

ESTUDO COMPARATIVO DE VACINA ANTI-RÁBICA DE USO BOVINO

Dres. A. Ribeiro-Netto,¹ M. R. Nilsson,² O. Miguel,³ M. Mizuno³ e T. Nikitin³

Vacinas anti-rábicas do tipo Formidogel, Flury e a Fuenzalida modificada são comparadas quanto à proteção que conferem a bovinos. A avaliação baseia-se, principalmente, nos resultados do "challenge," realizado oito meses após a vacinação.

Introdução

A raiva representa importante causa de mortalidade na população bovina brasileira, determinando prejuízos econômicos estimados em 300 milhões de cruzeiros anuais (1).

O controle da raiva bovina fundamenta-se, principalmente, na imunização ativa do suscetível, posto que as possibilidades de atuação profilática na população do reservatório, representado pelo morcêgo hematófago, apresenta óbvias limitações.

Entretanto, a vacinação de bovinos, mormente em áreas de grande endemicidade, tem fornecido resultados contraditórios, indicando a necessidade de se proceder a estudos da proteção conferida pelos diferentes tipos disponíveis de vacina anti-rábica de uso bovino. Este é o objetivo do presente trabalho, que adota, como critérios de avaliação, a dosagem de anticorpos neutralizantes do soro e, principalmente, a resposta à infecção experimental.

Segundo nossa hipótese de trabalho e as comprovações de Abelseth (2) em bovinos, animais vacinados apresentariam, no soro, maior taxa de anticorpos neutralizantes e, submetidos à infecção experimental, menor

mortalidade, comparativamente aos não vacinados.

Fixamos em 0,05 o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

Material e métodos

Animais

Utilizamos 56 bovinos, 32 fêmeas e 24 machos, nascidos e criados no Instituto de Zootecnia e Indústrias Pecuárias "Fernando Costa", em Piraçununga, onde não ocorre raiva transmitida por morcêgos e não se pratica a vacinação de bovinos.

Estes animais apresentavam idades compreendidas entre 17 e 32 meses e, exceção feita a duas fêmeas de raça Schwitz, todos eram mestiços zebuinos.

Inicialmente colheram-se amostras de sangue de todos os animais do experimento para pesquisa de anticorpos específicos no soro. A seguir, os bovinos foram, mediante sorteio, distribuídos em quatro grupos de 14 indivíduos. Impuseram-se restrições à casualização a fim de garantir a comparabilidade dos grupos experimentais relativamente à composição por sexo e idade. Também mediante sorteio, atribuíram-se os tipos de vacina aos diferentes grupos.

Vacinas

Formidogel. Produzida pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" em cérebro de carneiro, inativada pelo formol e adsorvida pelo hidróxido de alumínio. Esta vacina, contendo 10% de tecido

¹ Chefe do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Chefe da Seção de Enzootias do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Instrutor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

nervoso, foi aplicada, subcutâneamente, na dose de 10 ml.

Flury-HEP. Produzida pelo Instituto Biológico de São Paulo em ovos embrionados, com vírus de 200 passagens que apresentou título igual a $10^{4,6}/0,01$ ml em camundongos lactantes. O hidróxido de alumínio foi adicionado no momento da aplicação da vacina, em substituição ao diluente. Empregaram-se 5 ml da vacina por via intramuscular.

Fuenzalida modificada. Produzida, especialmente, no Instituto Butantã, em camundongos lactantes, contendo partes iguais de cérebros infectados com vírus 51-123 e 91-122. O título do "pool" de vírus dosou $10^8/0,03$ ml. Adicionou-se à suspensão contendo 20% de cérebro de camundongo lactante, igual volume de hidróxido de alumínio. Procedeu-se à inativação com formol na concentração final de 0,4%, mantendo-se a vacina na geladeira a 5°C durante quatro dias. Esta vacina foi empregada na dose de 5 ml, por via subcutânea.

Tôdas as vacinas aprovaram nos testes laboratoriais de potência.

"Challenge"

Foi praticado oito meses após a vacinação com vírus isolado de bovino, amostra M 95/60, que sofreu passagens em cobaias (via intramuscular) e em camundongos (via intracranial).

O inoculum foi preparado a partir de cérebros de camundongos sacrificados na fase final da doença, imediatamente antes da infecção experimental dos bovinos, praticada por via intramuscular, a meia distância entre as tuberosidades do íleo e do ísquio.

Inoculamos 4 ml da suspensão de cérebro infectado que apresentou, em camundongo, título igual a $10^5/0,025$ ml.

