

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA VETERINÁRIA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-RÁBICA PELA TÉCNICA
DE CONTRAIMUNOELETROFORESE EM PESSOAS VACINADAS

WLAMIR CORRÊA DE MOURA

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR
MATEUS MANDU DE SOUZA

TESE, SUBMETIDA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PATOLOGIA VETERINÁRIA, ÁREA DE CONCEN-
TRAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO
26 DE ABRIL DE 1993

TÍTULO DA TESE

AValiação DA RESPOSTA ANTI-RÁBICA PELA TÉCNICA DE CONTRAIMUNOELETOFORESE
EM PESSOAS VACINADAS

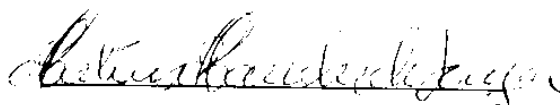
AUTOR

WILAMIR CORRÊA DE MOURA

APROVADO EM 26 DE ABRIL DE 1993

Mateus Mandu de Souza

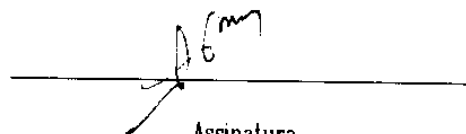
Nome



Assinatura

Francisco Benedito Rangel Filho

Nome



Assinatura

Carlos Mazur

Nome



Assinatura

À minha esposa Juliana,
e Aos meus pais Horacy e Jurema.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Mateus Mandu de Souza, pela valiosa orientação ministrada

Ao professor Francisco Benedito Rangel Filho, pela orientação inicial.

Ao Dr. Márcio José de Figueiredo, chefe do Serviço de Biologia Aplicada do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vailsman (IMMV), pelo fundamental amparo técnico científico e pelo apoio moral”.

Ao Dr. marlon Vicente da Silva, chefe da Seção de Sorologia do IMMV, pelo grande auxílio, sem o qual esta tese não teria sido possível.

A Dra. Rosineia Fernandes Correia, pelo auxílio constante.

Ao IMMV Jorge Vailsman, pela cessão das instalações para fase experimental deste trabalho.

Ao Dr. Deoclécio Bezerra Brito, diretor do IMMV, pelo incentivo e apoio.

A Dra. Rossana Aliende, pela oportunidade da produção de glicoproteína no Centro Panamericano de Febre Aftosa (CPFA).

Ao Dr. Mauricio A. Martins do CPFA, pela acessoria na produção de glicoproteína.

Ao Dr. Albino Alonso do CPFA pela calorosa acolhida no laboratório de sorologia do CPFA.

Ao Dr. Magnus S. Sondhál do CPFA pela oportunidade e apoio durante minha estadia no laboratório de sorologia.

Ao CPFA pela oportunidade oferecida.

Ao Professor Ulysses Confalonieri, pelas excelentes aulas nas disciplinas de Epidemiologia e Zoonoses e pelo exemplo de objetividade e ética profissional.

A professora Maria das Graças da UFF pela revisão incisiva do trabalho de tese

Ao meu “irmão” Carlos Henrique Machado, professor da disciplina de Anatomia da UFRRJ por ter me incentivado a cursar o mestrado na UFRRJ, pela grande amizade e pelo apoio contante.

Aos colegas de curso. Gilfredo Darsie Compare e Carla Lopes de Mendonça.

Ao Dr. Alexandre Nunes de Oliveira, acadêmico do IMMV, pelo grande auxílio.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Natural do Rio de Janeiro, diplomado em 1985 em Medicina Veterinária pela UFRRJ. Concluiu em 1986 o Curso de Especialização em Inspeção e Tecnologia de Alimentos na UFRRJ, ministrado em convênio firmado com o Ministério do Exército. Durante o ano de 1987, praticou clínica de pequenos animais nas cidades de São Paulo (SP), São Sebastião (SP) e Cuiabá (MT). Em 1988 foi aprovado em concurso para Médico Veterinário da Secretaria Municipal de Saúde do Município do Rio de Janeiro sendo lotado no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitzman, onde realiza sorologia e diagnóstico de raiva. Em 1989 foi aprovado para o concurso de mestrado em patologia animal da UFRRJ, área de concentração de Medicina Preventiva Animal.

SUMARIO

1- INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	9
3 - MATERIAL E METODOS	33
4 - RESULTADOS	45
5 - DISCUSSÃO	62
6 - CONCLUSÕES	71
7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	73

ÍNDICE DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

TABELA 1 antígeno de coelho, dados sobre a produção e inativação	46
TABELA 2 antígeno de camundongo, dados sobre a produção e inativação	46
TABELA 3 comparação dos tampões veronal e borato	47
TABELA 4 grupo A, resultados obtidos na CIE e no TN	49
TABELA 5 grupo B resultados obtidos na CIE e no TN	52
FIGURA 1 comparação entre tampões no grupo C	48
FIGURA 2 comparação dos antígenos no grupo A	51
FIGURA 3 comparação dos antígenos no grupo B	53
FIGURA 4 comparação dos antígenos no grupo A +B	54
FIGURA 5 comparação dos antígenos no grupo A	55
FIGURA 6 comparação dos antígenos no grupo B	57
FIGURA 7 correlação geral no grupo A+B	59
FIGURA 8 curva de anticorpos no grupo A	60
FIGURA 9 curva de anticorpos no grupo B	61
QUADRO 1 resumo dos tratamentos estatísticos grupo A	65
QUADRO 2 resumo dos tratamentos estatísticos grupo B	66
QUADRO 3 resumo dos tratamentos estatísticos grupo A+B	66

RESUMO

Com o objetivo de testar medidas que implicassem em simplificações na técnica de contraimunoeletroforese modificada, foi efetuado um estudo com amostras de soro de pessoas primovacinadas e revacinadas com vacina anti-rábica “Fuenzalida”.

As modificações testadas e adotadas foram a supressão do tratamento do antígeno com betapropiolactona; substituição do tampão veronal pelo tampão borato e a utilização de antígeno produzido em cérebro de camundongos lactentes. Os resultados dos testes mostraram que as modificações adotadas são eficientes, conferindo à prova uma maior praticidade na elaboração de antígenos e um menor ônus permitindo assim sua implantação em uma maior gama de laboratórios.

SUMARY

Aiming at to test options that imply some simplifications in modified conterimmunoelectrophoresis, a survey was undertaken with “Fuenzalida’s” anti-rabies primovaccinated and revaccinated treated persons seruns.

Those modifications were the betapropiolactona antigen inactivation supression; veronal saline buffer substitution by borate saline buffer and the utilization of a suckling mouse brain origin antigen. The obtained tests results shown that adoted modifications were efficients, giving to the technique a greater practicity in antigen doing and a lower cost. permitting so, the test implantation in a greater range of laboratories.

1 - INTRODUÇÃO

Há muito tempo que a vacinação anti-rábica humana vem sendo feita "as cegas" no Rio de Janeiro, assim como na maior parte do país, pois não existem técnicas efetivamente implantadas para determinação do título de Ac neutralizantes para dar suporte ao tratamento, que unam o custo acessível e a rapidez na obtenção dos resultados. A CIE modificada descrita por Diaz & Myers (1980) é uma prova rápida e segura para este fim, porém na prática não é tão acessível quanto o descrito, quando diante da realidade dos laboratórios de diagnóstico de raiva do País que, em sua maioria, não apresentam os recursos necessário

A motivação principal para realização deste estudo foi a necessidade de se adotarem modificações que viabilizassem a técnica de CIE e sua implantação em laboratórios de diagnóstico de raiva que disponham de poucos recursos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vírus rábico

A raiva é uma doença que afeta o sistema nervoso central, sendo importante para humanos e animais. É causada pelo Vírus Rábico (VR), o qual é membro do gênero *Lyssavirus*, da família *Rhabdoviridae*. O VR é envelopado, em forma de bala (projétil), possuindo um genoma com fita única de RNA de polaridade negativa, que codifica cinco proteínas.

O gênero *Lyssavirus* compreende o vírus rábico e quatro outros vírus relacionados (Mokola, Lagos Bat, Duvenhage e Finlândia). Segundo a WHO (1984), o VR, constitui a espécie tipo. Mediante provas sorológicas, tem-se demonstrado a existência de relações antigênicas entre os distintos vírus deste grupo, o que tem permitido classificá-los em 5 sorotipos (WHO, 1989): **Tipo 1- RAIVA:** Cepa protótipo CVS-24 (Challenge Vírus Standard 24 passagens intracerebral em camundongos). Inclui vários subtipos distribuídos mundialmente.

Tipo 2 - LAGOS: Cepa Lagos Bat. Inclui 3 subtipos:

subtipo	ano	hospedeiro	local
LAG 2 (prototipo)	1974	Morcego Frugivoro	Rep.Centro Africana.
	1986	Gato	Zimbabwe
LAG 3(prototipo)	?	Gato SA30	África do Sul
	1980	Morcego SA2	África do Sul
?	1980	Morcego SA3	África do Sul
?	1980	Morcego Frugivoro	África do Sul
"	1985	Morcego Frugivoro	Senegal
"	1980	Morcego Frugivoro	África do Sul

Tipo 3 - MOKOLA: Há apenas um subtipo do vírus Mokola.

hospedeiro	ano	local
1968 (prototipo)	Mussaranho	Nigeria
1969	Humano	Nigéria
1971	Humano	Nigéria
1971 (1974 ?)	Mussaranho	Camarões
1981 Republica	Roedor	Centro Africana
1981	5 Gatos, Cão	Zimbabwe

Tipo 4 -- DUVENHAGE: Há 2 subtipos do vírus Duvénhage:

subtipo	ano	hospedeiro	local
DUV1 prot	1970	Humano	África do Sul
	1981	Morcego Inset	África do Sul
	1986	Morcego	Zimbabwe
DUV 2	1968	Morcego	Hamburgo, R.F.A.*
(prot.)	1970	Morcego	Bremeshavem, R.F.A.*
	1982	Morcego	Polônia
	1986/87	100 Morcegos	R.F.A.* e Dinamarca

* República Federativa Alemã

Tipo 5: Finlândia Há apenas um isolamento do tipo 5, de material humano em 1985, na Finlândia.

Se o ciclo desses vírus, que parece se completar em animais silvestres, se estendesse a animais domésticos, ocorreria um problema de Saúde Pública. Em Zimbabwe foram notificados 5 casos de vírus Mokola em gatos e 1 em cão (WHO, 1989). Estes achados demonstram a necessidade de se estudar ainda mais a natureza destes agentes e sua epizootiologia em animais domésticos.

Através de provas sorológicas de proteção cruzada, neutralização viral, cinética de neutralização e contraimunoelektroforese, demonstrou-se que existem diferenças antigênicas entre distintas cepas do VR (Crandell, 1966; Diaz, 1976; Wright, 1948; Wiktor et al., 1973). O desenvolvimento

recente de técnicas de anticorpos monoclonais tem permitido a detecção de diferenças de composição em um determinado epitopo da glicoproteína ou do nucleocapsídeo do VR.

O uso conjunto de uma bateria de anticorpos monoclonais antinucleocapsídeo e antiglicoproteína, permite diferenciar as distintas cepas do VR e este dos vírus relacionados a ele (Flamand et al., 1980 a e b; Wiktor, 1978; Wiktor et al., 1980). Resta esclarecer se essas diferenças antigénicas são responsáveis pelos ocasionais casos de raiva em humanos e animais devidamente vacinados.

2.2. infecção e patogenia

A infecção rábica ocorre, habitualmente, pela mordedura de um animal raivoso, cuja saliva contenha vírus ativos. Sem dúvida, outras possíveis vias de infecção para o vírus são: a aerógena (Constantine, 1962; Hronovsky & Benda, 1969 a e b; Hronovsky. 1971; Jenson et al., 1969) e a oral (Correa et al.. 1970). Nos últimos anos têm sido notificados casos de pessoas que contraíram raiva depois de receber transplantes de córnea provenientes de doadores não controlados para a doença (U.S.Centers for Disease Control. 1980) e pela via transplacentária (Sipahioglu & Alpaut, 1985).

Depois de introduzido por inoculação ou mordedura, o vírus aloja-se durante um período variável de tempo no local de inoculação (Baer et al.. 1968; Baer & Clearley. 1972). O primeiro ciclo de replicação do vírus ocorre no músculo estriado comprometido, que atua então como sítio amplificador da infecção. Murphy et al. (1973) consideram que em infecções com um período de incubação prolongado, este tecido poderia atuar também como sítio de seqüestro do vírus, ainda que esta hipótese não tenha sido comprovada (Charlton & Casey, 1981; Charlton et al., 1982).

O VR tem demonstrado um marcado neurotropismo, em condições naturais e experimentais (Matsumoto, 1962; Tsiang. 1979).

O vírus passa logo aos nervos periféricos através da junção neuromuscular, onde os receptores da acetilcolina exercem papel importante para a entrada do VR nos nervos periféricos (Tsiang, 1979), a partir daí ele se desloca passivamente pelo axoplasma de forma centrípeta até os gânglios espinhais aonde se replica aumentando a quantidade de vírions que chegarão ao cérebro através dessa estrutura. As tentativas de identificar o VR no sistema nervoso periférico não têm tido êxito, sendo a raiz do gânglio dorsal o primeiro ponto de onde se consegue isolar o VR entre o ponto de entrada e o SNC. Uma vez atingida a medula espinhal, o curso ascendente para o cérebro é rápido (Baer, 1975). Geralmente, a infecção está limitada ao neurônio e suas estruturas, porém, têm-se notificado casos de raiva com invasão de astrócitos e células da glia (Matsumoto. 1975; Sung et al., 1976).

inicialmente a infecção compromete ao sistema límbico e estende-se logo ao resto do cérebro (Torres et al., 1984). Nesta etapa, começa a dispersão centrífuga do vírus, que pode ocorrer por via axoplásmica. por infecção de neurônios ou através do espaço intersticial (Murphy, 1977). Praticamente qualquer neurônio do corpo pode servir para multiplicação do vírus nesta etapa da enfermidade, assim como células da córnea (Larghi et al., 1973; Schneider, 1969), da pele (Blendin et al., 1983; Smith et al., 1972), células cromafins do pâncreas, miocárdio, gordura parda e glândulas salivares (Dierks et al., 1969; Dierks, 1975; Murphy. 1977). A presença de VR nas glândulas salivares tem sido detectada inclusive em animais pré-sintomáticos (Bell et al., 1969; Sikes, 1962; Vaughn et al., 1963). Também foi verificada a eliminação intermitente de vírus na saliva de animais aparentemente sãos (Fekadu & Baer, 1980; Fekadu et al., 1981; Yurkovsky. 1962). Em períodos

terminais da enfermidade, observa-se, às vezes, a infecção maciça das terminações olfatórias e das papilas gustativas (Dierks et al.. 1969; Dierks, 1975).

Segundo Murphy (1977), o VR exibe uma marcada habilidade para enganar os mecanismos de defesa do hospedeiro até fases muito avançadas da infecção. Assim este autor observou, em parte, que o fenômeno de brotamento ao nível da membrana citoplasmática é raro no SNC, e que o número de partículas liberadas no meio extra celular é limitado e estas infectam rapidamente as células vizinhas ou ficam retidas na bainha de mielina que envolve o axônio. Por outro lado, não se evidenciam alterações citopatológicas que possam estimular reação inflamatória no tecido nervoso ou em tecidos extra neurais.

Em acompanhamento sorológico de 40 pacientes humanos que vieram a falecer de raiva, Souza (1980). encontrou apenas 7 com título de anticorpos neutralizantes nos soros colhidos na Manhã do falecimento, dos quais três estavam recebendo tratamento vacinal quando adoeceram, entretanto, por falta de dados não foi possível precisar o início dos sintomas em cada paciente.

