovinos, caprinos, ovinos e equinos (Baer⁵, 1989).

A vacina ERA, apesar do crescente progresso das vacinas inativadas, ainda continua sendo utilizada principalmente nas áreas de elevada endemicidade, e, sobretudo, nos países da América do Sul, para o controle da raiva dos ruminantes (OMS²³, 1984; Andral e Blancou⁶, 1985; Erbolato e col.¹¹, 1989).

* Projeto financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Processo nº 823015/87-4/BM. Trabalho apresentado no World Zoonoses Congress, Porto Alegre, 1989.

** Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA), do Ministério da Agricultura - Rodovia Heitor Penteado, Km 3,5 - 13100 - Campinas, SP - Brasil.

*** Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - Av. Dr. Arnaldo, 715 - 01255 - São Paulo, SP - Brasil.

Trabalhos experimentais e de campo comprovam que a vacina ERA apresenta elevado poder antigênico, conferindo imunidade de longa duração (2 a 3 anos) e mantendo sua potência, mesmo quando diluída (Baer⁵, 1989). Todavia, por ser uma vacina de vírus atenuado, sua inocuidade é contestada, principalmente em relação aos animais silvestres (Chomel e col. ⁹, 1985). Apesar das críticas, ao longo dos últimos anos, esta vacina tem fornecido resultados práticos muito bons, notadamente entre os bovinos (Mansour e Mostefai ²², 1983; Prosperi e col. ²⁴, 1984; Baer ⁵, 1989; Erbolato e col. ¹¹, 1989).

No Brasil, a vacina ERA ainda continua a ser utilizada na prevenção da raiva, tanto nos carnívoros domésticos quanto nos ruminantes. Por outro lado, está comprovada a existência, em nosso meio, de diferentes variantes antigênicas do vírus rábico (Hayashi e col.¹⁶, 1984; Germano e col.¹⁵, 1990). Como conseqüência, é de relevante importância a avaliação do desempenho dessa vacina anti-rábica, frente as cepas do vírus da raiva predominantes no país.

Com base nesses aspectos objetiva-se, no presente trabalho, avaliar, em camundongos, a eficácia da vacina anti-rábica ERA, frente a diferentes variantes antigênicas do vírus da raiva, isoladas no Brasil, em diferentes período pós-imunização, utilizando dois esquemas de vacinação, representados por uma única dose e por 6 doses da vacina.

MATERIAL E MÉTODO

Vírus

Foram utilizadas 6 variantes antigênicas do vírus da raiva, em suspensão a 20% de cérebros de camundongos, identificadas como antigenicamente distintas, através dos anticorpos monoclonais antinucleocapside (Germano e col.^{13,15}, 1988, 1990; Erbolato e col.¹¹, 1989), assim identificadas:

- C/SP, isolada de cão proveniente da cidade de Jales, São Paulo, segunda passagem em camundongos;
- C/NG, isolada de cão proveniente da Nigéria, África, sexta passagem em camundongos;
- Z/RN, isolada de raposa do Estado do Rio Grande do Norte, primeira passagem em camundongos;
- M/PE, isolada de morcego do Estado de Pernambuco, primeira passagem em camundongos;
- DR-19, isolada de *Desmodus rotundus* do Brasil (Fuenzalida e Larghi¹², 1972), adaptada às condições de laboratório, vigésima segunda passagem em camundongos; e,
- CVS "Challenge Virus Standard".

Vacina

Utilizou-se a vacina anti-rábica, atenuada, preparada em cultura de tecido renal de suíno, a par-

tir da amostra de vírus ERA (Abelseth¹, 1964). O título obtido pela prova de potência de Koprowski (Koprowski¹⁸, 1973) foi da ordem de $10^{4.50}/0,03$ ml.

Inoculação Experimental

Foram utilizados, aproximadamente, mil camundongos albinos suíços, fêmeas, com 21 dias de idade e com peso médio igual a 11g, para a constituição dos diferentes grupos experimentais.

