

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

WILDEBERG CÁL MOREIRA

Avaliação da Profilaxia contra o Vírus da Raiva pelas Técnicas de
Contraímuno eletroforese e Rápida Inibição de Focos Fluorescentes

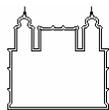
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do Título
de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

Orientador: Dr.^a Rugimar Marcovitz

RIO DE JANEIRO

2007

Trabalho realizado no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge “Vaitsman”, na Seção de Diagnóstico de Raiva, no Setor de Sorologia Específica, sob orientação da Dr.^a Rugimar Marcovitz.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

Wildeberg Cál Moreira

**AVALIAÇÃO DA PROFILAXIA CONTRA O VÍRUS DA RAIVA PELAS TÉCNICAS
DE CONTRAIMUNOELETOFORESE E RÁPIDA INIBIÇÃO DE FOCOS
FLUORESCENTES**

ORIENTADORA: Dr.^a Rugimar Marcovistz

Aprovada em : 07/02/2007

EXAMINADORES:

Dr. Renato Sergio Marchevsky – Presidente
Dr.^a Phyllis Catharina Romijn
Dr. Carlos Mazur

Rio de Janeiro

À minha família, em especial aos meus pais que me proporcionaram a oportunidade de estudar e chegar aonde cheguei.

AGRADECIMENTOS

À Dr.^a Rugimar Marcovitz, pela orientação e enriquecimento do conteúdo desta dissertação.

Ao Diretor do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, Dr. Akira Homma, por propiciar as condições para a realização deste curso.

À Coordenação do Curso de Mestrado Profissional em Tecnologia em Imunobiológicos – MPTI, Dra. Sheila Farage e Dr. Ricardo Galler – pelo apreço na qualidade do ensino bem como a sempre atenciosa Zaíra Antunes Prado.

Ao Diretor do Centro de Criação de Animais de Laboratório – Cecal –, Dr. Antenor Andrade, pelo apoio ao crescimento dos profissionais dessa Unidade.

À Dra. Tatiana Rezende Vieira Pessoa, Diretora do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge “Vaitsman” – IMMJV –, por possibilitar a realização dos experimentos desta dissertação.

À Diretora do Instituto Oswaldo Cruz – IOC –, Dra. Tânia Cremonini de Araujo-Jorge.

Ao Presidente da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz –, Dr. Paulo Marchiori Buss.

Ao Dr. Wlamir Correa de Moura, pelo grande auxílio na consecução de todas as tarefas.

Ao Dr. Marlon Vicente da Silva e à Dra. Beatriz Cristina Pereira dos Santos, pelas importantes contribuições e pelo apoio constante em todos esses anos.

Ao Dr. Pedro Cabello, pelo valioso auxílio na área da estatística.

Ao Dr. Renato Marchevsky, pelo empenho e dedicação na correção desta dissertação.

À Allan Rogério de Alvarenga, pelo grande auxílio na parte técnica dos experimentos.

Aos colegas do MPTI 2005, Carlos Correa Netto, Carlos Renato Calvet, Catia Cristina Santanna, Claudia Moraes Molinaro, Cristine Maria de Lima, Danilo Parmera Vassalo, Denise Aparecida Ramos, Elaine Maria de Faria Teles, Fernanda Rimolli de Castro Araújo, Henriana Landrini, Isabela Maluf, Luciana Carreiras Norte, Luiz Antonio da Cunha, Maria Celia Chaves Zuma, Mariza Cristina, Pedro Jorge de

O. Corrêa, Mauro França da Silva, Rafael Lawson Ferreira e Raouf Emile Sykora, pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Raiva do IMMJVJ e do Pavilhão de Animais de Médio e Grande Porte do Cecal – Fiocruz, pelo muito que contribuíram na minha valorização humana e profissional.

Aos amigos da Graduação, – impossível enumerá-los –, que sempre estiveram juntos em todos esses anos de crescimento profissional.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a elaboração desta Dissertação.

À Prof. Dra. Sigrid Gavazzi, pela acuidada revisão do português.

“...Tereis, contudo, razão, se afirmardes que a felicidade se acha destinada ao homem nesse mundo, desde que ele a procure, não nos gozos materiais, sim no bem. A história da cristandade fala de mártires que se encaminhavam alegres para o suplício. Hoje, na vossa sociedade, para serdes cristãos, não se vos faz mister nem o holocausto do martírio, nem o sacrifício da vida, **mas única e exclusivamente o sacrifício do vosso egoísmo, do vosso orgulho e da vossa vaidade.** Triunfareis, se a caridade vos inspirar e vos sustentar a fé...”

Espírito Protetor (Cracóvia, 1861)

“...O egoísmo é, pois, o alvo para o qual todos os verdadeiros crentes devem apontar suas armas, dirigir suas forças, sua coragem. Digo: **coragem, porque dela muito mais necessita cada um para vencer-se a si mesmo, do que para vencer os outros...**”

Emmanuel (Paris, 1861)

Extraído de O Evangelho Segundo o Espiritismo
– Allan Kardec. FEB. 85ª ed.

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
ANOVA	análise da variância
BHK-21	baby hamster kidney – linhagem 21
CAA	células apresentadoras de antígeno
CC	vacina de cultivo celular
CIE	contraimuno eletroforese
CAC	commercial antirabies conjugate
CVS	challenge virus standard
DICT ₅₀	dose infecciosa em cultura de tecido 50%
DL ₅₀	dose letal 50%
EBL	european bat lyssavirus
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FP	vacina fuenzalida & palácios
HDCV	human diploid cell vaccine – vacina de célula diplóide humana
HRIG	human rabies immunoglobulin – imunoglobulina anti-rábica humana
IC	intracerebral
IFD	imunofluorescência direta
IFN	interferon
IM	intramuscular
IMMVJV	Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”
IHC	in house produced antirabies conjugate
IP	intraperitoneal
LCE	líquido cérebroespinal
MHC	complexo maior de histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCRJ	Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro
PVPI	polivinilpirrolidona-iodo
PV	Pasteur virus
<i>r</i>	coeficiente de correlação de Pearson
RIFF	rápida inibição de focos fluorescentes
RNA	ácido ribonucléico
RNP	ribonucleoproteína
RT-PCR	PCR transcriptase reversa
SFB	soro fetal bovino
SAR	soro de cavalos hiperimunizados
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SNC	sistema nervoso central
S/SCZ Sanitária	Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização
<i>t</i>	teste <i>t</i> -Student
TNC	teste de neutralização em camundongos
UI/mL	unidades internacionais por mililitro
VR	vírus da Raiva

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	1
1.1.1. Antiguidade (4000 a.C. – séc. V)	1
1.1.2. Idade Média (séc. V – séc. XV)	1
1.1.3. Era Moderna (séc. XV – séc. XVIII)	2
1.1.4. Era Contemporânea (séc. XVIII – atual)	2
1.1.5. Brasil	3
1.2. Etiologia	5
1.3. Patogenia	7
1.4. Manifestações Clínicas da Raiva Humana	9
1.5. Patogênese	10
1.6. Histopatologia	11
1.7. Epidemiologia	12
1.8. Controle e Erradicação	13
1.9. Diagnóstico	14
1.9.1. Avaliação sorológica	15
1.10. Prevenção e Profilaxia	19
1.11. Resposta imunológica	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1. Amostras de Soro	27
2.2. Animais de Laboratório	34
2.3. Cultura de Células	35
2.4. Cepa Viral	35
2.5. Teste de Imunofluorescência (IF)	35
2.6. Titulação dos Vírus da Raiva CVS-38 e CVS-11	36
2.6.1. Determinação da Diluição Trabalho de CVS-11	36
2.7. Teste de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes	36

2.8. Preparo do Conjugado Anti-Rábico	37
2.9. Titulação do Conjugado	39
2.10. Tratamento Estatístico	39
3. RESULTADOS	40
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	69
Anexo I – Esquema de pré-exposição para tratamento profilático anti-rábico humano*	69
Anexo II – Esquema para tratamento profilático anti-rábico humano com vacina de cultivo celular*	70
Anexo III - Esquemas de reexposição, conforme o esquema e vacina prévios e a vacina a ser utilizada por ocasião da reexposição*	71
Anexo IV - Conduta em caso de possível exposição ao vírus da Raiva em pacientes que receberam esquema de pré-exposição*	72
Anexo V – Fotomicrografias de célula BHK 21, imunofluorescência direta	73
Anexo VI - Miscelânea	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Resultados representando a média geométrica, desvio-padrão e coeficiente de variação dos títulos do soro referência internacional de anticorpos anti-rábicos (1,0 UI/mL, Copenhagen, Denmark) pela rápida inibição de focos fluorescentes	41
Tabela 3.2 – Resultados dos testes de Contraímuno eletroforese e Rápida Inibição de Focos Fluorescentes para anticorpos anti-rábicos em 18 indivíduos vacinados	43
Tabela 3.3 – Descritores estatísticos dos títulos de anticorpos anti-rábicos pela técnica de RIFF para o Teste <i>t</i> -Student dados pareados, exibindo o coeficiente de correlação de Pearson	46
Tabela 3.4 – Descritores estatísticos das diferenças entre os títulos de anticorpos anti-rábicos pela técnica de RIFF para o Teste <i>t</i> -Student.....	46
Tabela 3.5 – Análise da variância (ANOVA) do modelo de regressão linear dos títulos de anticorpos neutralizantes titulado com os conjugados comercial e <i>in house</i>	47
Tabela 3.6 – Sensibilidade e especificidade entre os conjugados <i>in house</i> e comercial e as técnicas de CIE e RIFF	47
Tabela 3.7 - Regressão para a variável dependente título de anticorpos para Raiva na RIFF para o conjugado <i>in house</i>	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição de casos de Raiva humana por regiões do Brasil, no período de 1980 a 2005 (Brasil, 2006 ^a).....	4
Figura 1.2 – Esquema do vírus da Raiva secção longitudinal.....	5
Figura 1.3 - Corte transversal do vírion.....	5
Figura 1.4 – Esquema do genoma do vírus da Raiva.. ..	6
Figura 1.5 – Ciclo de infecção e replicação do vírus da Raiva.....	9
Figura 1.6 – Ciclos de Transmissão da Raiva (Brasil, 2002 ^a).	12
Figura 1.7. Técnica de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes.....	17
Figura 1.8. Técnica de Contraímunoelctroforese.. ..	18
Figura 3.1. Doses de vacina anti-rábica distribuídas em número de indivíduos tratados	40
Figura 3.2. Correlação dos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos pela técnica de RIFF com os conjugados <i>in house</i> e comercial	45

RESUMO

A Raiva é uma zoonose transmitida ao homem pela inoculação do vírus da Raiva principalmente pela mordedura de animais infectados e, mais raramente, pela arranhadura e lambadura de mucosas e/ou pele lesada. Apresenta letalidade de 100% e alto custo na prevenção de pessoas expostas ao risco de adoecer e morrer. No Brasil, os transmissores mais importantes são o cão e o gato, em áreas urbanas, e os morcegos que mantêm o ciclo silvestre da doença. Estimativas revelam que uma pessoa morre de Raiva a cada 15 minutos, mais de 300 outras são expostas e 4 milhões recebem tratamento em todo mundo. Em 2005, o Ministério da Saúde gastou cerca de R\$ 66,4 milhões com as ações de vigilância epidemiológica contra a Raiva. Tais recursos foram empregados para medidas como a realização de campanhas de vacinação e a aquisição de imunobiológicos. No período entre 2000 e 2006, 4.918 indivíduos vacinados tiveram amostras de soro examinadas pela Contraimuno eletroforese (CIE). De 5.502 soros analisados, 2.099 (38 %) apresentaram resposta insatisfatória à profilaxia realizada. Noventa e um soros, obtidos de 34 indivíduos que haviam recebido mais de um esquema profilático contra a Raiva foram selecionados para a titulação pela Rápida Inibição de Focos Fluorescentes (RIFF), utilizando dois conjugados: um produzido *in house* e outro comercial (padrão ouro). Setenta e quatro soros (82,22%) apresentaram título protetor ($\geq 0,5\text{UI/mL}$) e 12 soros (13,33%) título não-protetor ($< 0,5\text{UI/mL}$) quando testados pela técnica de RIFF. Os títulos de anticorpos, com o conjugado comercial e o conjugado *in house*, foram altamente correlacionados ($r = 0,94$). Assim, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com a titulação dos soros analisados para ambos os conjugados. O tipo de vacina, o número de doses de vacina e o intervalo entre o início do tratamento e o momento da coleta do sangue foram significativos sobre o título de anticorpos. A RIFF, usando o conjugado produzido *in house*, apresentou sensibilidade de 96% e especificidade de 92%, ao ser comparada com a RIFF usando o conjugado comercial. A sensibilidade da CIE foi 24 %, com 93% de especificidade em relação a RIFF, usando o conjugado *in house*. Com o conjugado comercial, a relação entre a CIE e a RIFF foi 25% para a sensibilidade e 100% para a especificidade. As diferenças entre os dois conjugados não foram significativas.

ABSTRACT

Rabies is a zoonotic disease transmitted to man through rabies virus inoculation, mainly via animal bite and, most rarely, through scratches or licks on mucous membrane and/or broken skin. The disease is 100% lethal and leads to high expenditure with preventive treatment of people exposed to the risk of becoming sick and dieing of rabies. In Brazil, the main responsables for rabies transmission are dogs and cats in urban areas, and bats, which are responsible for the wild cycle of the disease. Published data indicate that one person dies from rabies each 15 minutes, more than 300 others are exposed and 4 million people are treated in the whole world. In 2005, Ministry of Health spent about R\$ 66.4 million with epidemiologic surveillance of rabies. Such amount was invested in steps like vaccination campaigns and purchase of immunobiological products. From 2000 to 2006, 4,918 people had their serum samples examined by counterimmunoelectrophoresis (CIE) test. Of the 5,502 sera tested, 2,099 (38%) showed unsatisfactory response to the antirabies prophylactic treatment. Of these, 91 serum samples from 34 people treated with more than one antirabies prophylactic treatment were selected and examined by the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) using an in house produced antirabies conjugate (IHC) and a commercial antirabies conjugate (CAC) as the gold standard. Seventy four sera (82.22%) exhibited protective titers (≥ 0.5 UI/mL) and 12 (13.33%) had no protective titers (< 0.5 UI/mL) when tested by RFFIT. Antibody titers obtained using CAC and IHC were in strong correlation ($r=0.94$), with no significant difference between the results of the sera examined with both conjugates. The type of vaccine, the number of doses of vaccine and the interval between the beginning of the vaccination and blood sample collection significantly influenced the antibody titers. RFFIT using the IHC presented sensitivity and specificity equal to 96% and 92%, respectively, when compared to RFFIT using the CAC. CIE sensitivity was 24% while its specificity was equal to 93% when compared to RFFIT using the IHC; when compared to RFFIT using the CAC, CIE sensitivity was 25% and specificity was 100%. The differences between both conjugates were not statistically significant.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

1.1.1. Antiguidade (4000 a.C. – séc. V)

O vírus da Raiva (VR) é a causa de uma das doenças mais antigas e a mais letal de todas as doenças infecciosas. Foi reconhecida no Egito há 2300 anos antes de Cristo (a.C.) (White & Fenner, 1994; Collier & Oxford, 2000), e já na era pré-mosaica eram previstas multas no código de Eshnunna da Mesopotâmia para os proprietários de “cães loucos” que agredissem pessoas (Mattos *et al.*, 2001). Os gregos chamavam a Raiva de Lyssa ou Lytta, que significa “loucura”. Em latim, a palavra “raiva” deriva de “rabhas” do Sânscrito antigo que significa “ser violento” (Steele & Fernandez, 1991), ou “rabere” também do Latim, “raiva” ou “loucura” (Prescott *et al.*, 1996). Assim, em outros países, a mesma infecção recebeu outras denominações, a palavra alemã “tollwut”, originada do Indugermânico “Dhvar” (dano) e “wut” do alemão “wuot” (rage) na Alemanha de então. Em território francês, verificou-se que a palavra francesa “rage” é derivada do pronome “robere”, “ser louco” (Steele & Fernandez, 1991).

Cardanus, no século I, relatou a saliva de cães raivosos como a fonte de infecção e os especialistas romanos da época descreviam o material infeccioso como um veneno que, em Latim, era “virus” (Steele & Fernandez, 1991; Mattos *et al.*, 2001). Na medicina da Antiguidade, recomendavam-se os cáusticos, a cauterização, o uso de ventosas e a aspiração das feridas causadas por cães raivosos, de acordo com a extensão da lesão (Collier & Oxford, 2000; Mattos *et al.*, 2001).

1.1.2. Idade Média (séc. V – séc. XV)

Os doutores sírios acreditavam, no começo do século IX, que a doença era incurável. Rhazes, médico árabe, mencionou a hidrofobia e descreveu um paciente que, quando olhava a água, tinha ataques com tremores e enrijecimento muscular (Steele & Fernandez, 1991). Outro médico árabe, Avicenna, no século XI,

descreveu sinais cutâneos como eritema, designados de roséola rábica, também denominada de *pleiad rábica* e *bubo rábico*. Essas observações marcaram uma etapa importante para a compreensão da doença (Fleming, 1872). Com o progresso da medicina as observações tornaram-se mais valiosas e detalhadas, embora a prevenção bem sucedida (ou as tentativas em curar) ainda fosse desconhecida (Steele & Fernandez, 1991).

1.1.3. Era Moderna (séc. XV – séc. XVIII)

Uma transição gradual da era medieval e das superstições religiosas ao Renascimento, período do pragmatismo e da experimentação, resultou em um tratado, de 1546, intitulado “Una ferida incurable” escrito por Fracastoro, médico italiano (Mattos *et al.*, 2001). A Universidade de Sorbonne condenou as práticas – que considerava supersticiosas – para o tratamento da Raiva em uma declaração em 1671 (Steele & Fernandez, 1991).

1.1.4. Era Contemporânea (séc. XVIII – atual)

Na primeira década dos anos 1800, Zinke (1804) demonstrou que a doença poderia ser transmitida pela inoculação da saliva, por intermédio de uma experiência simples: utilizou a saliva de um cão com Raiva, aplicada com um pincel, em incisões feitas em outro cão. Naquela época, ocorreram também avanços no conhecimento da infecção, que incluíam o comprometimento do sistema nervoso e, ainda a respeito da fonte, da patogênese e do tratamento da Raiva (Steele & Fernandez, 1991). Em 1824, recomendava-se como tratamento, fazer incisões profundas nas feridas que deviam ser lavadas com água ou ácido clorídrico diluído. Depois que a ferida estivesse limpa e seca, era aplicado um ferro quente ou o ácido clorídrico concentrado (Ekstrom, 1830).

Já no passado, os estudiosos aceitavam a inoculação de um vírus pela mordedura como a causa da doença, mas consideravam a geração espontânea como a origem do vírus. Raynaud (1879) relatou, por exemplo, um experimento com

a saliva de um paciente com Raiva, que injetou subcutaneamente na orelha de coelho, e quatro dias mais tarde o animal apresentou paralisia e morreu. Estas observações não convenceram a Pasteur, mas são mencionadas como tendo conduzido a seu grande trabalho publicado em 1881 (Steele & Fernandez, 1991).

Portanto, no conhecimento da infecção, mesmo conhecendo os sinais clínicos da Raiva desde a mais remota Antiguidade, somente ao final do século XIX ocorreram significativos progressos para o diagnóstico, tratamento humano e controle da Raiva animal. Embora Pasteur não tenha conseguido identificar o vírus, já acreditava que um microorganismo infinitamente pequeno era a causa da enfermidade sob estudo, o que foi confirmado mais tarde pelos estudos de microscopia eletrônica (Atanasiu *et al.*, 1963; Davies *et al.*, 1963; Matsumoto, 1963).

1.1.5. Brasil

A primeira epizootia de Raiva em herbívoros notificada no Brasil ocorreu em Santa Catarina, entre 1906 a 1908. Foi denominada de Epizootia de Biguaçu, e estudada por Parreiras Horta, médico do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (Parreiras & Figueiredo, 1911). Carini, médico do Instituto Pasteur de São Paulo, identificou o VR determinando o agente causador da epizootia de Biguaçu e observou que o número de cães, afetados pela Raiva, era desproporcional ao de bovinos e eqüinos – levantou então – a hipótese da Raiva ser transmitida por morcegos hematófagos (Carini, 1911). A suspeita de Carini foi confirmada alguns anos mais tarde, entre 1914 a 1918, por dois veterinários alemães contratados pelo governo brasileiro para estudar as mortes dos animais no sul do país (Haupt & Rehaag, 1925). Posteriormente, Hurst e Pawan (1931) descreveram um surto de Raiva em Trinidad sem história de mordidas e com sinais de mielite ascendente aguda. Em 1936, Pawan demonstrou, pela primeira vez, seres humanos sendo mordidos por morcegos vampiros e morrendo de Raiva (Pawan, 1936).

