

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CAMILA SLOBODA PACHECO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA ANTI-RÁBICA ORAL TESTADA
EM CAMUNDONGOS**

(Development of an oral rabies vaccine tested in mice)

São José dos Pinhais

2011

CAMILA SLOBODA PACHECO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA ANTI-RÁBICA ORAL TESTADA EM
CAMUNDONGOS**

(Development of an oral rabies vaccine tested in mice)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração: Patologia Animal e Comparada, Cirurgia e Clínica, do setor de Ciências Agrárias e Ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador:
Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff

**São José dos Pinhais
2011**

TERMO DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

À Deus por escolher este trabalho para mim, pela benção da vida, sabedoria e luz de bons pensamentos, pelas respostas quando elas pareciam impossíveis e proteção.

À minha mãe, Maria Helena pelo amor incondicional, dedicação e paciência em me ouvir nos momentos mais difíceis. Pela oportunidade, apoio e palavras de união e tranquilidade. Por ter feito o possível e impossível para me proporcionar as melhores chances, acreditando e respeitando as minhas decisões e nunca deixando que os obstáculos e pedras, minassem o meu caminho de sonhos, serei eternamente grata.

Ao meu tio Carlos e tia Lorena pelo suporte e confiança, pela força e por dizerem sempre que tudo daria certo, por compartilharem felicidades, paciência e harmonia. Vocês são muito especiais.

Ao meu tio Luiz e tia Chirlei por acreditarem que eu chegaria até aqui, pelo carinho, apoio e instantes de descontração quando tudo parecia estar difícil. Obrigada por falarem que eu seria capaz.

Ao Professor Daniel Ollhoff pela orientação, construção, paciência e oportunidade, pelos ensinamentos que eu levarei para a vida toda. Obrigada pela confiança e apoio, pelo suporte e direcionamentos, e principalmente, por acreditar em meu potencial.

Aos gerentes Dr. Jorge Victor Bacila Agottani da Divisão de Antígenos e Dr. Rubens Chaguri da Vacina BHK pela paciência, amizade, apoio, compreensão e confiança.

Ao Dr. Ernesto Renato Krüger, à bióloga Tânia Regina Penha e ao farmacêutico Sandro Pereira pela amizade, força, por acreditarem em mim, pela companhia e por acompanharem todos os passos desta realização de perto. Pelo carinho e dedicação, afeto e paciência dedicada.

A todos os funcionários da equipe do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) pela ajuda e credibilidade. Agradeço especialmente, pelas ideias e serviços, pela amizade, consideração, confiança e gentileza.

Aos animais, pois sem eles não seria possível realizar esta pesquisa.

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio e familiares que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE ABREVIATURA.....	9
RESUMO GERAL.....	11
GENERAL ABSTRACT.....	12
CAPÍTULO 1 – VACINAS ANTI-RÁBICAS: TIPOS E DESENVOLVIMENTO.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. VÍRUS DA RAIVA.....	16
3. VACINAS ANTI-RÁBICAS.....	19
3.1 VACINAS DE CULTIVO CELULAR.....	20
3.2 VACINAS DE VÍRUS INATIVADO.....	21
3.3 VACINAS DE VÍRUS ATENUADO OU MORTO.....	22
3.4 VACINAS RECOMBINANTES.....	23
3.5 DESENVOLVIMENTO DE NOVAS VACINAS.....	23
3.5.1 Objetivos de novas vacinas.....	26
3.5.2 Veículos vacinais.....	27
3.5.3 Avaliação da inocuidade e eficácia.....	29
4. VIAS DE IMUNIZAÇÃO.....	30
5. ANIMAIS ALVOS DE VACINAÇÃO.....	31
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE VACINA ANTI-RÁBICA ORAL TESTADA EM CAMUNDONGOS.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	45
1.1 VACINAÇÃO ORAL DE CAMUNDONGOS.....	45

1.2	AÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA EM CAMUNDONGOS.....	45
1.3	TESTE ELISA PARA A DETECÇÃO DA RESPOSTA VACINAL ANTI-RÁBICA.....	46
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1	CAMUNDONGOS.....	46
2.2	LOCAL E PERÍODO DE AVALIAÇÃO.....	48
2.3	VÍRUS.....	48
2.3.1	Processo de Clarificação e Concentração Viral.....	48
2.3.2	Inativação do Vírus.....	49
2.4	FORMULAÇÃO DE VACINA ANTI-RÁBICA ORAL.....	49
2.5	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS VACINAIS.....	50
2.5.1	Determinação da concentração de proteínas virais para utilização no teste ELISA.....	50
2.5.2	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos para o vírus da raiva.....	51
2.5.3	Interpretação da leitura.....	51
3.	RESULTADOS.....	52
3.1	VACINA ANTI-RÁBICA.....	52
3.2	ACEITABILIDADE DA VIA ORAL.....	52
3.3	TESTE ELISA.....	54
4.	DISCUSSÃO.....	56
4.1	PERSPECTIVAS.....	58
5.	CONCLUSÃO.....	58
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7.	ANEXO.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	MÉDIA, MEDIANA E ERRO PADRÃO, MEDIDOS EM DENSIDADE ÓPTICA POR ELISA, DE SOROS DE 66 CAMUNDONGOS NA DILUIÇÃO 1:25, UTILIZADOS EM EXPERIMENTO DE VACINAÇÃO ORAL COM VACINA ANTIRÁBICA PV (TECPAR).....	54
TABELA 2 –	MÉDIA, MEDIANA E ERRO PADRÃO, MEDIDOS EM DENSIDADE ÓPTICA POR ELISA, DE SOROS DE 66 CAMUNDONGOS NA DILUIÇÃO 1:50, UTILIZADOS EM EXPERIMENTO DE VACINAÇÃO ORAL COM VACINA ANTIRÁBICA PV (TECPAR).....	54

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	–	CAMUNDONGO CALB 21 DIAS LAMBUZADO COM UMA DOSE DE PASTA VACINAL.....	50
FIGURA 2	–	ANIMAL A: APLICAÇÃO DE VEÍCULO VACINAL, DIA 1, ANIMAIS B: DIA 2 DO EXPERIMENTO, APÓS 24 HORAS DA APLICAÇÃO DE PASTA VACINAL, NOTA-SE CONSIDERÁVEL DIMINUIÇÃO DA QUANTIDADE DE PASTA NO PELAME. ANIMAL C: DIA 3 DO EXPERIMENTO. VISUALIZAÇÃO DO PELAME NO DORSO, SECO, COM RESQUÍCIOS DE PELOS AINDA COLADOS APÓS 48 HORAS DA APLICAÇÃO.....	53
QUADRO 1	–	REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO DE CASOS DE RAIVA DIAGNOSTICADOS NO BRASIL ENTRE 2002 E 2010 COM ESPECIAL ATENÇÃO AOS ANIMAIS DE PRODUÇÃO.....	15
GRÁFICO 1	-	VALORES MÉDIOS DE DENSIDADE ÓPTICA DOS SOROS (N=66) DE CAMUNDONGOS VACINADOS ORALMENTE CONTRA A RAIVA COM VACINA PV (TECPAR).....	57

LISTA DE ABREVIATURA

PV	–	<i>Pasteur Virus</i>
TECPAR	–	Instituto de Tecnologia do Paraná
µl	–	Microlitro (s)
ml	–	Mililitro (s)
ELISA	–	Ensaio imunenzimático
SNC	–	Sistema Nervoso Central
RNA	–	Ácido ribonucléico
M	–	Proteína Matriz
L	–	Proteína RNA polimerase
P	–	Fosfoproteína
G	–	Glicoproteína
N	–	Proteína nuclear
EBL	–	<i>European Bat Lyssavirus</i>
INF	–	Interferon
IL	–	Interleucina
TNF α	–	Fator de necrose tumoral
CD8+	–	Tipo de Linfócito T específico
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
SAD	–	<i>Street Alabama Dufferin</i>
SAG	–	<i>Street Alabama Gif</i>
V-RG	–	Vacina recombinante de glicoproteína
PP	–	<i>Paris Pasteur</i>
PM	–	<i>Pittman Moore</i>
CVS	–	<i>Challenge virus standard</i>
ERA	–	<i>Evelyn Rokitnicki Abelseth</i>
LEP	–	<i>Low-egg-passage</i>
HEP	–	<i>High-egg-passage</i>
BHK	–	<i>Baby hamster kidney</i>
PFU	–	<i>Plaque forming unit</i>
LD ₅₀	–	Dose letal para 50% dos camundongos
BPL	–	β-Propiolactona
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico

cDNA	–	Ácido desoxirribonucléico complementar
HIV	–	Vírus da imunodeficiência humana
pH	–	Potencial hidrogênio-iônico
NIH	–	<i>National Institute of Health</i>
SC	–	Subcutânea
ID	–	Intra-dérmica
IC	–	Intra-cerebral
IN	–	Intra-nasal
IM	–	Intra-muscular
VO	–	Via Oral
EU	–	Unidades de ELISA
Calb 21	–	Camundongos albinos de 21 dias
RPM	–	Rotações por minuto
FD	–	Fator de diluição
DO	–	Densidade Óptica
g	–	Grama
Kda	–	<i>Kilo Dalton</i>
PBS	–	<i>Phosphate buffer saline</i>
HCl	–	Ácido clorídrico
PASNI	–	Programa de Auto-Suficiência Nacional de Imunobiológicos
OMS	–	Organização Mundial da Saúde
DAN	–	Divisão de Antígenos
MAPA	–	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
FIOCRUZ	–	Instituto Fundação Oswaldo Cruz
MS	–	Ministério da Saúde
SVS	–	Sistema de Vigilância em Saúde
OPAS	–	Organização Pan-Americana da Saúde

