

VACINA ANTI-RÁBICA TIPO "FUENZALIDA" MODIFICADA¹

Newton Neves da Silva,² Hélio Leopoldo Markus³ e Alvaristo A. Padilha⁴

Apresenta-se uma modificação de técnica de preparação de vacina anti-rábica com encéfalo de camundongo lactente, a fim de eliminar o irradiador UV de Dill e centrifugadores de grande capacidade.

As vacinas anti-rábicas à base de tecido nervoso, cérebro e medula de coelho, vêm sendo utilizadas desde a sua criação por Pasteur. Inúmeras modificações introduzidas no decurso dos anos, melhoraram esta vacina, porém, o problema dos acidentes pós-vacinais persistiu, podendo ocasionar alterações do SNC numa proporção de 1/600 a 1/8,000 nas pessoas tratadas. Os casos fatais chegam a 40%.

Em 1947, Kabat *et al.*, Thomaz *et al.*, e outros provaram que as substâncias responsáveis pela encefalomielite alérgica experimental (EAE) e presumivelmente pelos acidentes pós-vacinais do homem, não existem no tecido nervoso de embriões ou mamíferos recém-nascidos. Além disso, provou-se também que o encéfalo de mamíferos lactentes, no qual ainda não se processou uma completa diferenciação, é uma ótima fonte para uma abundante multiplicação do vírus rábico.

Baseados nestes fatos, Fuenzalida e Palacios (2-5), em 1954, elaboraram uma vacina de encéfalo de camundongos lactentes inoculados com vírus fixo, inativados pelos raios UV e para uso em cães.

Em 1956, Peck, Powell e Culbertson (9) introduziram uma vacina elaborada a partir

do ôvo embrionado de pata, sendo o vírus inativado pela beta-propiolactona. Esta vacina, para uso no homem, embora desprovida praticamente do assim denominado "fator paralítico" deixa muito a desejar quanto às suas propriedades imunogênicas (1, 11, 13), além de ser contra-indicado o seu uso em pessoas alérgicas às proteínas do ôvo (12).

Em 1959, Fuenzalida *et al.* (2, 4, 5), iniciaram a aplicação de sua vacina no homem, publicando os resultados sómente em 1964. Este produto mostrou uma elevada condição imunogênica nas provas de potência, ao ser comparada com outras vacinas de uso rotineiro, tanto na vacinação de animais como no tratamento anti-rábico do homem.

Em 1965, Gispen *et al.* (6), produziram uma vacina com encéfalo de coelhos recém-nascidos. Ainda neste mesmo ano, Svet-Moldavskij *et al.*, (10) usaram o rato lactente com o mesmo fim. Karakujuncan *et al.* (7), na Rússia, baseados nos trabalhos de Fuenzalida *et al.*, também usaram o rato para a fabricação de uma vacina anti-rábica liofilizada.

O Instituto de Pesquisas Biológicas do Rio Grande do Sul, responsável pela produção de vacina anti-rábica para uso no homem neste Estado, iniciou em julho de 1965, a fabricação de uma vacina tipo "Fuenzalida", porém, modificada.

A técnica por nós empregada difere da

¹ Trabalho realizado no Instituto de Pesquisas Biológicas do Rio Grande do Sul (I.P.B.), Brasil, e apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Higiene (Curiába, novembro de 1966).

² Médico-Laboratorista, Diretor do I.P.B.

³ Veterinário, Chefe do Laboratório de Vacina Anti-Rábica do I.P.B.

⁴ Farmacêutico-químico, Laboratório de Vacina Anti-Rábica do I.P.B.

original de Fuenzalida e Palacios (3, 4) em três pontos:

1. A suspensão do encéfalo virulento de camundongo lactente é feita em solução fisiológica em lugar de água bidestilada.

2. A inativação realiza-se pela beta-propiolactona, segundo trabalhos de Peck, Jr. (8) e Peck *et al.* (9), em vez de pela irradiação ultravioleta.

3. A centrifugação da suspensão encefálica inicial foi substituída pela sedimentação.

Material e métodos

1. Camundongos lactentes de 3 a 5 dias são inoculados por via cerebral com 0.01 ml de uma suspensão de aproximadamente 100 DL₅₀ de vírus fixo (raça CVS). São feitas provas de esterilidade do inóculo, antes e depois da inoculação, em caldo tioglicolato. O controle de virulência é realizado mediante a inoculação em camundongos adultos, via I.C.

2. Após período de incubação de 4 dias, os encéfalos são extraídos mediante sucção, usando-se uma seringa de 2 ou 3 ml provida de uma agulha 15 x 30. A massa é recolhida em pequenos frascos que, se não forem utilizados imediatamente serão armazenados a -20°C. Cada encéfalo extraído dessa forma pesa 0.20 a 0.25 g.

3. O material coletado é moído em liquidificador com solução fisiológica, na proporção de 1 parte de encéfalo para 9 partes de solução salina (10%). Retira-se uma amostra para os testes de virulência, de sôro-neutralização e de contagem bacteriana.