Em pacientes não vacinados, anticorpos não aparecem antes do 10º dia de doença, mas após este dia, o título sobe rapidamente, atingindo níveis muito altos. Uma similar elevação foi observada em pacientes que receberam vacinação pós-exposição (Hattwick & Gregg. 1915). A ausência de anticorpos neutralizantes durante os 10 primeiros dias de doença sugere que a raiva é uma infecção imunologicamente privilegiada que não estimula mecanismos imunes até o início da doença clínica. Durante o período de incubação, o vírus está presumivelmente dentro dos neurônios, protegido do sistema imune do hospedeiro. Como a morte ocorre normalmente antes do 10º dia, as

defesas do hospedeiro são alertadas tarde demais para poder ajudar nos casos não tratados (Hattwick & Gregg, 1915).

Em humanos, o VR normalmente pode ser isolado do cérebro após a morte, em casos em que esta ocorre cedo no curso da doença. Mas após 10 a 14 dias, o isolamento do vírus do cérebro, pós-morte ou em biópsias cerebrais, pode ser impossível (Rubin et al., 1970; Hattwick et al., 1972). O título de anticorpos no líquido céfalo-raquidiano, na raiva clínica é muito maior do que o obtido com aplicação de soro hiperimune (Bell et al., 1971; Hattwick et al., 1972) ou induzido pela vacinação (Arko et al., 1973).

Segundo teorias recentes, o desenlace fatal desta enfermidade poderia debitar-se a fenômenos imunopatológicos. Tem sido demonstrada a produção de interferons em animais infectados experimentalmente, assim como períodos de incubação excessivamente prolongados em animais atímicos ou com imunossupressão química (Guillon & Tsiang, 1980; Smith et al., 1982). Também poderiam participar certos mecanismos de disfunção neuronal ainda não identificados (Tsiang, 1982). É provável que vários fatores interajam para aumentar a severidade e a fatalidade da enfermidade. A complexidade do problema justifica a necessidade de se continuar com essa linha de pesquisa para esclarecer os possíveis mecanismos imunológicos e moleculares envolvidos.

Dados comprovam que a raiva humana e canina vêm aumentando em todo mundo, apesar dos conhecimentos adquiridos e da disponibilidade de meios para controlar a doença (Schneider, 1990).

Alguns países de economia capitalista desenvolvida, como o Japão e a Inglaterra, conseguiram controlar a raiva. Por outro lado, na Índia ocorrem anualmente cerca de 25.000 óbitos causados por raiva humana (WHO, 1986). A raiva na América Latina ainda é um sério problema de saúde pública. Em 1985 foram registrados 250 casos em humanos, sendo que em alguns países a situação é bastante grave, e depois da Índia, esta é a segunda região no mundo em número de casos notificados de raiva humana, provavelmente devido às condições sócio-econômicas e culturais de seus habitantes.

A raiva, bem como outras doenças transmissíveis, têm uma situação conjuntural¹ bastante favorável para se expandir vem na América Latina frente a grave crise sócio-econômica que ocorrendo neste continente, agravada ainda mais pela dívida externa de grande parte dos países, os quais, como parte das negociações com os países credores, deterioram ainda mais a qualidade de vida de seus habitantes (Schneider. 1990).

2.4. A raiva no Brasil

O Brasil já apresentou incidência de raiva humana e canina altas. porém com a criação em 1973 do Programa Nacional os de Profilaxia da Raiva (PNPR), mediante convênio firmado entre Ministérios da Saúde e da Agricultura, Central de Medicamentos (CEME) e a Organização Panamericana de Saúde (OMS-OPAS), este índice vem se reduzindo consideravelmente. Para ilustra-lo pode-se citar que em 1980 notificaram-se 168 casos de raiva humana e 4.570 casos caninos, e já em 1988 foram notificados 37 casos humanos e 464 caninos, havendo uma redução de 78% e 89,8% respectivamente. Porém esta redução não foi homogênea em todo País. A regioao sudeste que em 1980 apresentava 40%

dos casos de raiva humana notificados no Brasil, passou a apresentar apenas 10.8% dos casos diagnosticados em 1988 (Schneider. 1990).

A região sul desde o início da criação do PNPR, sempre apresentou uma baixa incidência de casos de raiva humana e não registrou nenhum caso entre no período de 1982 a 1986.

As regiões Norte e Nordeste têm apresentado anualmente incidência de raiva humana bastante alta e em 1988 mil os coeficientes de incidência nestas regiões foram de 0.07/100 habitantes (hab) e 0,06/100 mil hab, respectivamente. Estes índices foram bastante superiores ao da região sudeste no mesmo período, que foi de 0.01/100 mil hab. (Schneider, 1990).

Convém lembrar que o número de casos de raiva diagnosticados está relacionado com o volume de amostras recebidas em cada estado. Grande número das amostras encaminhadas para diagnóstico da raiva, concentram-se na região Sudeste, onde se localizam 14 dos 27 laboratórios de diagnóstico do País. Em contrapartida nas regiões Norte e Nordeste o número de casos notificados é mínimo, contando estas regiões com apenas 3 e 5 laboratórios respectivamente (Ministério da Saúde, 1992).

A partir de 1974 surgiram as Vacinas Anti-Rábicas (VAR) produzidas em células diplóides humanas. Outras vacinas derivadas de cultivos celulares, mais econômicas são agora disponíveis (por exemplo: vacina purificada de células VERO e vacina purificada de embrião de galinha). Apesar da alta potência e ótimos resultados desta nova geração de vacinas, a maioria dos países do Terceiro Mundo não têm condições de implantar sua produção em laboratórios da rede pública para produção em

massa, devido primordialmente, ao seu custo ainda bastante elevado para a realidade de tais países (Kaplan et al.. 1986).

Na América Latina ocorre a maior parte das vacinações humanas em todo o mundo e a maioria destes países utiliza a vacina produzida em cérebro de camundongos lactentes desenvolvida por Fuenzalida & Palácios (1955). A partir de 1964, esta vacina começou a ser adotada por países como o Chile, Argentina, Peru, Uruguai e Brasil. No Brasil apesar de introduzida em 1965, somente a partir de 1973 foi escolhida dentre as várias vacinas até então produzidas no país, como a que melhor atenderia as exigências do PNPR, sendo produzida, a partir daí, com a adoção da inativação pela beta-propiolactona (Silva et al.. 1967; Markus et al.. 1971). Testes e padrões foram também adotados para o controle de qualidade de sua produção. A vacina Fuenzalida tem sido utilizada nestes países em grande escala para cães, gatos, bovinos e para o homem, e em muitos deles a raiva foi controlada com êxito (Fuenzalida et al., 1964; Fuenzalida. 1914). Esta vacina preparada em cérebros de camundongos lactentes contém altos títulos de vírus antes de sua inativação (107,5 a 1085 DL 50 / 0,03 ml por via intra cerebral em camundongos), sendo estes os maiores já obtidos quando comparados com qualquer sistema utilizado para replicação do vírus. Quando convenientemente inativada, é inteiramente segura para qualquer espécie animal suscetível a doença (Souza. 1980).

2.6. Imunidade

Anticorpos anti-rábicos parecem estar relacionados principalmente as classes das imunoglobulinas 1gM e IgG (Fujisaki et al., 1968; Matsumoto, 1970; Rubin et al., 1971; Souza, 1980). Durante a resposta primária IgM pode, aparentemente, ser detectada antes de 3 a 4 dias (Fujisaki et

al., 1968), enquanto que IgG aparentemente não pode ser detectada até aproximadamente o 10º dia (Rubin et al., 1971). Souza (1981), acompanhando as respostas de IgM e IgG em 22 pacientes primovacinados, detectou título de IgM a partir do 4º dia em 3 pacientes (14%) e dos 31 testados para IgG, esta foi detectada no 4º dia em 2 (9%).

Souza (1981) e Lemos (1984), não detectaram Ac no TN antes do 4º dia após início da vacinação.

A IgM normalmente começa a cair dentro de 41 dias (Rubin et al., 1971) enquanto IgG começa a declinar em torno de 225 dias, mas permanecendo detectáveis por mais de 20 anos (Fox, 1958; Greenberg & Childress, 1960). A persistência destes anticorpos tem permitido o uso de vários testes sorológicos para determinação de imunidade anti-rábica.

Testes de neutralização têm sido utilizados para correlacionar anticorpos com resistência a desafio em cães, gatos, bovinos, raposas e outros animais (Koprowski & Black, 1952; Fenje, 1960; Dean et al., 1964). Tem sido reportado que anticorpos neutralizantes em camundongos, cobaias e coelhos são induzidos pela glicoproteína do envelope viral, e que estes anticorpos parecem proteger contra subsequente desafio com o VR. Anticorpos com esta propriedade não são produzidos quando o nucleocapsídeo purificado é inoculado em coelhos, entretanto são produzidos anticorpos detectáveis pela imunofluorescência indireta e fixadores de complemento (Schneider et al., 1973; Wiktor et al., 1973).

Os papéis definitivos da resposta imune humoral e celular na proteção contra a raiva, continuam sob investigação. A maioria das reações indicativas de imunidade celular podem ser induzidas por antígenos rábicos em animais e no homem.

Algumas reações citotóxicas, assim como as de anticorpos, poderiam ser tanto protetoras quanto patogênicas.

Muitos dados na resposta celular foram obtidos sob condições experimentais. Por enquanto, continua indefinido se eles são componentes críticos na defesa do hospedeiro contra a raiva.

Por outro lado, muito mais é conhecido sobre os anticorpos que neutralizam o VR. Anticorpos no soro de animais e do homem podem ser estimados com razoável precisão e a quantidade presente utilizada para avaliar a resposta imune. Vários autores têm demonstrado a correlação entre a quantidade de anticorpos no soro e a resistência a subsequente infecção. Porém em indivíduos que estão realmente infectados, o papel de anticorpos induzidos pelo método clássico de tratamento vacinal é difícil de explicar (Kaplan et al., 1986). pois anticorpos neutralizantes não são normalmente detectados antes de 4 dias após o início da vacinação no homem e animais (Souza, 1980; Lemos, 1984; Lemos et al., 1987) e a vacinação sozinha em infecções severas onde o período de incubação é curto, sem o uso do soro hiperimune, tem demonstrado ser pouco eficiente (Kaplan et al., 1986),

Rubin et al, apud Crick & Brown (1976) verificaram que pacientes recebendo doses diárias de vacina mantinham uma prolongada resposta de IgM e a conversão em IgG era retardada. Eles indicaram que o fato de IgM não deixar a circulação e que apenas IgG penetra nos tecidos,

representaria uma séria desvantagem que poderia servir de explicação para algumas das falhas de tratamento que têm sido reportadas.

As variações na produção de IgC estão relacionados com o tipo de vacina, seu valor antigênico, o esquema vacinal empregado e a existência ou não de vacinações anteriores (Souza, 1980).

2.7. Acidentes pós-vacinais

Apesar da vacina Fuenzalida ser altamente potente e ser utilizada em doses pequenas, estudos feitos em 1986 revelaram que entre os vários milhões de pessoas tratadas durante 11 anos na América Latina, também ocorreram acidentes neurológicos com esta vacina (Kaplan, 1986).

Segundo Schneider (1990), nos últimos anos, para cada 1.000 pessoas, 3 buscam uma vez por ano atendimento na Rede Pública de Saúde devido a agressões animais. Dados precisos quanto ao número de agressões não foram achados, porém o número de atendimentos é alto.

O número de pessoas atendidas está diretamente associado a acessibilidade ao tratamento na rede pública básica de saúde e a informação quanto a gravidade da doença e da necessidade de buscar atendimento em caso de agressão (Schneider, 1990).

Ainda segundo Schneider (1990), o número de pessoas que buscam atendimento e se enquadram em uma das possibilidades de indicação de tratamento, é bastante alto (67,2%). Os

técnicos do PNPR sugerem um percentual de pessoas tratadas em relação as atendidas entre 20% e 30%.

Tem sido atendidas nos centros de prevenção da raiva, cerca de 350.000 pessoas por ano, e aproximadamente 45% destas pessoas são tratadas. Entre 1980 e 1988 o número médio de acidentes pós-vacinais com comprometimento do SNC foi de 5 por ano, dando uma proporção de 1 acidente para cada 38.080 pessoas tratadas, sendo que o máximo de acidentes esperados com a vacina Fuenzalida estaria próximo a 1 acidente/20.000 pessoas tratadas por ano (Schneider, 1990).

É questionável o percentual alto de pessoas tratadas em regiões onde não vem ocorrendo casos de raiva canina ou silvestre e onde exista boa Vigilância Epidemiológica.

A última resolução do Comitê de Especialistas do PNPR já prescreve tratamento reduzido para áreas de baixo risco, porém efetivamente tal tratamento não vem sendo empregado.

A mordida de um animal nao é automaticamente razão para vacinação contra raiva. Para prevenir imunizações desnecessárias alguns dados devem ser observados:

- se a mordida foi defensiva;
 - se a espécie é raramente acometida por raiva natural;
 - se a área geográfica é livre de raiva,
- nesta situação é possível atrasar ou omitir a vacinação.

Por outro lado:

- se o animal escapa;
- se o ataque foi sem motivo;

- se a espécie é vetor freqüente da raiva ou apresentava sintomas da doença, então a imunização deve ser considerada fundamental.

2.8. Normas técnicas

As "Normas Técnicas para Tratamento Preventivo da Raiva" do PNPR/MS (1987), buscam reduzir o número de doses aplicados por tratamento, principalmente nos casos de revacinações e naqueles ocorridos em áreas de baixo risco, enfatizam ainda a necessidade da adoção de provas para acompanhamento dos tratamentos. Ressaltem-se algumas passagens destas normas:

a - em esquema pré-exposição, aplicar 01 (uma) dose nos dias 01, 08 e 29 com reforço aos 90 dias. Considerar como resposta imune títulos iguais ou maiores que 25 (1:25) no teste de Neutralização em camundongos (TN). Recomenda-se controle sorológico anual. É indicado em pessoas que por força de suas atividades, estão expostas permanentemente ao risco de infecção pelo VR;

b - considera-se tratado anteriormente todo indivíduo que tenha recebido, no mínimo, 3 doses, desde que em dias não consecutivos e no período não maior que 90 dias;

c - no caso de nova exposição dentro do intervalo de 90 dias após tratamento completo (7 + 2 ou 10 + 3), não aplicar vacina. Nas pessoas que não receberam tratamento completo, se indicado, completar a série a partir do número de doses recebidas anteriormente.

d - em caso de re-exposição com mais de 90 dias decorridos do início do tratamento, recomenda-se:

d.1 - sempre que possível, **proceder à prova rápida de determinação de anticorpos;**

d.2 - se houver **demonstração de resposta imunológica**, aplicar 01 (uma) dose de reforço apenas;

e - nos casos de exposição grave ou quando não for conhecida a resposta anterior, aplicar 03 (três) doses em dias alternados (dias 01, 03 e 05);

f - em caso de re-exposição com história de tratamento anterior nunca aplicar soro hiperhimune.

g - não se recomenda a vacinação contra a raiva em áreas de baixo risco com resultado laboratorial por imunofluorescência negativo, desde que seja fornecido por um dos laboratórios credenciados. É da maior importância o procedimento do teste biológico, para confirmação do diagnóstico.

Portanto, como foi visto anteriormente, as normas técnicas do PNPR recomendam o controle sorológico dos pacientes tratados em diferentes situações:

- 1 - controle sorológico anual dos pacientes tratados em esquema pré-exposição;
- 2 - em pessoas re-expostas deve ser feita **titulação com técnica rápida** devido a urgência;

3 - é também recomendado que sejam implantados testes e se incentive o envio de amostras para TN nas capitais de cada estado ou, no mínimo, em um laboratório por região que realize tal teste.

2.9. Custos da raiva

Além do elevado custo social de mortes ocorridas pela raiva, implicações (como falta ao trabalho e/ou escola) por parte dos pacientes e de transtornos físicos ocasionados pelo tratamento, (como risco de acidentes pós-vacinais) devemos, por outro lado, refletir sobre os custos reais. No Brasil, são distribuídas, anualmente, 2 milhões de doses de vacina para uso humano e cerca de 14 milhões de doses para cães, a um custo aproximado de US\$ 8 milhões. Esse montante cobre apenas o custo das vacinas aos laboratórios produtores. Some-se a isto o gasto com manutenção, operacionalização da rede pública para aplicação destas vacinas e os gastos na organização de campanhas de vacinação animal (Schneider, 1990).