RESUMO GERAL

A raiva permanece como uma doença preocupante para médicos e veterinários devido aos expressivos prejuízos e perdas que ela acarreta. O estudo continuado da raiva, focando em seus métodos profiláticos e em especial no desenvolvimento de novos métodos vacinais, torna-se imprescindível. São apresentados os aspectos da virologia, a história das vacinas anti-rábicas e as principais espécies alvos de vacinação. Tratamos de veículos vacinais, atividade imunogênica, e das transformações e avanços nas técnicas para formulação e eficácia de vacinas. A vacinação oral de camundongos representa um passo para a possível produção de vacina anti-rábica oral nacional. Objetivou-se formular vacina oral anti-rábica em pasta, a partir da vacina de cultivo celular PV do TECPAR capaz de suscitar a produção de anticorpos contra a raiva em camundongos. Obteve-se uma vacina em veículo de lanovaselina contendo $10^{7,5} \text{DL}_{50}/0,03 \text{ ml}$ de antígenos virais. Os camundongos vacinados com 2 doses espaçadas em 21 dias soroconverteram, mensurados por teste ELISA com valores de 0,43; superiores aos animais que receberam 2 doses de veículo somente com 0,13; e 0,31 e 0,09 ($P = 0,0001$), respectivamente, nas diluições 1:25 e 1:50. Não foram observados efeitos tóxicos pela ingestão da vacina ou do veículo. Os resultados poderão ser utilizados para direcionar o desenvolvimento de uma vacina oral anti-rábica para o principal vetor da raiva no Brasil, o morcego hematófago.

Palavras-Chave: Raiva, vacina oral, camundongos, controle, ELISA.

GENERAL ABSTRACT

Rabies remains a preoccupying disease in human and animal medicine due to the expressive losses that it causes. The continued study of rabies, concentrating on its prophylactic methods, specifically in the development of new vaccine methods becomes essential. Aspects of the virology, the history of anti-rabies vaccines and the main species of vaccination are discussed. Vaccine vehicles, immunogenic activity and the transformations and advances in the techniques for the development of effective vaccines are addressed. Oral vaccination of mice represents a step towards the possible production of a national oral anti-rabies vaccine. The objective of this study was to formulate an antirabies oral vaccine in paste from the cell culture vaccine PV TECPAR able to elicit the production of antibodies against rabies in mice. This research developed a vaccine homogenized in lanovaseline paste with $10^{7.5} \text{DL}_{50}/0,03 \text{ ml}$ viral antigens. The mice that were vaccinated with 2 doses with intervals of 21 days seroconverted, measured by ELISA, to 0,43; higher than the mice that received 2 doses of vehicle only with 0,13; and 0,31 e 0,09 ($P = 0,0001$), respectively, on the dilutions 1:25 e 1:50. The results could be used to direct the development of an antirabies oral vaccine for the main vector of rabies in Brazil, the vampire bat.

Keywords: Rabies, oral vaccine, mice, control, ELISA.

CAPÍTULO 1

VACINAS ANTI-RÁBICAS: TIPOS E DESENVOLVIMENTOS - Revisão

(Rabies vaccines: types and development - Review)

VACINAS ANTI-RÁBICAS: TIPOS E DESENVOLVIMENTO - Revisão

(Rabies vaccines: types and development - Review)

Camila Sloboda Pacheco da Silva¹ Ernesto Renato Krüger², Jorge Victor Bacila Agottani³, Rubens Chaguri de Oliveira⁴, Rüdiger Daniel Ollhoff⁵

¹ Mestrado em Ciência Animal – PUCPR. Médica Veterinária; Bióloga. PUCPR. camilasloboda@gmail.com

² Médico Veterinário – TECPAR. erkruger@tecpa.br

³ Médico Veterinário – TECPAR. agotani@tecpa.br

⁴ Médico Veterinário – TECPAR. rubens@tecpa.br

⁵ Professor, Médico Veterinário – PUCPR. daniel.ollhoff@pucpr.br

RESUMO

A raiva permanece como uma doença preocupante para médicos e veterinários devido aos expressivos prejuízos e perdas que ela acarreta. O estudo continuado da raiva, focando em seus métodos profiláticos e em especial no desenvolvimento de novos métodos vacinais, torna-se imprescindível. A vacinação oral de camundongos representa um acesso viável às tecnologias de ponta no campo científico para a verificação da possível produção de vacina anti-rábica oral. Aqui são apresentados os aspectos da virologia, a história das vacinas anti-rábicas e as principais espécies alvos de vacinação. Versa-se sobre veículos vacinais, atividade imunogênica e as transformações e avanços nas técnicas para formulação e eficácia de vacinas. O objetivo da revisão foi abordar o desenvolvimento de novas vacinas, em especial as de via oral.

Palavras-chave: Raiva, vacinas, camundongos.

ABSTRACT

Rabies remains a preoccupying disease in human and animal medicine due to the expressive losses that it causes. The continued study of rabies, concentrating on its prophylactic methods, specifically in the development of new vaccine methods becomes essential. Aspects of the virology, the history of anti-rabies vaccines and the main species of vaccination are discussed. Vaccine vehicles, immunogenic activity and the transformations and advances in the techniques for the development of effective vaccines are reviewed. The research objective was to address the development in particular the vaccines for the oral route.

Keywords: Rabies, vaccines, mice.

1. INTRODUÇÃO

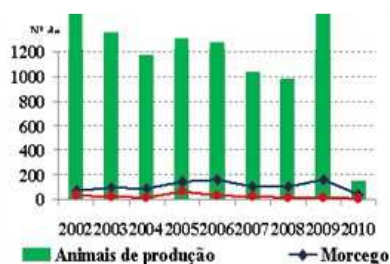
A raiva é uma doença que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC), fatal e progressiva. Considera-se que todos os animais vertebrados de sangue quente podem ser acometidos com 100% de letalidade (RUPPRECHT *et al.*, 2004), apesar de existirem relatos de hienas em parques africanos e cachorros subsaarianos com a presença de anticorpos e RNA viral, porém saudáveis clinicamente (WARRELL e WARRELL, 2004).

Devido a estimadas 40 mil mortes bovinas a cada ano no Brasil (HEINEMAN *et al.*, 2002), o Boletim de Defesa Sanitária Animal (2010) do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, relata as perdas econômicas para o setor por raiva herbívora em 15 milhões de dólares ao ano. No Brasil o investimento para a prevenção da raiva em 2004 foi US\$ 28 milhões de dólares. Esta quantia inclui custos das vacinas para humanos e cães, imunoglobulinas, diagnóstico laboratorial, equipe médica e veterinária e treinamento dos profissionais para campanhas de vacinação (CARNIELI *et al.*, 2006).

Os Estados com as maiores produções de ruminantes e equídeos são os que sofrem mais com as perdas. Apenas no Estado de São Paulo foram reportados 80 casos de raiva em morcegos e em Minas Gerais 837 casos de raiva bovina no período decorrido entre 1996 e 1999 (MENEZES *et al.*, 2008). Os casos de raiva dos animais de produção são reportados no Quadro 1, juntamente com os casos de raiva de morcegos no Brasil de 2002 a 2010.

Quadro 1: Representação do número de casos de raiva diagnosticados no Brasil entre 2002 e 2010 com especial atenção aos animais de produção.

Fonte: Covev/Cgdi/Devep/SVS/MS. Dados de 2010 parciais e sujeitos à alteração.



Desde 1975, 500 casos de raiva humana foram associados com morcegos hematófagos, responsabilizados por até 100.000 casos anuais de raiva herbívora em toda a América Latina. Em 1998, a raiva foi constatada em 428 municípios brasileiros, cerca de 7% do total (MENEZES *et al.*, 2008).

O morcego é o principal transmissor da raiva no Brasil, relativamente controlada na zona urbana e endêmica na zona rural (NEVES, 2008; NOVAIS, 2008).

O controle da raiva silvestre é executado em sua maioria pela redução da população de morcegos hematófagos por envenenamento químico com pasta vampiricida, constituída por anticoagulantes, como medida de redução populacional localizada e utilizada principalmente quando de um surto (KOTAIT, 2005).

Estas medidas, além de ineficazes para o controle definitivo da raiva silvestre (MEBATSION *et al.*, 2001; VOS, 2003; FOLLMANN *et al.*, 2004) como comprovado em outros vetores no hemisfério norte, devido à alta adaptabilidade a diferentes ambientes destes reservatórios e vetores naturais, não consideram o sofrimento animal e a possível contaminação humana e ambiental com os produtos vampiricidas utilizados, tais como o dicumarol (bishidroxycumarina) e a warfarina sódica.

O estudo continuado da raiva, focando em seus métodos profiláticos e em especial no desenvolvimento de novos métodos vacinais, torna-se imprescindível (WUNNER, 2007).

2. VÍRUS DA RAIVA

O vírus da raiva está classificado na ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus*. Consiste essencialmente de uma molécula de RNA (2-3%), proteína (65-75%), lipídio (15-25%) e carboidrato (3%). Os *Lyssavirus* são envelopados em forma de projétil de revólver com diâmetro de 45 a 100nm e 100 a 430nm de comprimento (CUNHA, 2006). As proteínas constituintes são enumeradas em 5 categorias: a nucleoproteína (N), a proteína matriz (M), a proteína do capsídeo (L), a fosfoproteína (P) e a glicoproteína do capsídeo (G) (FLORES, 2007).