Sôro-neutralização

Realizada de acôrdo com o preconizado por Atanasiu (3), tendo a dose de vírus variado, nas diferentes provas, entre 20 e 80 DL 50.

TABELA 1—Bovinos submetidos ao "challenge" oito meses após a vacinação, segundo a vacina empregada e o desenlace. São Paulo, 1969.

Desenlace Vacina	Sobreviventes	Mortos	Total
Formidogel	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13
Flury HEP	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13
Fuenzalida	1 (7,1%)	13 (92,9%)	14
Nenhuma	1 (7,7%)	12 (92,3%)	13
Total	19 (35,8%)	34 (64,2%)	53

De todos os animais do experimento foram colhidas amostras de sangue aos 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 240 dias após a vacinação.

Os animais que sobreviveram ao "challenge" foram também submetidos a provas de sôro-neutralização 30, 60, 90 e 120 dias após.

As amostras de sangue, antes de remetidas ao laboratório, eram codificadas, de sorte que a dosagem de anticorpos era cega.

Todos os animais que morreram após o "challenge" foram necropsiados, confirmando-se a *causa mortis* pelas técnicas histológicas usuais.

Resultados

Os resultados da infecção experimental figuram na tabela 1.

A análise estatística desta tabela forneceu para χ^2 (qui-quadrado) o valor 20,66 que é significativo, ultrapassando, inclusive, o nível de rejeição de 1% para 3 graus de liberdade.

As tabelas 2 e 3 dizem respeito ao prosseguimento da análise da tabela 1. Os valores encontrados para χ^2 mostram, correspondentemente, que a proteção conferida

TABELA 2—Bovinos submetidos ao "challenge" oito meses após a vacinação, segundo a vacina empregada e o desenlace. São Paulo, 1969.

Desenlace Vacina	Sobreviventes	Mortos	Total
Flury	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13
Nenhuma	1 (7,7%)	12 (92,3%)	13
Total	8 (30,8%)	18 (69,2%)	26

TABELA 3—Bovinos submetidos ao "challenge" oito meses após a vacinação, segundo a vacina empregada e o desenlace. São Paulo, 1969.

Desenlace Vacina	Sobreviventes	Mortos	Total
Formidogel	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13
Flury	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13
Total	17 (65,4%)	9 (34,6%)	26

pela vacina Formidogel não difere significativamente da proporcionada pela vacina Flury e que a sobrevivência no grupo imunizado com a vacina Flury é significativamente maior de que no testemunha.

É dispensável qualquer elaboração estatística para revelar que a sobrevivência nos grupos que receberam as vacinas Formidogel ou Flury é significativamente maior do que a encontrada no grupo vacinado com a Fuenzalida que, por sua vez, não difere significativamente do grupo não vacinado.

Nas tabelas 4 e 5 figuram os resultados das provas de sôro-neutralização, respectivamente antes ou após o "challenge".

Discussão

Os resultados obtidos, constantes da tabela 1, mostram que a vacina Formidogel foi a que ofereceu melhor proteção ao

"challenge", embora a análise estatística não tenha revelado diferença significativa, relativamente à vacina Flury.

É possível que o emprêgo do hidróxido de alumínio possa ter prejudicado o poder imunogênico da vacina Flury, conforme verificaram Atanasiu et col. (4). Entretanto, quando do início deste estudo, ainda não eram conhecidos os dados daqueles pesquisadores.

Os resultados obtidos com a vacina Fuenzalida modificada, no concordam com os de Fabrega et al (5), devendo-se tomar em conta que não se trata da mesma vacina. Desconhece-se a influência que podia haver tida a inativação por formol sôbre a antigenicidade da vacina.

A mortalidade encontrada no grupo testemunha, igual a 92,3%, retrata as condições de severidade da infecção experimental.

As provas de sôro-neutralização realizadas entre a vacinação e o "challenge" indicam que tôdas as vacinas estimularam a produção de anticorpos. É interessante anotar que foi a vacina Fuenzalida a que determinou resposta imunitária mais intensa aos 15 dias da vacinação. Todavia, o declínio da taxa de anticorpos foi rápido, como pode ser constatado na tabela 4. Provável-

TABELA 4—Medianas dos títulos de sôro-neutralização de bovinos, segundo o grupo experimental e o tempo, em dias, decorrido da vacinação. São Paulo, 1969.