2.10. Avaliação da imunidade

Webster & Dawson (1935) desenvolveram o primeiro teste "*in vivo*" para detecção de anticorpos neutralizantes para a raiva, e desde então, muitas outras técnicas foram desenvolvidas. algumas delas detectam anticorpos contra a ribonucleoproteína viral. tais como as técnicas de imunofluorescência indireta (Thomas, 1963), fixação de complemento (Kwert. 1973), imunoprecipitação (Sokol et al. 1969), radioimunoensaio (Lee. 1977) e imunoenzimática (Atanasiu & Perrin, 1977) Outras técnicas medem anticorpos induzidos pela glicoproteína do envelope viral, como por exemplo o teste de neutralização em camundongos - TN - (Atanasiu et al.. 1956), inibição rápida de focos fluorescentes - IRFF - (Smith et al., 1973), hemadsorção (Gradien, 1977) e contraímunoeletroforese - CIE - (Diaz & Mayers, 1980).

Souza et al, (1985), desenvolveram um método de avaliação de resposta imunológica celular anti-rábica através de uma reação intradérmica.

Como já foi explicitado, anticorpos neutralizantes na raiva são aqueles formados contra a glicoproteína, desta forma, as técnicas que detectam e titulam estes anticorpos são as indicadas para avaliação da imunidade anti-rábica.

2.10.1 Teste de neutralização em camundongos (TN)

O TN é considerado padrão para detecção de anticorpos neutralizantes, porém, seu curso demasiado longo (15 dias) não lhe confere aplicação clínica para interferir em tratamentos em curso, além disto seu custo é bastante elevado.

2.10.2. Inibição Rápida de Focos Fluorescentes (IRFF)

A IRFF apresenta altíssima correlação com TN e é concluída em 24 h, porém é baseada em técnicas de cultivo celular requerendo instalações e equipamentos razoavelmente sofisticados e portanto bastante caros.

2.10.3. Contraimuno eletroforese (CIE)

O teste de CIE inicial era aplicado como uma técnica de triagem para detecção de anticorpos (Diaz, 1977). entretanto o método não permitia a demonstração de níveis quantitativos e reações inespecíficas poderiam ocorrer quando soros hemolisados ou obtidos em fases de lipemia

fossem examinados. Em contraste, a técnica de CIE modificada removeu estas dificuldades uma vez que a amostra de soro a ser testada é inicialmente misturada com o antígeno, incubada, e então colocada nos orifícios localizados no lado catódico da lâmina. Durante a eletroforese, qualquer componente inespecífico do soro migra na direção oposta a da formação das bandas de precipitação (Diaz & Myers, 1980).

A CIE modificada é um método rápido (4 horas), acessível e menos oneroso quando comparado as demais técnicas de titulação de anticorpos para a raiva. A prova baseia-se na união dos Anticorpos presentes em diluições variáveis de um soro problema com quantidade constante de antígeno (vírus rábico inativado). A reação é evidenciada através de uma corrida eletroforética simultânea das misturas de Ag/Ac e de um soro anti-rábico hiperimune (soro indicador). A presença de bandas de precipitação indica que não há anticorpos (Ac) para raiva no soro problema, por isso o antígeno (Ag) livre reage com o soro indicador (Diaz & Myers, 1980).

Testes mesmos autores, analisando o grau de correlação entre a CIE modificada e o TN, em amostras de soro de 48 pessoas vacinadas contra a raiva em regime pós-exposição (das quais 24 receberam 7 doses e 24 receberam 14 doses), obtiveram um valor de $r = 0.58$. Já em 1981 quando compararam os resultados obtidos pela CIE e TN com 89 soros de pessoas que receberam vacinação AR pós ou pré-exposição, o valor chegou a $r = 0.60$. Tais resultados são bastante próximos.

Em trabalho posterior, já utilizando Ag produzido com água destilada suplementada com glicina e sacarose. Diaz (1983) examinando 45 soros de pacientes que receberam vacinação pós-exposição (6 doses), obteve um valor de $r = 0,83$ entre o TN e a CIE. Devido ao seu efeito estabilizante sobre o VR, sacarose e glicina têm sido usadas na produção de vacinas de alta potência (Larghi & Nebel, 1980; Sikes & Larghi, 1961). O uso destes produtos para o preparo de Ag para a CIE resultou na melhoria da estabilidade do Ag, (Diaz. 1983).

A principal vantagem da CIE sobre o TN consiste na considerável redução do tempo requerido para a obtenção dos resultados, fator este, que pode ser de importância clínica fundamental na avaliação de um paciente. Em adição, a CIE é uma prova fácil de realizar e menos onerosa em relação as demais (Diaz & Myers, 1980).

Soros fracionados em colunas de Sephadex G-200 demonstraram que a atividade neutralizante envolvida em ambas as técnicas estava presente nas frações de soro contendo IgG (Diaz & Myers, 1980).

A Prova de imunofluorescência indireta (IFI) era considerada como sendo um método qualitativo sensível para a detecção de anticorpos para raiva apresentando boa correlação com o TN, entretanto algumas diferenças foram observadas (Larsh. 1965; Thomas et al.. 1963). Estudos subseqüentes comparando quantitativamente estes métodos, mostraram que os títulos de Ac obtidos pela IFI não se correlacionaram bem com os títulos obtidos no TN (Campolina & Reis, 1975; Grandien, 1977; Peck. 1966).

As diferenças foram atribuídas ao fato de que os Ac predominantemente medidos por esta prova são dirigidos contra a ribonucleoproteína viral e são considerados como desprovidos de capacidade neutralizante (Lee et al., 1977).

Tem sido também notificado que Ac detectáveis pela IFI são mais afetados pelas condições adversas, como congelamento ou Hemólise, do que o são os Ac neutralizantes (Leffingwell & Irons. 1965). Diaz & Myers (1981) avaliaram a correlação entre a CIE modificada e a IFI para detecção de Ac AR em soros de humanos, usando o TN como referência, obtendo maior sensibilidade com a CIE do que com a IFI.

Vários métodos para testar atividade neutralizante em cultivos celulares através de Ac fluorescentes têm sido descritos (King et al., 1965; Lennette & Emmons. 1971). Destes, o teste de eleição parece ser o de inibição rápida de focos fluorescentes (IRFF) de Smith et al. (1973) que requer apenas 24 h para se concluir. O resultado deste teste correlaciona-se bastante bem com aqueles obtidos pelo TN quando soros de animais e do homem são testados (Guillemin et al. 1981 a e b; Louie et al., 1975). A correlação entre a CIE e a IRFF foi estudada por Diaz (1983) titulando Ac AR em soros humanos usando o TN como referência padrão. Não houve diferenças significativas entre os títulos obtidos pelo TN e pela IRFF e os títulos estimados com base nos resultados obtidos pela CIE modificada.

A CIE permite a determinação quantitativa dos títulos de Ac AR em aproximadamente 4 horas, enquanto o TN requer 15 dias. Ela compartilha a vantagem de outras técnicas rápidas como o ELISA e a IRFF de prover informações aos epidemiologistas sobre o estado imune do paciente a tempo de interferir no tratamento AR, com a vantagem de ser menos onerosa, dispensar equipamentos

muito sofisticados, cultivos celulares e/ou técnicos altamente qualificados (Diaz, 1983). Estes predicados tornariam a CIE a prova ideal para a realidade dos países pobres, porém na prática, a prova ainda apresenta pontos críticos com relação a seu custo, como o tampão veronal. A utilização da betapropriolactona para inativação do vírus e a manutenção de biotérios de coelhos para produção de antígenos.

2.11. Justificativa

Este trabalho é uma tentativa de reduzir os custos da prova de CIE visando torná-la ainda mais acessível para laboratórios que apresentem poucas condições em termos de equipamentos e manutenção geral. Basicamente, procura-se testar os pontos que representam maiores obstáculos, para se manter a prova na rotina, que são:

- Tampão Veronal para a eletroforese. O tampão Veronal é um dos reagentes de maior custo na prova de CIE, ficando o preço de 1 litro da solução em torno de U\$12. Associado a isto, a durabilidade da solução é curta pois é altamente propensa ao desenvolvimento de fungos. Para se obter 10 volts em uma lâmina para CIE é necessário que a fonte indique uma força de saída de 150 volts/16 mA, por vezes a temperatura do sistema se eleva podendo gerar deformidade nas lâminas de agarose. Na tentativa de amenizar estes custos, tentou-se a utilização do Tampão borato em substituição ao tampão veronal. Segundo Campbell et al. (1970), o tampão borato é um bom substituto para o veronal em provas para detecção de reação Ag/Ac, tendo sido reportadas boas resoluções com seu uso. Associado a este fato, tem-se o baixo custo, pois 1 litro da solução custa

aproximadamente U\$0.35,33 vezes menos que 1 litro de Veronal. Sua durabilidade também é superior, pois apresenta propriedades antissépticas, dificultando desenvolvimento de fungos. Para se obter 10 volts/lâmina necessita-se de uma carga de saída da fonte de 70 volts/ 15 mA, representando uma múltipla vantagem pois exige menos da fonte e aquece menos a cuba de eletroforese.

- Produção do Ag em coelhos. Ao se implantar a prova de CIE no laboratório houve problemas com a criação de coelhos para produção do Ag, pois o biotério era totalmente voltado para a produção de camundongos e não dispunha de instalações adequadas para coelhos, assim iniciou-se a criação destes animais com algumas deficiências e, por um certo período, não se obteve muito sucesso. Como alternativa testou-se a produção do Ag em camundongos, frente a disponibilidade desta espécie na maioria dos laboratórios de raiva.

- Utilização da betapropriolactona para inativação do Ag. A manipulação e estocagem da betapropriolactona são um tanto delicadas, devendo ser feitas a baixas temperaturas, porém seu preço bastante elevado é sua maior desvantagem. Como solução adotou-se uma simplificação na inativação do vírus. Esta simplificação foi fundamental por não se dispor de recursos como ultra-centrífugas refrigeradas, betapropriolactona e reagentes para concentração do Ag (polietilenoglicol -PEG), nem meios de obtê-los de forma efetiva. Assim suprimiu-se a utilização da betapropriolactona e passou-se a inativar o vírus rábico pela ação do calor (56°C /30 minutos), pois segundo Turner et al. (1967) suspensões aquosas de tecidos contendo VR são inativadas em 5 minutos a 60°C. Convém lembrar que tal prática é uma das etapas da elaboração do antígeno descrita por Diaz (1985), para a inativação de enzimas, após a inativação com betapropriolactona.

- Utilização de Glicoproteína purificada de vírus rábico obtido em células BHK-21, pelo método de Petri & Wagner modificado (1979), como antígeno de CIE para comparação com o antígeno de coelhos.

2.12. Objetivos

2.12.1. objetivos gerais:

Adotar modificações na prova de CIE que simplifiquem sua implantação, tornando-a acessível a uma maior gama de laboratórios envolvidos no diagnóstico de raiva, mesmo aqueles que disponham de poucos recursos.

2.12.2. Objetivos específicos:

- a) Avaliar a modificação da inativação do Ag;
- b) Comparar o tampão veronal com o tampão borato;
- c) Comparar a eficiência dos Ags produzidos em camundongos e coelhos;
- d) Comparar os resultados da CIE utilizando o Ag de coelho com a CIE utilizando glicoproteína purificada de vírus rábico;
- e) Estabelecer o grau de correlação entre a CIE com as modificações adotadas e o TN, para criar tabela de títulos esperados.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado utilizando amostras de soro de pessoas que sofreram suposta exposição ao VR, e foram encaminhadas ao Serviço de Prevenção da Raiva Humana do Rio de Janeiro, sito a rua do Rezende, nº 128, Centro, aonde foram acompanhadas pelo Professor Mateus Mandu de Souza, do laboratório de raiva, Departamento de Microbiologia, UFRJ, localizado na Cidade Universitária da ilha do Fundão. As amostras de soro foram colhidas e submetidas ao teste de neutralização em camundongos no referido laboratório. Os soros chegaram ao laboratório de sorologia de raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” (situado a av. Bartolomeu de Guzmão, 1120, São Cristóvão), codificados, de forma que não eram conhecidos seus títulos. A utilização destes soros permitiu economizar um grande período de tempo que seria necessário para o acompanhamento dos pacientes, assim como para o procedimento do TN.

Um grupo misto foi composto por amostras de soro que foram colhidas em Postos de Saúde, onde é feita a vacinação anti-rábica humana, e encaminhadas a nós para titulação do nível de Ac.

Foi produzida, no Centro Panamericano de Febre Aftosa, sito a Rod. Pres. Kennedy, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, C.P.589, 20000, sob a supervisão do Dr. Maurício A. Martins, uma partida de Glicoproteína purificada de vírus rábico cultivado em células BHK gentilmente cedido pela Dra. Rita Maciel do laboratório QULMIO Produtos Quím. Com. e Ind. (R. Prof. Vicente Siqueira, 234, C.P. 643, Fortaleza, CE.). As espículas de Gp foram purificadas pela técnica de Petri & Wagner (1979), utilizando Octil-B-D-Glicopiranosídeo (OGP), e seriam utilizadas como Ag para CIE, sendo os testes iniciais satisfatórios, porém uma estocagem excessivamente prolongada a -20°C, provocou queda nos títulos obtidos e perda total do material.

3.1. Pacientes estudados

Foram analisados três grupos de pacientes assim distribuídos:

3.1.1. Grupo A - Primovacinados Pacientes que anteriormente não haviam recebido vacina anti-rábica e, na ocasião, receberam tratamento constituído de 9 doses de vacina, sendo a administração diária até a 7^a dose e reforços nos dias 10 e 20 a contar da última dose. Amostras de soro foram colhidas nos dias 6, 16, 26 e 36 a contar do início da vacinação, somando um total de 40 amostras.

3.1.2 Grupo B - Revacinados Pacientes que anteriormente haviam recebido tratamento anti-rabico completo e, apos 10 anos receberam uma unica dose de vacina. Amostras de soro foram colhidas nos dias zero, 7 e 30 a contar do dia da revacinação. somando um total de 30 amostras (Os pacientes do grupo B são os mesmos do grupo A).

3.1.3. Grupo A+B para cálculo da regressão geral. Os resultados dos grupos A e B foram reunidos para calcular a regressão geral.

3.1.4. Grupo C - Dos soros provenientes de Centros de Saúde do Município do Rio de Janeiro, de primovacinados e revacinados. Formado por amostras de soro de 15 pessoas que sofreram diferentes esquemas de vacinação, tendo sido as amostras colhidas em dias diversos para cada pessoa. Estes soros foram escolhidos ao acaso entre os soros recebidos para exame pelo laboratório de sorologia do IMMV, procurou-se incluir soros com títulos baixos, médios e altos.

3.2. Obtenção dos soros

Nos soros dos grupos A e B, a colheita de sangue foi feita com "Vacutainers", sendo a seguir deixado a temperatura ambiente durante duas horas para retração do coágulo, e a seguir refrigerado a 4°C até a hora de separação do soro, o que foi feito assépticamente em centrífuga de rotor horizontal a 3.000 x G por 30 minutos. Posteriormente, os soros foram guardados no congelador a -20°C até a realização dos exames, quando se procedeu a sua inativação a 56°C durante 30 minutos. Os soros do grupo A e do grupo B foram colhidos, em média, a 15 anos e 5 anos respectivamente.

As amostras de soro do grupo C foram colhidas em Postos Municipais de Saúde e enviadas ao nosso laboratório para acompanhamento de tratamento vacinal anti-rábico. As amostras foram recebidas já como soro separado em tubos de ensaio do tipo "Vaccutainers" e então inativados a 56°C por 30 minutos, sendo a seguir submetidas a prova de CIE e o soro restante estocado em "freezer" a -20°C. Os soros foram escolhidos de acordo com seu título inicial na CIE e por ocasião do trabalho foram submetidos novamente a CIE utilizando diferentes tampões.