O gênero *Lyssavirus* é dividido em sete genótipos. O genótipo 1 inclui a amostra do vírus clássico da raiva, apresentando ampla distribuição mundial; os genótipos 2, 3 e 4 incluem respectivamente, o vírus Lagos bat, Mokola e

Duvenhage, encontrados na África; os genótipos 5 e 6 correspondem ao European bat *Lyssavirus* (EBL1 e EBL2), isolados na Europa, enquanto o genótipo 7 é representado pelo “Australian bat *Lyssavirus*”, encontrado na Austrália (WARRELL e WARRELL, 2004; BRITO, 2008). Um *Lyssavirus* associado ao morcego (Aravan vírus) foi recentemente descrito na Ásia Central, sendo proposto como um novo genótipo (WOLDEHIWET, 2005).

Estudos realizados por Kobayashi *et al.* (2010) utilizando cepas de vírus rábico provenientes de raposas, cães, morcegos hematófagos, frugívoros e insectívoros demonstraram pouca variabilidade genética do vírus circulante no Brasil, todos pertencentes ao genótipo 1.

O agente etiológico é transmitido pela saliva, por contato próximo entre animais contaminados e destes com o homem (EUROPEAN COMMISSION, 2002). O *Lyssavirus* se fixa na membrana celular do hospedeiro, segundo Velandia *et al.* (2007), especificamente nos receptores nicotínico de acetilcolina, na molécula de adesão em células neuronais e no receptor de baixa afinidade neural através de uma glicoproteína viral (G). Após a mordida há uma replicação do vírus no músculo localizado na porta de entrada. O vírus liga-se aos receptores na junção neuromuscular, segue pelos axônios dos nervos periféricos e neurônios motores da medula espinal, ascendendo até o cérebro, onde causa inflamação aguda, apoptose e degeneração neural. Ocorre então a disseminação através de nervos até a glândula salivar, pele, córnea e outros órgãos (SILVA, 2008). O vírus da raiva, assim como todos os membros do gênero *Lyssavirus* é neurotrópico e após a mordida de um animal acometido, infecta por movimento axonal retrógrado, neurônio a neurônio até chegar ao gânglio dorsal, onde a sua replicação pode ser detectada (JOHNSON *et al.*, 2010). Um vírus rábico pode migrar ao longo dos nervos periféricos até o Sistema Nervoso Central numa velocidade que atinge 50 a 100 mm por dia por rápido sistema de movimento axonal em sentido estritamente retrógrado segundo Warrell e Warrell (2004).

Os mecanismos de defesa contra o vírus da raiva incluem mecanismos específicos e não-específicos. Provavelmente o mais importante fator entre os mecanismos não-específicos seja a produção de interferon tipo 1 (IFN-1) liberado imediatamente após a infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2000). A produção de 6 citocinas foi estudada por Lambot *et al.* (2001) no envolvimento na estimulação da imunidade celular ou seja, o envolvimento de interleucina (IL)-2, interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α . Outro fator seria a ativação de genes de

expressão imunológica. Na maior parte dos estudos em laboratório, as moléculas gênicas das respostas imunes inatas após a infecção com vírus da raiva atenuado incluem os genes que codificam respostas inflamatórias, citocinas, assim como peptídeos IFN-relacionados, responsáveis pela infiltração de macrófagos, e envolvimento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (ZHAO *et al.*, 2009). O mecanismo específico está caracterizado pelos linfócitos T CD8+ e pela citotoxicidade mediada (WUNNER *et al.*, 1983), que induz apoptose por múltiplas citocinas, e quimiocinas, capazes de lisar especificamente células com receptores em membrana celular (WANJALLA *et al.*, 2008).

A imunidade induzida é principalmente celular e humoral e isto, assim como a replicação lenta do vírus no tecido possibilitou o desenvolvimento de vacinas, uma vez que as vacinas de vírus atenuado mimetizam o que ocorre na infecção natural do vírus rábico, tipicamente, estimulando uma resposta imunológica longa e duradoura (ZEPP, 2010). A principal imunidade correlacionada a produção induzida por vacinação é a produção de anticorpos e células T-helper, que contribuem para o desenvolvimento de imunidade onde células T citotóxicas não apresentam contribuição na proteção (JOHNSON *et al.*, 2010). Em modelos experimentais, utilizando camundongos, foi constatado que o envolvimento de linfócitos B e T, ou somente B, é responsável pela geração de imunidade por anticorpos neutralizantes pós-vacinação, a partir da infecção por vírus rábico atenuado e que, na falta das células CD8+, essa imunidade foi também induzida (HOOPER *et al.*, 1998).

Durante a infecção rábica ainda não está claro o caminho percorrido pelo anticorpo vírus neutralizante, se a partir da replicação viral primária dos sítios periféricos da infecção ou a partir do vírus do SNC. Da mesma forma, não há completo esclarecimento a respeito da fonte das citocinas envolvidas, se são geradas dos neurônios ou do suporte celular periférico da infecção e populações introduzidas no SNC (JOHNSON *et al.*, 2010). O status privilegiado do SNC e da barreira hemato-encefálica pode explicar algum atraso na entrega de anticorpos ao sistema, ou seja, do desenvolvimento da resposta imunológica. A replicação viral só aumenta uma vez que o vírus tenha entrado no Sistema Nervoso Central, então o nível de anticorpos na periferia é, até o momento em que o processo se torna clinicamente irreversível, limitado (JOHNSON *et al.*, 2010). Um único estudo revelou a relação entre a apresentação dos antígenos rábicos e o complexo de imuno-estimulantes (tratamento com clodronato). Esse estudo demonstrou a entrega de

antígenos pelos macrófagos da via marginal do baço, logo após o desenvolvimento de anticorpos (CLASSEN *et al.*, 1998).

3. VACINAS ANTI-RÁBICAS

As vacinas anti-rábicas à base de tecido nervoso, cérebro e medula de coelho, e camundongos neonatos vêm sendo utilizadas desde a sua criação por Pasteur (RIBEIRO-NETTO *et al.*, 1971) em 1889. Somente a partir do estabelecimento da tecnologia de cultura celular em laboratório, na década de 1950, foi possível um avanço significativo nos estudos dos vírus, e conseqüentemente das vacinas virais (MESLIN, 1996). A tecnologia de cultivo de células de animais sempre teve um papel central na evolução da virologia (MESLIN, 1996). Apenas em 1980, uma vacina anti-rábica do tipo de vacina desenvolvido por Pasteur foi reconhecida e aprovada pelo órgão fiscalizador dos Estados Unidos da América “FDA” (*Food and Drug Administration*), um dos principais órgãos de controle de medicamentos do mundo (WU *et al.*, 2004). Este tipo de vacina é considerado de primeira geração.

Os tipos de vacinas podem ser distinguidos na segunda geração de vacinas anti-rábicas para uso veterinário, dependendo se são de vírus inativados ou atenuados, pela cepa com que são produzidas e pelas características das células substrato e dos inóculos escolhidos para a replicação viral (RECLARD, 1996).

A imunização oral de animais selvagens com vacinas atenuadas, tais como a vacina SAD B19, SAG-1, e a SAG-2 ou com a vacina recombinante de glicoproteína (vacina V-RG) é considerada o método mais eficaz para prevenir e controlar a raiva (WILDING *et al.*, 1994; DIETZSCHOLD e SCHNELL, 2002).

Os principais vírus utilizados para a produção de vacinas contra raiva para uso veterinário são segundo Reculard (1996):

- Paris Pasteur: isolado de uma vaca infectada, na França em 1882. Adaptado em cérebro de coelho e em células Vero;

- PV (*Pasteur Virus*): Vírus da raiva fixado em coelhos de Louis Pasteur. Adaptado para cérebro de coelho, rim de feto de bovino, rim de camundongo neonato, linhagem 21 de células BHK (BHK-21), e células Vero;

- PM (*Pittman Moore*): Vírus de cepa Pasteur fixado. Adaptado em cérebro de coelhos, células humanas diplóides, células primárias de rim canino e células Vero e Nil-2;

- CVS (*Challenger Virus Strain*): Vírus de cepa Pasteur fixado. Adaptado em cérebro de camundongos, células embrionárias e células Vero;
- Nishagara: Vírus de cepa Pasteur fixado, no Japão em 1915. Adaptado em cérebro de coelhos, e de porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) lactantes;
- Fuenzalida S-51: Isolado de um cão infectado, no Chile em 1943. Adaptado para cérebro de camundongos;
- Fuenzalida S-91: Isolado de um humano no Chile em 1943. Adaptado em cérebro de camundongos lactantes;
- Kelev: Isolado de um cão raivoso em Israel no ano de 1950. O histórico de passagens descreve 100 passagens em células embrionárias de galinha, também adaptado em células cerebrais de ratos;
- SAD (*Street Alabama Dufferin*): Isolado de um cachorro morto, em Alabama, EUA, em 1935. Adaptado em células de cérebro de camundongo e células BHK-21;
- ERA (Evelyn Rokitnicki Abelseth): Vírus SAD. Adaptado para célula renal suína e BHK-21;
- Vnukovo-32: Vírus SAD. Adaptados em célula primária renal de camundongos;
- Flury: Isolado de um humano na Geórgia, EUA em 1939. Adaptado a células embrionárias de galinha;
- LEP: Vírus Flury. Adaptado em 40-50 passagens em células de embrião de galinha e também adaptado em células BHK-21;
- HEP: Vírus Flury. Mais de 180 passagens em célula embrionária de galinha.