No período de 1980 a 2005, foram notificados 1.432 casos de Raiva humana no Brasil (Brasil, 2006^a) (Figura 1.1). Entre 1997 e 2001, mais de 400 mil pessoas ao ano procuraram atendimento médico por terem sido expostas ou por se julgarem expostas ao VR e 60% recebeu algum tipo de indicação de tratamento profilático (Brasil, 2002^a). Entre os anos de 1980 e 2004, houve uma redução

significativa no número de casos registrados por ano, caindo de 173 para 30, representando uma queda de 83%. A maioria dos casos está concentrada nas Regiões Norte e Nordeste.

No Estado do Rio de Janeiro, o último caso de Raiva humana registrado havia sido em 1985 e, em 1984, o último caso no Município do Rio de Janeiro. Porém de janeiro a outubro de 2006, foram notificados 6 casos de raiva humana (Brasil, 2006^c) e recentemente um caso humano ocorrido na Região Serrana Fluminense (Marlon Vicente da Silva, comunicação pessoal). A Raiva canina, de ciclo urbano, teve seu último registro no Estado em 1987 (ERJ, 2006).

Atualmente, todos os Estados do Brasil têm à disposição, nas Unidades de Saúde, vacina de alta qualidade para a prevenção da doença, e quando indicado, o soro está disponível nos hospitais de referência (Brasil, 2006^b). Em 2005, o Ministério da Saúde gastou cerca de R\$ 66 milhões com as ações de vigilância epidemiológica para Raiva. Esses recursos serviram para medidas como a realização de campanhas de vacinação e a aquisição de imunobiológicos (Brasil, 2006^c).

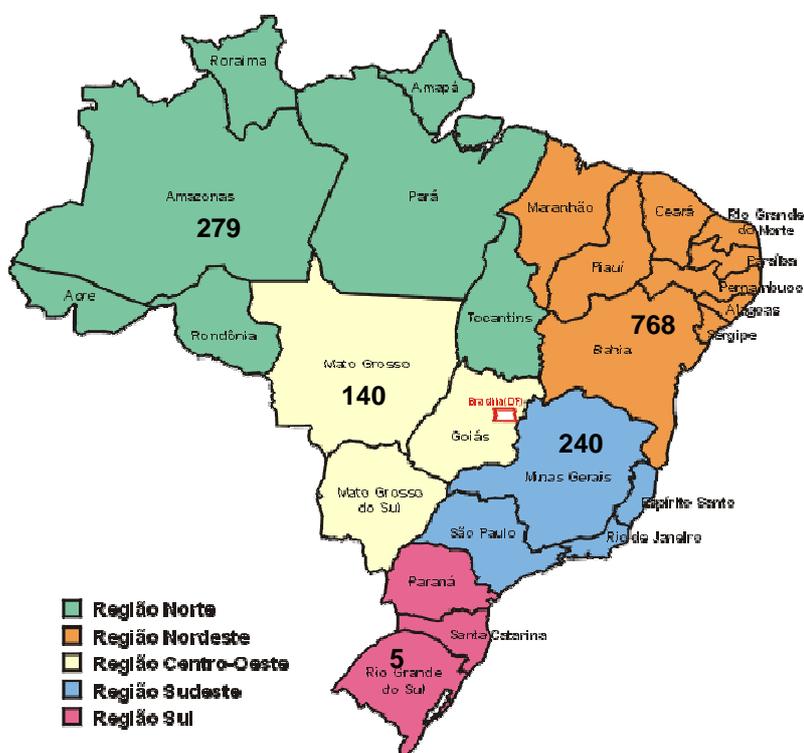


Figura 1.1 - Distribuição de casos de Raiva humana por regiões do Brasil, no período de 1980 a 2005 (Brasil, 2006^a)

1.2. Etiologia

O VR pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, que inclui pelo menos três gêneros de vírus que afetam animais, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* e *Vesiculovirus*. Atribuía-se a Raiva apenas uma espécie de vírus, até que os métodos sorológicos, antigênicos e genéticos, demonstraram a existência de (pelo menos) sete genótipos diferentes (Rupprecht, *et al.*, 2002).

De acordo com as características sorológicas e antigênicas, o gênero *Lyssavirus*, é classificado em quatro sorotipos. O sorotipo 1, inclui o vírus rábico “clássico”, o “street” (selvagem) e as cepas vacinais. Os demais sorotipos são vírus relacionados a Raiva (Tordo, 1996). Os outros membros do gênero *Lyssavirus* são vírus Lagos Bat (LBV, sorotipo 2, genótipo 2), vírus Mokola (sorotipo 3, genótipo 3), European Bat Lyssavirus 1 (EBL-1, genótipo 5) e European Bat Lyssavirus 2 (EBL-2, genótipo 6), vírus Duvenhage (sorotipo 4, genótipo 4) e Australian Bat Lyssavirus (ABLV, genótipo 7) (King & Turner, 1993; Westbury, 1997; Mattos, *et al.*, 2001). O vírus possui a forma de *projétil* e seu genoma é constituído por ácido ribonucléico (RNA) de fita simples, não-segmentada e polaridade negativa (Prescott *et al.*, 1996; Tordo, 1996) (Figuras 1.2 e 1.3).

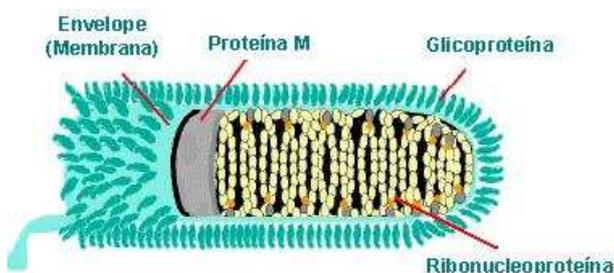


Figura 1.2 – Esquema do vírus da Raiva secção longitudinal
[capturado 23 dez. 2006] Disponível em:
http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the_virus/virus.htm

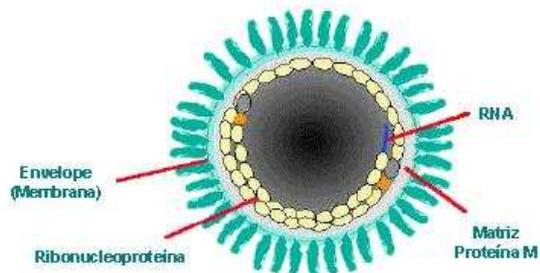


Figura 1.3 - Corte transversal do vírion
[capturado 23 dez. 2006] Disponível em:
http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the_virus/virus.htm

A partícula viral possui diâmetro de 75 nm (60 a 110 nm) e de 180 nm (100 a 300 nm) de comprimento (Hummeler *et al.*, 1967; Vernon *et al.*, 1972). As

partículas defeituosas assemelham-se ao vírus padrão na composição protéica e lipídica e têm a mesma configuração básica, porém, são mais curtas com 20% a 50% do comprimento do vírus padrão, 50% a 80% do genoma pode ser suprimido e não são infecciosas (Mattos *et al.*, 2001). Morfologicamente pode ser dividida em duas unidades estruturais: a central – formada por um cilindro denso, o nucleocapsídeo de simetria helicoidal – e a periférica, um fino envelope de 8 nm de largura coberto com espículas, que envolve o nucleocapsídeo. A massa molecular é de $4,6 \times 10^6$ kDa, a densidade $1,20 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de cério (CsCl), $1,19 \text{ g/cm}^3$ em sacarose (Koprowski, 1991; Mattos *et al.*, 2001) e com 12 kilobases de tamanho (White & Fenner, 1994).

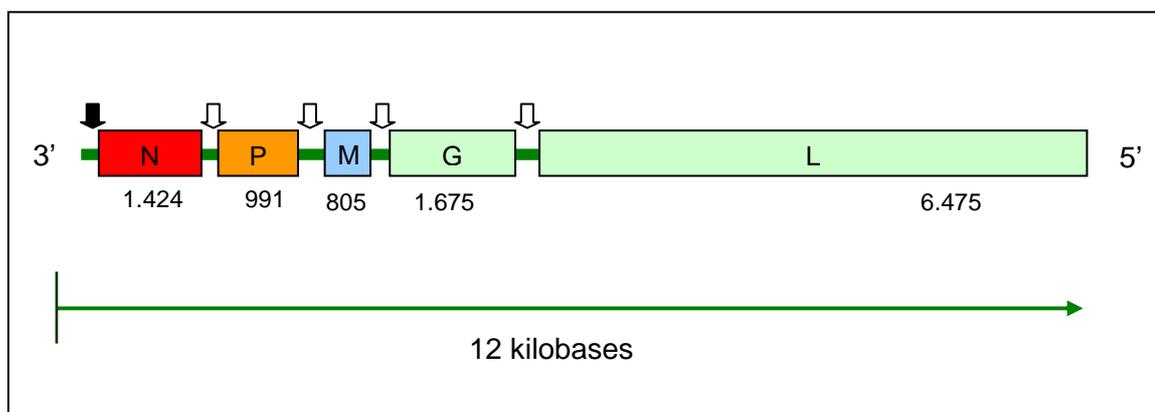


Figura 1.4 – Esquema do genoma do vírus da Raiva. Seqüência líder (seta preta) seguida pelos genes N, P, M, G e L. Seqüências intergênicas não-codificantes (setas brancas) (adaptado, CDC, 2006)

O genoma codifica cinco proteínas, nucleoproteína (N), polimerase (L), fosfoproteína (P), glicoproteína (G) e proteína da matriz (M) (Figura 1.4). No complexo ribonucleoproteína (RNP), a molécula de RNA genômico está firmemente associada à nucleoproteína N (Sokol *et al.*, 1971). Essa conformação protege o RNA da ação de ribonucleases e parece manter o RNA em uma configuração apropriada para a transcrição (Sokol *et al.*, 1969). Outras duas proteínas virais estão associadas à RNP, a fosfoproteína e a proteína L.

Essa última possui massa molecular relativamente alta e está ligada a molécula de RNA (Wunner, 1991; Tordo, 1996). Suas funções incluem a síntese, o *capping* (polarização), a metilação e a poliadenilação do RNA (Mattos *et al.*, 2001).

Em compensação, pouco se sabe sobre a fosfoproteína e sua associação à estrutura helicoidal da RNP e a natureza do complexo fosfoproteína-nucleoproteína N do vírion, ou como ela interage com a proteína L no complexo ativo da polimerase nas células infectadas (Wunner, 1991).

Já a glicoproteína G está presente em duas formas, com diferentes extensões de glicosilação, mas ambas são gorduras aciladas com ácido palmítico (Tordo, 1996). Tal proteína forma projeções de 10 nm de comprimento distando 5 nm entre elas, organizadas em trímeros de proteína G e ancoradas à membrana que envolve a partícula viral. Essa proteína é o antígeno de superfície capaz de induzir a formação e de reagir com os anticorpos neutralizantes (Mattos *et al.*, 2001). Acredita-se que as proteínas da matriz (M) estejam situadas na superfície interna do envelope viral onde interagem com segmentos internos das proteínas G ancoradas na membrana, ligando as proteínas associadas a membrana ao nucleocapsídeo, além de exercerem uma função essencial no brotamento do vírus (Hummeler *et al.*, 1968; Weiss & Bennett, 1980).

O VR apresenta dois antígenos principais. Um externo (glicoproteína G) e outro, interno (nucleoproteína N) (Brasil, 2002^a). O vírus é estável em uma faixa de pH entre 5 e 10 e é inativado por agentes físicos e químicos, como o calor, radiação ultravioleta, raios X, detergentes, agentes oxidantes, etc. (Mattos *et al.*, 2001). É sensível a solventes lipídicos, ao álcool etílico de 45% a 70%, às preparações iodadas e aos compostos quaternário de amônio (Kaplan, 1996).

1.3. Patogenia

A Raiva é uma antropozoonose transmitida ao homem pela inoculação do VR principalmente pela mordedura de animais infectados e, mais raramente, pela arranhadura e lambedura de mucosas e/ou pele lesada (Brasil, 2002^a). A pele íntegra é uma barreira importante ao vírus, mas as mucosas são permeáveis, mesmo quando intactas (Costa *et al.*, 2000). O VR não é estável no ambiente em circunstâncias comuns, porém, em cavernas habitadas por morcegos, pode ocorrer a transmissão por aerossóis (Constantino, 1962). Existe a possibilidade de transmissão inter-humana iatrogenicamente por meio de transplante de órgãos cujos

doadores que morreram de Raiva não diagnosticada (White & Fenner, 1994; Collier & Oxford, 2000).

O vírus penetra no organismo, replica-se no ponto de inoculação, atinge o sistema nervoso periférico e, posteriormente, o SNC e causa um quadro clínico característico de encefalomielite aguda. Com a progressão do quadro clínico, ocorre a disseminação para vários órgãos. O VR replica, também, nas glândulas salivares e é eliminado na saliva de pessoas ou animais infectados (Brasil, 2002^a; Xavier *et al.*, 2005).

Com a fusão do envelope do vírus à membrana da célula hospedeira pelo processo de adsorção, inicia-se a infecção. A interação da proteína G com os receptores específicos da superfície promovem a entrada na célula por endocitose. Os agregados de vírions permanecem em endossomas até que as membranas virais fundem-se à membrana endossomal, liberando a RNP viral no citoplasma. Ocorre então a transcrição do RNA.

A transcrição preliminar, pelo complexo da transcriptase do vírus, produz cinco espécies de mRNA na ordem N, P, M, G, e L. Cada um destes é 5' polarizado e 3' poliadenilado pela enzima codificada pela proteína L. A tradução, por sua vez, que envolve a síntese das proteínas N, P, M, G e L, ocorre nos ribossomas livres do citoplasma. Embora a síntese da proteína G seja iniciada nos ribossomas livres, a terminação e glicosilação ocorrem no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi.

Por fim, a concentração intracelular de moléculas de RNA líder para a proteína N, regula a interrupção da transcrição e a transição para a replicação, cuja primeira etapa é a síntese de cópia complementar autêntica do RNA genômico. Quando ocorre interrupção da replicação, a transcrição do mRNA não contém *stop códons*. Observa-se também que: a) A polimerase viral reconhece a extremidade 3' e inicia a síntese de cópias do RNA genômico; b) Estas fitas positivas do RNA do VR servem como moldes para a síntese das fitas negativas do genoma viral; c) Na montagem da partícula viral, o complexo protéico N-P-L encapsula o RNA genômico formando RNP e a proteína de M forma a matriz em torno do RNP; d) O complexo de RNP-M migra em áreas da membrana plasmática da célula que contêm inserções de glicoproteínas e e) O complexo de RNP-M liga com as glicoproteínas e o vírus terminado brota da membrana (CDC, 2006) (Figura 1.5).

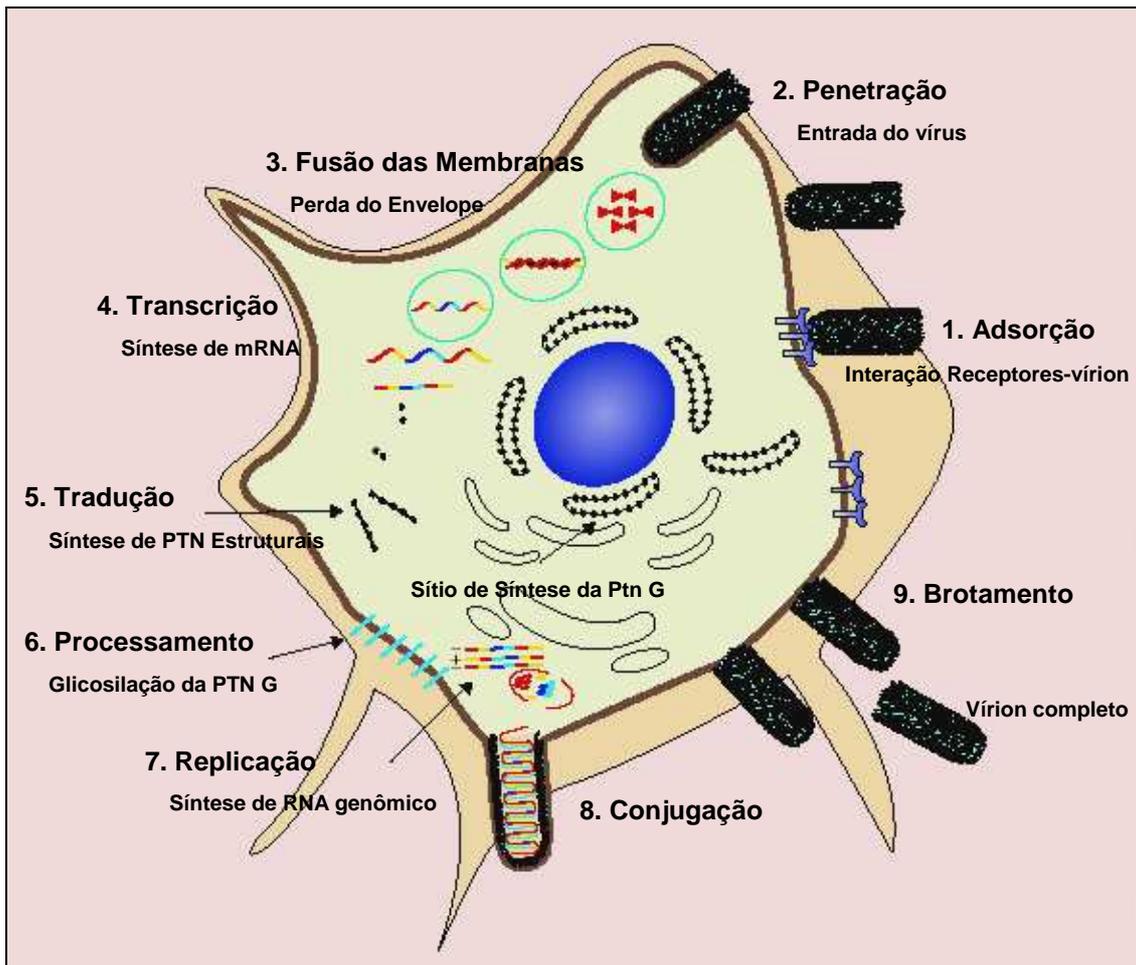


Figura 1.5 – Ciclo de infecção e replicação do vírus da Raiva (adaptado de CDC, 2006)

1.4. Manifestações Clínicas da Raiva Humana

O período de incubação é altamente variável e depende do local, tamanho e profundidade da ferida, e ainda da concentração de partículas virais inoculadas na mordida (Madigan *et al.*, 2000). Quando nenhuma vacinação é iniciada, a mortalidade mais elevada (40% a 80%) tende a ocorrer em pessoas mordidas na cabeça, naquelas mordidas nas mãos ou nos braços, a mortalidade gira em torno de 15% a 40%, e é menor (5% a 10%) em pessoas mordidas no tronco ou nos pés, ou sobre a roupa, menor que 5% (Mattos *et al.*, 2001).

O quadro clínico pode ser dividido em três fases gerais, sendo um período prodromal, uma fase neurológica aguda e o coma que precede a morte (Mattos *et al.*, 2001).

A – Os sinais clínicos da Raiva geralmente começam de 2 a 16 semanas depois da exposição (Prescott *et al.*, 1996), ou entre 14 e 90 dias, mas pode ser consideravelmente mais longo, havendo casos de período de incubação de até 6 anos (White & Fenner, 1994), em média é de 1 a 3 meses, dependendo da quantidade do vírus depositada e da distância da mordida à cabeça (Collier & Oxford, 2000). A paralisia é frequentemente a principal manifestação clínica e ocorre delírio, coma e morte (White & Fenner, 1994);

B – A Raiva parálitica ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes e parece ser mais freqüente naqueles expostos a determinadas variantes, como às cepas de morcegos vampiros. Os pacientes desenvolvem inicialmente parestesia e fraqueza, e posteriormente paralisia flácida na extremidade mordida. A paralisia progride para a paraplegia seguida de quadriplegia (Mattos *et al.*, 2001). O curso é geralmente mais lento que na Raiva *furiosa*, com alguns pacientes sobrevivendo até 30 dias sem cuidado intensivo (Collier & Oxford, 2000; Mattos *et al.*, 2001).

C – O estágio final da doença é o coma, que dura 3 a 7 dias e resulta em morte (Mattos *et al.*, 2001). A Raiva parálitica é caracterizada por paralisia ascendente e nestes casos a medula espinhal tem maior comprometimento do que o cérebro (Collier & Oxford, 2000).

1.5. Patogênese

A patogenia da raiva não está ainda totalmente esclarecida. A transmissão mais comum do VR é pela mordida e saliva de um animal infectado (CDC, 2006). Depois da infecção inicial, o vírus entra em uma fase em que não é detectado. Esta fase pode durar para diversos dias ou meses. O período de incubação varia 3 a 12 semanas, podendo chegar a anos (Baer & Lentz, 1991). O vírus pode alcançar diretamente as terminações nervosas sensoriais e/ou motoras, ou permanecer algumas horas nas células musculares estriadas, onde ocorre uma amplificação viral, que propiciará a infecção dos nervos periféricos (Tsiang, 1988). O receptor nicotínico da acetilcolina é local de ligação (White & Fenner, 1994; Prescott *et al.*, 1996; Collier & Oxford, 2000; Tyler & Nathanson, 2001). O genoma viral é transportado no interior do axoplasma dos neurônios, centripetamente, à razão de

50 a 100 mm por dia, provocando os primeiros sinais específicos da doença, como a dor ou a parestesia no local da ferida (Prescott *et al.*, 1996), até alcançar o Sistema Nervoso Central (SNC) (Tsiang *et al.* 1991).