Os camundongos foram divididos em dois grupos, um para cada esquema de vacinação. A partir destes grupos, os animais foram subdivididos em seis sub-grupos, um para cada tipo de variante antigênica do vírus rábico. Finalmente, cada sub-grupo foi separado em quatro lotes de camundongos, com cerca de 17 animais cada um, correspondente aos períodos de desafio pós-vacinal (15, 30, 60 e 120 dias). Em paralelo, foi constituído o grupo testemunho, reservando-se 10 camundongos para cada variante e para cada período pós-vacinal.

Os animais do grupo experimental foram vacinados aos 21 dias de idade, por via intraperitoneal. Os camundongos, submetidos a uma única dose vacinal, foram inoculados com 0,5 ml da suspensão da vacina pura, enquanto que aqueles, submetidos a 6 doses receberam 0,25 ml da vacina, a cada dois dias, durante duas semanas consecutivas.

Os desafios, com as diferentes variantes virais, foram realizados aos 15, 30, 60 e 120 dias pós-vacinação, tanto nos grupos experimentais, quanto nos testemunhos, por via intracerebral, com 0,03 ml da respectiva suspensão viral contendo entre 16 e 38 DL₅₀/0,03 ml de vírus (Koprowski¹⁷, 1973). O período de observação pós-desafio foi de 30 dias.

A vacina anti-rábica estudada foi considerada eficaz quando os resultados de proteção, nos diferentes grupos experimentais, foram iguais ou superiores a 70%, de acordo com o valor estabelecido como limite mínimo de proteção para vacinas atenuadas (Koprowski¹⁸, 1973)

RESULTADOS

Os resultados de proteção, conferidos pela vacina anti-rábica ERA, nos diferentes grupos experimentais, estão apresentados na Tabela e na Figura.

A vacina ERA, aplicada em dose única (Figura), protegeu, eficazmente, os animais de todos os sub-grupos desafiados com as variantes antigênicas do vírus da raiva de rua (C/SP e C/NG) e silváticas (M/PE e Z/RN), em todos os períodos pós-imunização. Contudo, o mesmo resultado não foi observado com as variantes de laboratório (DR-19 e CVS), aos 30, 60 e 120 dias pós-imunização.