3.3. Teste de Neutralização em camundongos

Os soros foram submetidos ao TN no laboratório de raiva do Departamento de Virologia da UFRJ, seguindo-se a técnica descrita por Thomas (1975), e depois estocados a -20°C. Estes soros permaneceram congelados em média 15 anos no grupo A, e 5 anos no grupo B.

3.4. Técnica de Contraimunoeletroforese

A técnica de CIE, implantada na rotina do laboratório de sorologia de raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária "Jorge Vaitsman" desde 1988, sofreu algumas adaptações às condições do laboratório, devido as dificuldades, principalmente de ordens instrumental e econômica, encontradas ao tentar-se seguir a técnica em sua íntegra, como descrita por Diaz (1985).

3.4.1. Antígeno (Ag)

Consistiu de uma suspensão a 40% de tecido nervoso, ora de camundongos lactentes, inoculados com vírus CVS recebido do CEPANZO com 33 passagens I.C. em camundongos adultos, sofrendo mais duas passagens no laboratório de sorologia do IMMV, ora de coelhos lactentes, sendo que, neste caso a amostra de vírus utilizada foi o CVS CCL 2 (CVS com duas passagens I.C. em coelhos lactentes) também recebido do CEPANZO.

3.4.1.a - Foram inoculados animais recém-natos (com 1 a 4 dias de nascidos), com suspensão de tecido nervoso contendo entre 100 e 1000 DL 50% I.C. testado em camundongos adultos. os animais foram observados, e quando demonstraram sinais de encefalite com avançado estado de paralisia, foram sacrificados e tiveram os cérebros coletados. Para produção do Ag de coelho, normalmente toda uma ninhada é inoculada (em média 7), rendendo aproximadamente 16 g de cérebro. Para a produção do Ag em camundongos são necessários em média 10 ninhadas de camundongos recém-natos (aproximadamente 10 por ninhada) para a obtenção da mesma massa de cérebros.

3.4.1.b Os cérebros foram mantidos congelados até serem triturados em grau com pistilo, também congelados, sendo feita suspensão em água destilada suplementada com glicina e sacarose, sendo então centrifugada a 1.000 X G durante 15 minutos utilizando copos de centrifuga congelados.

3.4.1.c- Do sobrenadante resultante foi retirada alíquota para titulação pela inoculação em camundongo 0.03 ml por via I.C.

3.4.1.d - A seguir a suspensão foi tratada a 56° C por 30 minutos, como preconiza Diaz (1985). para destruir enzimas hidrolíticas tal tratamento é suficiente para inativar o vírus pela ação do calor.

3.4.1.e- Então, a seguir uma amostra foi submetida a prova de inocuidade pela inoculação de 0,02 ml I.C. em camundongos lactentes.

3.4.1.f - O Ag foi distribuído em frascos do tipo “Ependorff” em volumes de 1ml, titulado pela CIE em diluições seriadas (fator 5). Foram obtidos títulos de 1:5 no Ag de coelhos e 1:12 no Ag de camundongos.

A inativação com betapropriolactona foi suprimida devido a seu elevado custo e manuseio um tanto delicado.

3.4.2. Soro indicador (SI).

Foi produzido imunizando-se coelhos adultos com vacina elaborada com cérebro de coelhos lactentes em 2º passagem, seguindo esquema preconizado por Diaz (1985). Sendo obtida um título ideal de trabalho de 1:6 na CIE.

3.4.3. Tampão para eletroforese

O tampão veronal (dietil barbiturato de sódio) foi substituído pelo tampao borato por ser o veronal um dos reagentes de maior custo e os testes preliminares terem indicado ser o borato um

bom substituto para o veronal, sem implicações na sensibilidade da prova. Tais testes mostraram ser o pH 9.1 o que melhor resultados oferecia. Campbell (1970), recomenda o uso do tampão borato em substituição ao veronal, em várias técnicas de detecção de reação Ag/Ac.

3.5. Procedimentos da técnica.

Os trabalhos foram desenvolvidos com uma fonte da marca ELOMED de eletroforese (Buenos Aires, Argentina), em sala refrigerada (25°C).

Testes preliminares foram desenvolvidos para padronizar a técnica e reagentes.

3.5.1 - Lâminas: Foram utilizadas lâminas de vidro medindo 75mm x 50mm, tais lâminas eram recobertas com uma fina camada de agarose fundida em tampão veronal pH 8.2. 0.05 M e dispostas sobre suporte com superfície devidamente nivelada.

3.5.2 - A seguir, 8 ml do gel foram vertidos sobre cada lâmina, com auxílio de uma pipeta graduada, e após gelificação parcial, deixados solidificar em placas de petri no refrigerador a 4°C por 10 a 15 minutos.

3.5.3 - A seguir, um gabarito foi utilizado para guiar a perfuração do gel. Cada lâmina assim perfurada permite o teste de 5 diluições de soro.

3.5.4 - As lâminas foram então montadas na cuba de eletroforese, sendo o papel de filtro recomendado por Diaz (1985) substituído por tecido sintético para limpeza a base de viscose, devido a sua maior resistência e durabilidade.

3.5.5 - Os orifícios de 6mm da lâmina foram posicionados do lado catódico da cuba de eletroforese.

3.5.6 - Inicialmente, foram feitas 5 diluições de cada amostra de soro: 1:2 - 1:4 - 1:8 - 1:16 e 1:32. A seguir misturavam-se volumes iguais da diluição padronizada de antígeno com as diluições seriadas de soro problema e encubava-se a 37°C durante 60 minutos. Após este período, os orifícios de 6mm foram preenchidos com a mistura e uma corrida eletroforética de 45 minutos era realizada inicialmente, utilizando-se 10 Volts por lâmina, aferidos com voltímetro (multímetro científico).

3.5.7 - Decorrido este período, a passagem de corrente foi suspensa e retirou-se a agarose dos orifícios de 3mm preenchendo-os, a seguir, com o soro indicador na diluição padronizada pré-determinada.

3.5.8 - A passagem de corrente foi então restabelecida e prosseguiu-se a corrida eletroforética por mais 120 minutos.

3.5.9 - Terminada a corrida, identificou-se as bandas formadas com a ajuda de um foco de luz transmitida através da lâmina.

3.5.10 - Considerou-se como título do soro a maior diluição que não produziu banda de precipitação cuja forma, tamanho e localização fossem comparáveis com a do sistema controle utilizado na prova.

3.5.11 - Amostras em que o título superou a maior diluição (1:32), tinham a titulação prosseguida por mais 5 diluições a partir da próxima diluição (1:64).

3.6. Metodologia

Basicamente o trabalho consistiu de 3 etapas:

3.6.1 - Avaliação da modificação no método de inativação do Ag para CIE.

3.6.2 - Comparação entre os tampões Veronal pH 8,2 e Borato pH 9,1. submetendo o grupo misto de soros a CIE utilizando-se uma cuba preenchida com tampão Veronal pH 8.2 e, paralelamente, outra cuba preenchida com tampão Borato pH 9.1.

3.6.3 - Comparação entre a eficiência dos Ag produzidos em coelhos com a eficiência daqueles produzidos em camundongos. Através da comparação dos títulos obtidos para os mesmos soros submetidos a CIE utilizando os diferentes Ag.

3.6.4 - Estabelecer o grau de correlação entre a CIE com as modificações adotadas e o TN, calculando o coeficiente de regressão geral usando o grupo A+B, criando uma tabela para estimar títulos neutralizantes através dos títulos obtidos pela CIE com os diferentes Ag.

3.7. Tratamento Estatístico

3.7.1 - Foram calculados o coeficiente de correlação (r), e os valores de "a" e "b" utilizando os resultados obtidos entre:

- a) os títulos determinados com os diferentes tampões para os soros do grupo C;
- b) os antígenos de coelho e camundongo no grupo A, no grupo B e no grupo A+B;
- c) as provas de CIE e o TN no grupo A, no grupo B e no grupo A+B.

3.7.2 - Para estabelecer se havia correlação significativa entre os títulos obtidos, aplicou-se o teste T de Student, determinando o nível de significância dos resultados.

3.7.3 - Gráficos e tabelas foram elaborados para melhor visualização dos resultados.

3.7.4 - Os títulos obtidos foram expressos em log 5 para o TN e log 2 para a CIE. Para o cálculo da regressão os soros com título < 5 no TN e < 2 na CIE, foram considerados negativos e tiveram valor atribuído igual a zero.

3.7.5 - No TN foi adotado um título máximo de 15625 e aqueles que o excederam foram expressos como >15625. Para efeito de cálculos, na prova de CIE o título máximo foi de 64 e >64 para aqueles que superaram tal título, mesmo sabendo-se o "end-point" dos soros.

3.8. Materiais:

3.8.1 - Equipamentos:

- Fonte e cuba de eletroforese ELOMED (Argentina)
- Voltímetro Simpson.
- Centrífuga Excelsa 2. FANEM Ltda.

-Banho-maria BIOMATIC.

-Calculadora científica HEWLETT & PACKARD 20-S

3.8.2 - Reagentes:

-Agarose Sigma tipo II.

-5-5 Dietil-barbiturato de sódio (Veronal). MERCK.

-Ácido Bórico P.A. MERCK.

-Borato de Sódio P.A. HERZOG.

-Cloreto de Sódio P.A. MERCK.

Na_2HPO_4 . Fosfato diSódico, REAGEN.

KH_2PO_4 . Fosfato Monobásico de Potássio, REAGEN.

-Sacarose P.A. DIFCO.

-Glicina P.A. MERCK.

3.8.3 - Soluções:

3.8.3.a - Salina Fosfatada Tamponada pH 7,2:

Na_2HPO_4 anidro.....8,33 g

KH_2PO_41,09 g

NaCl8,5 g

H_2O bidestilada.....1.000 ml

3.8.3.b – Glicina–Sacarose pH 7,2:

Sacarose.....5,0 g
 Glicina.....0,01 g
 H₂O bidestilada.....100 ml

Esterilizar por filtração.

3.8.3.c – Tampão Veronal, 0.05 M, pH 8,2:

Veronal sódico.....10,31 g
 Tiomersal (pó).....100 mg
 H₂O bidest.estéril q.s.p.....1.000 ml

pH ajustado com HCl 1N

3.8.3.d – Tampão Borato, pH 9,1:

Acido Bórico.....6,184 g
 Borato de sódio (Bórax).....9,536 g
 Cloreto de sódio.....4,384 g
 H₂O bidestil.q.s.p.....1.000 ml

pH ajustado com NaOH 1N

3.8.3.e – Gel de Agarose:

a) Preparar suspensão de agarose a 0,9% em solução de veronal 0,05 M, pH 8,2; em banho–maria em temperatura não superior à 90°C.

b) Distribuir volumes de 10 ml em tubos de ensaio e manter a 4°C até usar.

4 - RESULTADOS

Os resultados foram dispostos em tabelas e gráficos para permitir melhor visualização e comparação dos dados. Considerou-se como título da CIE a última diluição que não produziu bandas de precipitação comparáveis as do sistema controle os títulos neutralizantes foram calculados pelo teste de Reed & Muench (1938). Nas tabelas os títulos estão expressos pela recíproca das diluições.

4.1. Inativação do antígeno:

A inativação do Ag pela betapropiolactona foi suprimida, fazendo-se apenas o tratamento com calor, usando banho-maria a 56°C durante 30 minutos preconizado por Diaz (1985) para inativar enzimas hidrolíticas, pois este tratamento é suficiente para inativar o vírus. Esta modificação foi avaliada através da pesquisa da presença de vírus vivo no Ag tratado, inoculando-se uma amostra de 0,02 ml de Ag puro (40%) por via l.C., em camundongos recém-natos.

As tabelas 1 e 2 demonstram dados referentes à elaboração de vários lotes de Ag. nessas tabelas pode-se ver que após o tratamento pelo calor, a suspensão de cérebro a 40% não apresentava mais vírus vivos, pois não causava mais morte nem em camundongos recém-natos. Assim pode-se concluir que este tratamento é suficiente para inativar o vírus. Não obteve-se boa correlação entre os títulos infectantes antes da inativação e o título dos Ag pela CIE após a inativação. Obteve-se maiores títulos de trabalho na CIE quando o Ag foi produzido em camundongos.

Tabela 1 : Antígeno de coelho, dados sobre produção e inativação

Antígeno N ^o	3/89	7/90	1/91	2/91	3/91	1/92
DL ₅₀ ¹ antes de inativar	10 ^{-7.61}	10 ^{-7.8}	10 ^{-6.81}	10 ^{-5.25}	10 ^{-6.57}	10 ^{-6.36}
Pesquisa de vírus vivo ²	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Título obtido na CIE	2	10	5	5	10	20
N ^o de animais inoculados	9	9	5	5	10	20
Massa de cérebros obtida	16.9 g	18 g	16.6 g	13.4 g	20 g	37.4 g

1 - DL 50 0.03 ml i.c. em camundongos adultos

2 - Presença de vírus vivo avaliada pela inoculação i.c. em camundongos recém-natos

Tabela 2 : Ag de camundongo, dados sobre a produção e inativação

Antígeno N ^o	1/90	2/90	1/91	2/91
DL ₅₀ ¹ antes de inativar	10 ^{-6.83}	10 ^{-7.77}	10 ^{-7.31}	10 ^{-6.35}
Pesquisa de vírus vivo ²	Neg	Neg	Neg	Neg
Título obtido na CIE	30	12	30	10
N ^o de animais inoculados	65	43	64	70
Massa de cérebros obtida	14.4 g	10 g	14 g	14.8 g

1 - DL 50 0.03 ml i.c. em camundongos adultos

2 - Presença de vírus vivo avaliada pela inoculação i.c. em camundongos recém-natos

4.2. Comparação dos tampões veronal e borato.

Os dados da tabela 3 correspondem a 15 amostras de soro de diferentes pacientes (grupo C). A tabela demonstra os títulos obtidos quando as amostras de soro foram submetidas à prova de CIE utilizando tampão veronal e, paralelamente, tampão borato, com Ag de Coelhos nos dois casos, e ao ser titulado pela CIE com os diferentes tampões, apresentou o mesmo título de trabalho. Os títulos dos soros testados variaram com o tampão veronal de < 2 a 2048 e com o tampão borato de < 2 a 1024.

Tabela 3 : Comparação dos títulos de Anticorpos contra a raiva obtidos pela técnica de CIE, utilizando tampão veronal e tampão borato, em amostras de soro de 15 pacientes submetidos a diferentes esquemas de vacinação (grupo C). Os resultados foram expressos em: recíproca das diluições / log na base 2 das mesmas.

Soro Nº	CIE veronal		CIE borato	
	Título	log 2	Título	log 2
01	32	5	32	5
02	16	4	8	3
03	32	5	16	4
04	1024	10	1024	10
05	16	4	8	3
06	512	9	512	9
07	2048	11	1024	10
08	< 2	0	< 2	0
09	2	1	2	1
10	2	1	< 2	0
11	512	9	256	8
12	64	6	64	6
13	2	1	2	1
14	4	2	4	2
15	< 2	0	< 2	0

Os títulos foram expressos em log na base 2 para ambos os casos e submetidos a testes estatísticos para verificar o grau de correlação e determinar se houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos. Estes resultados foram utilizados para traçar a reta da regressão, que pode ser vista na figura 1. Os títulos apresentaram, no máximo, uma diluição de diferença nas duas provas, sendo que esta diferença não foi significativa quando testada contra $p < 0.001\%$. A figura 1 mostra os resultados da plotação feita com os títulos obtidos na CIE utilizando tampão Borato contra os títulos obtidos na CIE utilizando tampão Veronal quando os 13 soros positivos do grupo C foram testados, a equação da regressão linear foi $y = 0,99x + 0,48$ e o coeficiente de correlação(r) entre os títulos obtidos com os dois tampões foi $= 0,98$. Não houve diferenças significativas quando testado contra $p < 0,001$ pelo teste T de Student. Este gráfico sumariza a tabela 3.