As manifestações clínicas, como ataxia ou depressão, são em consequência do efeito direto do vírus na função das células neurais (Tollis *et al.*, 1991). O vírus alcança o sistema límbico, responsável pelo comportamento e, conseqüentemente, pela agressividade manifestada pelos hospedeiros durante a doença (Germano, 1994). Uma encefalite progressiva se desenvolve rapidamente enquanto o vírus dissemina pelo SNC (Prescott *et al.*, 1996). Replica-se no neocórtex, levando a Raiva parálitica, que evolui a depressão, coma (White & Fenner, 1994), e morte por depressão respiratória (White & Fenner, 1994; Madigan *et al.*, 2000).

1.6. Histopatologia

As lesões histológicas causadas pelo VR no homem e nos animais são geralmente limitadas ao SNC, podendo ser discretas ou, mesmo, estar ausentes. Um quadro de característico de encefalomielite pode ser observado. O exame microscópico pela coloração de hematoxilina e eosina, revela a presença de infiltrado mononuclear, acúmulos perivasculares principalmente de linfócitos, nódulos de Babes constituídos por células gliais, variados graus de degeneração, apoptose e necrose dos neurônios. Classicamente são citados os corpúsculos de Negri (inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas) observados nos neurônios (Storts & Montgomery, 2001). Há uma destruição celular mínima em contraste com a extensa disfunção neurológica observada na doença (White & Fenner, 1994). Uma miocardite está frequentemente presente, com inclusões citoplasmáticas características (corpúsculos de Negri) em alguns pacientes (Collier & Oxford, 2000).

1.7. Epidemiologia

O vírus da Raiva ocorre em todo mundo, exceto na Austrália, na Antártida e em algumas ilhas como o Japão e a Nova Zelândia (Mattos *et al.*, 2001). Os reservatórios da infecção variam de acordo com a área geográfica, sendo os cães e os gatos as fontes de maior importância na infecção humana. Os outros reservatórios importantes são os lobos na Europa Oriental, a raposa vermelha na Europa Ocidental, os mangustos e morcegos vampiros no Caribe, gambás, guaxinins e morcegos nos EUA e Canadá, e os morcegos vampiros na América Latina (Collier & Oxford, 2000).

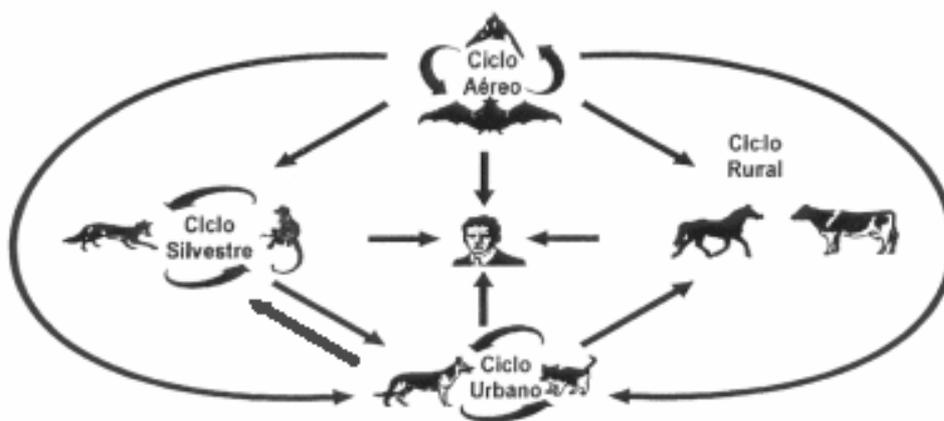


Figura 1.6 – Ciclos de Transmissão da Raiva (Brasil, 2002^a)

No Brasil, os transmissores mais importantes são o cão e o gato, em áreas urbanas, e os morcegos que mantêm o ciclo silvestre da doença. Os casos confirmados de Raiva orientam as ações de vigilância epidemiológica da doença, porém a ocorrência de casos em área urbana indica deficiência das ações dirigidas à população animal, como a vacinação de cães e o controle de animais vadios além da atenção aos indivíduos expostos ao risco, incluindo o tratamento profilático e o diagnóstico de animais agressores (Figura 1.6) (Brasil, 2002^b).

Estimativas revelam que, a cada 15 minutos, é registrada uma morte e mais de 300 outras pessoas são expostas ao VR no mundo (Rupprecht *et al.*, 2002). A cada ano ocorrem 75 mil casos de Raiva humana no mundo (White & Fenner, 1994), sendo aproximadamente 35 mil nos países em desenvolvimento onde a Raiva ainda é endêmica em animais domésticos como o cão. Em torno de 1 milhão de

peças recebem tratamento por terem sofrido algum acidente com animais (Madigan *et al.*, 2000).

No Brasil, até o ano de 2003, o ciclo de transmissão predominante responsável pelos casos de Raiva humana era o urbano, e o cão contribuiu com a maioria dos casos. No ano de 2004 houve uma inversão dessa situação, quando o morcego tornou-se o principal responsável pelos casos de Raiva humana, devido a ocorrência de dois surtos nos municípios de Portel e Viseu no Pará (Brasil, 2002^c), totalizando 15 casos confirmados (Brasil, 2002^c; Brasil, 2004). Essa situação se repetiu no ano de 2005, devido aos surtos no Pará e Maranhão, onde foram notificados 32 casos de Raiva humana, sendo 30 por morcegos, um por cão e um por primata não-humano (Brasil, 2002^c).

1.8. Controle e Erradicação

Os princípios para o controle da Raiva incluem o controle de populações (cães, gatos e morcegos) como a primeira etapa. Os Estados Unidos gastam anualmente dez milhões de dólares no controle animal. É difícil estimar a população mundial de cães, mas usando a relação de um a dez para 6 bilhões de pessoas, a população canina estimada pode se aproximar a 600 milhões. A informação, a pesquisa e a vacinação fazem parte do tripé para os programas de controle da Raiva no mundo (OMS, 1983).

Eliminar o VR, no entanto, apresenta um alto grau de dificuldade, uma vez que a Raiva é endêmica em muitos animais selvagens que transmitem o vírus direta ou indiretamente ao homem (Dimmock *et al.*, 2001). Nos países desenvolvidos, onde a Raiva foi controlada ou eliminada dos animais domésticos, os esforços são concentrados para controle da Raiva nos animais silvestres. Nesses países está sendo estudada a vacinação oral, utilizando vacinas recombinantes e de DNA (Marcovistz *et al.*, 2005). A OMS vem experimentando a imunização de animais selvagens distribuindo iscas de carne com vacina de vírus ativado. Por exemplo, na Bélgica, foi usada uma vacina projetada geneticamente para expressar a proteína do envelope do vírus que tem apresentado bons resultados (Dimmock *et al.*, 2001).

Para o estabelecimento de um sistema eficiente de controle da Raiva, além das ações diretas nos animais, o programa deve incluir o tratamento das

peças expostas ao risco da infecção, a vigilância epidemiológica contemplando a coleta e o envio de material para exames de laboratório, o controle de áreas de foco de Raiva e a educação em saúde (Reichmann *et al.*, 1999; Brasil, 2002^a).

1.9. Diagnóstico

O diagnóstico da Raiva é realizado por detecção do antígeno viral em amostras biológicas provenientes de animais e seres humanos (Koneman *et al.*, 2001). Todo material coletado para o diagnóstico da Raiva deve ser considerado potencialmente infeccioso e precauções durante a manipulação e o transporte devem ser tomadas. É necessário enviar a cabeça do animal suspeito, o encéfalo inteiro ou fragmentos do tecido cerebral de ambos os hemisférios (córtex, cerebelo e hipocampo) (Costa *et al.*, 2000). Os fragmentos de eleição do SNC a serem coletados para diagnóstico laboratorial da Raiva, de acordo com a espécie são: o hipocampo e medula nos cães e gatos; o cerebelo e medula espinhal no bovino; medula nos eqüídeos; cérebro e cerebelo nos ovinos, caprinos e suínos; para animais silvestres, cérebro, cerebelo e medula, ou quando possível enviar animal inteiro para a identificação da espécie (Brasil, 2002^a).

Durante a coleta da amostra, o técnico deve usar instrumentos preferencialmente esterilizados e paramentação adequada, como luvas de borracha resistente, protetor facial e vestimenta apropriada (Costa *et al.*, 2000; Smith, 2003). Todo indivíduo que executa, ou auxilia, necrópsias de animais com suspeita de raiva deve submeter-se ao esquema vacinal de pré-exposição e ter seu soro titulado para anticorpos anti-rábicos duas vezes ao ano. A amostra selecionada deve ser devidamente embalada e identificada, colocada em caixa de isopor, com gelo suficiente. A forma de conservação dependerá do prazo estimado entre a coleta da amostra e a chegada ao laboratório. Até 24 horas, o material deve ser refrigerado e para período maior, obrigatoriamente congelado. Na falta de condições apropriadas de refrigeração, o material deverá ser conservado em solução salina com glicerina a 50%. Nunca devem ser utilizados formol ou outros conservantes que inativem o vírus (Costa *et al.*, 2000; Brasil, 2002^a).

Para o diagnóstico da Raiva em humanos, as amostras utilizadas incluem a saliva, o líquido cérebrospinal, biópsia de pele da região occipital e

impressão de córnea. Uma variedade de métodos podem ser utilizados dependendo do estágio da infecção. Dentre esses, citem-se: a imunofluorescência direta, a cultura e isolamento pela inoculação intracerebral em camundongos ou em células de neuroblastoma e a amplificação do ácido nucléico (PCR transcriptase reversa/RT-PCR). Após o oitavo dia da doença, os anticorpos podem estar presentes e são utilizados para o diagnóstico caso o paciente não tenha histórico de imunização. A presença de anticorpos para Raiva no LCE é sempre indicativa de diagnóstico positivo para a Raiva. Ao serem recebidas, as amostras devem ser processadas imediatamente, e quando não seja possível, mantidas a -20° C. (Crespin *et al.* 1998; Storch, 2001; Mattos *et al.*, 2001; Brasil, 2002^a; Smith, 2003; OMS, 2004).

O diagnóstico *post-mortem* deve ser executado em amostras do SNC, especialmente cérebro e cerebelo. O teste de IFD e o método imunohistoquímico da avidina-biotina são sensíveis e específicos para detectar o antígeno viral (Mattos *et al.*, 2001).

É importante que o diagnóstico laboratorial seja realizado em laboratórios aprovados e com pessoal qualificado e experiente (White & Fenner, 1994). Toda amostra positiva de humanos, animais silvestres e de cão e/ou gato de área indene, deve ser encaminhada para o Laboratório de Referência Nacional (Instituto Pasteur/SES/SP) para diagnóstico virológico (identificação de variante viral) (Brasil, 2002^a). As técnicas de caracterização antigênica e/ou genética permitem a identificação da variante viral e das espécies transmissoras, e são instrumentos decisivos para epidemiologia. A Raiva é a única zoonose cujo tratamento profilático dos humanos depende essencialmente do diagnóstico laboratorial das amostras dos animais agressores (OPAS, 2001).

1.9.1. Avaliação sorológica

A soroneutralização do VR é o método utilizado para a detecção de anticorpos. Neste método, as diluições de soro são incubadas com uma quantidade fixa de vírus e o vírus infectante residual é determinado pela inoculação em animais ou cultura de células (Smith *et al.*, 1996). Dois tipos de testes de soroneutralização são, rotineiramente, utilizados para quantificar os anticorpos neutralizantes contra

Raiva: Teste de Neutralização em Camundongo (TNC) e a Rápida Inibição de Focos Fluorescentes (RIFF) (Smith, 1991; OMS, 1992; Chiquet *et al.*, 1998).

Um grande avanço no diagnóstico da Raiva foi o Teste de Inoculação em Camundongo por Webster e Dawson (1935). O TNC tem sido considerado como a prova de referência também para quantificar anticorpos neutralizantes para Raiva. Nesta técnica, diluições seriadas de soro são confrontadas a uma concentração constante de VR, e o esgotamento dos anticorpos pela diluição permite que o vírus não seja neutralizado e camundongos adultos desenvolvem a Raiva quando inoculados. Por envolver animais, esta é uma técnica de custo elevado. Os animais inoculados são observados por 15 dias para acompanhar a evolução clínica da doença (Rizzo, 1983). Os camundongos adultos podem ser substituídos por camundongos lactentes e fornecer resultados seguros em três dias. Essa rapidez pode ser valiosa na detecção de resposta imunológica em pacientes submetidos a esquemas de vacinação pré ou pós-exposição (Gouvêa & Silva, 2000).

As alternativas menos dispendiosas e mais rápidas que o TNC foram desenvolvidas com a adaptação do VR em cultura de células. O primeiro dos métodos, desenvolvido em cultura de células, foi o teste de redução em placa. A desvantagem deste procedimento é o tempo requerido (5 a 7 dias) (Wiktor & Clark, 1973). A introdução do Teste de Inibição de Focos Fluorescentes (FFIT) permitiu diminuir sensivelmente o tempo requerido para a titulação de anticorpos em cultura de células, que detecta vírus residual pela imunofluorescência. Neste procedimento, as diluições seriadas do vírus são incubadas por 40 h. O vírus é titulado, contando-se os focos de infecção por orifício (dose infecciosa em cultura de tecido, TCID) ou encontrando-se o ponto em que 50% de culturas inoculadas são positivas (TCID₅₀). Finalmente, os títulos são comparados com o do soro padrão de referência (King *et al.*, 1968; Zalan *et al.*, 1979).

Os anticorpos também podem ser titulados por uma modificação do FFIT (Smith *et al.*, 1973). A Rápida Inibição de Focos Fluorescentes consiste em misturar o soro sob teste com a suspensão viral, adicionando esta mistura à monocamada de células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*). Revela-se a presença ou ausência de infecção viral após 24 horas, avaliada pela IFD (Zalan *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1996). A técnica apresenta ótima correlação com o TNC para a titulação de anticorpos (Smith *et al.*, 1996; Simani *et al.*, 1999). O fundamento da técnica de diversos métodos sorológicos como a RIFF envolve a replicação do VR não-reativo

com os anticorpos presentes no soro, que, na cultura de células, é detectado quando revelado pela técnica de imunofluorescência ao se observar as células infectadas (Smith, 1991) (Figura 1.7). Embora a TNC seja um teste da referência, a RIFF vem sendo utilizada como a técnica de escolha e é tão sensível quanto a TNC para a titulação de anticorpos específicos – e os resultados têm boa correlação (Smith *et al.* 1973; Khawplod *et al.*, 2005). Entretanto, a dificuldade de se processar um grande número de amostras e a necessidade de instalações especializadas podem limitar o uso rotineiro dessas técnicas (Yang *et al.*, 2006).

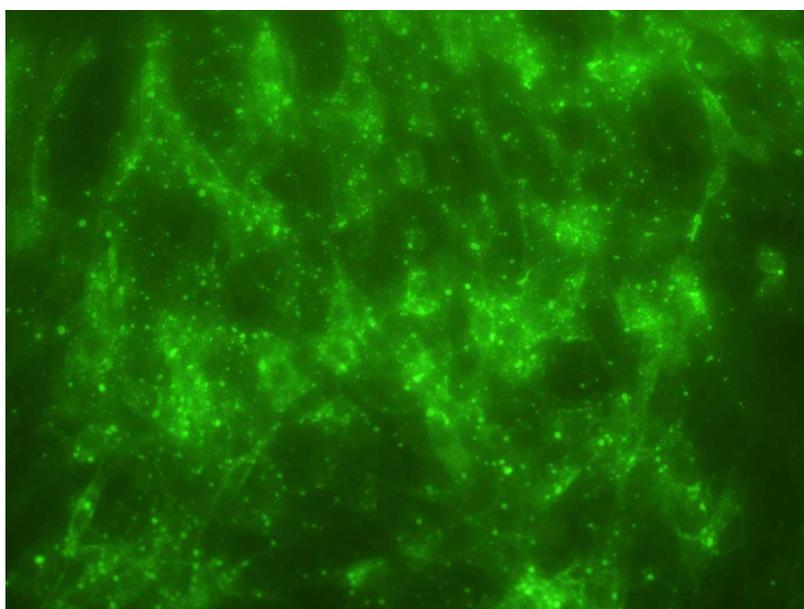


Figura 1.7. Técnica de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes. Células BHK-21 infectadas com cepa CVS-11. 20x

A Contraimunoeletroforese (CIE) é outra técnica *in vitro* para titulação de anticorpos neutralizantes para Raiva. Detecta basicamente anticorpos da classe IgG, anti-glicoproteína do VR, a principal imunoglobulina envolvida na proteção contra a doença. Por essa razão é capaz de determinar o potencial neutralizante dos soros analisados (Diaz & Myers, 1980; Diaz & Myers, 1981).

Essa técnica é desenvolvida em lâminas de gel agarose e baseia-se na união entre os anticorpos presentes nas diluições seriadas do soro de pessoas vacinadas, frente a uma concentração constante de antígeno (vírus da Raiva). Após uma primeira corrida eletroforética, o soro indicador hiperimune é colocado para

difundir em sentido contrário. Em toda diluição do soro, em que não houver anticorpos, será formada uma linha de precipitação, pois o antígeno livre migrará ao encontro do soro indicador. Na CIE é considerado como mínimo protetor o título 1:2.

A técnica é simples, de baixo custo, e por meio da qual se obtém resultados em curto período de tempo (6 a 8 horas), portanto de grande aplicação na rotina clínica (Diaz & Myers, 1980; Diaz, 1985; Diaz *et al.*, 1986; Diaz *et al.*, 1991). A CIE apresenta boa especificidade, porém é menos sensível que o TNC e não detecta baixas concentrações de anticorpos. Devido à menor sensibilidade da CIE, o título mínimo de anticorpos (1:25 ou 0,5 UI/mL pelo TNC) encontra-se no limite da capacidade de detecção da técnica (Diaz, 1985) (Figura 1.8).

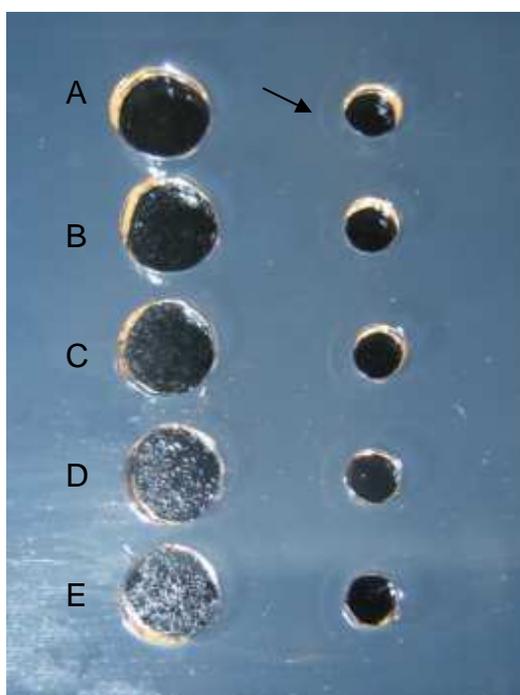


Figura 1.8. Técnica de Contraimunoeletroforese. Soro de um vacinado em diluição seriada (A) 1:2, (B) 1:4, (C) 1:8, (D) 1:16 e (E) 1:32. A visualização das bandas de precipitação (seta) indica que não houve neutralização

O teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), por sua vez, tem sua melhor aplicação no diagnóstico *ante-mortem* e deve detectar qualquer anticorpo induzido pelas proteínas virais. Quando o ELISA é utilizado para estimar a resposta imunológica a vacinação, o kit deve conter apenas a proteína G (Smith, 2003). Esse teste dispensa a microscopia de fluorescência para determinar títulos de anticorpos nos soros diluídos e distribuídos em microplacas de 96 poços. O título do

vírus é detectado pela leitura em espectrofotometria (492 nm) e calculado comparando com o soro controle negativo (Smith, 1991).

Outros métodos têm sido desenvolvidos para a titulação de anticorpos contra o VR, como o micrométodo para anticorpos neutralizantes e a citometria de fluxo (Andrulonis *et al.* 1976; Vengatesan *et al.*, 2006).

1.10. Prevenção e Profilaxia

Pasteur obteve imunidade em cães usando uma série de injeções do vírus atenuado, descobrindo, assim, uma maneira de imunizar seres humanos. Inoculava a medula de um coelho *raivoso* com fragmentos dessecados até 15 dias. Assim, o método consistiu essencialmente em injetar quantidades maiores do vírus a cada dia (Pasteur, 1886). Antes mesmo que a natureza dos vírus fosse compreendida, Louis Pasteur foi estimulado a alcançar uma das grandes descobertas na pesquisa biomédica, abrindo desse modo a era moderna da prevenção das doenças infecciosas pela vacinação (White & Fenner, 1994).