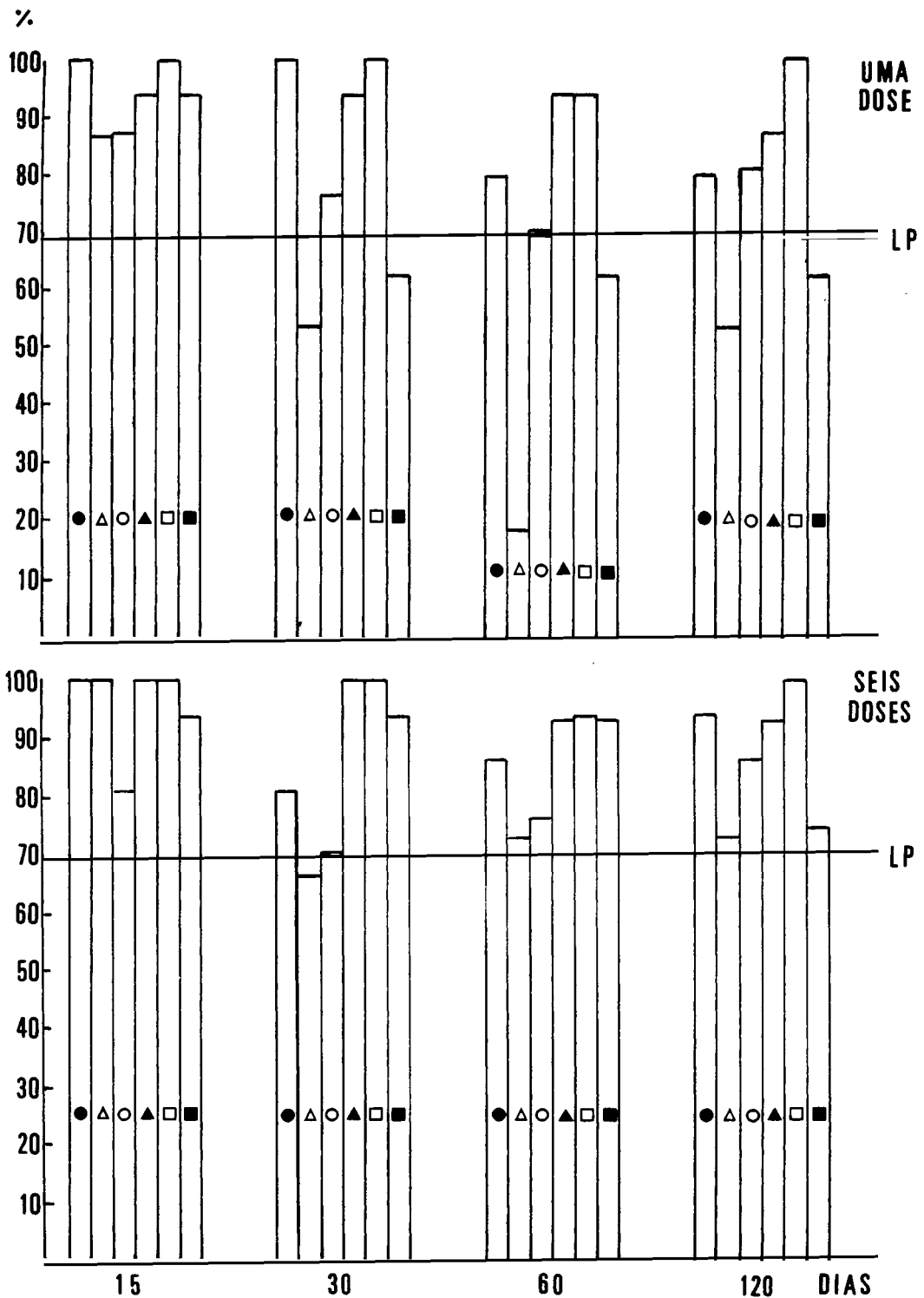


Figura — Percentuais de proteção, de camundongos vacinados com a vacina anti-rábica ERA e desafiados com o vírus rábico, por via intracerebral, segundo o esquema de vacinação, as variantes antigênicas e os períodos de desafio pós-immunização (dias).

TABELA

Percentuais de proteção de camundongos, previamente vacinados com a vacina anti-rábica ERA e desafiados com o vírus rábico, por via intracerebral, segundo o esquema vacinal, cepa rábica e o período de desafio pós-vacinal (dias).

| V.A | Dose Única | | | | Seis Doses | | | |
|-------|------------|-------|------|-------|------------|-------|------|-------|
| | 15 | 30 | 60 | 120 | 15 | 30 | 60 | 120 |
| C/NG | 100,0 | 100,0 | 80,0 | 88,2 | 100,0 | 51,2 | 86,7 | 94,2 |
| | 86,7 | 53,3 | 18,8 | 53,3 | 100,0 | 66,7 | 73,3 | 73,3 |
| DR-19 | 87,5 | 76,5 | 70,6 | 81,2 | 81,2 | 70,6 | 76,5 | 86,7 |
| C/SP | 93,8 | 93,8 | 94,1 | 87,5 | 100,0 | 100,0 | 93,3 | 93,3 |
| M/PE | 100,0 | 100,0 | 93,8 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 93,3 | 100,0 |
| Z/RN | 93,8 | | 62,5 | 62,5 | 94,1 | 93,8 | 93,3 | 75,0 |

V.A. = Variante Antigênica

Os percentuais de proteção, observados nos sub-grupos imunizados com doses múltiplas da vacina ERA (Figura), foram semelhantes aos anteriores: todos os sub-grupos foram protegidos, eficazmente, contra todas as cepas do vírus rábico em estudo, em todos os períodos pós-imunização. A única exceção registrada foi com a variante DR-19, aos 30 dias pós-imunização.