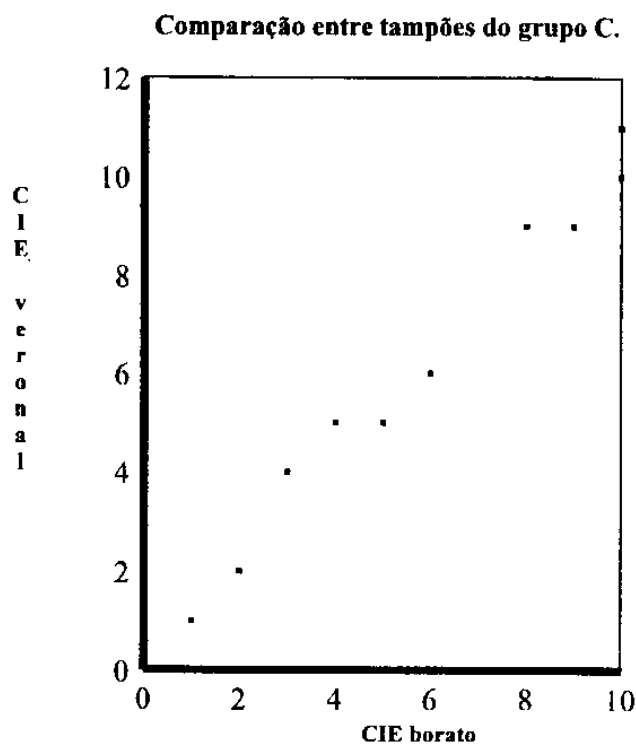


Figura 1 - Regressão linear para valores obtidos na CIE utilizando diferentes tampões em 13 soros positivos, onde $y = 0,99x + 0,48$ e $r = 0,98$.

4.3. Comparação da utilização de Ag produzidos em coelhos com Ag produzidos em camundongos para a prova de CIE.

Segundo Diaz (1980), a contra indicação para o uso de Ag produzido em camundongos seria o fato da vacina Fuenzalida também ser produzida em animais desta espécie, o que possibilitaria a ocorrência de reações inespecíficas. Porém os 12 soros negativos pelo TN também foram negativos pela CIE utilizando o Ag de camundongos no presente trabalho. Foram também testados pela CIE soros de outras 12 pessoas não vacinadas utilizando Ag de camundongo, todos apresentaram resultado negativo (< 2). Tal fato associado à alta correlação obtida entre a CIE com os diferentes lâmpões sugere que reações inespecíficas com o Ag de camundongo parecem não ocorrer. Na tabela 4 pode-se comparar os resultados obtidos quando os soros do grupo A foram submetidos a prova de CIE com Ag produzido em coelhos e com Ag produzido em camundongos.

Tabela 4 - Grupo A: Resultados obtidos no TN e na prova de CIE utilizando Ag de coelho e camundongos para avaliação dos títulos de Ac contra a raiva em pessoas primovacinadas com esquema 7 + 2 doses, amostras foram colhidas nos dias 6, 16, 26 e 36 a contar do início da vacinação.

N °	6 dias			N °	16 Dias		
	CIE ₁	CIE ₂	TN		CIE ₁	CIE ₂	TN
	RD Log ₂	RD Log ₂	RD Log ₅		RD Log ₂	RD Log ₂	RD Log ₅
01	<2/0	<2/0	7/1.2	02	16/4	16/4	6910/5.49
05	<2/0	<2/0	<5/0	06	16/4	16/4	446/3.79
09	<2/0	<2/0	<5/0	10	16/4	16/4	9/1.3
13	8/3	4/2	125/3	14	64/6	>64/6	>15625/6
17	<2/0	<2/0	<5/0	18	8/3	8/3	275/3.48
21	<2/0	<2/0	<5/0	22	16/4	16/4	55/2.48
25	<2/0	<2/0	<5/0	26	8/3	4/2	13/1.59
29	<2/0	<2/0	<5/0	30	8/3	16/4	223/3.35
33	<2/0	<2/0	<5/0	34	16/4	32/5	323/3.58
37	<2/0	<2/0	<5/0	38	32/5	32/5	390/3.71
MG	3	2	2.1	MG	4	4.1	3.4

Continuação da tabela 4:

N :	26 Dias			N :	36 Dias		
	CIE ₁	CIE ₂	TN		CIE ₁	CIE ₂	TN
	RD	RD	RD		RD	RD	RD
	Log ₂	Log ₂	Log ₅		Log ₂	Log ₂	Log ₅
03	16/4	32/5	5623/5,36	04	16/4	16/4	5370/5,33
07	16/4	16/4	977/4,27	08	8/3	8/3	1143/4,37
11	8/3	4/2	16/1,72	12	8/3	16/4	1778/4,64
15	32/5	32/5	15625/6	16	16/4	16/4	15625/6
19	16/4	16/4	1096/4,34	20	32/5	32/5	625/4
23	16/4	16/4	3125/5	24	16/4	32/5	6760/5,47
27	16/4	16/4	263/3,46	28	2/1	4/2	2160/4,77
31	8/3	16/4	398/3,71	32	8/3	8/3	1348/4,47
35	16/4	64/6	3125/5	36	8/3	16/4	8128/5,59
39	>64/6	>64/6	15625/6	40	64/6	32/5	6918/5,49
MG	4,1	4,4	4,48	MG	3,6	3,9	5,01

CIE₁ - Utilizando Ag produzido em CoelhosCIE₂ - Utilizando Ag produzido em Camundongos

RD - Recíproca da diluição

MG - Média Geométrica.

A figura 2 mostra os resultados da plotação feita com os títulos obtidos na CIE utilizando o Ag de coelhos contra os títulos obtidos na CIE utilizando o Ag de camundongo quando 35 soros positivos do grupo A foram testados, a equação da regressão linear foi $y = 0,67 + 0,79x$ e o coeficiente de correlação (r) entre os títulos obtidos com os dois antígenos foi = 0,83. Não houve diferenças significativas quando testado contra $p < 0,001$ pelo teste T de Student. A figura 2 sumariza a tabela 4.

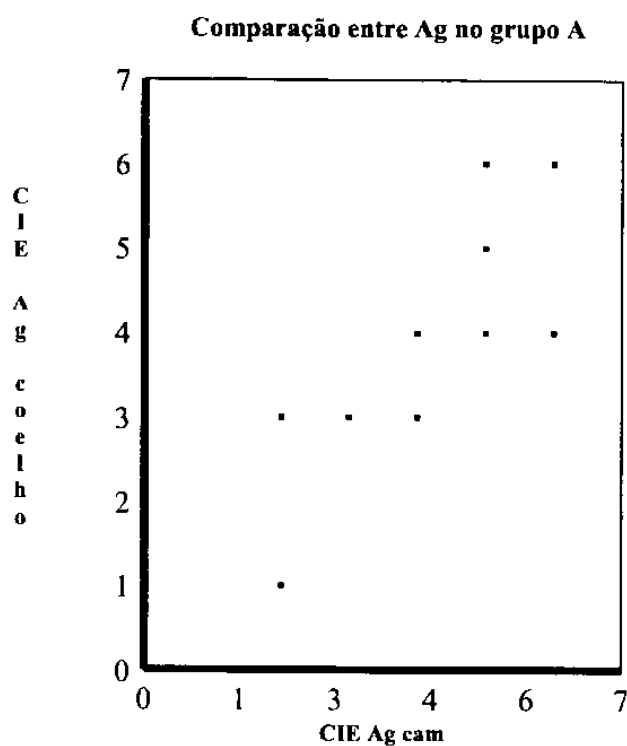


Figura 2 - Regressão linear para valores obtidos na CIE utilizando diferentes tampões em 13 soros positivos, onde $y = 0.67 + 0.79x$ e $r = 0.83$.

Na tabela 5 pode-se comparar os resultados obtidos quando os soros do grupo B foram submetidos à prova de CIE com Ag produzido em coelhos e com Ag produzido em camundongos.

A figura 3 mostra os resultados da plotação feita com os títulos obtidos na CIE utilizando Ag de camundongos contra a CIE utilizando Ag de coelhos quando os 26 soros positivos do grupo B foram testados, os títulos foram expressos em log 2 para ambas CIE, a equação da regressão linear foi: $y = -0.61 + 0.85x$ e o valor de r entre os títulos foi $= 0.95$. Não houve diferenças significativas contra $p < 0.001$ pelo teste T de Student. A figura 3 resume parte da tabela 5.

Tabela 5 - Grupo B: Resultados obtidos no TN e na prova de CIE utilizando Ag de coelho e camundongos para avaliação dos títulos de Ac contra a raiva em pessoas revacinadas com uma dose 10 anos após receberem tratamento completo anti-rábico. amostras foram colhidas nos dias zero, 7 e 30 a contar do início da vacinação.

N :	Zero dia			N :	7 Dias		
	CIE ₁	CIE ₂	TN		CIE ₁	CIE ₂	TN
	RD Log ₂	RD Log ₂	RD Log ₅		RD Log ₂	RD Log ₂	RD Log ₅
41	<2/0	<2/0	<5/0	42	16/4	16/4	91,2/2,0
44	16/4	16/4	>15625/6	45	64/6	>64/4	15625/6
47	<2/0	<2/0	<5/0	48	8/3	8/3	102/3,2
50	4/2	4/2	25/2	51	32/5	>64/6	625/4
53	2/1	<2/0	12,5/1,56	54	4/2	2/1	204/3,3
56	<2/0	<2/0	<5/0	57	<2/0	<2/0	<5/0
59	4/2	4/2	60/2,62	60	1/2	4/2	79/2,71
62	4/2	4/2	19,5/1,84	63	32/5	32/5	1348/4,47
65	<2/0	<2/0	9/1,36	66	16/4	16/4	635/4,
68	8/3	8/3	331/3,6	69	64/6	>64/6	>15625/6
MG	2,3	2,6	2,7		4,1	4,1	4,05

N :	30 Dias		
	CIE ₁	CIE ₂	TN
	RD Log ₂	RD Log ₂	RD Log ₅
43	8/3	16/4	54/2,47
46	64/6	64/6	>15625/6
49	16/4	16/4	2454/4,84
52	>64/6	>64/6	9332/5,67
55	8/3	4/2	199/3,28
58	8/3	16/4	55/2,62
61	32/5	16/4	990/4,28
64	32/5	32/5	316/3,57
67	16/4	16/4	990/4,28
70	>64/6	>64/6	>15625/6
MG	5,0	4,0	4,3

CIE₁ Utilizando Ag produzido em Coelhos

CIE₂ Utilizando Ag produzido em Camundongos

RD - Reciprocidade da diluição

MG - Média Geométrica.

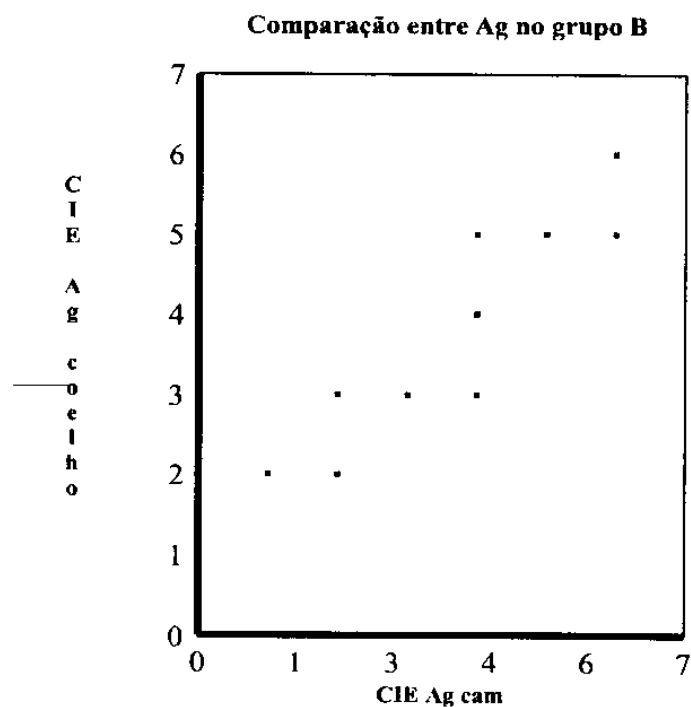


Figura 3 - Regressão linear para valores obtidos pela CIE com Ag de coelhos contra Ag de camundongos em 26 soros positivos onde: $y = 0,61 + 0,5 x$ e $r = 0,95$.

Correlação geral entre os Ag: Na figura 4 observa-se os resultados da plotação feita com os títulos obtidos na CIE com Ag de coelhos contra os títulos obtidos na CIE com Ag de camundongos quando os 61 soros do grupo A+B foram testados, a equação da regressão linear foi: $y = 0,53 + 0,84x$ e obteve-se $r = 0,92$. Os resultados foram submetidos ao teste T de Student, sendo significativo contra $p < 0,001$.

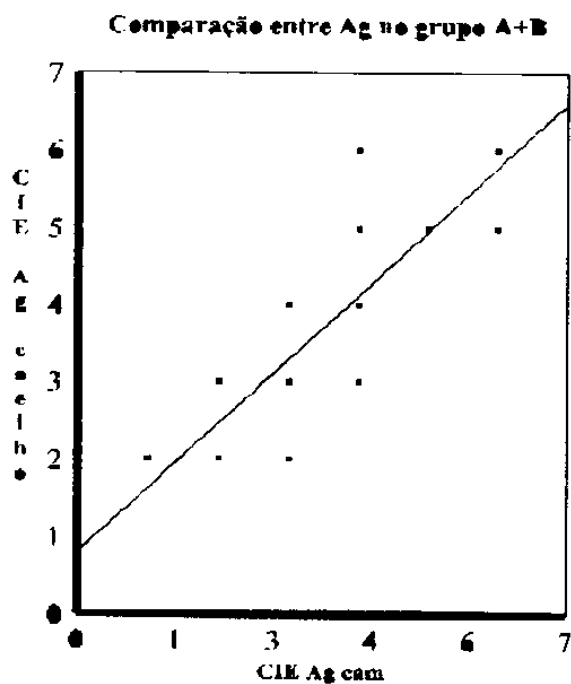


Figura 4 - Regressão linear para valores obtidos na CIE utilizando Ag produzido em camundongos e Ag produzido em coelhos em 61 soros positivos, onde $y = 0,53 + 0,84x$ e $r = 0,92$

4.4. Correlação entre a CIE, com as modificações adotadas e o TN.

Foram comparados os resultados da CIE com os resultados do TN nos grupos A, B e A+B. Esta comparação foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação (r) entre os resultados obtidos nas duas provas, elaborando-se os gráficos das retas de regressão.

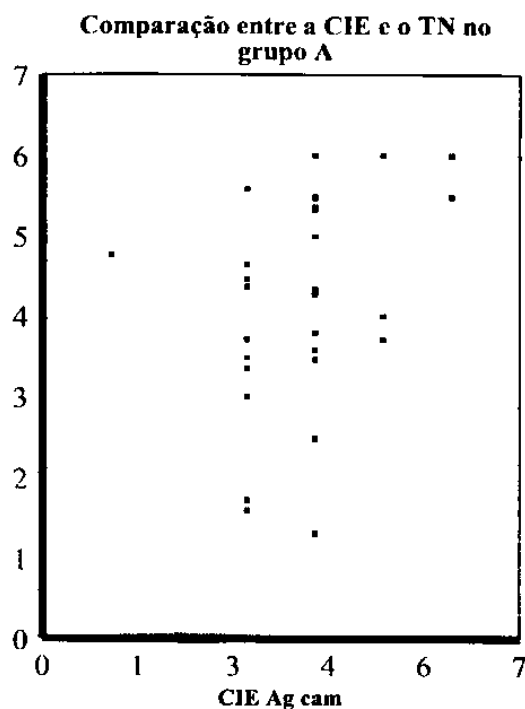


Figura 5 Regressão linear para valores obtidos no TN e na CIE utilizando Ag produzido em coelhos em 35 soros positivos, onde: $y = 1,97 + 0,57x$ e $r = 0,51$.