4. Acrescentamos à suspensão acima beta-propiolactona a 1/4,000, processando-se a inativação em geladeira a 4°C, durante 48 horas, em repouso, período durante o qual verifica-se a sedimentação de parte da massa encefálica (oscila entre 20 a 24% do volume total).

5. A parte líquida é separada com um sifão, sendo o volume inicial reconstituído com solução fisiológica. São efetuadas pro-

vas de inocuidade em camundongos adultos e lactentes e prova de esterilidade em tioglicolato. Não são admitidos vírus e germes vivos.

6. A diluição final a 2% é feita em solução salina. Acrescenta-se timerosal a 1/10,000 e fosfato dissódico a 0.5 por mil para ajuste do pH entre 7.0 e 7.2. O teste de potência que utilizamos é o de Habel (13).

7. Após o envasamento, procedem-se às provas de inocuidade final em cobaias e camundongos e as de esterilidade em caldo tioglicolato ou ágar-sangue.

Vacina liofilizada

Experimentalmente o Instituto produziu algumas partidas de vacina dessecada. O método empregado consiste no seguinte:

1. Suspensão da massa encefálica a 20% em PBS.

2. Acrescenta-se beta-propiolactona a 1:4,000. A inativação é feita em repouso durante 48 horas a 4°C.

3. Retira-se por decantação a parte líquida, desprezando-se cerca, de 18% do sedimento. Reconstituição do volume primitivo com PBS.

4. *Suspensão final a 10%:* Misturam-se partes iguais da suspensão a 20% em PBS com a solução seguinte:

PBS pH 7,2 . . .	84.0
Sacarose . . .	15.0
Gelatina . . .	1.0

5. Acrescenta-se para que a vacina, após a reconstituição, tenha timerosal a 1% uma concentração de 1: 10,000 da substância.

6. *Distribuição e dessecção:* Distribuem-se 2.8 ml da suspensão a 10% em vidros tipo "penicilina". Conserva-se a vacina a -25°C durante 24 horas. A seguir, 8 horas a -70°C. Dessecção em aparelhagem Stokes. Fechamento dos frascos em atmosfera de nitrogênio.

7. *Reconstituição:* Adicionando-se 14.0 ml de água bidestilada a cada frasco, temos uma vacina na concentração de 2%. Os testes e provas a que submetemos este tipo de vacina são idênticos aos da vacina líquida.

Resultado

1. Foram produzidas até o presente cerca de 150,000 doses de 1 ml da vacina líquida a 2% num total de 14 partidas.

2. A concentração inicial do vírus na suspensão encefálica mostrou-se muito elevada, variando de 10^{-7} ,²⁸ a 10^{-8} ,¹⁶ DL₅₀.

3. O processo de inativação utilizado mostrou-se eficaz em todas as partidas, não restando vírus vivo residual.

4. A potência proporcionada pelas vacinas, tanto líquida como liofilizada, quando provada em camundongos mediante o teste de Habel, apresentou valores de proteção que variavam de mais de 100,000 DL₅₀ a mais de 3,000,000 DL₅₀.

5. Submeteram-se ao tratamento anti-rábico até a presente data com a vacina líquida, em todo o Estado do Rio Grande do Sul, 7,964 pessoas, não se registrando nenhum insucesso, nem qualquer acidente pós-vacinal de ordem neurológica.

6. A técnica descrita dispensa o uso do

irradiador de ultravioleta de Dill, bem como de centrifugadores de grande capacidade, o que torna o método mais econômico.

Resumo

Os autores apresentam uma vacina anti-rábica em uso no Rio Grande do Sul (Brasil), constituída de uma suspensão a 2% de encéfalo de camundongos lactentes, inoculados por via cerebral com vírus fixo, inativado com beta-propiolactona, e adicionada de timerosal a 1:10,000. Descrevem ainda o método de preparação da mesma vacina sob forma liofilizada.

Os elevados títulos de potência observados no teste de Habel, a eficiência e inocuidade comprovada em 7,964 pessoas tratadas, a facilidade e economia da mesma (dispensa o irradiador UV de Dill e centrifugadores), justificam plenamente o emprêgo dessa vacina para o tratamento anti-rábico do homem. □