A mortalidade nos grupos testemunhos, sem exceção, foi de 100% para todas as variantes estudadas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A eficácia da vacina ERA, frente às cepas de vírus rábico de rua (C/SP e C/NG) e silváticas (M/PE e Z/RN), não sofreu interferência dos esquemas de imunização adotados, pois, em ambos os grupos experimentais, os valores de proteção foram semelhantes. Estes resultados, em princípio, são coerentes com o tipo de imunógeno utilizado, porquanto as vacinas preparadas a partir de vírus atenuado ou modificado não requerem doses de reforço (Abelseth², 1975). Uma única dose, com este tipo de vacina, é suficiente para induzir reposta imune, com elevado nível de anticorpos e de longa duração, mesmo em animais primo vacinados (Blancou⁶, 1985).

Frente aos desafios com as variantes C/SP, C/NG, M/PE e Z/RN, todos os sub-grupos experimentais apresentaram níveis de proteção acima do limite mínimo estabelecido em 70%, observando-se flutuações de pequena intensidade nesses valores. Estas diferenças podem ser decorrentes da sensibilidade individual dos animais, em função da idade quando do desafio, da possível variabilidade das doses infectantes virais, e, sobretudo, como resultado da virulência das próprias variantes antigênicas estudadas (Soulebot e col.²⁶, 1982; Hayashi e col.¹⁶, 1984; Larghi e Diaz²¹, 1985; Dietzschold e col.¹⁰, 1988; Germano e col.¹³, 1988; Blancou e col.⁷, 1989).

Em relação às cepas de laboratórios, CVS (vírus fixo) e DR-19 (semi-adaptada às condições de laboratório), a vacina ERA foi eficaz, em dose única, exclusivamente, aos 15 dias pós-imunização. Deve-se levar em consideração, contudo, que ambas as cepas são extremamente virulentas para camundongos (Fuenzalida e Larghi¹², 1972; Chantal e Blancou⁸, 1985), razão pela qual uma única dose vacinal pode não ter sido suficiente para proteger os sub-grupos a partir dos 30 dias pós-imunização. Quando se analisam os resultados de proteção dos animais desafiados com estas mesmas variantes, após imunização com 6 doses da vacina, observa-se que apenas aos 30 dias pós-imunização não houve proteção eficaz no subgrupo desafiado com a cepa DR-19. Todavia, o valor de proteção obtido neste sub-grupo (66,7%) está muito próximo do limite mínimo de 70%, e ao dos resultados obtidos nos sub-grupos subsequentes, 60 e 120 dias pós-imunização (73,3%).

Os resultados obtidos comprovam, em camundongos, a eficácia da vacina ERA, frente a variantes antigênicas do vírus da raiva, distintas em relação ao perfil do nucleocapside, ao longo de 120 dias pós-imunização. Trabalhos anteriores já haviam comprovado a eficácia desta vacina, em diversas espécies animais, na prevenção da raiva, sobretudo, em condições experimentais e de campo (Abelseth², 1975; Tierkel²⁸, 1975; Mansour e Mostefai²², 1983; Prosperi e col.²⁴, 1984; Blancou⁶, 1985; Chantal e Blancou⁸, 1985; Baer⁵, 1989; Erbolato e col.¹¹, 1989).

Deste modo, observadas as devidas indicações da vacina ERA, na prática de campo, somente para caninos e ruminantes domésticos, conclui-se que, ao menos em camundongos, este imunógeno é capaz de proteger, eficazmente, os suscetíveis contra as mais variadas cepas de vírus rábico. Contudo, para que esta conclusão possa ser definitivamente corroborada, é necessário submeter as "espécies-alvo" da vacina ERA a experimentos semelhantes, para verificar se estes resultados se confirmarão (Dietzschold e col.¹⁰, 1988).

CORDEIRO, C.C. et. al. [Evaluation of the ERA antirabies vaccine against antigenic variants of rabies virus in different post-immunization periods]. *Rev. Saúde públ., S. Paulo*, 24: -512-7, 1990.