4.4.1. Grupo A

Os dados da tabela 4 correspondem a 40 amostras de soro dos 10 pacientes que formam o grupo A, estas amostras foram testadas na prova de CIE e no TN. A CIE foi efetuada utilizando Ag de Coelho, para estabelecer o grau de correlação entre a CIE com tal Ag e o TN. A maior diluição realizada na CIE foi de 64 e no TN de 15625, tendo alguns soros ultrapassado estes títulos. Os títulos foram também expressos em log na base 2 para a CIE e log na base 5 para o TN e submetidos ao cálculo da regressão e a testes estatísticos, visando estabelecer o grau de correlação entre as provas e avaliação do nível de significância.

A figura 5 mostra a plotação feita com os títulos obtidos na CIE utilizando o Ag de coelhos e o TN quando os 35 soros positivos do grupo A foram testados. Os títulos foram expressos em log 2 para a CIE e log 5 para o TN. a equação da regressão linear foi: $y = 1,97 + 0,57x$ e foi obtido um valor de $r = 0,51$. Não houve diferenças significativas quando testado contra $p < 0,01$ pelo teste T de Student.

4.4.2 Grupo B.

Os dados da tabela 5 correspondem a 30 amostras de soro dos 10 pacientes que formam o grupo B. Estas amostras foram testadas na prova de CIE e no TN. A CIE foi efetuada utilizando Ag de Coelhos. A maior diluição realizada na CIE foi de 64 e no TN de 15625, tendo alguns soros ultrapassado estes títulos. Os títulos foram também expressos em log na base 2 para a CIE e log na base 5 para o TN e submetidos ao cálculo da regressão e testes estatísticos, visando estabelecer o nível de correlação entre provas e entre antígenos e avaliação do grau de significância.

Os resultados da tabela 5 demonstram que a prova apresenta 100% de sensibilidade pois todos os soros negativos pelo TN (< 5), também foram negativos pela CIE (< 2). Também fica fácil observar que os títulos obtidos nas duas provas apresentaram boa correlação neste grupo.

A figura 6 mostra os resultados da plotação feita com os títulos obtidos na CIE, utilizando o Ag de coelhos, contra os resultados obtidos no TN quando os 26 soros positivos do grupo B foram testados. Os títulos foram expressos em log 2 para a CIE e log 5 para o TN, e a equação da regressão linear foi: $y = 0,90 + 0,78x$, o valor de r obtido entre as duas provas foi $= 0,89$. Não houve diferenças significativas quando testado contra $p < 0,001$ pelo teste T de Student.

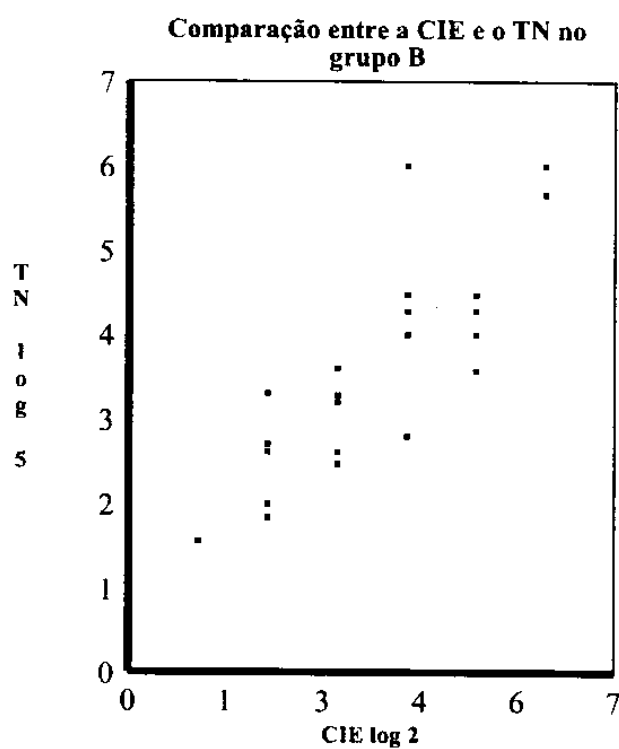


Figura 6 – Regressão linear para valores obtidos no TN e na CIE utilizando Ag produzido em coelhos em 26 soros positivos, onde: $y = 0.90 + 0.78x$ e $r = 0.89$.

4.4.3. Correlação geral entre a CIE e o TN:

Foi calculada a correlação geral entre a CIE e o TN, utilizando-se os soros do grupo A+B, com o Ag de coelho, com a finalidade de construir-se uma tabela que determinasse os títulos esperados no TN através dos títulos obtidos pela CIE.

A figura 7 mostra os resultados da plotação feita com os títulos obtidos na CIE utilizando o Ag de coelhos e os títulos obtidos no TN quando os 61 soros positivos do grupo A+B foram testados, os

titulos foram expressos em log 2 para a CIE e log 5 para o TN, obteve-se um valor de $r = 0,70$ e não houve diferenças significativas quando testado contra $p < 0,001$ pelo teste T de Student. A equação da regressão linear foi: $y = 1,35 + 0,69x$ e o dado $b = 0,70$ deve ser interpretado como o aumento no titulo do TN em log 5 por unidade de CIE em log 2 para obter uma estimativa do titulo do TN baseado no resultado da CIE, a seguinte conversão deve ser usada: titulo log 5 TN = $1,35 + 0,69 \times [\text{titulo da CIE log 2}]$. Obteve-se a seguinte estimativa de titulos neutralizantes com base nos resultados da CIE no grupo A+B.

TN	CIE
2	27
4	83
8	251
16	778
32	2.399
64	7.413
128	22.908

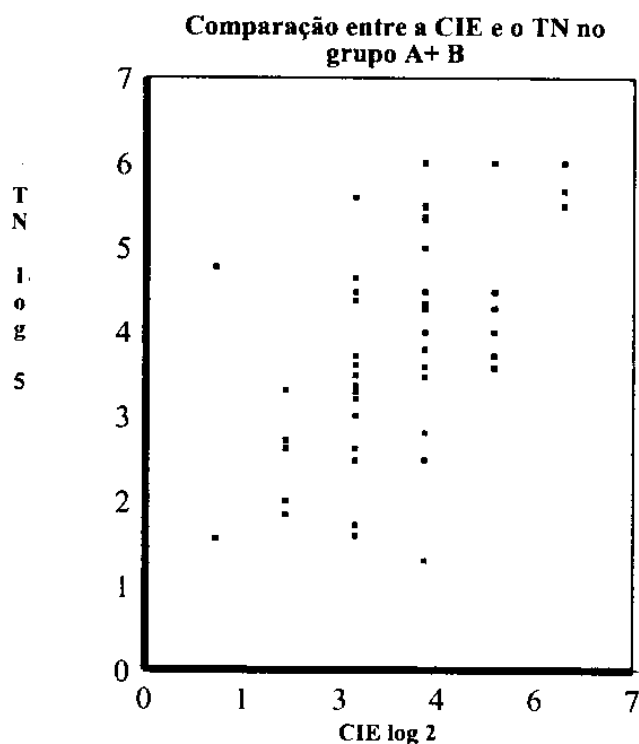


Figura 7 -- Regressão linear para valores obtidos no TN e na CIE utilizando Ag produzido em coelhos em 61 soros positivos, onde: $y = 1,35 + 0,69x$ e $r = 0,70$.

4.4.4 Sensibilidade e especificidade

Foram calculadas a sensibilidade e a especificidade no grupo A+B com os resultados obtidos com os diferentes antígenos na CIE. Foram obtidos os seguintes resultados.

a) Antígeno de coelho	b) Antígeno de camundongo
Positivos verdadeiros = 56	Positivos verdadeiros = 55
Falso positivos = 0	Falso positivos = 0
Negativos verdadeiros = 12	Negativos verdadeiros = 12
Falso negativos = 2	Falso negativos = 3
Sensibilidade = 96%	Sensibilidade = 95%
Especificidade = 100%	Especificidade = 100%

4.5 Curva de anticorpos

Foram elaborados gráficos utilizando as médias geométricas dos títulos obtidos para cada dia de colheita. cada gráfico apresenta os resultados do TN, da CIE com antígeno de coelho e com antígeno de camundongos, assim como o título neutralizante estimado com base no resultado da CIE com antígeno de coelho. A figura 8 representa o grupo A, podemos ver que as curvas estão bem semelhantes, havendo maior divergência de resultados no dia 36. A figura 9 representa o grupo B, onde houve uma coincidência ainda maior.

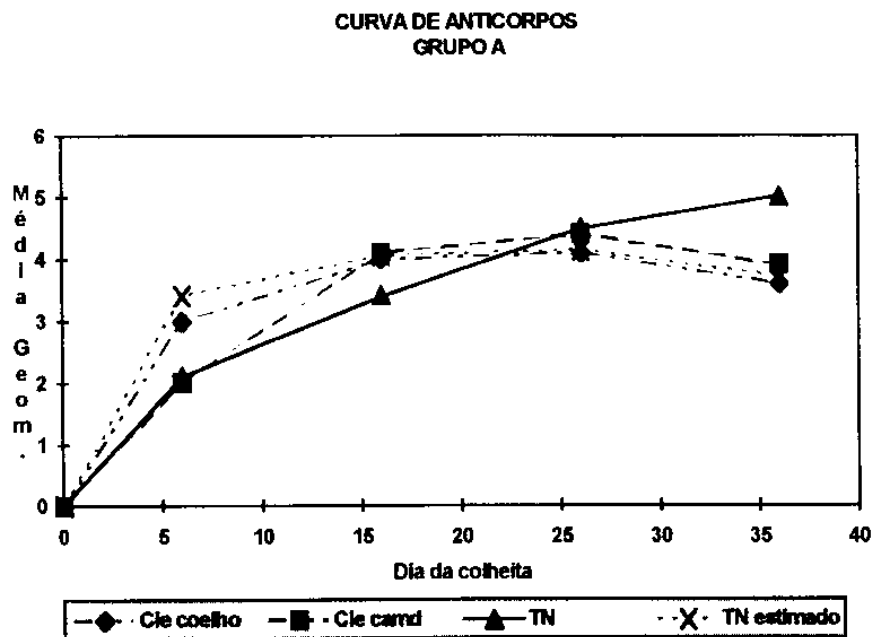


Figura 8 - Plotação dos resultados obtidos com os 31 soros positivos do grupo A pela CIE com Ag de coelho e camundongo, o TN e o título de TN estimado com o resultado obtido pela CIE Ag coelho com a fórmula da correlação geral ($y = 1,35 + 0,69x$).

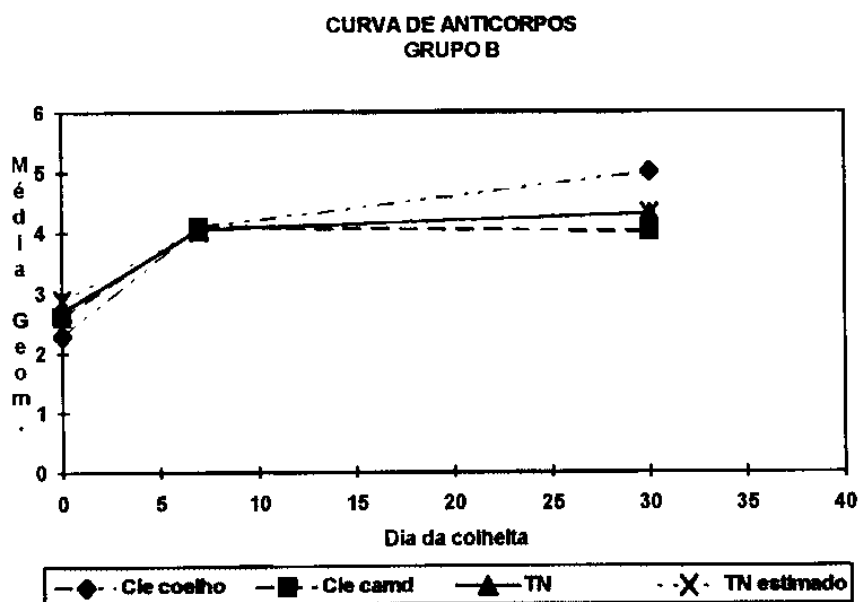


Figura 9 - Plotação dos resultados obtidos com os 25 soros positivos do grupo B pela CIE com Ag de coelho, Ag de camundongo, TN e o título de TN estimado com o resultado obtido pela CIE Ag coelho com a fórmula da correlação geral ($y = 1,35 + 0,69x$).

5 - DISCUSSÃO

5.1. Inativação do Ag.

Pode-se observar nas tabelas 1 e 2 que o tratamento a 56°C por 30 minutos preconizado por Diaz (1985) para inativar enzimas líticas presentes nos tecidos, é suficiente para que a suspensão de Ag a 40% não cause a morte de camundongos recém-natos inoculados com 0,02 ml por via I.C, tal resultado é coerente com o relato de Turner et al. (1967), de que o vírus rábico presente em suspensões aquosas de tecido nervoso é inativado quando submetido a temperatura de 60°C durante 5 minutos.

A inativação assim procedida permite uma substancial simplificação na elaboração do Ag através da supressão de varias etapas desta prática. tais como: a mistura com a betapropiolactona. a incubação a 37°C durante 120 minutos, a manutenção a 4°C durante uma noite e a concentração com polietilenoglicol (PEG).

Foram produzidos e testados vários Ag em coelhos (Tabela 1) e camundongos (Tabela 2) utilizando esta técnica.

A adoção desta simplificação na inativação suprimindo o tratamento com betapropiolactona torna a elaboração do Ag muito mais simples e menos onerosa, dispensando o uso de reagentes caros e equipamentos mais sofisticados. Isto permitirá que a CIE seja adotada por um maior número de laboratórios.

5.2. Comparação entre o tampão Veronal e o tampão Borato para eletroforese.

Analisando a tabela 3, observa-se que os títulos variaram de <2 a 2048 com o veronal e de <2 a 1024 com o borato. Houve ótima correlação entre os diferentes tampões e não havendo diferença maior que uma diluição entre os resultados encontrados. O soro 15 apresentou título negativo (1:2) na prova utilizando o borato enquanto com o veronal foi detectado um título de 1:2. provavelmente o título neutralizante desse soro é baixo, o que pode gerar falsos negativos, (pois a CIE apresenta uma sensibilidade menor que o TN, 96% com antígeno de coelho).

Os resultados obtidos com o tampão borato confirmam os relatos de Campbell (1970), de que o borato é um bom substituto para o tampão veronal em técnicas eletroforéticas de detecção da reação Ag/Ac, segundo este autor, têm-se reportado boas definições de resultados.

Quando os resultados da CIE utilizando tampão Borato e tampão Veronal foram submetidos a análise estatística não houve diferenças significativas entre tais resultados. Sendo o coeficiente de correlação de 0.98.

Foram obtidos títulos iguais, quando um mesmo Ag foi titulado com os diferentes tampões pela CIE para determinar o título ideal de trabalho.

Tais fatos significam que o tampão borato é um bom substituto para o tampão veronal, e além da boa correlação de resultados tem-se ainda como propriedades do Borato uma durabilidade superior, uma estabilidade maior e ainda a principal vantagem que é o custo por litro de solução 33 vezes menor que o do Veronal. Baseado nestes fatos pode-se dizer que, para a utilização na CIE, as maiores diferenças entre tais tampões são o preço e a durabilidade, e ainda que os dados obtidos em nosso estudo confirmam ser o borato um ótimo tampão para a CIE na pesquisa de Ac para raiva.