Outras exigências legais e técnicas sob o aspecto industrial necessárias para o desenvolvimento e produção de uma boa vacina foram revistas por Heldens e Patel (2008).

A vacinação anti-rábica faz parte da história de sucesso das vacinas veterinárias, levando à erradicação da raiva em algumas regiões (MCVEY e SHI, 2010). As particularidades das vacinas anti-rábicas existentes no mercado são descritas nos subtópicos 3.1. a 3.6. a seguir.

3.1. VACINAS DE CULTIVO CELULAR

Dois tipos de substrato celular são geralmente utilizados na produção de vacinas anti-rábicas para uso veterinário, segundo Reculard (1996):

- Células primárias de organismos de animais adultos e neonatos ou embriões. O principal recurso de tais células são hamsters, feto bovino, cachorro ou tecido renal de cobaia e embriões de galinha.

- Células diplóides humanas ou linhagem celular contínua. Estas células são em sua maioria derivadas de rins de camundongos, assim como as linhagens BHK-21 e Nil-2.

As vacinas de cultivo celular vão de encontro ao padrão tecnológico internacional. Essas vacinas, geralmente produzidas em biorreatores, são determinantes de um período de imunidade mais longo, conferindo uma imunidade mais efetiva na maioria das avaliações (KALLEL *et al.*, 2006). Entretanto, as vacinas de cultivo celulares são mais caras e o processo de fabricação é mais complexo, quando comparado com as demais vacinas existentes.

3.2. VACINAS DE VÍRUS ATENUADO

As vacinas de vírus atenuados são produzidas com a liberação de partículas virais em meio de cultivo, no qual é mensurado o efeito citocida, sendo a lise celular verificada logo que uma replicação maciça viral é obtida. A purificação é então procedida para eliminar os debris celulares restantes, por centrifugação ou pela filtração através de membrana porosa (MESLIN *et al.*, 1996).

Se a vacina for produzida com partículas virais atenuadas, a dose vacinal contém a quantia necessária de vírus infectante relativa à imunização dos animais hospedeiros (MESLIN *et al.*, 1996). A potência das vacinas de vírus vivos é expressa em unidade de infecção, ou seja, unidades formadoras de partículas (“PFU – *plaque forming units*”) ou a dose letal média para camundongos (LD 50%). São exemplos dessas vacinas: ERA, Flury e SAD.

As vacinas atenuadas ou de vírus modificado são assim chamadas, pois portam em sua composição o vírus rábico vivo, sem que em sua produção a inativação viral seja procedida. Essas vacinas têm seus problemas de efetividade e segurança comprovados por não induzirem imunidade protetora suficiente em espécies silvestres particulares (DIETZSCHOLD e SCHNELL, 2002). De acordo com Zepp (2010), as vacinas atenuadas possuem o antígeno capaz de se replicar nos hospedeiros e têm sua atenuação no que tange a antigenicidade. A resposta imune é ampla em relação às vacinas atenuadas e essas, quando testadas, necessitam de poucas doses para a geração de imunidade efetiva de longa duração (ZEPP, 2010).

Os desafios vistos como as desvantagens das vacinas de vírus atenuado podem ser enumerados: 1) Possibilidade de reversão vacinal com patogenicidade como efeito adverso da vacina. 2) As vacinas atenuadas possuem estabilidade reduzida, e então a abrangência em campanhas de vacinação é menor. 3) Em condições de produção as vacinas de vírus atenuado necessitam de testes *in vivo* e sofisticados processos de atenuação (ZEPP, 2010).

Devido ao risco de desenvolvimento dos sinais, as vacinas de vírus atenuado não devem ser administradas em gestantes ou naquelas que estejam planejando engravidar nos 3 meses decorrentes (WU *et al.*, 2004).

3.3. VACINAS DE VÍRUS INATIVADO OU MORTO

Vários métodos de inativação viral são usados para o vírus rábico, como o tratamento com betapropiolactona (BPL), acetiletilamina ou outros compostos amina, e radiação ultravioleta. O fenol e o formaldeído não são recomendados, por reduzirem a imunogenicidade do vírus, liberarem resíduos irritantes ou tóxicos (SILVA *et al.*, 1967, ATANASIU *et al.*, 1982). O agente inativante mais utilizado é a BPL, geralmente em concentração de 1:4.000 ml e em um meio mantido com o pH acima de 7. A BPL mata bactérias e vírus, ambos sem interferir na antigenicidade do vírus rábico (ROSSI, 2008).

Diversos métodos combinando ação térmica e BPL são freqüentemente aplicados para garantir a completa inativação do vírus e hidrólise total dos agentes inativados. Após a inativação, a suspensão viral pode ser concentrada por ultrafiltração em membranas semi-permeáveis (MESLIN *et al.*, 1996).

Como estabilizantes, e também com efeito conservante e adjuvante em vacinas inativadas líquidas são utilizados: Glicina; histidina, arginina, alanina, dextrano, lactose, sorbitol, albumina bovina, sacarose, hidróxido de alumínio (RECLARD, 1996).

Os pontos fortes das vacinas inativadas foram abordados por Zepp (2010). Uma das características importantes dessa vacina corresponde à incapacidade de gerar reação reversa específica da vacina e de transmitir a doença, uma vez que o patógeno é inativado. As técnicas de produção para as vacinas inativadas geralmente são simplificadas. A demanda de adjuvantes e de maiores doses de reforço é descrita como pontos negativos das vacinas inativadas (ZEPP, 2010).

No mercado brasileiro atual, as vacinas comercializadas para uso veterinário, todas possuem vírus inativado ou morto em sua composição (FLORES, 2007).

3.4. VACINAS RECOMBINANTES

As vacinas de subunidades usam somente os fragmentos antigênicos de um microrganismo que melhor estimulam uma resposta imune. As vacinas de subunidades produzidas por técnicas de engenharia genética, onde outros micróbios são programados para produzir a fração antigênica desejada, são chamadas de vacinas recombinantes (ANDRADE *et al.*, 2010).

No decorrer de 30 anos, grandes esforços vêm sendo realizados no desenvolvimento das vacinas orais contra a raiva. Os primeiros esforços mencionam a vacinação de animais silvestres na Europa e América do Norte como foco principal e objetivo da estratégia de distribuição da vacina pronta em iscas. Em 1983 foi desenvolvida a vacina recombinante V-RG (vacina recombinante de glicoproteína), que é efetiva em gerar anticorpos neutralizantes nos guaxinins, raposas e outras espécies selvagens. Para os efeitos da rota oral em diversas espécies de mamíferos carnívoros são necessárias amplas quantidades de antígenos inativados e purificados tais como a porção da glicoproteína do vírus rábico em alta densidade como a partícula viral antigênica (RUPPRECHT *et al.*, 2005).

As vacinas de subunidades permitem a síntese de subunidades de antígenos somente frente o cultivo em células e, em sua grande maioria desencadeiam a imunidade celular. Entretanto, são consideradas como o método padrão para produção e análises por gerarem uma potente estimulação imunológica (ZEPP, 2010).

3.5 DESENVOLVIMENTO DE NOVAS VACINAS

Em primeiro lugar, a área da saúde constitui um dos espaços econômicos mais dinâmicos de acumulação de capital e de inovação, cuja compreensão se mostra essencial para pensar políticas de desenvolvimento. Em segundo plano, atualmente é reconhecido o caráter sistêmico que envolve a geração de novos produtos, processos e sistemas organizacionais na área da saúde. Essa área alia grande possibilidade e necessidade de informação (difusão da biotecnologia, de novas formas de organização dos serviços, etc.) com uma forte dimensão social, que

requer a mobilização de um amplo aparato regulatório e institucional. Em terceiro, a saúde continua sendo uma das áreas de maior intervenção estatal, tanto do setor de serviços quanto nas atividades científicas e tecnológicas (GADELHA *et al.*, 2003).

De forma semelhante ao setor farmacêutico, as atividades de pesquisa e desenvolvimento de vacinas envolvem as seguintes etapas principais: pesquisa e produção piloto de pequenos lotes, testes pré-clínicos (em animais), testes clínicos em seres humanos ou espécie alvo e monitoramento após utilização em maior escala (GADELHA *et al.*, 2003).

Em meados dos anos 50 os veterinários comumente utilizavam vacinas anti-rábicas originadas em cérebro de camundongos. Os principais produtos nos procedimentos utilizados, nos tempos das primeiras vacinas anti-rábicas eram vacinas de hepatite, cólera, leptospirose, erysipela, soros de enfermidades tais como hepatite e toxóides clostrídios (McVEY e SHI, 2010).

O desenvolvimento tecnológico na área das vacinas ganhou um forte dinamismo com o advento das novas biotecnologias, havendo um crescimento exponencial no número de vacinas introduzidas no mercado mundial de 1960 até o presente (PORTO e PONTE, 2003; GADELHA *et al.*, 2003; HOMMA *et al.*, 2003). Esse dinamismo acabou representando um alto estímulo à entrada no setor de grandes produtores privados provenientes da indústria farmacêutica. Com isso, a estrutura e a dinâmica da indústria de vacinas vêm se aproximando das observadas na indústria de medicamentos, com a crescente concentração do mercado em torno de algumas poucas empresas (GADELHA *et al.*, 2003).

O uso de vacinas na Medicina Veterinária tem progredido de uma aventura experimental para uma rotina e prática relativamente segura. A comum e robusta utilização de vacinas eficazes vem sendo, relevantemente responsável pelo controle e erradicação das doenças infecciosas. Mesmo em decorrência do avanço tecnológico, alguns problemas são concernentes, tais como, consistência e potência vacinal, avaliações de suprimento, pureza e segurança, além de significativa preocupação com viabilidade globalizada. Mesmo recentemente, na era da moderna produção de vacinas, ainda tecidos infectados são freqüentemente utilizados como fonte de antígenos através de concentração, inativação e subsequente filtração e clarificação (McVEY e SHI, 2010).