A profilaxia da Raiva humana pode ser feita por pré ou pós-exposição ao vírus. A profilaxia na pré-exposição compreende a vacinação, e é indicada para pessoas que correm o risco de exposição devido a atividade profissional, como os médicos veterinários. A profilaxia de pós-exposição tem indicação quando ocorrem exposições acidentais e deve incluir além da limpeza da lesão, a administração da vacina contra a Raiva isoladamente ou associada ao soro ou a imunoglobulina humana anti-rábica (Costa *et al.*, 2000) (Anexos 1, 2, 3 e 4).

Ressalte-se que existem vacinas seguras e eficazes contra a Raiva, entretanto, para ser eficaz devem ser administradas logo que o indivíduo tenha sido infectado. Os médicos veterinários e os técnicos de laboratório, que têm alto risco de exposição ao VR, devem ser testados quanto a presença de anticorpos semestralmente (Prescott *et al.*, 1996; Brasil, 2002^a).

Em caso de possível exposição ao VR, é imprescindível a limpeza do ferimento com água corrente abundante e sabão ou outro detergente, pois essa conduta diminui, comprovadamente, o risco de infecção (Brasil, 2002^a), em aproximadamente 90% (Collier & Oxford, 2000). Após a limpeza, devem ser

utilizados anti-sépticos que inativem o vírus, como o polivinilpirrolidona-iodo (PVPI[®], Rioquímica), gluconato de clorexidina (Chlorohex[®], Johnson) ou álcool iodado. O profissional que estiver assistindo o caso deve fazer a anamnese completa visando a indicação correta do atendimento profilático (Brasil, 2002^a).

Todas as vacinas para uso humano contra a Raiva são inativadas. A vacina Fuenzalida & Palácios modificada foi desenvolvida no Chile, na década de 1950, por Fuenzalida & Palácios. Produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos infectados com vírus fixo das cepas PV ou CVS, inativados pela beta-propiolactona. Fabricada pelo Instituto Butantan em São Paulo e pelo Instituto Tecnológico do Paraná - Tecpar, contém cerca de 2% de tecido nervoso, 0,01% de timerosal e 0,1% de fenol (Costa *et al.*, 2000). Os eventos adversos associados à vacina Fuenzalida & Palácios modificada incluem manifestações no local de aplicação da vacina e sistêmicas. Em geral, as manifestações são auto-limitadas e de evolução benigna. As manifestações neurológicas indicam a ocorrência de eventos adversos graves e incluem a encefalomielite, a mielite transversa e a síndrome de Guillain-Barré (polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda) (Costa *et al.*, 2000). A incidência de manifestações neurológicas associadas à vacina é de 1 caso para 8.000 vacinações (Held & Adaros, 1972). Essa vacina foi a mais utilizada no Brasil até o ano de 2000 quando passou a ser substituída pela vacina produzida em célula Vero.

Koprowski e Cox (1948) atenuaram a cepa Flury pela passagem em embrião de galinha, reduzindo extremamente sua neurovirulência. Esta vacina de baixa passagem em ovo (*Egg Passage Low - LEP*) juntamente com a variante de alta passagem em ovo (*Egg Passage High - HEP*), foram adaptadas mais tarde à cultura de células. Similarmente, uma vacina para uso humano foi produzida em embrião de pato (*Duck Embryo Rabies Vaccine - DEV*) e foi considerada como a medida profilática padrão por 25 anos (Peck *et al.*, 1955). A vacina DEV era relativamente ineficaz e seu uso foi descontinuado. Além disso, causava freqüentemente severas reações tóxicas sistêmicas (Tizard, 1995; Collier & Oxford, 2000).

Todavia, foram alcançados realmente progressos na produção de vacinas anti-rábicas, com elevado grau de imunogenicidade, utilizando-se culturas de células. A vacina contra Raiva, obtida a partir de fibroblastos humanos ou em cultura de células Vero, posteriormente inativada pela betapropiolactona ou tri-*n*-

butil, é um exemplo de vacina que apresenta várias características desejáveis (White & Fenner, 1994). As vacinas de células diplóides humanas são mais seguras e eficazes, eliminando muitos dos problemas com as vacinas produzidas em tecido cerebral. As células diplóides humanas (WI-38 / MRC-5) e Vero são as utilizadas para a produção comercial de vacina anti-rábica (Mattos *et al*, 2001).

O trabalho combinado de Wiktor e colaboradores (1978) resultou em uma vacina desenvolvida da linha humana homóloga a de cultivo celular (*human diploid cell vaccine - HDCV*) e foi considerada a vacina padrão-ouro para o tratamento anti-rábico (Dreesen, 1997). É produzida com a cepa Pitman-Moore e inativada pela beta-propiolactona. A potência mínima requerida (2,5 UI por dose) é maior que a da Fuenzalida & Palácios modificada devido à maior concentração viral, obtida por ultracentrifugação. Cada dose contém 5% de albumina humana, fenolsulfoftaleína e sulfato de neomicina (< 150 µg). Eventos adversos associados à vacina HDCV incluem manifestações locais e sistêmicas. As reações neurológicas associadas a esta vacina são de baixa ocorrência, cerca de 1 para cada 500 mil pacientes vacinados (Costa *et al*, 2000).

Em função do alto custo para o uso em larga escala da HDCV, nas décadas seguintes desenvolveu-se uma vacina contra a Raiva a partir de células renais de macacos africanos (Vero). As células Vero anteriormente foram utilizadas para a produção de vacinas contra a poliomielite (Purified Vero Cell Vaccine – PVCV). A vacina desenvolvida em células Vero é semelhante à HDCV, produzida com a cepa Pitman-Moore, inativada pela beta-propiolactona e concentrada por ultracentrifugação. A potência mínima é de 2,5 UI por dose e a incidência de reações adversas é semelhante à da HDCV (Costa *et al.*, 2000).

A vacina produzida em cultura de células de embrião de galinha (*Purified Chick-Embryo Cell Vaccine – PCEV*) é preparada com a cepa Flury LEP-C25 e desenvolvida em fibroblastos de embrião do mesmo tipo. Tem segurança semelhante à da HDCV. A vacina purificada produzida em embrião de pato (*Purified Duck-Embryo Vaccine – PDEV*), assim como a vacina de célula Vero, também utiliza a cepa Pitman-Moore. É produzida na Suíça e causa maior frequência de eventos adversos, embora moderados, quando comparada com a HDCV. No Brasil, vacinas produzidas em cultura celular ou em embrião de pato eram disponíveis apenas para pacientes imunodeprimidos e para os que apresentassem eventos adversos graves

à vacina Fuenzalida & Palácios modificada. Hoje, as vacinas produzidas em célula Vero estão disponíveis em toda Rede de Saúde Pública (Costa *et al.*, 2000).

Além da imunização, as pessoas em risco devem receber a vacina associada à imunoglobulina, o que reduz substancialmente a mortalidade (White & Fenner, 1994). Antes de serem purificados por processos de digestão enzimática, precipitação com sulfato de amônia e remoção do excesso de proteínas por termocoagulação, os soros anti-rábicos eram associados a reações anafiláticas e a reações de hipersensibilidade tardia (doença do soro). No momento, a incidência de doença do soro varia entre 1% e 6,2%, e a reação anafilática ocorre, raramente, com incidência menor que 1:40.000 procedimentos (Costa *et al.*, 2000).

A resposta anafilática pode ocorrer quando doses sucessivas de imunoglobulina são administradas. As melhores alternativas para evitá-la são usar *pools* de imunoglobulinas humana ou imunoglobulinas monoclonais de hibridomas humanos, ou ainda anticorpos humanos clonados (Dimmock *et al.*, 2001). O soro heterólogo pode ser preparado a partir de soro de cavalos hiperimunizados (SAR) enquanto a imunoglobulina anti-rábica humana (*Human Rabies Immunoglobulin – HRIG*) é produzida a partir do plasma de doadores previamente imunizados. Quando o SAR ou a HRIG não são administrados no início do esquema de vacinação, deverão ser aplicados antes da 3ª dose das vacinas de cultura celular ou embrião de pato. Após esse período, o emprego não é mais necessário, porque a própria vacina determina títulos de anticorpos protetores. Pacientes que previamente receberam tratamento completo para prevenção da Raiva não devem receber SAR ou HRIG (Costa *et al.*, 2000).

A pesquisa laboratorial em Raiva teve, especialmente no final da década de 1980, um avanço considerável. Destacam-se, principalmente, a evolução da qualidade das vacinas anti-rábicas, tanto as destinadas a seres humanos, quanto às espécies animais. O aprimoramento das vacinas de uso humano possibilitou uma drástica redução dos esquemas de tratamento pós-exposição (Germano, 1994). As perspectivas para o futuro, em matéria de imunógenos anti-rábicos, tanto para seres humanos, quanto para animais domésticos e silvestres, estão relacionadas com a produção de vacinas recombinantes, vacinas preparadas a partir da ribonucleoproteína do VR e vacinas preparadas com peptídeos sintéticos carreando epítomos para linfócitos B. Anticorpos monoclonais humanos específicos contra a glicoproteína e a nucleoproteína do VR serão utilizados no tratamento anti-rábico

pós-exposição (Germano *et al.*, 1988; Wilde *et al.*, 1991; Germano, 1994; Halon *et al.* 2001; Follmann *et al.*, 2004; Irie & Kawai, 2005; Marissen *et al.*, 2005).

1.11. Resposta imunológica

A intervenção imunológica é eficaz durante o longo período de incubação devido à demora entre a replicação inicial e a entrada do vírus no ambiente protegido do sistema nervoso. Mesmo a imunização de pós-exposição sendo muito eficaz, deve ser feita o mais próximo possível do momento da agressão pelo animal suspeito, uma vez que, se os sinais clínicos surgirem, será demasiado tarde. Embora as proteínas do VR sejam altamente imunogênicas, nem as respostas mediadas por célula e humoral podem ser detectadas durante a migração do vírus do local da mordida ao SNC (White & Fenner, 1994; Dimmock *et al.*, 2001).

Quando a resposta imunológica antiviral acontece após a vacinação ou tardiamente na infecção, uma combinação de resposta imunológica específica (humoral ou mediada por células) ou não-específica é observada. Os antígenos da partícula viral são capturados pelas células apresentadoras de antígeno (CAA) como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, que após os fagocitarem, processam e apresentam os antígenos para as células imunológicas. Os antígenos processados são expressos na superfície de CAA associados a moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e apresentados aos linfócitos. Já os macrófagos são células importantes para a produção de anticorpos pelos linfócitos B para a ativação dos linfócitos T auxiliares produtores de diferentes citocinas envolvidas na ativação de diferentes células implicadas na eliminação direta do vírus ou de células infectadas. Embora tenham função crucial na resposta imunológica inespecífica, os macrófagos podem produzir um efeito negativo auxiliando a difusão do vírus no organismo, após a opsonização de complexos imunológicos anticorpo-vírus levando à "mortalidade precoce" (Zanetti, 2003).

A infecção da célula pelo VR induz a liberação de interferons (IFN) que são de grande importância no início da infecção, particularmente antes de sua migração para o SNC. Anteriormente, acreditava-se que a atividade protetora de uma vacina anti-rábica estivesse relacionada com sua habilidade de induzir a produção de IFN, entretanto, é sabido que algumas vacinas de boa eficácia não são

indutoras de IFN. Na infecção natural a síntese de imunoglobulinas pelos linfócitos B, geralmente, não ocorre até que os sinais clínicos apareçam. A produção de anticorpos acontece depois que a infecção está disseminada pelo SNC, devido à quantidade maciça de antígeno viral processado pelas CAA. O título de anticorpos neutralizantes permanece baixo, elevando-se, atinge seu pico próximo da morte, na fase terminal da doença. A classe de imunoglobulina que predomina na infecção tardia é a IgG, e pouca ou nenhuma IgM é detectada (Zanetti, 2003).

Assim, o papel principal dos anticorpos é bloquear o vírus extracelular antes que ocorra a interação com receptores das células musculares, limitando a propagação no local de infecção e a progressão para o SNC (Zanetti, 2003). Segundo o modelo estudado por Flamand e colaboradores (1993), a dose neutralizante é de 130 a 320 moléculas de IgG, sendo 3 moléculas por projeção espinhosa da proteína G, ou 40 a 50 moléculas de IgM por virion.

A neutralização do VR, por sua vez, é dependente de três fatores: do anticorpo, do antígeno e da célula alvo (Flamand *et al.*, 1993). Quase todas as vacinas são apoiadas nos aspectos funcionais da proteína G, conferindo imunidade contra uma infecção letal. Os anticorpos exercem seu efeito protetor pela neutralização extracelular do vírus, pela lise de células infectadas mediada por complemento e pela citotoxicidade dependente de anticorpos. A ribonucleoproteína também induz uma resposta específica de anticorpos que podem contribuir contra a infecção (Mattos *et al.*, 2001). A antigenicidade da glicoproteína é conferida por dois sítios antigênicos dominantes (sítios II e III), compostos de 20 aminoácidos de um total de 505, um sítio antigênico menor e poucos epítopos isolados (Dietzschold *et al.*, 1990; Benmansour *et al.*, 1991).

É importante destacar que, dentre todas as respostas do sistema imunológico, a produção de anticorpos é a mais acessível para detecção laboratorial. Sua determinação pode ser considerada como indicadora de que os outros mecanismos de defesa foram ativados, já que tem sido demonstrado, em experimentos com animais, que há boa correlação entre o nível de anticorpos circulantes e a proteção contra o desenvolvimento da doença. Duas a quatro semanas após o início do esquema profilático anti-rábico, espera-se a produção de anticorpos suficientes para reagir totalmente uma concentração padrão de VR no Teste de Neutralização em Camundongos (TNC), na diluição 1:25. Esta diluição, equivale a aproximadamente 0,5 UI/mL, é a recomendada pela OMS, como índice

mínimo de proteção (OMS, 1992). A avaliação sorológica deve ser realizada a partir do 10º dia da administração da última dose da vacina e somente títulos iguais ou acima de 0,5 UI/mL de anticorpos neutralizantes são considerados como satisfatórios.

Além disso, pessoas com exposição continuada, como pesquisadores, profissionais de laboratório que manipulam o vírus e os médicos veterinários que atuam em áreas epizoóticas, devem ser avaliadas semestralmente. Profissionais com menor risco de exposição devem ser avaliados anualmente. A avaliação sorológica deve ser realizada em todos os pacientes submetidos a vacinação profilática (Costa *et al.*, 2000), e é o método mais aceito para verificar a resposta imunológica (Moore *et al.*, 2005).

Caso se detecte resultado insatisfatório, ou seja, se o título de anticorpos for menor do que 0,5 UI/mL, é indicada a aplicação de uma dose de reforço e a reavaliação sorológica a partir do 14º dia após o reforço. É importante lembrar ainda, que o controle sorológico é exigência básica para a correta avaliação da pessoa vacinada (Reichmann *et al.*, 1999; Brasil, 2002^a). Aqueles que, sistematicamente, apresentem títulos menores que 0,5 UI/mL, deverão ser afastados de atividades que imponham contatos com mamíferos (Reichmann *et al.*, 1999). Títulos elevados de anticorpos no TCN ou na RIFF são indicativos de resposta imunológica humoral protetora (Wunderli *et al.*, 1991), ao mesmo tempo animais com títulos muito baixos resistem ao desafio, sugerindo que as respostas imunológicas celulares têm importante papel na resposta imunológica (Zanneti *et al.*, 1998).

Porém, apesar da redução na sua ocorrência, observada nos últimos anos, **a Raiva humana continua sendo um problema de Saúde Pública, pela altíssima gravidade do seu acometimento.** A vacinação anti-rábica, a seu turno, constitui ainda a ação de maior eficiência para a eliminação desse agravo em seu ciclo urbano, pois a Raiva apresenta alta prevenção, quando adotadas as estratégias adequadas para imunização das pessoas sob risco, bem como dos animais que constituem a principal fonte de infecção. **Neste sentido, o controle sorológico configura a exigência básica para a correta avaliação da pessoa vacinada, para garantia do êxito nos esquemas de profilaxia adotados** (Brasil, 2002^a).

Precisa, pois, o clínico, na prática médica, utilizar uma ferramenta eficaz para eliminar (ou reduzir) a incerteza quanto à resposta ao tratamento prescrito (vacinação), possibilitando rapidamente a prescrição de reforços, caso haja necessidade (Medronho & Perez, 2004).

Em decorrência dos referidos postulados, acima descritos, os objetivos deste estudo foram:

a) Avaliar a sensibilidade e a especificidade da titulação de anticorpos contra Raiva, empregando as técnicas de Contraímunoeletroforese e Rápida Inibição de Focos Fluorescentes; b) Analisar comparativamente a sensibilidade e a especificidade do conjugado anti-rábico, tanto o produzido *in house* a partir de soro de coelhos hiperimunizados quanto um conjugado anti-rábico comercial; c) adotar técnicas mais sensíveis na avaliação dos tratamentos profiláticos na rotina laboratorial e d) **propor a técnica de RIFF, utilizando um conjugado produzido *in house*, para a titulação de anticorpos contra a Raiva de soros examinados pela CIE que apresentarem resposta insatisfatória à profilaxia realizada.**

Esperamos que esta dissertação possa vir a fundamentar as decisões sobre a conduta vacinal em indivíduos com resposta insatisfatória à profilaxia realizada, após sofrerem uma triagem pela CIE, para uma posterior titulação anticorpos contra Raiva pela RIFF.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras de Soro

Para este estudo foram selecionadas 91 amostras de soro de 34 indivíduos que apresentaram resposta insatisfatória – ao esquema de tratamento profilático para Raiva (Tabela 2.1). Foi considerada como tal, depois da profilaxia realizada, os indivíduos com títulos de anticorpos anti-rábicos abaixo de 1/2 (<0,5 UI/mL) pela técnica de CIE (Brasil², 2002). O levantamento das amostras foi realizado no período compreendido entre os anos de 2000 e 2006. A busca foi efetuada no banco de dados do Setor de Sorologia Específica da Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” (IMMVJV), Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária (S/SCZ) da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro (PCRJ). As amostras são provenientes da SMS e da Secretaria Estadual de Saúde, ambas do Rio de Janeiro. As amostras de sangue foram coletadas com consentimento livre e esclarecido, e os soros foram numerados, proporcionando o sigilo de identidade dos indivíduos vacinados (CNS, 1996; CNS, 2005). Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética da SMS-RJ.