5.3. Comparação da utilização de antígeno de coelho e antígeno de camundongos para a prova de CIE.

Segundo Diaz (1980), a contraindicação para o uso de antígeno produzido em camundongos seria o fato da vacina Fuenzalida também ser produzida em animais desta espécie, o que possibilitaria a ocorrência de reações inespecíficas. Porém como pode ser visto na tabela 4 os 8 soros negativos pelo TN no grupo A, também foram negativos pela CIE utilizando o Ag de camundongo, assim como na tabela 5, podemos ver que os 4 soros negativos pelo TN no grupo B também foram negativos pela CIE com o Ag em questão. Foram ainda testados pela CIE soros de 12 pessoas não vacinadas utilizando Ag de camundongo, todos apresentaram resultado negativo ($<1:2$). Estes fatos associados as altas correlações obtidas entre a CIE com os diferentes Ag nos grupos A, B e a correlação geral com o grupo A+B, sugerem que reações inespecíficas com o Ag de camundongo parecem não ocorrer. Uma possível explicação para este fato é que segundo os próprios autores (Diaz & Myers, 1980); "a técnica de CIE modificada removeu os problemas de reações inespecíficas

(Diaz & Myers, 1980): "a técnica de CIE modificada removeu os problemas de reações inespecíficas desde que a amostra de soro a ser testada é inicialmente misturada com o Ag. incubada, e então colocada nos orifícios localizados no lado catódico da lâmina. Durante a eletroforese, qualquer componente inespecífico do soro", (e portanto do antígeno também), "migra na direção oposta à da formação das bandas de precipitação".

Na tabela 4 pode-se observar os resultados da comparação entre os antígenos de coelho e camundongo para CIE com os soros do grupo A. Não houve diferença maior que uma diluição entre os títulos dos soros obtidos com os diferentes antígeno pela CIE.

O quadro 1 mostra os resultados do tratamento estatístico do grupo A, no qual foi obtido $r = 0,83$ e não houve diferenças significativas quando testado contra $p < 0,001$.

Quadro 1: Resumo dos resultados do tratamento estatístico do grupo de primovacinados

	a	b	r	p
Antígeno de coelho x TN	1,97	0,57	0,51	<0,01
Antígeno de camd. x TN	1,38	0,69	0,64	<0,001
Ag coelho x Ag camd.	0,67	0,79	0,83	<0,001

Na tabela 5 pode-se observar os resultados da comparação entre os antígenos de coelho e camundongo para CIE com o grupo B. Também não houve diferença maior que uma diluição entre os títulos dos soros obtidos com os diferentes antígenos pela CIE. O quadro 2 resume o tratamento estatístico do grupo B, no qual foi obtido $r = 0,95$ - não houve diferença significativa quando testado contra $p < 0,001$.

Quadro 2: Resumo dos resultados do tratamento estatístico do grupo de revacinados.

	a	b	r	p
Antígeno de coelho x TN	0,90	0,78	0,89	<0,001
Antígeno de camd. x TN	1,39	0,65	0,82	<0,001
Ag coelho x Ag camd.	0,61	0,85	0,95	<0,001

No quadro 3 pode-se ver os testes feitos com os soros do grupo A+B, obtendo-se um valor de $r = 0,92$ - não houve diferenças significativas quando testado contra $p < 0,001$.

Quadro 3: Resumo dos resultados do tratamento estatístico do grupo A+B

	a	b	r	p
Antígeno de coelho x TN	1,35	0,69	0,70	<0,001
Antígeno de camd. x TN	1,39	0,67	0,73	<0,001
Ag coelho x Ag camd.	0,53	0,84	0,92	<0,001

Os resultados sugerem não haver problemas de interferência com o antígeno de camundongos na prova de CIE, tal antígeno pode ser uma alternativa para laboratórios que por algum motivo não consiga sustentar a produção do antígeno em coelhos ou para cobrir eventuais períodos de falta de coelhos.

5.4. Correlação entre a CIE com as modificações adotadas e o TN.

A tabela 4 relaciona os resultados obtidos com os testes feitos no grupo A, sendo que o valor de r obtido (0,51) entre a prova de CIE e o TN neste grupo foi menor que as do grupo B (0,89). Este valor de r foi também inferior aqueles descritos por Diaz & Myers (1980 e 1981) de 0,58 e 0,60 e por Diaz (1983) de 0,82.

Suspeita-se que tais valores inferiores de r podem ser devido ao fato destes soros estarem estocados a muito tempo (aproximadamente 15 anos no grupo A), pois segundo Thrusfield (1986). haveria um declínio dos Ac específicos em soros submetidos a estocagem prolongada a -20°C devido a formação de fragmentos Fab monovalentes. O autor relata ainda que a estocagem ininterrupta a -20°C , parece ser satisfatória, havendo muito pouca perda de atividade específica por no mínimo 2 anos, no entanto, dados precisos sobre tal fato não são conhecidos, mas o descongelamento e o recongelamento seriam deletérios.

Ainda na tabela 4, pode-se observar que não houve falsos positivo pela CIE. ou seja, todos os soros negativos pelo TN também foram negativos pela CIE, dando um resultado de 100% de especificidade. Houve um soro com resultado >15625 pelo TN que apresentou resultado = 64 com antígeno de coelho e >64 com antígeno de camundongos. Dos três soros que apresentaram resultado = 15625 pelo TN, um apresentou resultado >64 com os dois antígeno pela CIE e os demais apresentaram títulos inferiores a 64. O soro de nº 1 apresentou resultado falso negativo com ambos antígeno na CIE, pois apresenta título neutralizante baixo e a CIE é menos sensível que o TN. obtivemos uma estimativa de 96% de sensibilidade com o antígeno de coelhos ao testarmos os resultados do grupo A+B.

Podemos observar na tabela 4 que, aos 6 dias do início da vacinação, dos 10 pacientes apenas 2 apresentaram resposta detectável pelo TN, sendo que destes, apenas 1 apresentou resposta detectável pela CIE. Aos 16 dias todos os pacientes estavam soroconvertidos pelo TN e pela CIE com ambos antígenos. Os pacientes permaneceram positivos até o último dia de colheita.

Na tabela 5 pode-se observar os resultados do grupo B, constatando que houve boa correlação quando se comparou a CIE com o TN. O valor de r obtido está de acordo com os relatados por Diaz (1983), e foi superior aos descritos inicialmente por Diaz e Myers (1980 e 1981), os soros que complete este grupo foram colhidos a 5 anos em média. Analisando a resposta dos pacientes, observamos que no dia zero, 7 (70%) dos 10 pacientes ainda apresentavam títulos detectáveis pelo TN 10 anos após receberem tratamento completo (7+2), destes, 6 obtiveram título na CIE com antígeno de coelho e 5 com o antígeno de camundongo. No 7º dia após a revacinação com dose única, 9 (90%) dos pacientes apresentaram título detectável tanto pelo TN quanto pela CIE com os diferentes antígenos. No dia 30, os 10 (100%) pacientes apresentavam título satisfatório tanto na CIE quanto pelo TN.

Não houve falsos positivos pela CIE, ou seja, todos os soros negativos pelo TN também foram negativos pela CIE (100% de especificidade). O soro de nº 53 apresentou um resultado falso negativo pela prova de CIE utilizando o antígeno de camundongos, quando comparado com o resultado do TN (1:12,5), o soro nº 65 apresentou títulos negativos com ambos antígenos na CIE, apresentando um título 1:9 no TN, tais resultados falso negativos devem-se a uma menor sensibilidade da Prova de CIE com relação ao TN. Dos 5 soros com título >15625 pela SN. 4 obtiveram título >64 (80%) com os dois antígenos na CIE. Na CIE com antígeno de coelho, houve cinco títulos >64 e destes, 4 (80%) foram >15625 pelo TN, com o antígeno de camundongo houve seis títulos >64 dos quais 4 (66%) foram >15625 pelo TN. Pode-se observar que os soros 11 e 12 foram coincidentes nos títulos altos pela CIE com os diferentes antígenos embora os resultados do TN tenham sido comparativamente mais baixos.

Ao se proceder o cálculo da regressão geral, estudando o grupo A+B, obteve-se um valor de $r = 0.70$ com o antígeno de coelho que foi testado contra $p < 0,001$ não havendo diferenças significativas, Este valor de r esta dentro da faixa relatada por Diaz et al, (1986), quando foi comparado o grau de correlação entre os títulos obtidos pelo TN feita no CEPANZO com os títulos obtidos pela CIE em 3 diferentes laboratórios da Argentina, 1 laboratório da Venezuela e também no CEPANZO.

Obteve-se valores de r (0,70) com o antígeno de coelho superiores aos valores descritos inicialmente por Diaz & Myers (1980 e 1981) de 0.58 e 0.60 para a correlação entre os resultados obtidos pela titulação de soros na prova de CIE e no TN, porém tal valor foi inferior ao descrito por Diaz (1983) utilizando antígeno já produzido com uso de glicina e sacarose (0,82).

Todos os soros negativos pelo TN ($<1:5$) também foram negativos pela CIE com os dois antígeno, o que revelou uma especificidade de 100% para a prova de CIE com ambos. Alguns soros com título baixo no TN deram título negativo na CIE como era esperado, pois a CIE é menos sensível que o TN. Obteve-se assim 96% de sensibilidade para a CIE com o antígeno de coelho e 95% com o antígeno de camundongo.

5.5 - Curva de anticorpos

Foram feitas as plotações das médias geométricas dos títulos do TN. CIE Ag coelho e CIE Ag camundongo, do grupo A e do grupo B, de acordo com o dia de colheita.

A figura 8 mostra a plotação dos resultados do grupo A, pode-se observar que as linhas são bastante próximas, havendo uma maior divergência no dia 36, onde a média no TN foi superior. A relação entre a CIE e o TN foi utilizada para calcular uma curva teórica de anticorpos neutralizantes através dos títulos obtidos na CIE com antígeno de coelho.

A figura 9 mostra a plotação dos resultados do grupo B, neste caso a coincidência das curvas é ainda maior. A relação entre a CIE e o TN foi também utilizada para calcular uma curva teórica de anticorpos neutralizantes com os resultados obtidos na CIE com antígeno de coelho.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem tirar as seguintes conclusões:

1 - O antígeno produzido adotando apenas o tratamento a 56°C para inativação, apresenta resultados satisfatórios, o que implica em maior simplificação e economia, na técnica de CIE.

2 - O tampão Borato pH 9.1, é um bom substituto para o tampão Veronal pH 8,2 na técnica de CIE, permitindo tornar a prova menos onerosa.

3 - O Antígeno produzido em camundongos apresentou bons resultados, com ótima correlação com aqueles obtidos com antígeno de coelho, e não houve interferência detectável que pudesse ser atribuída ao fato do antígeno e da vacina Fuenzalida serem produzidas em camundongos. O uso de antígeno de camundongos seria opcional para laboratórios que apresentem dificuldades na criação de coelhos.

4 - A CIE apresenta boa correlação com o TN. Apesar de ser menos sensível, sua rapidez permite que os resultados tenham valor clínico, o que possibilita as equipes de saúde, modificar o curso de um tratamento anti-rábico.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ARKO, R.J.; SCHNEIDER, L.G.; BAER, G.M. Nonfatal canine rabies. *Amer. J. Vet. Res.* 34: 937-938, 1973.
- 2 - ATANASIU, P.; BANMAYAR M; BALTAZARD, M.; KOMAROV, A., et al. Rabies neutralizing antibodies response to diferent schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons. *Bull. WHO.* 14: 593-611, 1956.
- 3- ATANASIU, P.; PERRIN, P. Epreuve immunoenzymatique pour la deteccion rapide des anticorps antirabiques. *Ann. Microbiol. Paris, A* 128: 489-498, 1977.
- 4 - BAER, G.M.; SHANTA, T.R.; BOURNE, G.H. The pathogenesis of street rabies virus in rats. *Bull. WHO.* 38: p.119-125, 1968.
- 5-BAER, G.M.; CLEARLY, W.F. A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. *J. Inf. Dis.* 125: p.520-527, 1972.
- 6 - BAER, G.M. Pathogenesis to the central nervous system infection. In: *The Natural History of Rabies.* Ac. Press, N.Y., 1 v., 1975. n p., p.181-198.
- 7 - BELL, J.F.; MOORE, G.J.; RAYMOND, G.H. Protective survival of a rabies infected insetivorous bat after infection by bite. *Am. J. Trop. Hyg.* 18: p.61-66, 1969.
- 8 - BELL, J.F.; GONZALES, M.A.; DIAZ, A.M. MOORE, G.J. Non- fatal rabies in dogs: experimental studies and results of a survey. *Amer. J. Vet. Res.* 32. p.2049-2058, 1971.
- 9 - BLENDEN, D.C.; BELL, J.F.; TSAO, A.T.; UMOH, J.U. Immunofluorescent examination of the skin of rabies infected animals as a means of early detection of rabies virus antigen. *J. Clin. Microb.* 18: p.631-636, 1983.

- 10 - CAMPBELL, D.H.; GARVEY, J.S.; CREMER, N.E.; SUSSDORF, D.H. Methods in immunology, A laboratory text for instruction and research, 2. ed. Massachussets; W.A.Benjamin Inc.1970, 454p. Reagents, p.430-431.
- 11 - CAMPOLINA, D.C.C. & REIS, R. Comparative studies beetwen indirect immunofluorescence and serum neutralization procedures in rabies antibodies titration of vaccinated cale, Arq. Esc.UFMG. 27: p.29-37, 1975.
- 12 - CHARLTON, K.M.; CASEY, G.A. Experimental rabies in skunks: persistence of the inoculation site. Can. J. Comp. Med. 45: p.357-362, 1981.
- 13 - CHARLTON, K.M.; CASEY, G.A.; BOUCHER, D.W.; WIKTOR, T.J. antigenic variants of rabies virus. Comp. Immun. Microb. Inf. Dis. 5: p.113-115, 1982.
- 14 - CONSTANTINE, D.G. Rabies transmission by nonbite route. Publ. Hlth. Rep. 77: p.287-289, 1962.
- 15 - CORREA, G.P.; ALLEN, R.; SUCKLIN, S.E. the infectivity an pathogenesis of rabies virus administered orally. Am. J. Epid. 91: p.203-215, 1970.
- 16 - CRANDELL, R. A. Rabies in Northern Greenland: some observations on the epizootiology and etiology. Proc Nat.Rabies Symp., Atlanta, G. A., 1966.
- 17 - CRICK, J. & BROWN, F. Rabies virus and the problem of rabies vaccination in man. Trans. Roy. Trop. Med. Hyg. 70(3) p.196-201, 1976.
- 18 - DEAN, D.J.; EVANS, W.M.; THOMPSON, W.R. Studies on the low-egg-passage Flury strain of modified live rabies virus produced in embryonated chicken eggs and tissue culture. Am. J. Vet. Res. 25: p.756-763, 1964.
- 19 - DIAZ, A.M.; VARELA DIAZ V. M., Detection of antigenic differences among street and fixed rabies virus strains by the counterimmunoelectrophoresis test. Zbl. Bakt. Hyg. orig. A 236: p.185-190, 1976.
- 20 - DIAZ, A. M.; VARELA DIAZ, V.M. The conterimmuno- electrophoresis test for detection of antibodies to rabies virus. Ann. Microbiol (Paris) A 128: p 331-337, 1977.