Historicamente, o desenvolvimento de vacina exigia o crescimento do patógeno em grandes quantidades. As primeiras vacinas virais bem-sucedidas foram desenvolvidas através do cultivo em animais. Cultivos celulares originários de seres

humanos ou, mais freqüentemente, de animais como macacos permitiram a produção dessas vacinas em larga escala. As vacinas recombinantes e as de DNA não necessitam de células vivas ou animais hospedeiros para o crescimento do micróbio. Isso contorna o principal problema de determinados vírus, como o da hepatite B, que não crescem em cultivo celular (ANDRADE *et al.*, 2010). Entretanto, é irreal pensar que vacinas de cultivo celular, mais caras, e protocolos de vacinação utilizados freqüentemente em países industrializados serão amplamente implementados em muitos países em desenvolvimento, que são endêmicos para a raiva (WUNNER, 2007).

A produção nacional de vacinas tem sido realizada fundamentalmente por laboratórios públicos desde os anos 40, quando o aumento das atividades de regulação para o controle de qualidade levou ao fechamento do principal produtor privado de vacinas, que era uma empresa estrangeira. A atratividade relativamente baixa do mercado de vacinas e mercado de medicamentos não estimulava a entrada de outras empresas no Brasil, levando a uma crise de ofertas de vacinas (GADELHA *et al.*, 2003). Em resposta, o governo colocou em prática uma política de substituição de importações articulada com a expansão da produção de vacinas pelos laboratórios públicos, a partir da formulação do Programa Nacional de Auto-Suficiência em Imunobiológicos (PASNI) em 1985. Os principais produtores hoje atuantes no mercado local, Instituto de Tecnologia (Bio-Manguinhos), FIOCRUZ, Instituto Butantã e Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) respondem por 90% do valor das vendas nacionais na linha humana (GADELHA *et al.*, 2003).

O governo federal, nos anos mais recentes, vem desenvolvendo importantes iniciativas no sentido de fortalecer o sistema científico de tecnologia e inovação, e conseqüentemente, de aumentar os resultados da inovação tecnológica em várias áreas importantes da economia do país (HOMMA *et al.*, 2003).

A nova geração de vacinas anti-rábicas vem sendo desenvolvida a partir dos avanços em clonagem e expressão de genes. Cepas de orthopoxvírus, assim como o vírus da vacina têm sido extensivamente caracterizadas em níveis moleculares. O genoma amplo, facilidade de produção, termo-estabilidade, semelhança de arranjo e segurança de expressão fazem algumas viroses altamente adaptáveis para a expressão de genes hóspedes, incluindo a hepatite, herpes e raiva. A expressão de vetores virais pela própria replicação fornece um potencial para imunidade de longa duração sem o risco de desenvolvimento da doença para o agente hospedeiro, como em determinadas viroses.

Por exemplo, o vírus vacina recombinante (V-RG) que expressa o gene da glicoproteína (proteína G) do genoma do vírus rábico, o qual foi desenvolvido pela inserção de um plasmídeo vetor e anelamento de uma cópia de fragmento de DNA (cDNA – DNA complementar) da proteína G do genoma da cepa do vírus rábico ERA na porção do gene da timina quinase do genoma do vírus da vacina da cepa Copenhague, não causa raiva (MESLIN *et al.*, 1996). Outro exemplo foi o gene artificial codificador da glicoproteína da membrana (G) do vírus rábico estrategicamente designado para alcançar maior expressão na planta do fumo (*Nicotiana tabacum* L.) transgênica com transformações nucleares e reposição do peptídeo da glicoproteína G relativo à patogênese em lugar do peptídeo natural PR-S (ASHRAF *et al.*, 2005).

A vacina contra o vírus da hepatite B consiste de um fragmento da proteína do envelope viral produzida por uma levedura modificada geneticamente (ANDRADE *et al.*, 2010). As vacinas de subunidades são inerentemente mais seguras, porque não podem se reproduzir no receptor. Elas também contêm pouco ou nenhum material estranho e por isso tendem a produzir menos efeitos adversos (ANDRADE, *et al.*, 2010). De modo semelhante, é possível separar as frações de uma célula bacteriana rompida, isolando as frações antigênicas desejadas. Os avanços recentes em tecnologia de DNA recombinante têm determinado com significativo otimismo muitas inovações e alavancado a produção de vacinas orais (WILDING *et al.*, 1994).

Experimentos com animais mostram que a injeção intramuscular de plasmídeos contendo DNA “nu” resulta na produção da proteína modificada por esse DNA. Essas proteínas permanecem no organismo receptor e desencadeiam uma resposta imune. A segurança desse tipo de vacina é incerta, mas estão sendo consideradas muitas aplicações, especialmente contra câncer e vírus que possuem altas taxas de mutação (como *influenza* e HIV) (ANDRADE *et al.*, 2010). Entretanto, com o uso de carreadores de DNA, o sistema imune fica susceptível, não apenas ao antígeno de interesse, mas também a um vasto arranjo de antígenos adicionais que constituem a estrutura carreadora para o organismo (WILDING *et al.*, 1994).

3.5.1 Objetivos de novas vacinas

A evolução conjunta e retroalimentada da virologia e da tecnologia de cultura celular permitiu mais recentemente, na década de 1990, a disponibilidade de

manipulações moleculares tanto virais como celulares, de amplo acesso aos laboratórios de pesquisa e desenvolvimento, com o estabelecimento de ferramentas e bioprocessos de produção de produtos gênicos virais (GERMANO, 1994).

O desenvolvimento de uma vacina de mucosa oral eficiente é um dos pontos principais delineados na vacinologia moderna (ZHANG *et al.*, 2005).

As características desejadas das novas vacinas anti-rábicas, segundo ARTOIS *et al.* (1992) são:

- Eficácia – proteger contra a raiva;
- Facilidade de aplicação; Elevado número de animais abrangidos dentro de uma população;
- Maior estabilidade em temperatura ambiente (importante para países em desenvolvimento – dificuldade de manutenção em uma cadeia de frio);
- Redução dos custos;
- Efeitos colaterais amenos;
- Não ser espécie-específico (poder ser utilizados por diferentes espécies domésticas e selvagens);
- Ser apatogênico para diferentes espécies.

3.5.2 Veículos vacinais

No desenvolvimento de vacinas, foram utilizados os mais diversos veículos. Vacinas anti-rábicas de vírus atenuados foram introduzidas na cabeça de galinhas, salsichas e biscoitos caninos como isca e distribuídos no ambiente natural para vacinar as raposas selvagens (BLANCOU *et al.*, 1986). Os autores não informaram a forma de acondicionamento dentro destas iscas.

A vacina anti-rábica em emulsão de água em óleo estável com uma viscosidade reduzida foi administrada via intramuscular em rebanhos bovinos,

resultando em altos níveis de resposta imunogênica e alta titulação de anticorpos em detrimento de uma única dose vacinal em um estudo comparativo entre vacinas anti-rábicas (CAMERON *et al.*, 1987).

O tipo de veículo vacinal impõe barreiras nas rotas potenciais de distribuição da vacina. Avanços em biologia molecular agora permitem a geração de subunidades recombinantes vacinais baseadas em diferentes meios de cultivo, os quais têm um forte impacto na resposta imunológica ao antígeno da vacina (XIANG *et al.*, 2003).

Estudos experimentais com adjuvantes lipídicos foram conduzidos por Süli *et al.* (2004) para preparar vacinas veterinárias, onde a atividade antigênica, ou seja, a produção de anticorpos específicos após a vacinação foi significativa pelo uso do adjuvante lipídico na emulsão de água em óleo. Camundongos foram imunizados intraperitonealmente com a proteína G purificada da fração microssomal e registrando-se altos níveis de resposta imune quando comparados com os obtidos pela imunização com a vacina inativada comercial contra a raiva, em estudos conduzidos por Ashraf *et al.* (2005). A análise da estimulação de resposta imune específica frente à vacina oral com subunidades de hemoaglutinina feita em plantas quilaia contra o sarampo resultou em intensificação da resposta imune, nos estudos de saponificação para aumento da resposta imune de camundongos (PICKERING, *et al.* 2006).

Segundo Huang *et al.* (2005), vírus inativado com hidróxido de alumínio como adjuvante podem elicitar maior título de anticorpos neutralizantes em diferentes modelos animais após imunização e também conferir proteção contra a raiva em ratos.

Segundo Cooper (1995) um bom adjuvante deverá ser:

- Comprovadamente capaz de ajudar a desenvolver uma imunidade melhor que o antígeno sozinho;
- De baixo risco/ alto benefício, ou seja, estimular a resposta imune desejada;
- Biodegradável com baixa meia vida e sem antigenicidade sozinho;
- Não carcinogênico, teratogênico ou abortogênico;
- Barato, estável e de fácil produção;
- Mimetizar e possivelmente exagerar de forma atóxica o processo invasivo;
- Fácil de se misturar / aderir ao antígeno que irá potencializar;
- Fácil em dissociar-se novamente do antígeno.

3.5.3 Avaliação da inocuidade e eficácia

Testes de Segurança (inocuidade):

Os exames de inocuidade de produtos biológicos são elaborados para detectar qualquer material ou propriedade que pode ser perigoso para o receptor, por exemplo, contaminação bacteriana, infecção viral, ou toxicidade (HABELM, 1996).