ABSTRACT: Protection levels of an attenuated antirabies vaccine, of ERA origin, prepared in Kidney tissue culture, were evaluated in mice. Two schemes of vaccination were utilized: a single dose and 6 doses on alternate days. Animals of different experimental groups were challenged at 15, 30, 60 and 120 days post-immunization with six antigenic variants of rabies virus: strains of dog origin (S. Paulo, Brazil and Nigéria), vampire origin (DR-19 and Pernambuco, Brazil), fox origin (Rio Grande do Norte, Brazil), and CVS (Challenge Virus Standard). The results showed the effectiveness of the ERA vaccine against all antigenic variants of street and sylvatic rabies virus, independently of the vaccination scheme. Against the laboratory strains (DR-19 and CVS) the ERA vaccine was less effective, mainly in the groups vaccinated with a single dose.

KEYWORDS: Rabies vaccine. Efficacy. Rabies, prevention and control.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABELSETH, M. K. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Canad. vet. J.*, 5: 279-86, 1964.
2. ABELSETH, M. K. Bovine vaccines - past and present. In: Baer, G. M., ed. *The natural history of rabies*. New York, Academic Press, 1975. v.2, p. 203-19.
3. ANDRAL, L. & BLANCOU, J. La rabia: nuevos desarrollos en materia de vacunación. Malzevilli, Office International de Epizootie, 1985. [Mimeografado].
4. ATANASIU, P. & SUREAU, P. Rage. In: *Encyclopedie Méd. Chir. Paris - France, Maladies Infectieuses*, 8065 C10, 7-1987, 18 p.
5. BAER, G. M. Vacunas antirrábicas para los animales domésticos: pasado, presente y futuro. In: *Foro Internacional Sobre Rabia. Congreso de Ciencias Veterinarias*, 1ª, Maracaibo, Venezuela, 1989. Maracaibo, Venezuela, 1989. p. 23-32.
6. BLANCOU, J. La vaccination antirabique des animaux domestiques. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, 136E: 475-82, 1985.
7. BLANCOU, J.; AUBERT, M. F. A.; CAIN, E.; SELVE, M.; THRAENHART, O.; BRUCKNER, L. Effect of strain differences on the potency testing of rabies vaccines in mice. *J. biol. Stand.*, 17:259-66, 1989.
8. CHANTAL, J. & BLANCOU, J. Le virus rabique. In: *Pasteur et la rage*. Paris, Ministère de l'Agriculture, 1985. p. 281-92. (Informations Techniques de Services Vétérinaires, 92-95).
9. CHOMEL, B.; CHOMEL, R.; SAINT-GERAND, A. L. Prophylaxie de la rage animale. In: *Reunion Franco-Colombienne, Bogota, 1984. Deux zoonoses majeurs: la rage et la brucellose*. Lyon, Bosc. Frères, 1985. p. 29-48 (Collection Fondation Marcel Merieux).
10. DIETZSCHOLD, B; RUPPRECHT, TOLLIS, M.; LAFON, M.; MATTEL, J.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Rev. infect. Dis.*, 10: S-785-S-798, 1988.
11. ERBOLATO, E. B.; SILVA, E. V.; MIGUEL, O.; SUREAU, P.; GERMANO, P. M. L. Eficácia da vacina antirábica ERA em camundongos, frente a quatro variantes antigênicas do vírus da raiva. *Rev. Saúde públ., S. Paulo*, 23:447-54, 1989.
12. FUENZALIDA, E. & LARGHI, O. P. Características de una cepa de vírus rábico aislada del cerebro de *Desmodus rotundus*. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 73:93-8, 1972.
13. GERMANO, P. M. L.; SILVA, E. V.; SUREAU, P. Determinação do perfil antigênico de 3 cepas de vírus rábico, isoladas no Brasil, através de técnica dos anticorpos monoclonais antinucleocapside. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 25:199-295, 1988.
14. GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M. M.; SILVA, E. V. Avaliação de três cepas de vírus rábico antigênicamente distintas, em camundongos. I. Estudo dos períodos de observação clínica. *Rev. Saúde públ., S. Paulo*, 22:375-83, 1988.
15. GERMANO, P. M. L.; SILVA, E. V.; MIGUEL, O.; SUREAU, P. Variantes antigênicas del vírus de la rabia aisladas en el nordeste y sudeste del Brasil. Estudio preliminar. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 108:39-45, 1990.
16. HAYASHI, Y.; MORA, E.; CHANDELIER, E. L.; MONTAÑO, J. A.; OHI, M. Estudos de proteção cruzada de 24 cepas de vírus rábico isoladas de diferentes espécimes animais no Brasil. *Arg. biol. Tecnol.*, 27:27-35, 1984.
17. KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: *World Health Organization. Laboratory techniques in rabies*. 3rd. ed. Geneva, 1973. p. 85-93.
18. KOPROWSKI, H. Guinea pig potency test for chicken-embryo vaccine. In: *World Health Organization. Laboratory techniques in rabies*. 3rd. ed. Geneva, 1973. p. 287-91.
19. KOPROWSKI, H. & WIKTOR, T. J. Monoclonal antibodies against rabies virus. In: *Kennet, R.H., McKeam, T.*