Tabela 2.1 – Distribuição de 34 indivíduos vacinados que receberam mais de um esquema para a profilaxia anti-rábica, segundo número de amostras, primovacinação, tipos de vacina, número de doses, intervalo (em dias) do término do tratamento à coleta, intervalo (em dias) do início do tratamento à coleta e título pela técnica de Contraímuno eletroforese

Número de Vacinados	Soro	Primovacinado	Tipo de Vacina	Doses	Intervalo em dias do Término do Tratamento à Coleta	Intervalo em dias do Início do Tratamento à Coleta	Título na CIE
1	A	Não	FP	1	15	15	<1/2
	B			1	7	22	<1/2
	C			-	14	44	1/2
2	A	Não	FP	3	3	8	<1/2
	B			1	4	29	1/2
3	A	Sim	FP	13	3	40	<1/2
	B			-	12	59	<1/2
	C		3	3	65	1/2	
	D		1	3	77	1/2	
	E		-	16	90	1/2	
4	A	Sim	FP	4	6	33	<1/2
	B			1	10	137	<1/2
5	A	Sim	FP	4	7	34	<1/2
	B			1	-	-	<1/2
6	A	Sim	FP	4	13	41	<1/2

Número de Vacinados	Soro	Primovacinado	Tipo de Vacina	Doses	Intervalo em dias do Término do Tratamento à Coleta	Intervalo em dias do Início do Tratamento à Coleta	Título na CIE
	B			1	7	60	<1/2
	C			3	3	104	1/4
7	A	Não	CC	3	-	4	<1/2
	B			-	6	10	<1/2
	C			4	9	24	1/2
8	A	Não	FP	13	11	93	<1/2
	B			3	14	137	<1/2
9	A	Não	CC	3	15	19	<1/2
	B			3	11	42	<1/2
10	A	Não	CC	3	4	8	<1/2
	B			-	12	16	<1/2
	C			4	8	30	1/4
11	A	Não	CC	1	19	19	<1/2
	B			-	80	120	<1/2
12	A	Não	CC	3	15	19	<1/2
	B			3	14	59	<1/2
	C			4	-	150	<1/2

Número de Vacinados	Soro	Primovacinado	Tipo de Vacina	Doses	Intervalo em dias do Término do Tratamento à Coleta	Intervalo em dias do Início do Tratamento à Coleta	Título na CIE
	D			-	-	157	1/8
13	A	Não	CC	3	-	18	<1/2
	B			-	24	<1/2	
14	A	Não	CC	?	-	22	<1/2
	B			1	14	118	<1/2
15	A	Sim	CC	5	-	52	<1/2
	B			1	-	66	<1/2
	C			1	-	100	<1/2
	D			1	-	-	1/2
16	A	Sim	CC	5	-	45	<1/2
	B			1	-	67	<1/2
	C			1	-	104	<1/2
	D			2	-	200	1/2
17	A	Não	CC	?	-	-	<1/2
	B			1	-	14	1/2
18	A	Não	CC	1	27	27	<1/2
	B			?	-	24	<1/2

Número de Vacinados	Soro	Primovacinado	Tipo de Vacina	Doses	Intervalo em dias do Término do Tratamento à Coleta	Intervalo em dias do Início do Tratamento à Coleta	Título na CIE
19	A	Não	CC	2	-	20	<1/2
	B			-	64	<1/2	
	C			3	-	115	1/2
20	A	Sim	CC	2	-	49	<1/2
	B			1	-	79	<1/2
	C			1	-	106	<1/2
	D			5	-	270	1/2
21	A	Sim	CC	5	-	45	<1/2
	B			1	-	69	<1/2
22	A	Sim	CC	5	-	67	<1/2
	B			1	-	141	<1/2
23	A	Sim	CC	3	-	69	<1/2
	B			2	-	106	<1/2
24	A	Sim	CC	3	-	7	<1/2
	B			-	-	21	<1/2
25	A	Ignorado	CC	1	44	44	<1/2
	B			2	-	55	1/4

Número de Vacinados	Soro	Primovacinado	Tipo de Vacina	Doses	Intervalo em dias do Término do Tratamento à Coleta	Intervalo em dias do Início do Tratamento à Coleta	Título na CIE
26	A	Sim	CC	1	1	1	<1/2
	B			-	-	7	<1/2
	C			4	-	-	1/8
27	A	Igorado	CC	3	110	140	<1/2
	B			3	-	-	<1/2
28	A	Não	CC	5	14	44	<1/2
	B			9	64	84	<1/2
	C			10	11	230	<1/2
29	A	Não	CC	3	70	100	<1/2
	B			2	13	40	<1/2
	C			1	160	150	1/2
30	A	Não	CC	1	11	11	<1/2
	B			-	-	-	<1/2
	C			2	-	-	<1/2
31	A	Ignorado	CC	2	16	21	<1/2
	B			-	72	62	<1/2
32	A	Ignorado	CC	3	130	140	<1/2

Número de Vacinados	Soro	Primovacinado	Tipo de Vacina	Doses	Intervalo em dias do Término do Tratamento à Coleta	Intervalo em dias do Início do Tratamento à Coleta	Título na CIE
	B			1	-	-	<1/2
	C			1	-	-	1/4
33	A	Sim	CC	5	15	40	<1/2
	B			-	-	118	<1/2
	C			-	-	128	<1/2
34	A	Não	CC	5	14	29	<1/2
	B			2	17	95	<1/2
	C			1	28	132	1/2

As letras A,B, C, D e E indicam diferentes coletas de soro do mesmo indivíduo. (?) Ignorado / (FP) Vacina Fuenzalida & Palácios (Tecpar, Paraná, Brasil) / (DP) Vacina dde Célula Diploide Humana (Imovax® Rabies, Aventis Pasteur, Paris, França) / (CC) Vacina de Cultivo Celular (Vacina contra Raiva em célula Vero Liofilizada, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil).

Analisaram-se os soros previamente testados pela CIE, pela técnica de RIFF, em célula BHK (células de rim de hamster recém-nascidos). Inicialmente foi realizada uma titulação pela RIFF para verificar quais soros não apresentavam título protetor (Tabela 2.3). As amostras que não neutralizaram a dose de vírus desafio na diluição inicial 1:4, foram tituladas nas diluições 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256, para comparar a sensibilidade e a especificidade da titulação de anticorpos contra Raiva na CIE e pela RIFF, empregando um conjugado produzido *in house* a partir de soro de coelhos hiperimunizados, comparado com um conjugado comercial padrão ouro (Liquid Rabies Antinucleocapsid Conjugate – Sanofi Diagnostic Pasteur, Paris, França) (Anexo V).

Os soros foram inativados 56° C por 30 minutos e mantidos a temperatura de -20° C por período de até três anos e a partir daí a -70° C, antes de serem testados pela RIFF.

2.2. Animais de Laboratório

Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, machos de 3 a 6 meses de idade, pesando entre de 1,5 e 2,5 Kg para a obtenção soro hiperimune e produção do conjugado anti-rábico.

No preparo da suspensão viral utilizada na imunização dos coelhos adultos, foram inoculadas duas ninhadas de coelhos da raça Nova Zelândia com idade de até 3 dias de vida.

Para a titulação da cepa de vírus CVS-38, foram utilizados camundongos Suíços albinos recém desmamados com peso de 18 a 20 g.

Todos os animais eram provenientes de colônia convencional *outbreed*, fornecidos pelo Setor de Biotério do IMMJVJ.

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas no infectório do Laboratório de Raiva, com ciclo de 12 horas de luz e escuridão, temperatura média de 22° C e com água e ração *ad libitum* (Anexo VI).

Incluindo a premissa de uma expectativa razoável de benefício imediato ou eventual para a sociedade ou para os animais, foram seguidos alguns critérios, tais como o tratamento humanitário aos animais, evitando o estresse excessivo, minimizando a dor e o desconforto e, principalmente, evitando o uso desnecessário de animais. Assim, todas as etapas de experimentação animal

seguiram os princípios éticos do uso de animais de experimentação (Andersen *et al.* 2004; CCAC, 1984).

2.3. Cultura de Células

Utilizou-se células BHK-21 clone 13 linhagem certificada (CCL – *certified cell line*) de rim de hamster recém-nascidos (*baby hamster kidney*), obtidas da coleção americana de culturas e depósitos (ATCC, 1961). Para a manutenção no Setor de Testes Biológicos do Laboratório de Raiva do IMMJV, as células BHK-21 clone 13 foram estocadas em criotubos de 2,0 mL, conservadas por criopreservação em nitrogênio líquido (-196° C) à concentração de $2,8 \times 10^6$ células/mL. No momento do uso, as células foram descongeladas a 37° C e cultivadas em garrafas de polietileno de 25 cm² ou 75 cm², em meio mínimo essencial de Glasgow, suplementado com penicilina 50 UI/mL e estreptomicina 0,05 mg/mL, fungisone 0,42 mg/L, glutamina 0,3 mg/mL e 10% de soro fetal bovino (SFB). Após o descongelamento as células foram utilizadas por até 10 passagens (Anexo VI).

2.4. Cepa Viral

Utilizaram-se as cepas CVS-38 (*Challenge Virus Standard*) e CVS-11 de vírus da Raiva fixo para a produção do conjugado anti-rábico e para os testes de RIFF, respectivamente.

2.5. Teste de Imunofluorescência (IF)

Para o exame de IF, foram utilizados os mesmos conjugados na diluição trabalho, e as microplacas examinadas segundo a técnica descrita por Trimarchi e colaboradores (1996), visualizadas em microscópio invertido de imunofluorescência (Olympus CK 40), com objetiva 20x fluorita LWD CA20PL 0,40 160/1,2 e, caso necessário, objetiva de 40x LWD CDPlan 40 FPL 0,55 160/1 (Anexo VI).

2.6. Titulação dos Vírus da Raiva CVS-38 e CVS-11

Reconstitui-se a cepa CVS-38 liofilizada em PBS pH 8,0 e titulou-se antes de ser utilizada. A titulação ocorreu em diluições seriadas em progressão geométrica ($q= 10$), partindo do liofilizado reconstituído a 10% (p/v). Cada diluição foi inoculada por via intracerebral (IC) em 10 camundongos com volume de 30 μ L, nas diluições de 10^{-2} a 10^{-7} . Os camundongos inoculados foram observados por 21 dias e todos os animais que morreram, a partir do quinto dia pós-inoculação, ou que exibiam sinais neurológicos patognomônicos, eram considerados positivos para Raiva (Koprowski, 1996). O título do vírus foi então calculado de acordo com o método de Reed e Muench (1938).

A amostra de vírus CVS-11, adaptado ao cultivo celular replicada em células BHK-21 clone 13, foi mantida congelada no Laboratório de Raiva e conservada a -70° C. A titulação foi realizada segundo Trimarchi e colaboradores (1996), em células BHK-21 para o cálculo da dose infecciosa em cultura de tecido 50% (DICT₅₀) (Anexo V). Foi realizado o teste de IFD (Dean *et al.*, 1996), e o logaritmo da DICT₅₀ calculado segundo o método de Reed e Muench (1938).

2.6.1. Determinação da Diluição Trabalho de CVS-11

O cálculo da diluição trabalho da cepa CVS-11 em cultura de célula BHK-21 foi realizado contra o soro referência diluído previamente para conter 1 UI/mL. Foi procedido o teste de IF, para verificar a diluição de vírus, completamente neutralizada pela diluição 1:32 do soro referência, e onde havia, ainda, a presença de vírus na diluição 1:64. Essa diluição de vírus foi selecionada como a diluição trabalho (Trimarchi *et al.*, 1996). O vírus desafio deve conter entre 30 e 300 DICT₅₀/50 μ L (Council of Europe, 2005^a; Council of Europe, 2005^b).

2.7. Teste de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes

Foram utilizadas microplacas de fundo plano de 96 poços. Nas duas primeiras colunas, foi titulado o soro de referência internacional (International

Standard for Anti-rabies Immunoglobulin Human – RAI, lote 2nd, National Institute for Biological Standards and Control -NIBSC) contendo 30 UI/mL, diluído para conter 1,0 UI/mL. Nas duas últimas linhas da primeira a quinta colunas, foi titulada a suspensão do vírus desafio. Dois poços foram utilizados para o controle negativo e, outros dois, para o controle de células. Nos demais poços foram titulados os soros de cada indivíduo em duplicata, ou seja, doze soros por placa (Trimarchi *et al.*, 1996). Para o cálculo dos títulos, a leitura dos campos foi realizada de acordo com o descrito por Zalan e colaboradores (1979).

As células foram preparadas usando garrafas de 25 cm² ou 75 cm² contendo BHK-21 com 75 a 95% de confluência (Anexo VI). A concentração de células foi ajustada para $7,0 \times 10^5$ células/mL e distribuída no volume de 50 µL em cada poço e a placa incubada 34° C em atmosfera úmida com 5% CO₂ por 22 horas (Trimarchi *et al.*, 1996).

2.8. Preparo do Conjugado Anti-Rábico

O conjugado anti-rábico foi produzido com anticorpos obtidos de sangue de coelhos adultos da raça Nova Zelândia, imunizados com vacina produzida em cérebro de coelhos lactentes.

A suspensão de vírus CVS-38 foi utilizada no preparo da vacina para a imunização dos coelhos visando à produção de soro anti-rábico hiperimune. O vírus CVS-38 liofilizado foi reconstituído com água destilada estéril, contendo 100 a 1.000 DL₅₀/30 µL. A inoculação ocorreu pela via IC de duas ninhadas de coelhos e os cérebros dos animais, que ficaram paráliticos, foram coletados, após eutanásia, congelados e mantidos a -70° C (Trimarchi & Debbie, 1974).

No preparo da vacina, os cérebros foram pesados, macerados e, a eles, acrescentada a solução de glicina 0,01% e sacarose 5% com pH 7,2 contendo 1000 UI de penicilina e 2 mg de estreptomicina/mL, chegando-se a uma diluição de 20% do triturado. Após a centrifugação por 30 minutos (1.500 x g) a 4° C, o sobrenadante obtido foi dividido em duas alíquotas: uma foi inativada em banho-maria a 56° C por 30 minutos e, a segunda, alíquota foi mantida sem inativação. Ambas foram congeladas e estocadas a -70° C até o momento de uso (Trimarchi & Debbie, 1974).

Para realizar a imunização, a vacina inativada foi descongelada e emulsificada em igual volume com óleo mineral 90% de Marcol 52 (Esso Standard Oil Co.) e 10% de Montanide 888 (Sepic Co. Paris, França) imediatamente antes do uso.

O esquema de imunização de coelhos para a obtenção de soro anti-rábico hiperimune foi de uma dose semanal por quatro semanas. Os animais foram inoculados com a dose de 2,0 mL da emulsão pela via intraperitoneal (IP). Após a quarta dose de vacina, realizou-se o primeiro desafio, inoculando-se pela via IP 1,0 mL da vacina não-inativada. Após uma semana, os coelhos foram submetidos a um segundo desafio (Trimarchi & Debbie, 1974) do mesmo gênero.

A cada dose de vacina, uma amostra de sangue foi obtida por punção na veia marginal ou na artéria central da orelha para avaliar a curva de anticorpos. A amostra era, então, titulada pela técnica de CIE diluída de forma seriada, em uma progressão geométrica ($q=2$) iniciando de 1/128 até 1/2048.

Dez dias após a última dose de desafio foi realizada mais uma sangria teste, titulada pela CIE. Todos os animais que apresentaram título de anticorpos neutralizantes para Raiva $>1/128$ foram submetidos a sangria total por punção cardíaca.

Cada animal foi sedado com cetamina (Ketalar® - cloridrato de cetamina, 50,0 mg/mL de cetamina base) por via intramuscular (IM), com a dose de 1,0 mg/Kg de peso. O soro recolhido foi centrifugado por 30 minutos (1.500 x g) a 4° C. Uma alíquota foi separada para ser titulada pela CIE.

Os animais que não foram a óbito pela hipovolemia, foram submetidos a eutanásia utilizando-se anestésico barbitúrico (Thionembital® - tiopental sódico 1 g) por via IP, com a dose de 50 mg/Kg de peso, na concentração de 3% (CFMV, 2002; Massone, 1994).

O soro foi filtrado com membrana de 0,22 μm , a esterilidade testada e estocado a -70°C .

O soro hiperimune, por sua vez, foi precipitado três vezes com sulfato de amônia saturada por 16 a 18 horas sob agitação, e centrifugado por 30 minutos (1400 x g) entre cada precipitação. Após a última centrifugação, o precipitado foi ressuspenso e as proteínas dosadas por espectrofotometria. O isotiocianato de fluoresceína foi dissolvido em tampão carbonado pH 9,0 e adicionado por gotejamento à imunoglobulina sob agitação, na proporção de 1,0 mg de fluoresceína

para 100 mg de Imunoglobulina. A seguir, o pH foi ajustado para 9,0 e a mistura foi mantida sob agitação *overnight* 4° C (Perrin, 1996). O conjugado foi dialisado em membrana de 100 kDa e concentrado pelo método de ultrafiltração em *stirred cell*, como descrito por Akita e Nakai (1992), aliquotado, liofilizado e estocado a -20° C.

2.9. Titulação do Conjugado

A titulação do conjugado anti-rábico imunofluorescente em cultura de células foi realizada em microplaca de 96 poços, contra a suspensão viral na diluição trabalho da cepa CVS-11. A diluição da suspensão de células BHK-21 foi ajustada para conter $7,0 \times 10^5$ células/mL, e distribuída em duas colunas para cada conjugado testado, sendo uma coluna de células infectadas e outra de células normais. A microplaca foi incubada por um período de 22 horas, 35° C com 3% de CO₂. Foi preparada uma diluição seriada dos conjugados (*in house* e comercial), de 1:10 a 1:320. Adicionou-se cada diluição dos conjugados aos poços das colunas das células normais e das infectadas, e a microplaca foi examinada em microscópio invertido de fluorescência. A diluição de conjugado que demonstrou máxima coloração específica e com pouco ou nenhum fundo verde foi escolhida como a diluição de trabalho (Smith *et al.*, 1996).

2.10. Tratamento Estatístico

Com os resultados obtidos na titulação de anticorpos procedeu-se à análise estatística. O coeficiente de correlação de Pearson, o teste t-Student e a análise da variância, foram usados para comparar a relação entre os títulos dos soros obtidos com os conjugados *in house* e comercial (Pagano & Gauvreau, 2004). A regressão linear múltipla foi realizada empregando um programa computacional apropriado (Statistica®; SPSS®).

Avaliou-se a sensibilidade e especificidade dos testes segundo a fórmula proposta por Medronho e Perez (2004), e o Microsoft® Office Excell 2003 foi utilizado para realização dos cálculos.

3. RESULTADOS

Dentre os trinta e quatro (34) indivíduos submetidos ao tratamento profilático contra a Raiva, vinte e sete (27) receberam a vacina de cultivo celular (vacina contra Raiva em célula Vero, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil); seis (6), a vacina Fuenzalida & Palácios (Tecpar, Paraná, Brasil) e um (1), a vacina de célula diplóide humana (Imovax® Rabies, Aventis Pasteur, Paris, França) em combinação com a vacina Fuenzalida & Palácios. Os tratamentos tiveram prescrição mínima de uma e máxima de 24 doses de vacina (Figura 3.1). O intervalo entre o término do tratamento (última dose de vacina) e a coleta de sangue correspondente variou entre 0 e 80 dias, enquanto que o intervalo entre a primeira dose de vacina e a última coleta variou de 1 a 270 dias.

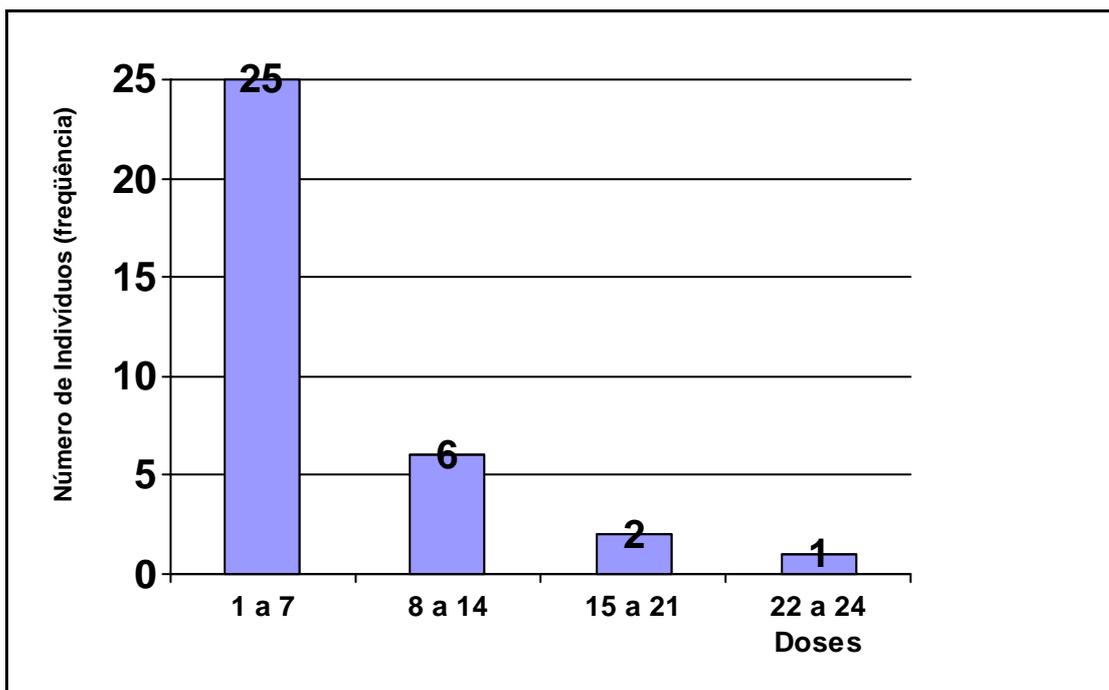


Figura 3.1. Doses de vacina anti-rábica distribuídas em número de indivíduos tratados

O soro de referência internacional (RI), com títulos expressos em dose infecciosa em cultura de tecido 50% (DICT₅₀), foi submetido a 12 ensaios pela técnica de RIFF contra a cepa padrão CVS-11. A DICT₅₀ do RI variou entre 25,84 e 35,55. A partir dos dados obtidos, pôde-se calcular a exatidão, em aproximadamente

100%, demonstrando a mínima variação entre os ensaios. O coeficiente de variação percentual (2,64%) e o desvio padrão (2,78) foram outros parâmetros observados nas titulações do soro referência contra o vírus desafio, indicando a precisão do teste (OMS, 1997) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Resultados representando a média geométrica, desvio padrão e coeficiente de variação dos títulos do soro referência internacional de anticorpos anti-rábiticos (1,0 UI/mL, Copenhagen, Dinamarca) pela rápida inibição de focos fluorescentes

Protocolo do ensaio	DICT ₅₀ ¹ RI	Média geométrica	Desvio-padrão	Coeficiente de variação %
014/2006	33,86			
015/2006	34,58			
016/2006	32			
016/2006	35,55			
017/2006	33,75			
017/2006	31,62	31,75	2,78	2,64
018/2006	25,84			
018/2006	32			
019/2006	32,89			
019/2006	27,73			
020/2006	31,06			
020/2006	33,86			

(1) DICT₅₀ - dose infecciosa em cultura de tecido 50%.