Apesar da prática padronizada dos testes de segurança ser acessível, sendo utilizada há mais de 25 anos, muitos laboratórios produtores ainda não possuem o teste de virulência residual como avaliação da segurança na rotina da produção (HABELM, 1996). Em caso de vacinas virais em geral, e especialmente para as vacinas contra a raiva, o problema específico vem a ser o resíduo de virulência viral, indesejável pela ameaça à vida que representa. Além do vírus rábico, que está intencionalmente presente, a vacina pode conter outros agentes infecciosos que estiveram presentes no animal de origem ou no tecido fonte. Em vacinas de vírus inativado, o teste da virulência residual é relativamente fácil e direto e usa o mais sensível dos procedimentos para demonstrar o vírus rábico – a inoculação intracerebral em camundongos neonatos (HABELM, 1996). Vacinas para uso veterinário podem ser testadas por inoculação direta na espécie na qual as vacinas serão usadas (HABELM, 1996). A vacina produzida também é testada quanto à inocuidade (toxicidade inespecífica) onde uma amostra do lote final de vacina é testada em cobaias e camundongos adultos que são pesados 7 dias após a inoculação, considerando-se satisfatório se todos os animais sobreviverem no período mínimo de 7 dias, nenhum dos animais apresentar qualquer resposta inespecífica e/ou inesperada que indique alteração na qualidade do produto inoculado. O peso dos animais deverá ser igual ou superior ao peso inicial (Portaria nº 176/MS/SVS, 1996, RECLARD, 1996).

O controle do produto vacinal acabado a granel passa pela prova de esterilidade bacteriana e fúngica (Portaria nº 176/MS/SVS, 1996), onde uma amostra do lote é submetida à prova de esterilidade e não deve apresentar crescimento bacteriano e fúngico, utilizando caldo de tioglicolato de sódio e caseína de soja. A prova de verificação de inativação viral ocorre com uma amostra do produto submetida à prova de inativação viral, onde utilizam-se camundongos lactentes e adultos saudáveis. O pH (Portaria nº 176/MS/SNVS, 1996) também deverá passar por uma mensuração permanecendo entre 6,4 e 7,8. Testes relativos ao controle de

timerosal, fenol, nitrogênio protéico, pH, volume médio por ampolas são realizados na produção de vacina anti-rábica e inspeção visual e estocagem.

Testes de Eficácia:

A necessidade de avaliação da potência imunogênica das vacinas anti-rábicas tem reconhecimento desde os tempos de Pasteur. Nos testes de eficácia, o produto final, lote da vacina é submetido à prova de atividade imunogênica, onde uma amostra do lote final de vacina contra a raiva é comparada a uma vacina anti-rábica de referência, pelo método de NIH (*National Institute of Health*). A atividade imunogênica do produto não deve ser inferior a 1,0 UI/dose individual humana.

4. VIAS DE IMUNIZAÇÃO

Ao contrário das infecções rábicas naturais, inoculações de vacinas experimentais são freqüentemente feitas pela via intramuscular, intranasal e intracerebral (PREUSS *et al.*, 2009). As demais vias utilizadas são:

- *Subcutânea (SC)*: Via de aplicação utilizada freqüentemente na vacinação anti-rábica veterinária.
- *Intradérmica (ID)*: Via utilizada na profilaxia pós-exposição em humanos.
- *Intramuscular (IM)*: Via de imunização utilizada em vacinação contra raiva em humanos.
- *Via intranasal (IN)*: Via de aplicação utilizada por Ertl (2005) em estudo das vacinas de alteração genética contra raiva, elaboradas com vetores adenovirais, obtendo-se resultados positivos na detecção de anticorpos antirrâbicos de camundongos (ERTL, 2005).
- *Via Oral (VO)*: Vacinas orais geralmente apresentam menos efeitos colaterais, são mais baratas de serem produzidas, não requerem equipe especializada para aplicação e são mais aceitáveis pelos pacientes que vacinas de administração parenteral (JEFFERY *et al.*, 1993), porém

somente a partir do final dos anos 80 chegaram ao mercado veterinário vacinas anti-rábicas orais (CROSS *et al.*, 2007).

A vacinação anti-rábica oral representa uma medida socialmente aceitável que pode ser aplicada em amplas áreas geográficas para controlar a doença em populações silvestres e em reservatórios silvestres específicos através do uso de iscas vacinais, assim como em ambientes domésticos e de animais ferozes, que impossibilitam a vacinação parenteral (SLATE *et al.*, 2009).

De todas as vias de imunização, a via oral vem recebendo as maiores atenções principalmente pela facilidade de aplicação em grandes populações de animais silvestres (GILLIGAN e PO, 1991; ALMEIDA *et al.*, 2005; CROSS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2005; TIWARI *et al.*, 2009). Outra vantagem da via oral para a aplicação das vacinas é o crescimento da produção de vacinas oral baseadas em cultivo em células vegetais (ASHRAF *et al.*, 2005).

5. ANIMAIS ALVO DE VACINAÇÃO

Em 1986, Blancou *et al.* descreveram a administração oral de vacinas anti-rábicas bem sucedida em raposas, possibilitando a vacinação de um maior número de animais selvagens, sendo o primeiro passo para uma vacinação oral em animais selvagens feito na natureza em larga escala.

Vacinas anti-rábicas de vírus atenuados foram introduzidos na cabeça de galinhas, salsichas e biscoitos caninos como isca e distribuídos no ambiente natural para vacinar as raposas selvagens. A mesma estratégia está sendo executada com sucesso nas florestas da Suíça, Alemanha e Canadá (BLANCOU *et al.*, 1986). Nos Estados Unidos da América, a vacinação oral com iscas é utilizada freqüentemente nas florestas e ambientes naturais americanos para a vacinação de guaxinins, raposas, gambás, texugos, furões e coiotes (BLANCOU *et al.*, 1986; BINGHAM *et al.*, 1997).

Devido a uma série de observações concomitantes: o aumento populacional e dispersão de raposas vermelhas nos Estados Unidos e Canadá, a contínua expansão da raiva em raposas vermelhas européias após a Segunda Guerra Mundial, a falta de manutenção de uma cobertura vacinal durável, a queda dramática de números de casos caninos de raiva, o reconhecimento da infecção

viral rábica através da mucosa oral e subsequente indução de imunidade e o desenvolvimento adequado das vacinas de vírus atenuados eficientes contra a raiva, desenvolveu-se a necessidade do conceito de vacinação oral de animais selvagens na década de 1950 e 1960 (RUPPRECHT *et al.*, 2004).

Implementado de maneira massal a partir de 1989, a vacinação oral das raposas provou ser um meio poderoso para eliminar a doença de diversos países europeus ocidentais – livres da raiva há mais de 5 anos (CLIQUET e NANCY, 2008). Os resultados do estudo conduzido em 1982 por Atanasiu *et al.*, mantiveram as possibilidades preliminares de vacinação oral anti-rábica de certos animais particularmente dos animais silvestres, promovendo, portanto a prevenção dos humanos.

Na Europa, a eliminação da raiva foi conseguida em um número de países usando a vacinação oral dos animais selvagens com todas as vacinas comercializadas disponíveis (Lysvulpen, SADB19 e SADP5/88, SAG2 e V-RG) (CLIQUET e NANCY, 2008).

Animais alvos de vacinação na América do Sul e especificamente no Brasil deveriam ser os silvestres, em especial os morcegos hematófagos do gênero *Desmodus* (AGUILAR-SÉTIEN *et al.*, 1998; DIETZSCHOLD e SCHNELL, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2008;) mantenedores da circulação viral e responsáveis pela raiva dos herbívoros.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tema raiva ainda se mantém entre os mais importantes objetivos dos profissionais relativos à Organização Mundial da Saúde (OMS) e à Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). A vacinação é fundamentalmente a medida de controle mais eficaz para as doenças, sendo o método mais indicado para a erradicação da raiva herbívora. Desde 1989, a vacinação oral dos reservatórios silvestres provou ser o único método eficaz para controlar a doença de diversos países ocidentais, países europeus como a Suíça e a Alemanha, os quais são livres da raiva há mais de três décadas (CLIQUET e NANCY, 2008).

Nos últimos 20 anos ocorreram notáveis transformações e avanços nas técnicas para formulação e eficácia de vacinas, como:

- Aprimoramento das técnicas de estabilidade genética em larga escala de crescimento em múltiplas passagens celulares e diversidade de células que podem ser cultivadas;
- Vacinas recombinantes de vetores poxvírus e vetores adenovírus;
- Vacinas recombinantes gênicas que utilizam plasmídeos como vetores;
- Vacinas orais diversas, algumas derivadas de folhas vegetais.

Os principais objetivos das vacinas anti-rábicas a serem desenvolvidos são os custos, a segurança e a viabilidade das vacinas. Apesar das estratégias de vacinação terem reduzido o número de casos de doença em países desenvolvidos, programas de vacinação de animais silvestres ainda permanecem em detrimento dessa tendência, principalmente em países em desenvolvimento. Outras possibilidades são procuradas para o barateamento e efeitos significativos da vacinação, inclusive a produção de vacinas viáveis produzidas em células vegetais, expressando os antígenos rábicos. Tem sido demonstrado, que a produção destas plantas transgênicas pode induzir uma resposta imunogênica em camundongos. O uso de bactérias recombinantes em células vegetais poderá representar um passo para o futuro das vacinas anti-rábicas recombinantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-SETIÉN A.; BROCHIER, B.; TORDO, N.; DE PAZ, O.; DESMETTRE, P.; PÉHARPRÉ, D.; PASTORET, P.; Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*), **Vaccine**, v. 16 (12/12). 1122-1126. 1998.
- ALMEIDA, M.F.; MARTORELLI, L.F.A.; AIRES, C.C.; BARROS, R.F.; MASSAD, E. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. **Virus research**, v. 137. 275-277. 2008.
- ALMEIDA, M.F.; MARTORELLI, L.F.A.; AIRES, C.C.; SALLUM, P.C.; MASSAD, E. Indirect oral imunization of captive vampires, *Desmodus rotundus*. **Virus research**, v. 111. 77-82. 2005.