- J.; Bechtol, K. B., eds. *Monoclonal antibodies-hybridomas: a new dimension in biological analyses*. New York, Plenum Press, 1980. p. 335-51.
20. LARGHI, O. P. Conceptos generales sobre rabia. In: Foro Internacional Sobre Rabia. Congreso de Ciencias Veterinarias, 1ª, Macaraibo, Venezuela, 1989. Maracaibo, Venezuela, 1989. p. 11-22.
21. LARGHI, O. P. & DIAZ, A. M. O. Cross protection of mice against different rabies virus isolates. *Zbl. Bakt. Hyg.*, A259: 268-74, 1985.
22. MANSOUR, A. B. & MOSTEFAI, F. Immunité et activité protectrice chez le chien de vaccins antirabiques expérimentaux produits sur culture cellulaire. *Maghreb Vét.*, 1:47-51, 1983.
23. ORGANIZATION MODIALE DE LA SANTE. Comité d'Experts de la Rage, Genève, 1983. *7ème rapport*. Genève, 1984. (Série de Rapports Techniques, 709)
24. PROSPERI, S.; IRSARA, A.; BATELLI, G.; SANGUINETTI, V. Vaccination of cattle with live and inactivated rabies vaccines: a study of antibody response. *Vet. Res. Communic.*, 8:181-5, 1984.
25. SMITH, J. S.; REID-SANDEN, F. L.; ROUMILLAT, L. F.; TRIMARCHI, C.; CLARK, K.; BAER, G. M.; WINKLER, W. G. Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. *J. clin. Microbiol.*, 24:573-80, 1986.
26. SOULEBOT, J. P., BRUN, A., CHAPPUIS, G.; GUILLEMIN, F.; TIXIER, G. Rabies virus pathogenicity and challenge. Influence of the method of preparation, the route of inoculation, and the species. Comparison of the characteristics of the modified, fixed and wild strains. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, 5:71-8, 1982.
27. SUREAU, P. & ROLLIN, P. E. Variantes antigéniques du virus rabique: souche des rues de France, d'Afrique, de Madagascar et d'Asie. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, 5:109-12, 1982.
28. TIERKEL, E. S. Control of urban rabies. In: Baer, G. M., ed. *The natural history of rabies*. New York, Academic Press, 1975. v.2, p. 189-201.
29. WEBSTER, W. A.; CASEY, G. A.; CHARLTON, K. M.; WIKTOR, T. J. Antigenic variants of rabies virus in isolates from Eastern, Central and Northern Canada. *Canad. J. comp. Med.*, 49:186-8, 1985.
30. WIKTOR, T. J. Les anticorps monoclonaux: application à l'étude de la rage. In: Pasteur et la rage. Paris, Ministère de l'Agriculture, 1985. p. 139-S-144-S. (Informations Techniques de Services Vétérinaires, 92-95).

Recebido para publicação em 30/3/1990
 Reapresentado em 19/9/1990
 Aprovado para publicação em 20/9/1990.