REFERÊNCIAS

- (1) Dean, J. D. y Sherman, I. "Potency of Commercial Rabies Vaccine Used in Man." *Public Health Rep* 77(8):705, 1962.
- (2) Fuenzalida, E. "Uso de la vacuna antirrábica preparada com cerebros de ratones lactantes." En *Curso Teórico-Práctico sobre Laboratório y Epidemiología de la Rabia*. Instituto "Carlos C. Malbrán." Buenos Aires, Argentina, 10-21 maio de 1965.
- (3) Fuenzalida, E. "Método de preparación de la vacuna antirrábica em cerebro de ratón lactante." En *Curso Teórico-Práctico sobre Laboratório y Epidemiología de la Rabia*. Instituto "Carlos C. Malbrán." Buenos Aires, Argentina, 10-21 maio de 1965.
- (4) Fuenzalida, E. Informação pessoal. Instituto Butantan. São Paulo, Brasil, outubro de 1964.
- (5) Fuenzalida, E., Palacios, R. y Borgoño, J. M. "Antirabies Antibody-Response in Man to Vaccine Made from Suckling-Mouse Brain." *Bull WHO* 30(3):431-436, 1964.
- (6) Gispen, R., Schmittmann, G. J. P. y Saathof, B. "Rabies Vaccine Derived from Suckling Rabbit Brain." *Arch Ges Virusforsch* 15(3):366, 1965.
- (7) Karakujuncan, M. K., Pariz, B. M. y Solov'ev, V. D. "The Preparation and Lyophilization of Antirabies Vaccine in Suckling Rats." En *Lab Techniques in Rabies*. 2a ed., pág. 132-134. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1966.
- (8) Peck, F. B., Jr. "Sterilization of Biological Products with Betapropiolactone." *JAMA* 174:1883, 1960.
- (9) Peck, F. B., Jr., Powell, H. M. y Culbertson, C. G. Duck-Embryo Rabies Vaccine (Study of Fixed Virus Vaccine Grown in Embryonated Duck Eggs and Killed with Beta-Propiolactone (BPL). *JAMA* 8(162):1373-1376, 1956.
- (10) Svet-Moldavskij, et al. "An Allergen-Free Antirabies Vaccine." *Bull WHO* 32:47, 1965.
- (11) Veeraraghvan, N. y Subrahmanyam, T. P. "The Value of Duck-Embryo Vaccine and High-Egg-Passage Flury Vaccine in Experimental Rabies Infection in Guinea-Pigs." *Bull WHO* 29(3):323-330, 1963.
- (12) World Health Organization. *WHO Expert Committee on Rabies. Fifth Report*. Tecn Rep Ser 321, 1966.
- (13) World Health Organization. *Laboratory Techniques in Rabies*, 2a ed. pág. 15.

Vacuna Antirrábica Tipo "Fuenzalida" Modificada (*Resumen*)

Los autores exponen los resultados de una vacuna antirrábica, en uso en Río Grande del Sur, Brasil, constituida por una suspensión al 2% de encéfalo de ratón lactante, inoculado por vía intracerebral con virus fijo inactivado con beta-propiolactona, y adicionada de timerosal a 1:10,000. Se describe, asimismo, el método de preparación de la misma vacuna en su forma lyophilizada.

Los elevados títulos de actividad observados mediante la prueba de Habel, la eficiencia e inocuidad comprobada en 7,964 personas a las que se aplicó la vacuna y la economía que la misma representa (no requiere irradiador UV de Dill ni centrifugadoras) justifican plenamente su empleo para tratamiento antirrábico del hombre.

"Fuenzalida"-type Modified Rabies Vaccine (*Summary*)

The authors describe the results achieved with a rabies vaccine used in Rio Grande do Sul, Brazil. It consists of a 2% suspension of suckling mouse brain, which has been inoculated intracerebrally with fixed virus inactivated with beta-propiolactone and to which timerosal at 1:10,000 has been added. The authors also describe the method used in preparing the lyophilized form of the vaccine.

The high activity titers obtained with the Habel test, the efficacy and innocuity confirmed in the 7,964 persons who were inoculated with the vaccine, as well as its economy (it requires no Dill UV radiation or centrifuge) fully justify its use in treating man against rabies.

Vaccin antirabique du type "Fuenzalida" modifié (*Résumé*)

Les auteurs décrivent les résultats obtenus avec un vaccin antirabique employé dans l'Etat de Rio Grande del Sur (Brésil), constitué par une suspension à 2% d'encéphale de très jeunes rats, inoculé par voie intracérébrale au moyen d'un virus fixe inactivé avec du béta-propylactone, et additionné de timersol à 1:10,000. Ils décrivent en outre la méthode de préparation de ce vaccin dans sa forme lyophilisée.

Les titres d'activité observés au moyen de l'épreuve de Habel, l'efficacité et l'innocuité constatée chez 7,964 personnes ainsi vaccinées, et l'économie réalisée (ce vaccin ne nécessite ni irradiateur UV de Dill ni centrifugeuses), justifient pleinement son emploi dans le traitement antirabique de l'homme.

NOTAS EPIDEMIOLOGICAS: DISMINUYE EL DENGUE EN VENEZUELA.—Hay indicios de que la epidemia de dengue que comenzó en Venezuela en 1964, parece estar desapareciendo en 1967, ya que en las 20 primeras semanas de este año se han notificado sólo 60 casos, en comparación con 4,097 en el período correspondiente de 1966. En 1967 ocurrieron dos pequeños brotes: uno de 29 casos en el Estado Táchira, en el mes de enero, y otro de 18 casos en el Estado Zulia, en abril. Estos Estados representan el extremo occidental de Venezuela; los brotes de 1964, 1965 y 1966 han afectado sucesivamente a Estados del este al oeste del país. (Oficina Sanitaria Panamericana: *Informe Epidemiológico Semanal* 39(27):152, 5 de julio de 1967.)