Grupo	Tempo						
	15	30	45	60	90	120	240
Testemunha	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
Fuenzalida	29,0	9,8	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
Flury	< 5,0	6,8	5,0	7,0	< 5,0	6,0	< 5,0
Formidogel	16,5	10,5	8,4	9,8	5,0	11,0	< 5,0

TABELA 5—Medianas dos títulos de sôro-neutralização de bovinos sobreviventes ao "challenge", segundo o grupo e o tempo, em dias, decorrido da infecção experimental. São Paulo, 1969.

Grupo	Tempo			
	30	60	90	120
Testemunha ^a	3,7	< 5,0	< 5,0	< 5,0
Fuenzalida ^a	125,0	> 125,0	> 125,0	> 125,0
Flury	> 125,0	125,0	125,0	18,0
Formidogel	> 125,0	89,0	65,0	18,0

^a Valor individual do sobrevivente.

mente, o processo utilizado para a inativação da vacina, não coincidente com a técnica recomendada pelo seu autor, possa ter modificado o comportamento do antígeno.

Em virtude da pequena precisão da prova de sôro-neutralização, preferimos expressar os resultados em termos da mediana de cada grupo.

Os valores encontrados para as provas de sôro-neutralização imediatamente antes do "challenge" indicam que a ausência de anticorpos ou sua presença em níveis muito baixos não equivale à suscetibilidade.

A tabela 5 indica que, nos animais sobreviventes, a infecção experimental teve o efeito de um "booster", determinado intensa resposta imunitária.

Resumo

Constituíram-se quatro grupos comparáveis de 14 bovinos. Um dos grupos foi mantido como controle e os restantes inoculados, respectivamente, com as vacinas anti-rábicas Formidogel, Flury e a Fuenzalida modificada.

Oito meses após, todos os animais do experimento foram submetidos ao "challenge", encontrando-se os seguintes valores para a mortalidade: grupo controle, 12/13 (92,3%); grupo inoculado com a vacina Fuenzalida, 13/14 (92,9%); grupo inoculado com a vacina Flury, 6/13 (46,2%);

grupo inoculado com a vacina Formidogel, 3/13 (23,1%). Segundo esta experiência, a vacina de Fuenzalida não tem dado resultados satisfatórios em bovinos, devendo-se tomar em conta a modificação introduzida em sua preparação.

A análise estatística dos resultados revelou que, ao nível de rejeição adotado, igual a 5% :

1) a mortalidade encontrada no grupo inoculado com a vacina Formidogel não diferiu, significativamente, da verificada no grupo que recebeu a vacina Flury;

2) a mortalidade encontrada tanto no grupo que recebeu a vacina Formidogel, quanto no inoculado com a vacina Flury, foi significativamente menor do que a encontrada quer no grupo inoculado com a vacina Fuenzalida modificada, quer no grupo controle;

3) a mortalidade observada no grupo inoculado com a vacina tipo Fuenzalida modificada não diferiu, significativamente, da obtida no grupo não vacinado.

Provas de sôro-neutralização foram realizadas aos 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 240 dias da vacinação. □

Agradecimento

Os autores expressam seu agradecimento ao Dr. Renê Corrêa, da Seção de Vírus Neurotrópicos do Instituto Butantã, pela colaboração que emprestou, preparando, especialmente, a vacina tipo Fuenzalida utilizada.

REFERÊNCIAS

- (1) Pinheiro, P. V. "Raiva dos Herbívoros. Comentários e Retrospectos". *Serviço de Defesa Sanitária Animal. Campanha de Combate à Raiva dos Herbívoros*. Rio de Janeiro, 1968.
- (2) Abelseth, M. K. "An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture", *Canad Vet J* 5:279-286, 1964.
- (3) Atanasiu, P. "Quantitative assay and potency test of antirabies serum". *Laboratory Techniques on Rabies*. World Health Organization, *Monograph Series No. 23* (2a ed.), 1966.
- (4) Atanasiu, P., Fuenzalida, E., Acha, P., Szyfres, B. "Inmunidad antirrábica en bovinos vacunados". *Bol Ofic Sanit Panamer* 64: 431-440, 1968.
- (5) Fábrega, F., Fuenzalida, E., Rodríguez, R. "Estudio de anticuerpos neutralizantes en el suero sanguíneo de bovinos tratados con vacuna antirrábica." *Zooiatria* 6:1-4, 1965.

Estudio comparado de vacunas antirrábicas para bovinos (Resumen)

Se constituyeron cuatro grupos comparables de 14 bovinos cada uno. Uno de esos grupos sirvió de testigo y los restantes fueron inoculados, respectivamente, con las vacunas antirrábicas Formidogel, Flury y Fuenzalida modificada.