Conjugado usado: Liquid Rabies Antinucleocapsid Conjugate – Sanofi Diagnostic Pasteur, lotes: 7HO26V, OCO36U e 4MO177 Paris, França.

Os resultados obtidos, após os esquemas terapêuticos, revelaram que 16 indivíduos apresentaram título não-protetor pela CIE apesar de exibirem título \geq 1/4 pela RIFF. A Tabela 3.2, então, revela a distribuição dos títulos de anticorpos pelos testes de CIE e RIFF em 18 indivíduos que apresentaram títulos protetores na CIE entre a 2^a e 5^a coletas de sangue. Assim, em três vacinados (3, 7 e 9) observam-se títulos não-protetores (<0,5UI/mL) pela RIFF na 1^a coleta. Na 2^a coleta, três vacinados (2, 17 e 25) demonstraram título protetor (>0,5 UI/mL) pela técnica CIE, enquanto que todos apresentaram atividade neutralizante na diluição 1/4 pela RIFF. Dez vacinados (1, 3, 6, 7, 10, 19, 26, 29, 32 e 34) desenvolveram título

protetor após a 3^a coleta de sangue. Somente cinco vacinados (3, 12, 15, 16 e 20) tiveram uma 4^a coleta de sangue, com resultados protetores pela CIE e neutralizando a dose de vírus desafio na diluição inicial na RIFF. Um único vacinado com 5^a coleta (3) apresentou título protetor na CIE e neutralizou completamente o vírus na diluição 1/4 pela RIFF. Em um indivíduo (10) a segunda coleta não foi testada pela RIFF por apresentar volume insuficiente (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Resultados dos testes de Contraímunoeletroforese e Rápida Inibição de Focos Fluorescentes para anticorpos anti-rábitos em 18 indivíduos vacinados

Número de Vacinados	Amostras de Soro ¹	Título de Anticorpos	
		CIE ²	RIF ³
01	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/2	≥1/4
02	A	<1/2	≥1/4
	B	1/2	≥1/4
03	A	<1/2	<1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/2	≥1/4
	D	1/2	≥1/4
	E	1/2	≥1/4
06	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/4	≥1/4
07	A	<1/2	<1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/2	≥1/4
09	A	<1/2	<1/4
	B	<1/2	≥1/4
10	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	NT ⁴
	C	1/4	≥1/4
12	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	<1/2	≥1/4
	D	1/8	≥1/4
15	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	<1/2	≥1/4
	D	1/2	≥1/4

Número de Vacinados	Amostras de Soro ¹	Título de Anticorpos	
		CIE ²	RIF ³
16	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	<1/2	≥1/4
	D	1/2	≥1/4
17	A	<1/2	≥1/4
	B	1/2	≥1/4
19	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/2	≥1/4
20	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	<1/2	≥1/4
	D	1/2	≥1/4
25	A	<1/2	≥1/4
	B	1/4	≥1/4
26	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/8	≥1/4
29	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/2	≥1/4
32	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/4	≥1/4
34	A	<1/2	≥1/4
	B	<1/2	≥1/4
	C	1/2	≥1/4

(1) As letras A, B, C, D e E, representam diferentes coletas de soro de um mesmo indivíduo.

(2) CIE – Contraimunoelctroforese. Diluição 1/2 na técnica de CIE corresponde a 0,5 UI/ mL.

(3) RIF- Rápida inibição de focos fluorescentes com soros diluídos a 1/4.

≥1/4 – Indica os soros que neutralizaram completamente a dose de vírus desafio;

<1/4 – Indica os soros que não neutralizaram a dose de vírus desafio.

(4) NT – Não testado.

Os resultados obtidos, utilizando tanto um conjugado quanto o outro, foram iguais em 95,35% dos soros. Do total de 90 soros testados, 74 (82,22%) exibiram título protetor, sendo que quatro tiveram título entre 0,45 e 0,49 UI/mL e foram, arbitrariamente, considerados com títulos = 0,5 UI/mL. Do total de soros analisados, 3 possuíam título não-protetor somente para o conjugado *in house* e 1 soro apresentou título não-protetor somente para o conjugado comercial.

A Figura 3.2 ilustra correlação entre os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos pela técnica de RIFF com os conjugados *in house* e comercial. Obteve-se um coeficiente de correlação de Pearson de 0,9367 ($p < 0,05$), sendo considerada uma correlação quase perfeita. Neste teste, a equação da regressão linear foi $y = 0,3641 + 0,8934x$.

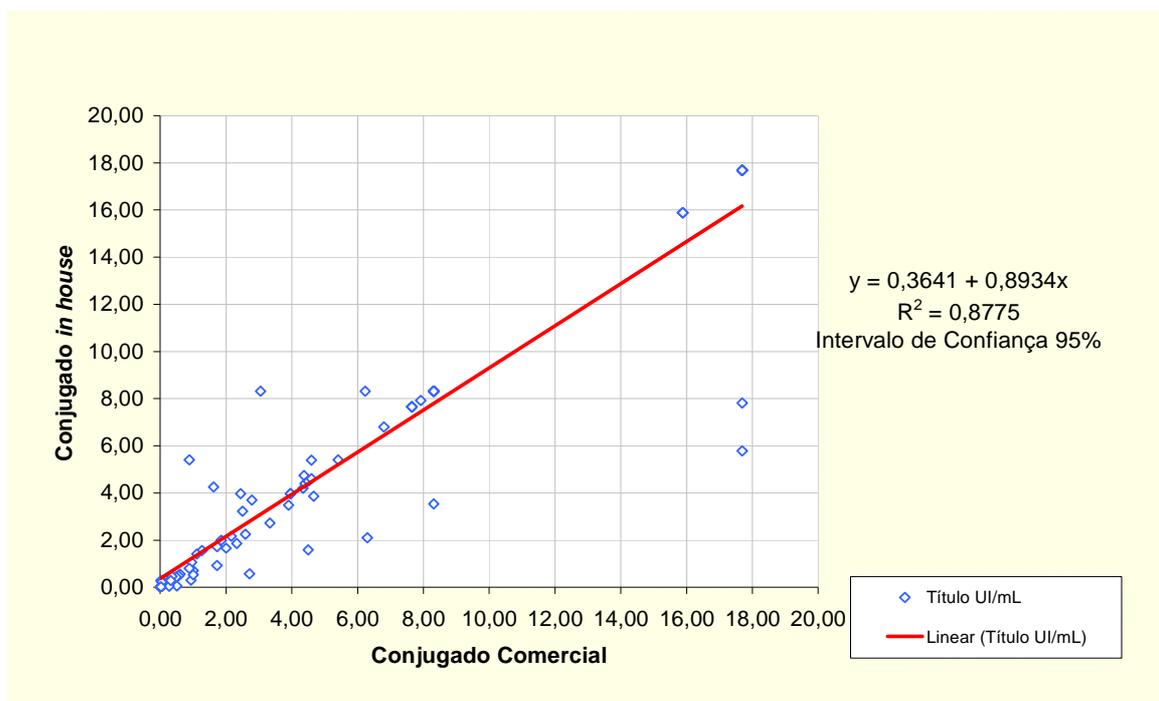


Figura 3.2. Correlação dos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos pela técnica de RIFF com os conjugados *in house* e comercial

O teste t (Student) foi aplicado para verificar se os soros possuíam a mesma média, determinando se existia diferença significativa nos resultados de titulação de anticorpos contra a Raiva entre o conjugado comercial e o conjugado *in house*. O teste t demonstrou não haver diferença significativa entre os títulos dos soros analisados. Para os pares de dados dos títulos de anticorpos, obtidos com o

conjugado comercial e com o conjugado *in house*, as médias foram de 5,7356 e 5,4971, os desvios-padrões 5,6684 e 5,4057, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,94 (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Descritores estatísticos dos títulos de anticorpos anti-rábicos pela técnica de RIFF para o Teste *t*-Student dados pareados, exibindo o coeficiente de correlação de Pearson

RIFF	Descritores Estatísticos		
	Média	Desvio-Padrão	N
Conjugado Comercial	5,7356	5,6684	90
Conjugado <i>in house</i>	5,4971	5,4057	90
Valor de <i>r</i>	0,94	-	-

O mesmo teste *t* foi utilizado para avaliar as diferenças dos resultados de titulação de anticorpos contra a Raiva entre o conjugado comercial e o conjugado *in house*. Com o segundo teste *t*, também foi verificado não haver diferença significativa entre os títulos de anticorpos obtidos dos soros analisados (Tabela 3.4). Para os pares de dados dos títulos de anticorpos, obtidos com o conjugado comercial e com o conjugado *in house*, a diferença entre as médias foi -0,2434, com um desvio-padrão de 1,9975, o valor *t* calculado foi -1,156 e o valor de *p* 0,2506.

Tabela 3.4 – Descritores estatísticos das diferenças entre os títulos de anticorpos anti-rábicos pela técnica de RIFF para o Teste *t*-Student

Diferenças Pareadas		Descritores Estatísticos		
Média	Desvio-Padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Grau Liberdade
-0,2434	1,9975	-1,156	0,2506	89

Os resultados da análise da variância do modelo de regressão dos títulos de anticorpos obtidos com o conjugado comercial e o conjugado *in house* estão representados na Tabela 3.5. Observamos que a relação entre estes dois resultados foi altamente correlacionada ($F = 622,425$; $p = 0,000$).

Tabela 3.5 – Análise da variância (ANOVA) do modelo de regressão linear dos títulos de anticorpos neutralizantes titulado com os conjugados comercial e *in house*

ANOVA ¹					
Fonte	Soma Quadrática	Grau Liberdade	Média Quadrática	F	p
Regressão	2505,486	1	2505,485	622,425	0,000
Residual	354,23	88	4,025	-	-
Total	2859,71	89	-	-	-

(1) Variável dependente: Título de anticorpos obtidos pela RIFF com o conjugado *in house*.

O conjugado produzido *in house* e o conjugado comercial tiveram sua sensibilidade e especificidade avaliadas. Os resultados evidenciaram que o conjugado *in house* apresentou alta sensibilidade (96%) e especificidade (92%). O cálculo da sensibilidade e especificidade entre as técnicas de CIE e RIFF foi 24% a 25% e 93% a 100% para a CIE quando comparada com os conjugados *in house* e comercial, respectivamente. Logo, as diferenças entre os conjugados não foram significativas (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Sensibilidade e especificidade entre os conjugados *in house* e comercial e as técnicas de CIE e RIFF

Testes	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
RIFF _{<i>in house</i>} x RIFF _{<i>comercial</i>}	96	92
CIE x RIFF _{<i>in house</i>}	24	93
CIE x RIFF _{<i>comercial</i>}	25	100

(Medronho e Perez, 2004).

A partir dos dados da “Ficha de coleta de soro” (IMMVJV) e os resultados da titulação das amostras com o conjugado *in house*, utilizou-se a regressão linear múltipla para verificar a interferência no título (obtido em UI/mL), de diferentes variáveis: doses de vacina, tipo de vacina, intervalo do início tratamento do a coleta do sangue e o intervalo do término do tratamento a coleta do sangue, se o indivíduo vacinado era primovacinado ou não, gênero e idade.

Pelos resultados apresentados na análise, pôde-se verificar que as variáveis tipo de vacina ($\beta = 5,52933$; $p = 0,011744$), doses de vacina ($\beta = -0,57259$; $p = 0,015629$) e o intervalo entre o início do tratamento e a coleta do sangue ($\beta = 0,03297$; $p = 0,023886$) foram significativas sobre o título de anticorpos. O valor obtido para r^2 (0,43070) demonstrou que 43,07% da variação do título de anticorpos obtido com o conjugado *in house* é explicado por essas três variáveis (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Regressão para a variável dependente título de anticorpos para Raiva na RIFF para o conjugado *in house*

	β	Desvio Padrão	p
Intercessão	0,39437	5,225610	0,940420
Tipo de Vacina*	5,52933	2,040092	0,011744
Doses de Vacina	-0,57259	0,221331	0,015629
Intervalo do Início do Tratamento a Coleta	0,03297	0,013740	0,023886
Intervalo do Término do Tratamento a Coleta	0,00145	0,027522	0,958366
Primovacinado	-1,98447	1,622843	0,232361
Gênero	-0,69150	1,669774	0,682175
Idade	0,03254	0,051627	0,534043

O modelo proposto, $Título\ de\ anticorpos = 5,52933 (Tipo\ de\ vacina) - 0,57259 (Doses\ de\ vacina) + 0,03297 (Intervalo\ do\ início\ do\ tratamento\ a\ coleta)$.

Número de vacinados, $n = 34$

$r^2 = 0,43070$

*Em negrito – variáveis estatisticamente significativas.

4. DISCUSSÃO

No período entre os anos de 2000 e 2006, 4.918 indivíduos vacinados tiveram amostras de soro examinadas pela Contraimuno eletroforese (CIE). De 5.502 soros analisados, 2.099 (38 %) apresentaram resposta insatisfatória à profilaxia realizada. Noventa e um soros, obtidos de 34 dos 139 indivíduos que haviam recebido mais de um esquema profilático contra a Raiva e foram selecionados para a titulação pela Rápida Inibição de Focos Fluorescentes (RIFF), segundo critérios descritos no item 2.7.

O método mais aceito para verificar a resposta imunológica ao antígeno da Raiva consiste na avaliação da quantidade de anticorpos neutralizantes contra o vírus no soro dos indivíduos expostos a tratamento profilático (Moore *et al.*, 2005). Ao longo dos anos, várias técnicas foram estudadas sobre a profilaxia da Raiva, e os testes de neutralização foram os mais utilizados para a detecção de anticorpos anti-rábicos, destacando-se o Teste de Neutralização em Camundongo (TNC), a Contraimuno eletroforese (CIE) e a Rápida Inibição de Focos Fluorescentes (RIFF). O TNC foi o primeiro a ser desenvolvido e se tornou o teste padrão para avaliar outros testes. Entre as técnicas mais empregadas em cultivo celular, estão aquelas em que focos de células infectadas pelo vírus e com anticorpos ligados, são observados quando revelados pela imunofluorescência, ou seja, por conjugados anti-rábicos marcados à fluoresceína (Smith, 1991; Smith *et al.*, 1996).

A CIE detecta anticorpos neutralizantes e o título é revelado pela presença de uma linha de precipitação nas diluições do soro que não neutralizaram o antígeno que reage com o soro indicador (Diaz & Myers, 1980; Diaz, 1985; Diaz *et al.*, 1986; Diaz *et al.*, 1991). A RIFF revela a presença ou ausência de infecção viral, após 24 horas de incubação das células, avaliada pela imunofluorescência direta (IFD) (Smith *et al.*, 1973; Zalan *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1996).

Na literatura sobre a profilaxia anti-rábica, várias publicações têm demonstrado boa correlação entre a RIFF e TNC (Smith, 1991; Smith *et al.*, 1996; Simani *et al.*, 1999). Segundo Simani e colaboradores (1999), a RIFF pode substituir o TNC como técnica padrão, uma vez que possui maior sensibilidade e é executada em menor tempo que na TNC (24 horas contra 21 dias) (Smith *et al.*, 1996).

Ora, no Município do Rio de Janeiro, a Secretaria de Saúde procura viabilizar a RIFF para substituir a CIE, utilizada desde 1990. Em consequência do custo e da dificuldade de importação de conjugado anti-rábico, tornou-se necessário produzir um conjugado *in house* com alta especificidade e sensibilidade para os testes de sorologia anti-rábica. No presente trabalho, a RIFF foi utilizada como técnica padrão, para serem cotejados, os resultados de titulação de anticorpos contra a Raiva pela CIE. Comparamos, ainda, o conjugado *in house* com o conjugado comercial.

De acordo com Costa e colaboradores (2000), há necessidade de o médico avaliar cada caso, prescrevendo – de forma adequada – o tratamento, ou, então, encaminhando o paciente, obviamente levando em consideração a situação epidemiológica da circulação do vírus.

François (2006) recomenda que, uma vez realizada a imunização, os títulos de anticorpos devem ser verificados pela RIFF e, em especial, quando o tratamento de pós-exposição é realizado em pessoas com doenças imunossupressoras e/ou as que receberam terapia para tal.

Já segundo Madigan e colaboradores (2000), a imunização contra a Raiva é recomendada também para indivíduos de alto risco, como, por exemplo, os médicos veterinários. Um controle sorológico anual deve ser realizado, administrando-se uma dose de reforço sempre que os títulos forem não-protetores, repetindo a sorologia cerca de 14 dias após a dose de reforço, como recomendado na Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano (Brasil, 2002^a; ERJ, 2003). Nesse sentido, a OMS (1992) e Reichmann (1999) afirmam que a RIFF oferece, dentre outras vantagens, maior rapidez na obtenção dos resultados, não se justificando a falta de acompanhamento dos tratamentos.

Na literatura concernente, os esquemas de profilaxia da Raiva variam de 4 a 13 doses com a vacina de Fuenzalida & Palácios e 3 a 5 doses quando o esquema vacinal é programado com a vacina de cultivo celular (Held & Adaros, 1972; Costa *et al.* 2000; Brasil, 2002^a; ERJ, 2003 e OMS, 2004). A maioria dos tratamentos, encontrados no levantamento feito para este estudo, teve prescrição mínima de 1 e máxima de 24 doses de vacina. O esquema profilático mostra-se de suma importância e, segundo Fishbein e colaboradores (1993), o número de pessoas submetidas a tratamento que desenvolvem reações alérgicas pode ser

diminuído pela administração de vacina somente quando for estritamente indicada. Dreesen (1997), também se refere à necessidade de um contínuo melhoramento das vacinas e o aperfeiçoamento dos esquemas profiláticos para que se tornem mais eficazes e seguros.

Goswami e colaboradores (2005) demonstraram ainda que o custo da vacinação contra a Raiva é um aspecto importante a ser considerado, particularmente, nos países em desenvolvimento – justamente os que registram casos quantitativamente mais elevados. Esse custo não deve ser considerado isoladamente já que a maioria das despesas – como o transporte e outros custos indiretos – são assumidos pelo paciente. Tem-se aí mais um motivo para que o tratamento prescrito seja bem elaborado e técnicas sensíveis para a titulação de anticorpos sejam empregadas na avaliação sorológica.

Em virtude do impacto dos casos de Raiva humana, que ocorrem principalmente quando não há atenção profilática adequada às pessoas expostas, é imperioso então capacitar os profissionais dos serviços de saúde para indicarem corretamente os tratamentos anti-ráбicos, bem como a busca ativa das pessoas que abandonam o tratamento (OPAS, 2001). A titulação de anticorpos permite verificar o grau de imunidade dos indivíduos que sofreram tratamento anti-ráбico ou os vacinados preventivamente. O título 0,5 UI/mL é considerado pela OMS (1992), como o título mínimo protetor.

Ora nos indivíduos deste estudo, o intervalo entre o término do tratamento e a coleta do sangue variou entre 0 e 80 dias. Tal fato poderia ter interferido nos resultados dos títulos de anticorpos. Mas, independente do intervalo de tempo entre a vacinação e coleta de sangue, 74 soros apresentaram título protetor pela técnica RIFF, contra apenas 20 na CIE.

A exatidão e a precisão são parâmetros de desempenho relevantes para validar procedimentos analíticos como a titulação de anticorpos (OMS, 1997). A exatidão dos testes demonstrou uma variação mínima entre os ensaios para a titulação das amostras deste estudo. A relação expressa em percentual entre os títulos observados e o título esperado para o soro de referência internacional, situou-se em aproximadamente 100%. O coeficiente de variação percentual de 2,64% e o desvio-padrão de 2,78, observados nas titulações do soro de referência contra o vírus desafio, permitiram avaliar a precisão inter-ensaios (97,36%). Estes parâmetros

demonstraram a baixa variabilidade dos ensaios, conforme indicado pela OMS (1997).

Em relação à metodologia para adotar a RIFF na rotina de detecção de anticorpos contra a Raiva em indivíduos vacinados, elaborou-se o presente trabalho prospectivo, orientado a averiguar os resultados da CIE registrados no IMMJV e compará-los com aqueles obtidos pela RIFF, utilizando conjugados comercial e *in house*.

As amostras de soro diluídas a 1/5, devem neutralizar completamente o vírus desafio pela RIFF após a profilaxia (OMS, 1992; Shayam *et al.*, 2006). Neste estudo, foi utilizada inicialmente a diluição do soro 1/4. Este procedimento foi adotado porque se esperava que os soros selecionados apresentassem títulos de anticorpos não-protetores, uma vez que eram negativos pela CIE. Na diluição inicial (1/4), verificou-se que apenas 3 soros não neutralizaram completamente a dose de vírus desafio, entre os 91 soros testados e foram considerados com título não-protetor ($< 0,5\text{UI/mL}$).