- 21 - DIAZ, A.M. & MYERS, D.M.; Determination of serum neutralization antibodies to rabies virus by a modified counterimmunoelectrophoresis test. *J. Clin. Microb.* 12(2): p.175-179, 1980.
- 22 - DIAZ, A.M. & MYERS, D.M.; Comparision beetwen a modified counterimmunoelectrophoresis test and the indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to rabies virus in human sera. *J. Clin. Microb. Oc.* 14 (4): p.446-448, 1981.
- 23 - DIAZ, A.M. Rabies neutralizing antibodies determination by the modified cie test and the rapid fluorescet focus inibition test. *Zbl. Bakt. Hyg.* A256: p.1-6, 1983
- 24 - DIAZ, A.M. Tecnica de contraimmunoelectroforesis para el diagnostico serologico de la rabia; OMS, CEPANZO, serie de monografias cientificas n°13, Martinez, 1985.
- 25 - DIAZ, A.M.; ARISPE, E.; BRUNEL, C.; CAVANDOLI, C.; DELLEPINE, N.; MIRANDA, A. La tecnica de contraimmunoelectroforesis para ladeterminacion de anticuorpos antirrabicos. *Boll. Of. Sanit. Panam.* 101 (3), p 225-261, 1986.
- 26 - DIERKS, R.E.; MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K. Extraneural rabies infection. Virus development in fox salivary gland. *Amer. J. Pathol.* 54: p.251-273, 1969.
- 27 - DIERKS, R.E. Eletron microscopy of extraneural rabies infection In: *The Natural History of Rabies*, Baer, G.M. ed. Ac. Press, NY, 1975, Vol 1, p.308-318. 28-FEKADU, M.; BAER, G.M. Recovery from clinical rabies of two dogs inoculated with rabies virus strain from Ethiopia. *Amer. J. Vet. Res.* 41: p.1632-1634, 1980.
- 29 - FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; BAER, G.M. Intermient excretion of rabies in the saliva of a dog two and six months after it had recovered from experimental rabies. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 30: p.1113-1115; 1981.
- 30 - FENJE P. A rabies vaccine from hamster kidney tissue cultures: preparation and evaluation in animals. *Can. J. Microbiol.* 6: p.605-609, 1960.
- 31 - FLAMAND, A.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and related virus proteins. I the nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 48: p.97-104, 1980 - a.

- 32 - FLAMAND, A.; WIKTOR, T.J., KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and related virus proteins. II the glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 48: p.105-109, 1980 - b.
- 33 - FOX, J.P. Prophylaxis against rabies in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 70, p.480-494, 1958.
- 34 - FUENZALIDA, E. & PALACIOS, R. Um metodo mejorado en la preparacion de la vacuna antirrábica. *Bol. Inst. Bact. Chile*, 8: p.3-10, 1955.
- 35 - FUENZALIDA, E. & PALACIOS, R.; BORGONO, J.M. Antirabies antibody response in man to vaccine made from infected suckling mouse brains. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 30: p.431-436, 1964.
- 36 - FUENZALIDA, E. Consideraciones sobre la vacuna en cerebro de raton lactente, *Salude Publica de México*, 16 (3): p.443-450, 1974.
- 37 - FUJISAKI, et al. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 8, p.132- 139, 1968.
- 38 - FUNDAÇÃO FESP. Norma técnica de tratamento preventivo contra a raiva humana, apostila xerocopiada. Rio de Janeiro, 1987.
- 39 - GRANDIEN, M. Evaluation of tests for rabies antibody and analysis of serum responses after administration of three diferent types of rabies vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 5: p.263-267, 1977.
- 40 - GREENBERG, M. & CHILDRESS, J. Vaccination against rabies with duck-embryo and Semple vaccines. *J. Am. Med. Ass.*, 173: p.333-337, 1960.
- 41 - GUILLEMIN, F.; TIXIER, G.; SOULEBOT, J.P.; CHAPPUIR, G. Comparision de deuex methodes de titrage des anticorps antirabiques neutralizants. *J. Biol. Stand.* 9, p.147-156, 1981. A
- 42 - GUILLEMIN, F.; TIXIER, G.; SOULEBOT, J.P. Résultats comparés des anticorps antirabiques par deux méthodes utilisant l'immunofluorescence. *J. Biol. Stand.* 9, p.157-160, 1981. B
- 43 - GUILLON, J. C. & TSIANG, H. Rôle de l'interferon et du thymus dans la pathogenese de l'infeccion rabique chez la sourts. *Annale de virol.*13/E: p.229-245, 1980.

- 44 - HATTWICK, M.A.; WEISS, T.T.; STECHSCHULTE, et al. Recovery from rabies: a case report. *Ann. Int. Med.* 76: p.931-942, 1972. a
- 45 - HATTWICK, M.A.; WEISS, T.T.; STECHSCHULTE. Recovery from rabies. *Ann. int. Med.* 222: p.44-47, 1972. b
- 46 - HATTWICK, M.A. & GREEG, M. B. Rabies and its prevention in man, the disease in man, in: *The natural history of rabies*, 2 v., BAER, G.M. (ed.), Ac. Press, NY, 1975. 387p.; p.281-301
- 47 - HRONOVSKY, V.; BENDA, R. Development of inalation of inahlation rabies infection in suckling guinea pigs. *Acta Virol.* 13: p.198-202; 1969.
- 48 - HRONOVSKY, V.; BENDA, R. Experimental inalation infection of laboratory rodents with rabies virus. *Acta. Virol.* 13: p.193-197, 1969.
- 49 - HRONOVSKY, V. Immunofluorescence study on pathogenesis of rabies virus. Respiratory infeccion in suckling mice. *Acta. virol.* 15: p.58-64, 1971.
- 50 - JENSON, A.B.; RABIN, E.R.; BENTICK, D.C.; MELNICK, J.L. Rabies virus neuronits. *J. Virol.* 3: p.265-269, 1969.
- 51 - KAPLAN, C.; TURNER, G. S.; WARREL, D.A. Rabies: the facts, 2. ed. Oxford, Oxford University, 1986. 126p. Rabies vaccines and immunity to rabies. p.8-20.
- 52 - KING, D.A.; GROGHAW, D.L.; SHAW, E.L. A rapid quantitative in vitro serum neutralization test for rabies antibody. *Can. Vet. J.* 6: p.187-190, 1965.
- 53- KOPROWSKI, H. & BLACK. Studies on chick-embryo adapted rabies virus. III. Duration of immunity in vaccinated dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80. p.410-415, 1952.
- 54 - KWERT, E. The complement fixation test, in: *Laboratory techniques in rabies*, Kaplan M.M. & Koprowski, H. 3rd ed. WHO (monograph series 23), Geneva, 1973. p.124- 134.
- 55 - LARGHI, O.P. & NEBEL, A.E. Rabies virus inativaction by binary ethylenimine: new method for inactivated vaccine production. *J. Clin. Microbiol.* 11 (120), 1980.

- 56 - LARGHI, O.P.; GONZALES, L.; HELD, J.R. Evaluation of corneal test as a laboratory method for rabies diagnosis. *Appl. Microbiol.* 25: p.187-189, 1973.
- 57 - LARSH, S.E. Indirect fluorescent antibody and serum neutralization response in pre-exposure prophylaxis against rabies. *Ann. Intern. Med.* 63: p.955-964, 1965.
- 58 - LEE, T.K.; HUTCHINSON, H.D.; ZIEGLER, D.W. Comparison of (rabies humoral antibody titers in rabbits and human by indirect radioimmuno-assay, rapid-fluorescent-focus inhibition technique, and indirect fluorescent antibody assay. *J. Clin. Microbiol.* 5: p.320-325.1977.
- 59 - LEFFINGWELL, L. & IRONS, J.V. Rabies antibody in human serums titrated by the indirect FA method. *Publ. Hlth. Rep.* 80: p.999-1004, 1965.
- 60 - LEMOS, A.N.; Estudo da imunização anti-rábica. *Inst. Microbiol. da UFRJ. Tese de Mestrado*, 1984.
- 61 - LEMOS, A.N.; SOUZA, M.M.; OLIVA, I.F.P. et al. Imunização anti-rábica em humanos. *F. Med. (Br)*, 94 (1/2) p.5-12, 1987.
- 62 - LENNETTE, E.M. & EMMONS, R.W. The laboratory diagnosis of rabies: review and prospective. in: *Rabies*, Nagano, Y. & Davenport, F.M. ed. Univers. Park Press, Baltimore, 1971.
- 63 - LOUIE, R.E. et al. Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test with the rapid-fluorescent-focus-inhibition test. *J. Biol. Stand.* 3: p.365-368, 1975.
- 64 - MARCHEVSKY, Correlação e regressão, CEPANZO, apostila xerocopiada, Argentina, 1980.
- 65 - MARKUS, H.L.; JOBIM, G.O. & MOURA, M.C.L. Vacina anti-rábica tipo "Fuenzalida" modificada. *Rev. Inst. Med. Trop. SGo Paulo*, 13 (2): p.114-120, 1971.
- 66 - MATSUMOTO, S. Rabies virus. in: *Advan. Vir. Res.* 16: p.257-301, 1970.
- 67 - MATSUMOTO, S. Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology*, 17: p.198-202, 1962.

- 68 - MATSUMOTO, S. Eletron microscopy of central nervous system infection. in: Baer, G.M. ed. The Natural History of Rabies. Ac.Press, N.Y., v.1, p.217-233, 1975.
- 69 - MINISTERIO DA SAÚDE; FNS; CNE; CCZAP; PNPR. Raiva. documento preliminar, cópia, fev/1992.
- 70 - MURPHY, F.A., HARRISON, A.K.; WINN, W.C.; BAUER, S.P. Comparative pathogenesis of rabies and rabies like viruses. Infection of the CNS and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. Lab. Invest. 29: p.1 - 16, 1973.
- 71 - MURPHY, F.A. Rabies pathogenesis: brief review. Arch. Virol. 54: p.279-297, 1977.
- 72 - PECK, F.B.Jr. The detection of human rabies antibodies by the indirect fluorescent test. Symp. Ser. Immunobiol. Stand. 1. p.201-206. 1966.
- 73 - PETRI, W.A. & WAGNER, R.R. Reconstitution into liposomes of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus by detergent dialysis. The Journal of Biol. Chem., 254 (11): p.4313-4316, 1979.
- 74 - REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end-point. Amer. J. Hyg. 27: p.493-497, 1938.
- 75 - RUBIN, R.H.; SULLIVAN, L.; SUMMERS, R.; GREGG, M.B. and SIKES, R.K. A case of human rabies in Kansas : epidemiologic, clinical and laboratory considerations. J. Infect. Dis. 122: p.318-322, 1970.
- 76 - RUBIN, R.H.; DIERKS, R.E.; GOUGH, P.; et al. Immunoglobulin response to rabies vaccine in man. Lancet, ii, p.625-628, 1971.
- 77 - SCHNEIDER, L. G. The cornea test: a new method for intra-vitan diagnosis of rabies. Zbl. Vet. Med. B-16: p.24-31, 1969.
- 78 - SCHNEIDER, L.G.; DIETZSCHOLD, B.; DIERKS, R.E. et al. Rabies group specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing rhabdoviruses. J. Virol. 11: p.748-755, 1973.
- 79 - SCHNEIDER, M.C. Estudo de avaliação sobre área de risco para a raiva no Brasil. Tese de Mestrado. ENSP, FIO CRUZ. 1990.

- 80 - SIKES, R.K. & LARGHI, O.P. Purified rabies vaccine. Development and comparison of potency and safety with two human human rabies vaccines. *J. Immunol.* 99: p.545-553, 1961.
- 81 - SIKES, R.K. Pathogenesis of rabies in wild-life 1. Comparative effect of varying doses of rabies virus inoculated into foxes and skunks. *Amer. J> Vet. Res.* 23: p.1041-1047, 1962.
- 82 - SILVA, N.N.; MARKUS, H.L. and PADILHA, A.A. Vacina anti-rabica tipo "Fuenzalida" modificada. *Bol. Ofic. Sanit. panamer.* 63: p.223-226, 1967.
- 83 - SIPAHIOGLU, V.; ALPAUT, S. Transplacental rabies in human, *Mikrobyol. Bull.*, 19: p.95-99, 1985.
- 84 - SMITH, W.B.; BLENDEN, D.C.; TSUE-HUEI, F.; HILER, L. Diagnosis of rabies by immunofluorescence. staining of frozen sections of skin. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 161: p.1495-1501, 1972. W4'0
- 83 - SMITH, J.S.; JAGER, P.A.; BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO.* 48: p.535-541, 1973.
- 84 - SMITH, J.S.; McCLELLAND, C.L.; REID, F.L.; BAER, G.M. Dual role of the immune response in street rabies infection in mice. *Inf. Imm.* 35: p.213-221, 1982.
- 85 - SOKOL, F.; SCHLUMBERGER, H.D.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. *Virology*, 38: p.651-665, 1969.
- 86 - SOUZA, M.M. A imunidade na raiva humana. Tese de Doutorado. Inst. Microb. da UFRJ, 1980
- 87 - SOUZA, M.M.; CAMPOS, H.H.V.; LEMOS, H.N. A reaço intradérmica da resposta imune na prevenção da raiva. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 17(4): p.203-205, 1985.
- 88 - SUNG, J.H.; HAYANO, F.A.; MASTRI, A.R.; OKAGAKI, T. A case of human rabies and ultrastructure of Negri bodies. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 35: p.541-559, 1976.
- 89 - THOMAS, J.B.; SIKES, R.K. and RICKER, A.S. Evaluation of indirect fluorescent antibody technique for detection of rabies antibody in human sera. *J. Immunol.* 91: p.721-723, 1963.

- 90 - THOMAS, J.B. The serum neutralization, indirect fluorescent antibody, and rapid fluorescent focus inhibition test. in: *The Natural History of Rabies*. ed. Baer, G.M. Ac. Press, NY. 1975. v.1: p.417-433.
- 91 - THURSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*, 1.ed. London, Buerworths, , 1986, 280p. serological epidemiology. p.175-186.
- 92 - TSIANG, H. Evidence for intra-axonal transport of fixed street rabies virus. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 38: p.286-299, 1979.
- 93 - TSIANG, H. Neuronal function impairment in rabies- infected rat brain. *J. Gen. Virol.* 61: p.277-281, 1982.
- 94 - TORRES, A.M.J.; MONTANO, H.J.; CAZABON, E.P.I.; OAKMAN, J. K.; WIKTOR, T.J. A new approach to the pathobiology of rabies virus as aided by immunoperoxidase staining. *Amer. Ann. Vet. Diag.* 27th. Annual Proceedings. p 1- 26. 1984.
- 95 - TURNER, G.S. & KAPLAN, C. Some properties of fixed rabies virus. *J. Gen. Virol.* 1: 537-551, 1967.
- 96 - U.S. CENTERS For DISIASE CONTROL. Human to human transmission of rabies via a corneal transplant. *France. M.M.W.R.* 29: p.25-26, 1980.
- 97 - VAUGHN, J.B.; GERHART, P.; PATERSON, J.C.S. Excretion of street rabies virus in saliva of cats. *J. Amer. Med. Assoc.* 184: p.705-708, 1963.
- 98 - WEBSTER, L.T. & DAWSON, J.R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32. 570-573, 1935.
- 99 - WHO Expert Commiee on Rabies. Seventh report. World Health Organization (Techn. Rep. Ser. 709). Geneva, 1984.
- 100 - WHO. World survey of rabies. 22: for years 1984/85 Geneva. 1986. 73 p. (WHO/RABIES/87.198)
- 101 - WHO. Report of Fifth WHO Consultation on monoclonal antibodies in rabies diagnosis and research. Geneva, 1989.

- 102 - WIKTOR, T.J., GYORGY, E.; SCHLUMBERGER, H.D.; SOKOL, F. and KOPROWSKI, H. Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.* 110: p.269-276, 1973.
- 103 - WIKTOR, T. J.; CLARK, H. F. Application of the plaque assay technic to the study of rabies virus neutralizing antibody interactions. *Ann. Microbiol. Pasteur Inst.* 124 A: p.283-287, 1973.
- 104 - WIKTOR, T.J. & KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 75: p.3938-3942, 1978.
- 105 - WIKTOR, T.J.; FLAMAND, A.; KOPROWSKI, H. Use of monoclonal antibodies in the diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies related viruses. *J. Virol. Meth.* 1: p.33-46, 1980.
- 106 - WRIGHT, J. T.; HABEL K. A comparison of antigenicity and certain biological characteristics of sub-strains of Pasteur fixed rabies virus. *J. Immunol.* 60: p.503-515, 1948.
- 107 - YURKOVSKY, A.M. Hydrophobia following the bite of apparently healthy dogs. *J. Hyg. Epid. Microb. Immun.* 6: p.73-78, 1962.