Al cabo de 8 meses todos los animales del experimento fueron sometidos a la prueba de confrontación, y se observaron los valores siguientes con respecto a la mortalidad: grupo testigo, 12/13 (92.3%); grupo inoculado con vacuna Fuenzalida, 13/14 (92.9%); grupo inoculado con vacuna Flury 6/13 (46.2%), y grupo inoculado con vacuna Formidogel, 3/13 (23.1%). Según este experimento, la vacuna Fuenzalida no ofrece resultados satisfactorios en el ganado bovino, debiéndose tener en cuenta una modificación introducida en la preparación de esta vacuna.

El análisis estadístico de los resultados, al

nivel adoptado de rechazo de la hipótesis de nulidad (5%), reveló que:

1) la mortalidad observada en el grupo inoculado con la vacuna Formidogel no difería de manera significativa de la registrada en el grupo que recibió la vacuna Flury;

2) la mortalidad en el grupo que recibió la vacuna Formidogel y el que fue inoculado con vacuna Flury, resultó significativamente menor que la acusada por el grupo inoculado con la vacuna Fuenzalida modificada y por el grupo testigo, y

3) la mortalidad observada en el grupo inoculado con vacuna Fuenzalida modificada no difirió significativamente de la registrada en el grupo no vacunado.

Las pruebas de neutralización del suero fueron efectuadas a los 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 240 días después de la vacunación.

Comparative study of anti-rabies vaccines for bovine use (Summary)

Four comparable groups were constituted, of 14 bovines each. One was kept as a control group and the others were inoculated with Formidogel, Flury and modified Fuenzalida anti-rabies vaccines, respectively.

After eight months, all the animals in the experiment were submitted to the "challenge", with the following results in mortality rates: control group, 12/13 (92.3%); group inoculated with the Fuenzalida vaccine, 13/14 (92.9%); group inoculated with the Flury vaccine, 6/13 (46.2%); group inoculated with the Formidogel vaccine, 3/13 (23.1%). According to this experiment, the Fuenzalida vaccine did not give satisfactory results with bovines; account must be taken of the modification introduced in its preparation.

A statistical analysis of the results revealed

that, at the 5% rejection level adopted:

1) the mortality rate for the group inoculated with the Formidogel vaccine did not differ significantly from that of the group receiving the Flury vaccine;

2) the mortality rate for the group that received the Formidogel vaccine and for the group inoculated with the Flury vaccine was significantly lower than either that of the group inoculated with the modified Fuenzalida vaccine or that of the control group;

3) the mortality rate observed in the group inoculated with the modified Fuenzalida vaccine did not differ significantly from that of the group not vaccinated.

Serum-neutralization tests were made 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 days after vaccination.

Etude comparée de vaccins antirabiques pour bovins (Résumé)

Aux fins de cette étude, quatre groupes comparables, de 14 bovins chacun, ont été constitués. Un des groupes a servi de groupe témoin; les vaccins antirabiques Formidogel, Flury et Fuenzalida modifié ont été administrés respectivement aux autres groupes.

Après une période de huit mois, tous les animaux ayant fait l'objet de cet essai expérimental ont été soumis à l'épreuve de confrontation qui a permis de relever les valeurs suivantes en ce qui concerne la mortalité: groupe témoin

12/13 (92,3%); groupe inoculé avec le vaccin Fuenzalida, 13/14 (92,9%); groupe inoculé avec le vaccin Flury, 6/13 (46,2%); groupe inoculé avec le vaccin Formidogel, 3/13 (23,1%). D'après cet essai, le vaccin Fuenzalida n'a pas donné de résultats satisfaisants chez les bovins, en tenant compte de la modification apportée dans sa préparation.

L'analyse statistique des résultats a révélé, en adoptant une proportion de rejet égale à 5%, que:

1) la mortalité dans le groupe inoculé avec le vaccin Formidogel n'a pas accusé de différence notable par rapport à celle enregistrée dans le groupe auquel le vaccin Flury a été administré;

2) la mortalité, tant dans le groupe inoculé avec le vaccin Formidogel que dans celui auquel on a administré le vaccin Flury, a été beaucoup plus faible que celle enregistrée dans

le groupe inoculé avec le vaccin Fuenzalida modifié et dans le groupe témoin;

3) la mortalité dans le groupe inoculé avec le vaccin du type Fuenzalida modifié n'a été guère différent de celle enregistrée dans le groupe non vacciné.

Des épreuves de séro-neutralisation ont été effectuées 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 240 jours après la vaccination.