Segundo Cortés e colaboradores (2004) a detecção precoce de anticorpos, após o início do tratamento, apresenta-se de grande importância para tratamentos pós-exposição onde a formação de anticorpos evita o avanço do vírus ao SNC. Neste levantamento, todos os soros de primeira coleta exibiram títulos negativos ($<0,5\text{UI/mL}$) pela CIE, enquanto que, pela RIFF, apenas 3 soros tiveram título não-protetor. Isso demonstrou que, se esses soros houvessem sido titulados desde o início pela RIFF, não haveria necessidade de reforços vacinais, novas coletas de sangue e titulações posteriores, evitando desconforto às pessoas em tratamento, gastos públicos desnecessários e talvez problemas de ordem imunológica, devido ao excesso de exposição do sistema imunológico aos antígenos vacinais (Tizard, 1995).

Todos os soros com título protetor detectados pela CIE também apresentaram título protetor pela RIFF. Entretanto, a recíproca não foi verdadeira. Apesar da baixa sensibilidade da CIE, alguns autores a consideram mais vantajosa que o TNC e a técnica de RIFF, por permitir resultados em um curto período de tempo, ter baixo custo, ser mais segura por não necessitar o uso de vírus viável e ser de simples execução (Budzko *et al.*, 1983; Diaz *et al.*, 1995). Embora a CIE seja

considerada uma técnica simples, a produção e o controle de qualidade do antígeno viral usado são etapas complexas.

A maioria das amostras, 88 (96,70%) soros, possuía título de anticorpos neutralizantes na diluição 1/4, embora ainda não se soubesse se o título era > ou < 0,5 UI/mL. Estas amostras foram, então, tituladas com os conjugados *in house* e comercial, verificando-se que apenas 12 soros, entre todos os testados pela RIFF, apresentavam título não-protetor, e os outros 74 soros títulos protetores que variaram de 0,50 a $\geq 17,70$ UI/mL. Estes resultados confirmaram a recomendação da OMS e de outros autores de diluir o soro a 1/5 (OMS, 1992; Shayam *et al.*, 2006), assim como demonstraram que a técnica RIFF seria mais apropriada para analisar os soros do IMMJVJ.

Quatro soros entre os 90 soros analisados apresentaram resultados diferentes quando foram usados os conjugados comercial e *in house*. Um soro apresentou título não-protetor para o conjugado comercial e 3 soros apresentaram título não-protetor somente para o conjugado *in house*. A variação entre os títulos dessas amostras pode ser considerada aceitável, porque frequentemente bioensaios apresentam alta variabilidade como sugerido por outros autores (OMS, 1997; Wood & Durham, 1980; Wood, 1981; Reed *et al.*, 2002).

Devido à dificuldade e custo no estabelecimento de uma técnica capaz de produzir conjugados anti-rábiticos de alta qualidade, são necessários estudos comparativos entre conjugados *in house* com conjugados comerciais (Pagano & Gauvreau, 2004; Khawplod *et al.*, 2005). Para a avaliação dos esquemas profiláticos são fundamentais, ainda, a escolha de técnicas sensíveis e específicas, além do uso de reagentes compatíveis que garantam a qualidade dos resultados.

A análise estatística com os resultados obtidos pela técnica de RIFF, usando os conjugados *in house* e comercial, foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson. Esta análise permitiu quantificar o grau em que os títulos de anticorpos neutralizantes estavam correlacionados, e demonstrou que eram muito semelhantes, com coeficiente de correlação $r = 0,9367$ (Pagano & Gauvreau, 2004). Para confirmar este dado, os resultados foram submetidos a outros testes. Os testes *t* e o teste de Anova confirmaram não haver diferença significativa entre os títulos dos soros analisados com ambos os conjugados. O coeficiente de correlação ($r = 0,94$) mostrou a alta similaridade entre os resultados dos conjugados testados. Na

análise da variância do modelo de regressão dos títulos de anticorpos também foi observado que a relação entre estes dois resultados foi extremamente correlacionada. Desta forma, o conjugado produzido *in house* (IMMVJV) poderá substituir o conjugado comercial sem prejuízos nos resultados dos títulos de anticorpos anti-rábicos, com segurança e bastante economia, desde que a cada novo lote de conjugado *in house*, seja feito um controle de sua qualidade com um conjugado certificado (comercial).

A especificidade é outro parâmetro indicado pela OMS (1997), para avaliar procedimentos de titulação de anticorpos. O conjugado produzido *in house* apresentou uma especificidade de 92% quando comparado com o conjugado comercial (padrão ouro), e sensibilidade de 96%. Comparando os resultados com os conjugados *in house* e comercial, em relação àqueles obtidos pela CIE, a especificidade também foi elevada em contraste com a sensibilidade desta técnica. A baixa sensibilidade observada na técnica de CIE indica a necessidade dos laboratórios substituí-la por técnicas mais refinadas e sensíveis, como a RIFF, embora uma única citação na literatura tenha apresentado completa (100%) concordância de sensibilidade entre CIE e RIFF (Diaz *et al.*, 1995).

As variáveis que influenciaram os títulos de anticorpos foram o tipo de vacina ($\beta = 0,91147$; $p = 0,0002$), as doses de vacina ($\beta = -0,10122$; $p = 0,0001$) e o intervalo entre o início do tratamento e a coleta do sangue ($\beta = 0,03297$; $p = 0,023886$). O tipo de vacina apresentou o maior valor para o coeficiente β , demonstrando ser a variável de maior significância para o título de anticorpos neutralizantes contra a Raiva. Entretanto, Ranney e colaboradores (2006), ao analisarem diferentes vacinas produzidas em cultivo celular, não encontraram significância estatística entre o título de anticorpos e o tipo de vacina, o intervalo entre a vacinação e a coleta do sangue e as doses de vacina.

Portanto, nossos resultados confirmam a alta especificidade da CIE. Entretanto, o método não foi adequado por sua baixa sensibilidade. Para garantir a acuidade diagnóstica da titulação de anticorpos contra a Raiva, a RIFF deveria ser utilizada nas amostras que apresentarem título não-protetor pela CIE.

5. CONCLUSÕES

- Tanto a CIE como a RIFF, utilizadas para a detecção de anticorpos contra vírus da Raiva, demonstraram concordância na especificidade.
- Os resultados atestam a maior sensibilidade da RIFF, quando comparada com a CIE.
- O conjugado comercial (Liquid Rabies Antinucleocapsid Conjugate – Sanofi Diagnostic Pasteur, Paris, França) e o conjugado *in house* testado demonstraram elevada sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos contra vírus da Raiva nos indivíduos vacinados.
- Em consequência, a RIFF e o conjugado *in house* são indicados para substituir a CIE na rotina de titulação de anticorpos anti-rábicos.
- Os testes estatísticos permitiram ainda concluir que os títulos de anticorpos com o conjugado comercial e o conjugado *in house* foram altamente correlacionados, não se constatando significativa diferença entre os resultados obtidos na titulação dos soros analisados.
- O tipo de vacina, as doses administradas e o intervalo entre o início do tratamento e a coleta do sangue foram as variáveis que apresentaram um efeito significativo sobre o título de anticorpos anti-rábicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. *J Food Sci* 1992; 57 (3): 629 – 634.

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Mázaró R. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo : UNIFESP -Universidade Federal de São Paulo, 2004.

Andrulonis JA, Trimarchi CV, Shipherd SV, Debbie JG. A micromethod for measuring rabies-neutralizing antibody. *J Wildlife Dis* 1976; 12: 552-554.

Atanasiu P, Lepine P, Sisinan J, Davgnet JC, Witten M. Etude morphologique du virus rabique des rues en culture de tissue. *CR Acad Sci* 1963; 256: 3219.

ATCC. American Type Culture Collection. [on line]. Estados Unidos; 1961. [capturado em 07 jan. 2007] Disponível em <http://www.atcc.org/common/catalog/linkin/index.cfm?id=CCL-10&partner=amaxa&CFID=7894183&CFTOKEN=35ccaa24105495de-DF7B45CB-C6E4-1A4B-0642917FC00F6C42>.

Baer GM, Lentz TL. Rabies Pathogenesis to the Central Nervous System. In: Baer GM, ed. *The natural history of rabies*. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991, p. 105-120.

Benmansour A, Leblois P, Coulon P, Teffereau C, Gaudin Y, Flamand A, Lafay F. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* 1991; 65: 4198-4203.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano, 1ª ed. Brasília: 2002^a; Fundação Nacional de Saúde.

_____. Rede interagencial de informações para a saúde indicadores básicos de saúde no Brasil: conceitos e aplicações/Rede interagencial de informações para a saúde - Ripsa. Brasília: 2002^b; Organização Pan-Americana da Saúde. 299 p.

_____. Ministério da Saúde. Comunicação [on line]. Brasília, Brasil; 2002^c. [capturado em 11 ago. 2006] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_raiva.pdf

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica. Raiva Humana Transmitida por Morcegos em Municípios do Estado do Pará. Brasília: 2004; Ministério da Saúde.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [on line] Raiva Humana - Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980 - 2005. Brasília, Brasil; 2006^a; [capturado 23 dez. 2006] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva_2006.pdf

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [on line] Tópicos de Saúde. Raiva. Situação da Doença no Brasil. Brasília, Brasil; 2006^b; [capturado 23 dez. 2006] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21831

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [on line] Brasília, Brasil; 2006^c; [capturado 23 dez. 2006] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=25213

Budzko DB, Charamella LJ, Jelinek D, Anderson GR. Rapid Test for Detection of Rabies Antibodies in Human Serum. J Clin Microbiol Mar. 1983; 17 (3): 481-484.

Carini A. Sur une grande epizootia de rage. Annales de l'Institut Pasteur 1911; 11: 843-846.

CCAC. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Ottawa: Canadian Council on Animal Care (CCAC), 1984. v.1.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infectious Diseases [on line]. Atlanta, USA; 2006. [capturado 24 dez. 2006] Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/>

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução Nº. 714, de 20 de Junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Brasília: 2002; CFMV.

Chiquet F, Aubert M, Sagne I. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. J Immunol Methods 1998; 212: 79-87.

CNS. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para saúde utilizando seres humanos. Brasília: 1996; CNS - Conselho Nacional de Saúde.

CNS. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 347, de 13 de janeiro de 2005. Regulamenta o armazenamento e a utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa. Brasília: 2005; CNS - Conselho Nacional de Saúde.

Collier L, Oxford J. Human virology: A text for students of medicine, dentistry and microbiology. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2000.

Constantino D. Rabies transmitted by non-bite route. *Publ Health Rep* 1962; 77; 287-289.

Cortés MF, Yung VP, Roos KO, Rodríguez LA, Trujillo MR, Acevedo AA. Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida-Palacios (CRL) y de la vacuna antirrábica de cultivo celular (Verorab®) en personas con tratamiento preexposición. *Rev Med Chile* 2004; 132: 41-46.

Costa WA, Ávila CA, Valentine EJJ, Reichmann MLAB, Cunha RS, Guidolin R, Panachão MRI, Omoto TM, Bolzan VL. Profilaxia da Raiva humana. 2ª ed. São Paulo, Instituto Pasteur, 2000. (Manuais, 4).

Council of Europe. Human rabies immunoglobulin (Monograph No. 0723). In: *The European Pharmacopoeia*, 5th ed. Strasbourg, France. 2005^a. p 1750-1.

Council of Europe. Assays depending upon quantal responses. (General texts - 4). In: *The European Pharmacopoeia*, 5th ed. Strasbourg, France. 2005^b. p 484-6.

Crespin P, Audry L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. Intravital Diagnosis of Human Rabies by PCR Using Saliva and Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microbiol* 1998; 36(4): 1117-1121.

Davies MC, Englert ME, Sharpless GR, Cabasso VJ. The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. *Virology* 1963; 21: 642-51.

Dean DJ, Ableseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-95.

Diaz AM, Myers DM. Determinação of serum neutralization antibodies to rabies virus by a modified counterimmunoelectrophoresis test. *J Clin Microbiol* 1980; 12(2): 175-179.

Diaz AM, Myers DM. Comparison between a modified counterimmunoelectrophoresis test and the indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to rabies virus in human sera. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 446-448.

Diaz, AM. Técnica de Contrainmunolectroforesis para el Diagnostico de la Rabia. Serie de Monografias Científicas y Técnicas. OPS; 1985. p. 13-38.

_____. Rabies Neutralizing Antibodies Determination by the Modified Counterimmunoelectrophoresis Test and the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test. *Zbl Bakt Hyg. A* 1983; 256: 1-6.

Diaz AM, Arispe E, Brunel C, Cavandoli C, Dellepiane N, Miranda A. La Técnica de Contrainmunolectroforesis para la Determinación de Anticuerpos Antirrábicos. *Bol Ofic Sanit Panamer* 1986; 101: 255-261.

Diaz AM, Albas A, Valentini EJM, Perdomo G. Evaluación de la Calidad de los Reactivos que se utilizan en la Técnica de Contrainmunolectroforesis para la Determinación de Anticuerpos Antirrábicos. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33(1): 44-49.

Diaz AM, Valentini EJM, Albas A, Fuches RMM, Gallina NMF. Hyperimmune antirabies sera titration by standard mouse neutralization and counterimmunoelectrophoresis tests, comparing results of different laboratories. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995; 37(5): 435-440.

Dietzschold B, Gore M, Marchadier D, Niu HS, Bunschoten HS, Otvos I, Wunner Junior WH, Ertl HCJ, Osterhaus ADMF, Koprowski H. Structural and immunological characterization of a linear virus neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J Virol* 1990; 64: 3804-3809.

Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. *Introduction to modern virology*. 5 ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2001.

Dreesen DW. A global review of rabies vaccines for human use. *Vaccine* 1997; 15 (supl): S2-S6.

Ekstrom FA. Rabies epidemic at Stockholm in 1824. *London Med Gas* 1830; 6: 689.

ERJ. Estado do Rio de Janeiro. Secretaria de Estado de Saúde. Subsecretaria de Saúde. Superintendência de Saúde Coletiva. Assessoria de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses. Programa de Profilaxia da Raiva Humana/Animal (3ª parte). Rio de Janeiro: 2003; Secretaria de Estado de Saúde.

ERJ. Estado do Rio de Janeiro. Secretaria de Estado de Saúde. Subsecretaria de Saúde. Superintendência de Saúde Coletiva. Assessoria de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses [on line]. Rio de Janeiro, Brasil; 2006. [capturado 30 dez. 2006] Disponível em:
<http://www.saude.rj.gov.br/cvas/documentos/Suspens%E3o%20exames%20sorologia.pdf>

Flamand A, Raux H, Gaudin Y, Ruigrok WH. Mechanisms of Rabies Virus Neutralization. *Virology* 1993; 194: 302-313.

Fleming G, Rabies and Hydrophobia: Their History, Nature, Causes, Symptoms, and Prevention. London: Chapman and Hall; 1872.

Fishbein DB, Yenne KM, Dreesen DW, Teplis CF, Mehta N, Briggs DJ. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: A nationwide prospective study. *Vaccine* 1993; 11(4): 1390-1394.

Follmann EH, Ritter DG, Hartbauer DW. Oral Vaccination of Captive Arctic Foxes with Lyophilized SAG2 Rabies Vaccine. *J Wildlife Dis* 2004; 40(2): 328–334.

François MR, ed. Rabies Prevention and Control in Florida [on line]. Florida, United States: Division of Environmental Health, Department of Health; 2006 [capturado em 03 de abr. 2006] Disponível em: URL:
<http://floridaanimalcontrol.org/resource/Rabies/PreventionandControl.pdf>

Germano PML. Avanços na pesquisa da raiva. *Rev Saúde Publica* 1994; 28(1): 86-91.

Germano PML; Silva, EV, Sureau P. Determinação de perfil antigênico de três cepas de vírus rábico isoladas no Brasil, através da técnica dos anticorpos monoclonais antinucleocapside. *Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo* 1988; 25:199-205.

Goswami A, Plun-Favreau J, Nicoloyannis N, Sampath G, Siddiqui MN, Zinsou JA. The real cost of rabies post-exposure treatments. *Vaccine* 2005; 23: 2970–2976.

Gouvêa MV, Silva MV, An improved method using suckling mice to detect rabies neutralizing serum antibodies level. XI Encontro Nacional de Virologia e 3 Encontro de Virologia do Mercosul; 2000 nov. 25-29; São Lourenço, Brasil.

Hanlon CA, DeMattos CA, DeMattos CC, Niezgodá M, Hooper DC, Koprowski H, et al. Experimental utility of rabies virus-neutralizing human monoclonal antibodies in post-exposure prophylaxis. *Vaccine* 2001; 19: 3834–3842.

Haupt H, Rehaag H. A Raiva epizootica nos rebanhos de Santa Catarina. *Bol Soc Bras Med Vet* 1925; 2: 36.

Held RJ, Adaros LH. Neurological disease in man following administration of suckling mouse brain anti-rabies vaccine. *Bull World Health Organ* 1972; 46: 321-327.

Hummeler K, Koprowski H, Wiktor TJ. Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J Virol* 1967; 1: 152.

Hummeler K, Tomassini N, Sokol F, Kuwert E, Koprowski H. Morphology of the Nucleoprotein Component of Rabies Virus. *J Virology* 1968; 2(10): 1191-1199.

Hust EW, Pawan J L. An outbreak of rabies in Trinidad without history of bites and with the symptoms of acute ascending myelitis. *Lancet* 1931; 221: 622.

Irie T, Kawai A. Further studies on the mechanism of rabies virus neutralization by a viral glycoprotein-specific monoclonal antibody, #1-46-12. *Microbiol Immunol* 2005; 49(8): 721-731.

Kaplan, M M. Safety precautions in handling rabies virus. In: Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 3-8.

Khawplod P, Inoue K-I, Shoji Y, Wilde H, Ubol S, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. A novel rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *J Virol Methods* 2005; 125: 35–40.

King AA, Turner GS. Rabies: a review. *J Comp Pathol* 1993; 108: 1-39.

King DA, Croghan DL, Shaw EL. A rapid quantitative *in vitro* serum neutralization test for rabies antibody, *Can Vet J* 1968; 6: 187.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico – Texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

Koprowski, H. The virus – Overview. In: Baer GM, ed. The natural history of rabies. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991, p. 27-29.

Koprowsky H. The mouse inoculation test. In: Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H, ed. Laboratory techniques in rabies. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 6. p. 80-89.

Koprowski H, Cox HR. Studies on chick embryo adapted rabies virus I. Culture Characteristics and pathogenicity. J Immunol 1948; 60: 533.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 9 ed. New Jersey: Prentice Hall; 2000.

Marcovistz R, Romijn PC, Zanetti CR. In: Coura JR, ed. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2005. Cap. 152. p. 1783-1794.

Marissen WE, Kramer RA, Rice A, Weldon WC, Niezgodka M, Faber M, et al. Novel Rabies Virus-Neutralizing Epitope Recognized by Human Monoclonal Antibody: Fine Mapping and Escape Mutant Analysis. J Virology 2005; 79(8): 4672–4678.

Massone F. Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas. São Paulo: Guanabara Koogan; 1994.

Matsumoto S. Electron microscope studies of rabies virus in mouse brain. J Cell Biol 1963; 19: 565-91.

Mattos CA, Mattos CC, Rupprecht CE. Rhabdoviruses. In: Knipe DM e Howley PM, editors-in-chief. Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, associate editors. Field's virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. cap. 39. p.1245-78.

Medronho RA, Perez MA. Testes Diagnósticos. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. Epidemiologia. Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 2004. p.259-270.

Moore SM, Ricke TA, Davis RD, Briggs DJ. The influence of homologous vs. heterologous challenge virus strains on the serological test results of rabies virus neutralizing assays. *Biologicals* 2005; 33: 269 – 276.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Unidad de Salud Pública Veterinária. Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas. Rio de Janeiro: 2001; Organização Pan-Americana da Saúde. Vol. XXXII.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Expert Consultation on Rabies: first report. WHO Technical report series 931. Geneva: WHO; 2004.

_____. Organização Mundial de Saúde. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Geneva: WHO; 1997.

_____. Organização Mundial de Saúde. WHO Expert committee on rabies: eighth report. Technical report series 824. Geneva: WHO; 1992.

_____. Organização Mundial de Saúde. WHO Guidelines for dog rabies control. VPH 83-43. Geneva: WHO; 1983.

Pagano M, Gauvreau K. Princípios de bioestatística. 2 ed. Brasil: Thompson; 2004.

Parreiras H, Figueiredo P. A epizootia de Biguaçu (nota preliminar). *Brasil Médico* 1911; ano XXV (5): 71-74.

Pasteur L. Resultats de l'application de la methode pour prevenir la rage apres morsure. *CR Acad Sci* 1886; 102: 459.

Pawan JL. Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and latency of infection. *Ann Trop Med* 1936; 30: 401-422.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology*. 3 ed. Boston: Wm. C. Brown Publishers; 1996.

Peck FB, Jr Powell HM, Culbertson CG. A new antirabies vaccine for human use. *J Lab Clin Med* 1955; 45: 679.

Perrin P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. In: Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4 ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 433-444.

Ranney M, Partridge R, Jay GD, Rozzoli DE, Pandey P. Rabies Antibody Seroprotection Rates Among Travelers in Nepal: Rabies Seroprotection in Travelers. *J Travel Med* 2006; 13 (6): 329.

Raynaud M. Sur la transmissibilité de la rage de l'homme au lapin. *CR Acad Sci* 1879; 89: 714.

Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of Coefficient of Variation in Assessing Variability of Quantitative Assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(6): 1235–1239.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27(3): 493-497.

Reichmann MLAB, Pinto HBF, Nunes VFP. Vacinação contra a Raiva de cães e gatos. São Paulo, Instituto Pasteur, 1999 (Manuais, 3) 32p.

Rizzo LF. Imunoprofilaxis antirrábica humana com vacina de cérebro de raton lactente usando esquemas reducidos de vacunacion. *Rev Univ San Carlos* 1983; Guatemala.

Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 327-343.

Shayam C, Duggal AK, Kamble U, Agarwal AK. Post-exposure Prophylaxis for Rabies. *J Indian Acad Clin Med* 2006; 7(1): 39-46.

Simani S, Amirkhani A, Farahtaj F, Hooshmand B, Nadim A, Sharifian J, *et al.*. Comparison of Three Serological Tests for Titration of Rabies Antibodies in Immunized Individuals. *Arch Iranian Med* July 1999; 2(3): 125-127.

Smith JS. Rabies serology. In: Baer GM, ed. *The natural history of rabies*. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991. cap. 12. p.235-254.

Smith JS. Rabies Virus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8 ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2003. cap. 102. p.1544-1552.

Smith JS, Summer JW, Roumillat LF, Baer GM, Winkler WG. Antigenic characteristics of isolates associated with a new epizootic raccoon rabies in United States. *J Infect Dis* 1984; 149: 769.

Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull World Health Organ* 1973; 48: 535-541.

Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H, ed. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 15. p. 181-192.

Sokol F, Schlumberger HD, Wiktor TJ, Koprowski H, Hummeler K. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. *Virology* 1969; 38: 651.

Sokol F, Stancek D, Koprowski H. Structural proteins of rabies virus. *J Virol* 1971; 7: 241.

Steele JH, Fernandez PJ. History of rabies and global aspects. In: Baer GM, ed. *The natural history of rabies*. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991. cap. 1. p.1-26.

Storch GA. Diagnostic virology. In: Knipe DM e Howley PM, editors-in-chief. Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, associate editors. *Field's virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Winlkins; 2001. cap. 18. p. 493-532.

Storts RW, Montgomery DL. The Nervous System. In: Thomson RG. *Thomson's Special Veterinary Pathology*. 3 ed. Missouri: Mosby; 2001. p. 381-460.

Tizard, IR. *Immunology: an introduction*. 4 ed. Philadelphia: Saunders College Publishing; 1995.

Tollis M, Dietzschold B, Volia CB, Koprowski H. Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. *Vaccine* 1991; 9: 134-136.

Tordo N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H, ed. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 3. p. 28-51.

Tsiang, H. Rabies virus infection of myotubes and neurons as elements of the neuromuscular junction. *Rev Infect Dis* 1988; 10: S733-S738.

Tsiang H, Ceccaldi PE, Lycke E. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. *J Gen Virol* 1991; 72: 1191-1194.

Tyler KL, Nathanson N. Pathogenesis of viral infections. In: Knipe DM e Howley PM, editors-in-chief. Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, associate editors. *Field's virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. cap. 9. p.199-244.

Trimarchi CV, Rudd RD, Safford Junior M. An in vitro virus neutralization test for rabies antibody. In: Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4 ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 193-199.

Trimarchi CV, Debbie JG. Production of rabies fluorescent conjugate by immunization of rabbits with purified rabies antigen. *Bull World Health Organ* 1974; 51: 447-449.

Vengatesan D, Raj GD, Raja A, Ramadass P, Gunaseelan L. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Wiley InterScience Journal* [on line]. 2006 [capturado 20 dez. 2006]; 70B (5). Disponível em: URL: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/112641612/ABSTRACT?CRETRY=1&SRETRY=0>

Vernon SK, Neurath AR, Rubin BA. Electron microscopic studies on the structure of rabies virus. *J Ultrastruct Res* 1972; 41: 29.

Xavier SM, Silva MV, Moreira WC, Santos BCP. Raiva em morcego insetívoro *Nyctinomops laticaudatus* (E. Geoffroy, 1805) na Cidade do Rio de Janeiro, RJ – Brasil. *Revista da Universidade Rural do Rio de Janeiro, Série Ciências da Vida. Seropédica, RJ, EDUR* 2005; 25 (suplemento): 417-18.

Webster LT, Dawson JR. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test, *Proc Soc Exp Biol Med* 1935; 32: 570.

Weiss RA, Bennett PLP. Assembly of membrane glycoproteins studied by phenotypic mixing between mutants of vesicular stomatitis virus and retroviruses. *Virology* 1980; 100: 252.

Westbury H. Australian bat lyssavirus. *Annals of the international Rabies meeting*; 1997 mar 13 –14; Paris, França. Paris: Institute Pasteur; 1997.

White DO, Fenner FJ. Medical virology. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1994.

Wiktor TJ, Clark HF. Application of the plaque assay technique to the study of rabies virus-neutralizing antibody interactions, *Ann Microbiol Inst Pasteur* 1973; 124A: 271.

Wiktor TJ, Plotkin SA, Koprowski H. Development and clinical trials of the new rabies vaccine of tissue culture origin (human diploid cells). *Dev Biol Stand* 1978; 40: 3.

Wilde H, Chutivongse S, Tepsumethanon W, Choomkasien P, Polsuwan C, Lumbertdacha B. Rabies in Thailand: 1990. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 644-652.

Wood RJ. Alternative ways of estimating serological titer reproducibility. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 760 -768.

Wood RJ & Durham TM. Reproducibility of Serological Titers. *J Clin Microbiol* 1980; 11(6): 541-545.

Wunderli PS, Shaddock JH, Scott-Schimid D, Milller TJ, Baer GM. The protective role of humoral neutralizing antibody in the N.I.H potency test for rabies vaccines. *Vaccine* 1991; 9: 638–642.

Wunner WH. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: Baer GM, ed. *The natural history of rabies*. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991. cap. 2. p. 31-67.

Yang Li-M, Zhao LZ, Hu RL, Shi ZS, Liu WJ. A novel double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibodies against rabies virus. *Clin Vac Immunol* 2006; 13(8): 966-968.

Zalan E, Wilson C and Pukitis D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J Biol Stand* 1979; 7: 213-220.

Zanetti CR. Imunidade anti-rábica. [Seminário Internacional de Raiva; 2003 Ago. 5-7; São Paulo, Brasil. São Paulo: Instituto Pasteur; 2003].

Zanneti CR, de Franco MT, Vassao RC, Pereira CA, Pereira QAC. Failure of protection induced by a Brazillian vaccine against Brazillian wild rabies viruses. *Arch Virol* 1998; 143: 1745–1756.

Zinke G. Neue Ansichten der Hundswuth, ihrer Ursachen und Folgen nebst einer sichern Behandlungsart der von tollen Thieren gebissenen Menscher. Gabler Jena Rev 1804; 16: 212.

ANEXOS

Anexo I – Esquema de pré-exposição para tratamento profilático anti-rábico humano*

	Tipo de Vacina	
	Fuenzalida & Palácios	Vacina de cultivo celular
Número de doses	03 doses	03 doses
Dias de aplicação	0, 7, 14	0, 7, 28
Via	Intramuscular profunda	Intramuscular profunda (dose completa) ou Intradérmica (dose 0,1 mL)
Local de aplicação	Músculo deltóide ou vasto lateral da coxa (não aplicar no glúteo)	Músculo deltóide ou vasto lateral da coxa (não aplicar no glúteo)

**Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano, 1ª ed. Brasília: 2002; Fundação Nacional de Saúde.*

Controle sorológico a partir do 14º dia, após a última dose do esquema.

Resultados:

- a) *Insatisfatório se o título de anticorpos for < 0,5 UI/mL. Nesse caso, aplicar uma dose de reforço e reavaliar a partir do 14º dia após o reforço.*
- b) *Satisfatório se o título de anticorpos for ≥ 0,5 UI/ml.*

Observação: O controle sorológico é exigência básica para a correta avaliação da pessoa vacinada.

Importante: Deve-se fazer o controle sorológico anual dos profissionais que se expõem permanentemente ao risco de infecção ao vírus da Raiva, administrando-se uma dose de reforço sempre que os títulos forem inferiores a 0,5 UI/ml. Repetir a sorologia a partir do 14º dia, após à dose de reforço.

Anexo II – Esquema para tratamento profilático anti-rábico humano com vacina de cultivo celular*

CONDIÇÕES DO ANIMAL AGRESSOR	CÃO OU GATO SEM SUSPEITA DE RAIVA NO MOMENTO DA AGRESSÃO ¹	CÃO OU GATO CLINICAMENTE SUSPEITO DE RAIVA NO MOMENTO DA AGRESSÃO	CÃO OU GATO RAIVOSO, DESAPARECIDO OU MORTO; ANIMAIS SILVESTRES ² (INCLUSIVE OS DOMICILIADOS) ANIMAIS DOMÉSTICOS DE INTERESSE ECONÓMICO OU DE PRODUÇÃO
TIPO DE EXPOSIÇÃO			
Contato Indireto	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Não tratar 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Não tratar 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Não tratar
<p>Acidentes Leves</p> <ul style="list-style-type: none"> Ferimentos superficiais, pouco extensos, geralmente únicos, em tronco e membros (exceto mãos e polpas digitais e planta dos pés); podem acontecer em decorrência de mordeduras ou arranhaduras causadas por unha ou dente; lambedura de pele com lesões superficiais 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Observar o animal durante 10 dias após a exposição. Se o animal permanecer sadio no período de observação, encerrar o caso. Se o animal morrer, desaparecer ou se tornar raivoso, administrar 5 doses de vacina (dias 0, 3, 7, 14 e 28). 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Iniciar tratamento com 2 (duas) doses, uma no dia 0 e outra no dia 3; Observar o animal durante 10 dias após a exposição. Se a suspeita de Raiva for descartada após o 10º dia de observação, suspender o tratamento e encerrar o caso. Se o animal morrer, desaparecer ou se tornar raivoso, completar o esquema até 5 (cinco) doses. Aplicar uma dose entre o 7º e o 10º dia e uma dose nos dias 14 e 28. 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Iniciar imediatamente o tratamento com 5 (cinco) doses de vacina administradas nos dias 0, 3, 7, 14 e 28
<p>Acidentes Graves</p> <ul style="list-style-type: none"> ferimentos na cabeça, face, pescoço, mão, polpa digital e/ou planta do pé; ferimentos profundos, múltiplos ou extensos, em qualquer região do corpo; lambedura de mucosas; lambedura de pele onde já existe lesão grave; ferimento profundo causado por unha de gato. 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Observar o animal durante 10 dias após exposição. Iniciar tratamento com duas doses uma no dia 0 e outra no dia 3; Se o animal permanecer sadio no período de observação, encerrar o caso. Se o animal morrer, desaparecer ou se tornar raivoso, dar continuidade ao tratamento, administrando o soro³ e completando o esquema até 5 (cinco) doses.. Aplicar uma dose entre o 7º e o 10º dia e uma dose nos dias 14 e 28. 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Iniciar o tratamento com soro³ e 5 doses de vacina nos dias 0, 3, 7, 14 e 28. Observar o animal durante 10 dias após a exposição. Se a suspeita de Raiva for descartada após o 10º dia de observação, suspender o tratamento e encerrar o caso. 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar com água e sabão Iniciar imediatamente o tratamento com soro³ e 5 (cinco) doses de vacina administradas nos dias 0,3,7,14 e 28.

*Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano, 1ª ed. Brasília: 2002; Fundação Nacional de Saúde.

(1) É preciso avaliar, sempre, os hábitos dos cães e gatos e os cuidados recebidos. Podem ser dispensados do tratamento as pessoas agredidas por cão ou gato que, com certeza, não tem risco de contrair a infecção rábica. Por exemplo, animais que vivem dentro do domicílio (exclusivamente); não tenham contato com outros animais desconhecidos; que somente saem à rua acompanhados dos seus donos e que não circulem em área com a presença de morcegos. Em caso de dúvida, iniciar o esquema de profilaxia indicado.

(2) Nas agressões por morcegos deve-se indicar a soro-vacinação independentemente da gravidade da lesão, ou indicar conduta de reexposição;

(3) Aplicação do soro na(s) porta(s) de entrada. Quando não for possível infiltrar toda dose, a quantidade restante deve ser aplicada pela via intramuscular podendo ser utilizada a região glútea. Sempre aplicar em local anatômico diferente do que aplicou a vacina.

Anexo III - Esquemas de reexposição, conforme o esquema e vacina prévios e a vacina a ser utilizada por ocasião da reexposição*

Tipo de esquema anterior	Vacina	Esquema da reexposição	
		Fuenzalida & Palácios	Cultivo Celular
Completo	Fuenzalida & Palácios modificada	a) até 90 dias não tratar b) após 90 dias 3 doses, em dias alternados	a) até 90 dias não tratar b) após 90 dias 2 doses, uma no dia 0 e outra no dia 3
	Cultivo Celular	a) até 90 dias não tratar b) após 90 dias 3 doses, em dias alternados	a) até 90 dias não tratar b) após 90 dias 2 doses, uma no dia 0 e outra no dia 3
Incompleto ¹	Fuenzalida & Palácios modificada ²	a) até 90 dias completar o número de doses b) após 90 dias ver esquema de pós-exposição (conforme o caso)	a) até 90 dias completar o número de doses. b) após 90 dias ver esquema de pós-exposição (conforme o caso)
	Cultivo Celular ³	a) até 90 dias vide observação b) após 90 dias ver esquema de pós-exposição (conforme o caso)	a) até 90 dias completar o número de doses b) após 90 dias ver esquema de pós-exposição (conforme o caso)

*Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano, 1ª ed. Brasília: 2002; Fundação Nacional de Saúde.

(1) Não considerar o esquema anterior se o paciente recebeu número menor de doses do que aqueles referidos nas notas (2) e (3);

(2) Pelo menos 3 doses da vacina Fuenzalida & Palácios em dias alternados ou 5 doses em dias seguidos;

(3) Pelo menos 2 doses de vacina de cultivo celular em dias alternados.

Importante: Em caso de reexposição, com histórico de tratamento anterior completo e se o animal agressor, cão ou gato, for passível de observação, considerar a hipótese de somente observar o animal;

Quando o paciente tiver o esquema de pré-exposição, em qualquer momento, adotar conduta conforme Quadro 4.

Anexo IV - Conduta em caso de possível exposição ao vírus da Raiva em pacientes que receberam esquema de pré-exposição*

Sorologia comprovada (titulação)	Vacina	
	Fuenzalida & Palácios modificada	Cultivo Celular
Com comprovação sorológica (título $\geq 0,5$ UI/mL).	3 (três) doses em dias alternados. Não indicar soro.	2 (duas) doses, uma no dia 0 e outra no dia 3. Não indicar soro.
Sem comprovação sorológica ou título $< 0,5$ LU/mL	Verificar o Quadro 3, em caso de esquema vacinal incompleto.	Verificar o Quadro 3, em Caso de esquema vacinal incompleto.

**Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano, 1ª ed. Brasília: 2002; Fundação Nacional de Saúde.*

Anexo V – Fotomicrografias de célula BHK 21, imunofluorescência direta

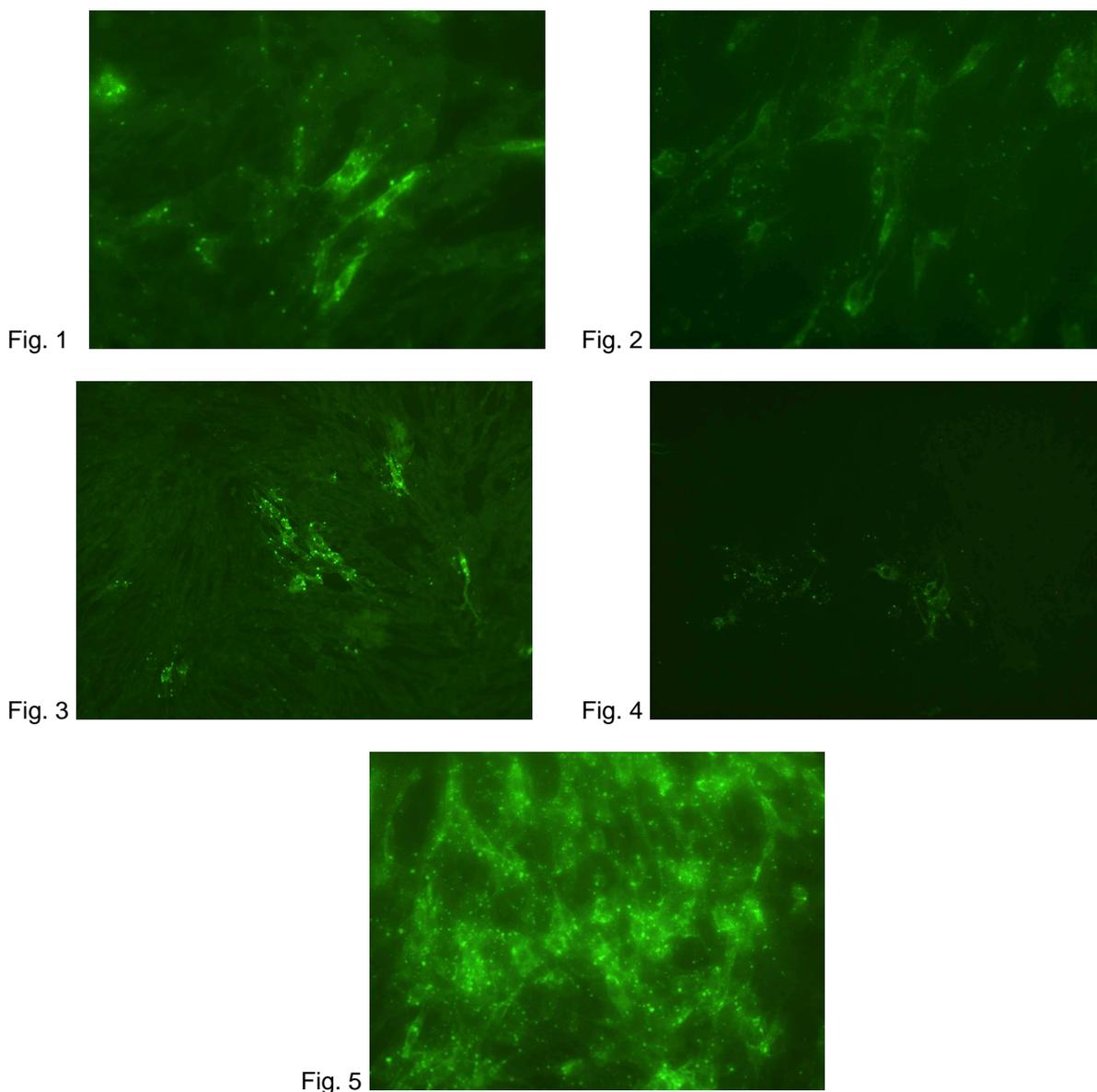


Figura 1. Células BHK-21 infectadas com 95,67 DICT₅₀ tratadas com conjugado-FICT *in house* diluído 1:100. Soro de um vacinado diluído 1:64 (x20).

Figura 2. Células BHK-21 infectadas com 95,67 DICT₅₀ tratadas com conjugado-FICT conjugado comercial diluído 1:20. Soro da Fig. 2.1 diluído 1:64 (x20).

Figura 3. Células BHK-21 infectadas com 95,67 DICT₅₀ tratadas com conjugado-FICT *in house* diluído 1:100. Soro de um vacinado diluído 1:128 (x20).

Figura 4. Células BHK-21 infectadas com 95,67 DICT₅₀ tratadas com conjugado-FICT conjugado comercial diluído 1:20. Soro da Fig. 2.3 diluído 1:128 (x20).

Figura 5. Células BHK-21 infectadas com 95,67 DICT₅₀ tratadas com conjugado-FICT *in house* diluído 1:100; titulação do vírus trabalho cepa CVS-11 diluída 1:2 (x20).

Anexo VI - Miscelânea



Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8

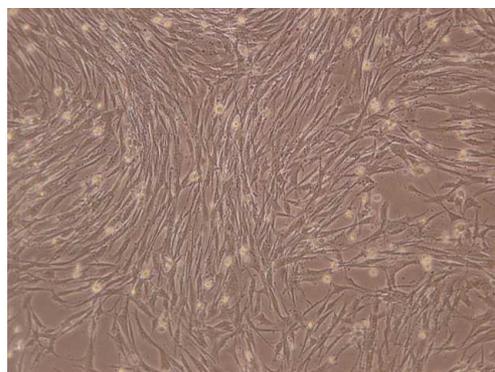


Fig. 9

Figura 6. Sala de manutenção de camundongos.

Figura 7. Garrafas de polipropileno de 25 e 75 cm² para cultivo celular.

Figura 8. Microscópio invertido e sistema de análise de imagem acoplado.

Figura 9. Células BHK-21. Monocamada aderente mostrando a morfologia fibroblastóide característica (x10).