- ANDRADE, R.V.; AVELANS, A.L.S.S.; CORREA, C.M.; MELO, C.M.; DEFINA, J.M.P.; BORGES, M.G.; DANIÃO, P.R. Vacinas: novos desafios farmacêuticos. **Ciências Farmacêuticas**, v. 1, 1. 2010.
- ARTOIS, M.; GUITTRÉ, C.; THOMAS, I.; LEBLOIS, H.; BROCHIER, B.; BARRAT, J. Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: a comparison. **Vaccine**, v. 10 (8). 524-528. 1992.
- ASHRAF, S.; SINGH, P.K.; YADAV, D.K.; SHAHNAWAZ, M.; MISHRA, S.; SAWANT, S.V.; TULI, R. High level expression of surface glycoprotein of rabies in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. **Journal of Biotechnology**, v. 119. 1-14. 2005.
- ATANASIU, P.; METIANU, T.; BOLANOS, A. Evaluation d'une vaccination rabique experimentale par la voie orale et intestinale avec des vaccins tués, concentrés et non concentrés. **Company Immunogenic Microbiology Infectious Disease**, v. 5. (1-3). 187-191. 1982.
- BLANCOU, J.; KIENY, M.P.; LATHE, R.; LECOCQ, J.P.; PASTORE, P.P.J.; SOULEBOT, P.; DESMETTRE, P. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. **Nature**, v. 322. 373 – 375. 1986.
- BINGHAM, J.; SCHUMACHER, C.; AUBERT, M.F.A.; HILLS, F.W.G.; AUBERT, A.A. Innocuity studies of SAG-2 oral rabies vaccine in various Zimbabwean wild non-target species. **Vaccine**, v. 15 (9). 937-943. 1997.
- BRITO, C.J.C. **Caracterização biológica, antigênica e genética de amostras de vírus da raiva isoladas de animais domésticos e de seres humanos no Estado do Maranhão**. São Paulo, 2008, 104 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal), Curso de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. SVS em Rede – Edição Especial Raiva. **Terceiro Boletim Editorial**, junho de 2010.
- CAMERON, C.M.; BARNARD, B.J.; ERASMUS, E.; BOTHA, W.J. Antibody response in cattle to oil emulsion rabies and ephemeral fever vaccines. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54 (2). 157-8. 1987.
- CARNIELI, P.C.; MACEDO, C.I.; BRANDÃO, P.E.; ROSA, E.S.T.; OLIVEIRA, R.N.; CASTILHO, J.G.; MEDEIROS, R.; MACHADO, R.R.; OLIVEIRA, R.C.;

CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Diagnosis of Human Rabies Case by Polimerase Chain Reaction of a Neck Skin Samples. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 10 (5). 341-345. 2006.

- CLASSEN, I.J.; OSTERHAUS, A.D.; POELEN, M.; VAN HOOJEN, N.; CLASSEN, E. Antigen detection in vivo after immunization with different presentation forms of rabies virus antigen II. Cellular but not humoral, systemic immune-stimulating complexes are macrophage dependent. **Immunology**, v. 94. 455-460. 1998.
- CLIQUET, F.; NANCY, A.F.S.S.A. Laboratory of Research on Rabies and Wildlife Diseases – WHO Collaborating Centre for Research and Management in Zoonoses Control – OIE REFERENCE LABORATORY FOR RABIES – COMMUNITY REFERENCE INSTITUTE FOR RABIES SEROLOGY. Malzéville, France. 1-9. 2008.
- COOPER, P. D. The selective induction of different immune responses by vaccine adjuvants. In Gordon, L. A.: Medical Intelligence Unit Strategies in Vaccine Design. Springer Verlag, Heidelberg e R.G. Landes Company, Austin, 125 – 158. 1995.
- CUNHA, E.M.S. **Caracterização genética de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos. Avaliação da patogenicidade e proteção cruzada em camundongos**. São Paulo, 2006, 77p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal), Curso de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.
- CROSS, M.L.; BUDDLE, B.M.; ALDWELL, F.E. The potencial of oral vaccines for disease control in wildlife species. **The Veterinary Journal**, v. 174. 472-480. 2007.
- DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M.J. New approaches to the development of live attenuated rabies vaccines. **Hybridoma and Hybridomics**, v. 21 (2) 129-134. 2002.
- EUROPEAN COMMISSION. The oral vaccination of foxes against rabies. REPORT OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH AND ANIMAL WELFARE ADOPTED ON 23, OCTOBER, 2002.

- ERTL, H.C.J. Immunological insight from genetic vaccines. **Virus research**, v. 111, 89-92. 2005.
- FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, Editora UFSM, 2007. 888 p.
- FOLLMANN, E.H.; RITTER, D.G.; HARTBAUER, D.W. Oral Vaccination of Captive Arctic Foxes with Lyophilized SAG2 Rabies Vaccine. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40 (2). 328-334. 2004.
- GADELHA, C.A.G.; QUENTAL, C.; FIALHO, B.C. Saúde e Inovação: Uma abordagem sistêmica das indústrias de saúde. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. 19 (1). 47-59, 2003.
- GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Saúde Pública**, v.28. 86-91, 1994.
- GILLIGAN, C.A.; PO, A.L.W. Oral vaccines: Design and delivery. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 75, 1 – 24. 1991.
- HELDENS, J.G.M.; PATEL, J.R. Immunoprophylaxis against important vírus diseases of horses, farm animals and birds. **Vaccine**, v. 27, 1797-1810. 2008.
- HOMMA, A.; MARTINS, R.M.; JESSOUROUM, E.; OLIVA, O. Desenvolvimento tecnológico: elo deficiente na inovação tecnológica de vacinas no Brasil. Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 10 (2). 671-96. 2003.
- HUANG, W.; ZHANG, Z.H.; JIANG, P.H.; LI, N.J.; SHI, M. Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-119. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11 (44). 1-6. 2005.
- HABELM, K. General Considerations in Safety and Potency Testing. In MESLIN, F.X; KAPLAN, M.M; KOPROWSKI, H: **Laboratory techniques in Rabies**. 4º Edição, WORLD HEALTH ORGANIZATION, NONSERIAL PUBLICATION, 1996.
- HEINEMANN, M. B. Genealogical analysis of rabies vírus from Brazil basead on N gene alleles. **Epidemiology and Infection**, v. 128, (3). 503-511, 2002.
- HOOPER, D.C.; MORIMOTO, K.; BETTE, M.; WEITHE, E.; KOPROWSKY, H.; DIETZSCHOLD, B. Collaboration of antibody and inflammation in

clearance of rabies virus from the central nervous system. **Journal of Virology**, v. 72. 3711- 3719. 1998.

- JEFFERY, H.; DAVIS, S.S.; O'HAGAN, D.T. The preparation and characterization of Poly(lactide-co-Glicolide) Microparticles. II. The Entrapment of a Model Protein Using a (Water-in-oil)-in-Water Emulsion Solvent Evaporation Technique. **Pharmaceutical Research**, v. 10 (3). 362-368. 1993.
- JOHNSON, N.; CUNNINGHAM, A.F.C.; FOOKS, A.R.; The immune response to rabies virus infection and vaccination. **Vaccine**, v. 28. 3896 – 3901. 2010.
- KALLEL, H.; DIOUANI, M.F.; LOUKIL, H.; TRABELSI, K.; SNOUSSI, M.A.; MAJOUL, S.; ROUROU, S.; DELLAGI, K. Immunogenicity and efficacy of in-house developed cell-culture derived veterinary rabies vaccine. **Vaccine**, v. 24. 4856 – 4862. 2006.
- KOTAIT, I. Raiva em morcegos em áreas urbanas no Estado de São Paulo. BEPA. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 20, 7-9, 2005.
- KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, Y.; ITOU, T.; ADOLORATA, A.B.C.; CUNHA, E.M.S.; ITO, F.H.; GOJOBORI, T.; SAKAI, T. Low genetic diversities of rabies vírus populations within different hosts in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10. 278 – 283. 2010.
- LAMBOT, M.; BLASCO, E.; BARRAT, J.; CLIQUET, F.; BROCHIER, B.; RENDERS, C.; KRAFFT, N.; BAILLY, J.; MUNIER, M.; AUBERT, M.F.A.; PASTORET, P.P. Humoral and cell-mediated responses of foxes (*Vulpes vulpes*) after experimental primary and secondary oral vaccination using SAG₂ and V-RG vaccines. **Vaccine**, v. 19. 1827-1835. 2001.
- MCVEY, S.; SHI, J. Vaccines in Veterinary Medicine: A Brief Review of History and Technology. **Veterinary Clinics: Small Animals**, v. 40. 381 – 392. 2010.
- MEBATSION, T.; KILARI, S.; VISSER, N. Development of an oral rabies vaccine with improved safety and efficacy to control canine rabies in ownerless and stray dogs. **Virology R&D**. 1 – 8. 2001.
- MENEZES, F.L.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; MENESES, J.N.C.; MAGALHÃES, D.F.; BARBOSA, A.D.; OLIVEIRA, C.S.F. Distribuição espaço-temporal da raiva bovina em Minas Gerais, 1998 a 2006. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 60 (3). 566-573, 2008.

- MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in Rabies**. 4º Edição, WORLD HEALTH ORGANIZATION, NONSERIAL PUBLICATION, 1996.
- NEVES, D.A. **Sazonalidade e ciclicidade da raiva em herbívoros domésticos no Estado do Mato Grosso do Sul, 1998 a 2006**. Mato Grosso do Sul, 2008, 84p. Tese (Mestrado em Ciência Animal). Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.
- NOVAIS, B.A.F. Raiva em bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VI (10). 1-7. 2008.
- OLIVEIRA, A.N. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95 (1). 83-88. 2000.
- PICKERING, R.J.; SMITH, S.D.; STRUGNELL, R.A.; WESSELINGH, S.L.; WEBSTER, D.E. Crude saponins improve the immune response to an oral plant-made measles vaccine. **Vaccine**, v. 24. 144-150. 2006.
- PORTARIA N°176/MINISTÉRIO DA SAÚDE/SNVS de 11 de novembro de 1996. Brasil, 1996.
- PORTO, A.; PONTE, C.F. Vacinas e campanhas: Imagens de uma história a ser contada. **Histórias, Ciências e Saúde - Manguinhos**, v. 10 (2). 725 – 742. 2003.
- PREUSS, M.A.R.; FABER, M.L.; TAN, G.S.; BETTE, M.; DIETZSCHOLD, B.; WEIHE, E.; SCHNEL, M.J. Intravenous Inoculation of a Bat-Associated Rabies Virus Causes Lethal Encephalopathy in Mice through Invasion of the Brain via Neurosecretory Hypothalamic Fibers. **PLoS Pathogens**. v. 5 (6). 1-10. 2009.
- REULARD, P. Cell culture vaccines for veterinary use. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in Rabies**. 4º Edição, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996.
- RIBEIRO-NETTO, A. Estudo Comparativo de Vacina Anti-Rábica de Uso Bovino. **BOLETIN DE LA OFICINA SANITARIA PANAMERICANA**. 538 – 544. 1971.
- ROSSI, N. **Efeito da temperatura na otimização da produção de glicoproteína do vírus da raiva em cultivos em suspensão de células recombinantes de *Drosophila melanogaster* S2**. São Carlos, 2008, 165p. Dissertação (Mestrado de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos

Químicos) Curso de Medicina Veterinária da Universidad e Federal de São Carlos.

- RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; SLATE, D. Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control. Control of infectious diseases by vaccination. **Developmental Biology Basel**. v. 119. 173-184. 2004.
- RUPPRECHT, C.E.; WIKTOR, T.J.; JOHNSTON, D.H.; HAMIR, A.N.; DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W.H.; GLICKMAN, L.T. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. EUA. v. 83.7947-7950. 2005.
- SILVA, N.N.; MARKUS, H.L.; PADILHA, A.A.; Vacina anti-rábica tipo Fuenzalida modificada. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana**. 223 – 227, 1967.
- SILVA, M.S.P. **Raiva dos Herbívoros**. Trabalho monográfico do curso de pós-graduação em Defesa Sanitária Animal, Universidade Castelo Branco: 1-29, 2008.
- SLATE, D.; ALGEO, T.P.; NELSON, K.M.; CHIPMAN, R.B.; DONOVAN, D.; BLANTON, J.D.; NIEZGODA, M.; RUPPRECHT, C.E. Oral rabies vaccination in north america: Opportunities, complexities, and challenges. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 3 (12). 549. Review. 22. 1- 9. 2009.
- SÜLI, J.; BENÍSEK, Z.; ELIÁS, D.; SVRCEK, S.; ONDREJKOVÁ, A.; ONDREJKA, R.; BAJOVÁ, V. Experimental squalene adjuvant. I. Preparation and testing of its effectiveness. **Vaccine**, v. 22 (25-26). 3. 2004.
- TIWARI, S.; VERMA, P.C.; SINGH, P.K.; TULI, R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. **Biotechnologies Advances**, v. 27. 449-467. 2009.
- VELANDIA, M.L.; PEREZ-CASTRO, R.; HURTADO, H.; CASTELLANOS, J.E. Ultrastructural description of rabies virus infection in cultured sensory neurons, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 (4). 441-447. 2007.
- VOS, A. Oral vaccination against rabies and the behavioural ecology of the Red Fox (*Vulpes vulpes*). **Journal of Veterinary Medicine**, Series B. v. 50 (10). 477 – 483, 2003.

- XIANG, Z.Q.; GAO, G.P.; REYES-SANDOVAL, .; LI, Y.; WILSON, J.M.; ERTL, H.C. Oral Vaccination of Mice with Adenoviral Vectors Is Not Impaired by Preexisting Immunity to the Vaccine Carrier. **Journal of Virology**, v. 77 (20) 10780–10789. 2003.
- WANJALLA, C.N.; FAUL, E.J.; SUTHAR, M. S.; JUNIOR, M.G.; WIRBLICH, C.; SCHNELL, M.J. Rabies Virus Infection Induces Type I Interferon Production in an IPS-1 Dependent Manner While Dendritic Cell Activation Relies on IFNAR Signaling. **Journal of Virology**, v. 382 (2). 226-238. 2008.
- WARRELL, M.J.; WARRELL, D.A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v. 363. 959 – 970. 2004.
- WHO. World Survey of Rabies World Health Organization. Genebra, Switzerland, 2007.
- WILDING, I.R.; DAVIS, S.S.; O’HAGAN, D.T. Targeting of drugs and vaccines to the gut. **Pharmaceutical Therapies**, v. 62. 97-124. 1994.
- WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 351. 49 – 63. 2005.
- WUNNER, W.H.; DIETZSCHOLD, B.; CURTIS, P.J.; WIKTOR, T.J. Rabies subunit vaccines. **Journal of General Virology**, 64, 1649-1656. 1983.
- WUNNER, W.H. Next generation rabies vaccine. Rabies. 2º Edição. **Science Direct**, 531 – 544. 2007.
- WU, J.J.; HUANG, D.B.; PANG, K.R.; TYRING, S.K. Vaccines and Immunotherapies for the prevention of infectious diseases having cutaneous manifestations. **American Academy of Dermatology**, v. 50 (4). 495 – 528. 2004.
- ZEPP, F. Principles of vaccine design – Lessons from nature. **Vaccine**, v. 285. 14-24. 2010.
- ZHANG, Z.H.; JIANG, P.H.; LI, N.J.; SHI, M.; HUANG, W. Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-119. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11 (44). 6975 – 6980. 2005.

- ZHAO, L.; TORIUMI, H.; KUANG Y.; CHEN, H.; ZHEN, F. The roles of chemokines in rabies virus infection: Over expression may not always be beneficial. **Journal of Virology**, v. 83 (22). 11808–11818. 2009.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE VACINA ANTI-RÁBICA ORAL TESTADA EM CAMUNDONGOS

(Development of an oral rabies vaccine tested in mice)

DESENVOLVIMENTO DE VACINA ANTI-RÁBICA ORAL TESTADA EM CAMUNDONGOS

(Development of an oral rabies vaccine tested in mice)

Camila Sloboda Pacheco da Silva¹ Ernesto Renato Krüger², Jorge Victor Agottani Bacila³, Rubens Chaguri de Oliveira⁴, Sandro Pereira⁵, Tânia Regina Penha⁶, Rüdiger Daniel Ollhoff⁷

¹ Mestrado em Ciência Animal – PUCPR. Médica Veterinária; Bióloga. PUCPR. camilasloboda@gmail.com

² Médico Veterinário – TECPAR. erkruger@tecpa.br

³ Médico Veterinário – TECPAR. agotani@tecpa.br

⁴ Médico Veterinário – TECPAR. rubens@tecpa.br

⁵ Farmacêutico – TECPAR. spereira@tecpa.br

⁶ Bióloga- TECPAR. trpenha@tecpa.br

⁷ Professor, Médico Veterinário – PUCPR. daniel.ollhoff@pucpr.br

RESUMO

Objetivou-se formular uma vacina oral anti-rábica em pasta, a partir da vacina de cultivo celular PV do TECPAR, capaz de suscitar a produção de anticorpos contra a raiva em camundongos. Obteve-se uma vacina em veículo de lanovaselina contendo uma concentração de antígenos virais acima de $10^{7,5}$ DL₅₀/0,03 ml. Os camundongos vacinados com duas doses espaçadas em 21 dias soroconverteram, mensurados por teste ELISA com valores de 0,43; superiores aos animais que receberam duas doses de veículo somente com valores de 0,13; e 0,31 e 0,09 ($P = 0,0001$), respectivamente, nas diluições 1:25 e 1:50. Não foram observados efeitos tóxicos pela ingestão da vacina ou do veículo. Os resultados poderão ser utilizados para direcionar o desenvolvimento de uma vacina oral anti-rábica para o principal vetor da raiva no Brasil, o morcego hematófago.

Palavras-chave: Raiva, vacina oral, camundongos, ELISA.

ABSTRACT

The objective of this study was to formulate an antirabies oral vaccine in paste from the cell culture vaccine PV TECPAR able to elicit the production of antibodies against rabies in mice. This research developed a vaccine homogenized in lanovaseline paste with $10^{7,5}$ DL₅₀/0,03 ml viral antigens. The mice that were vaccinated with 2

doses with intervals of 21 days seroconverted, measured by ELISA to 0,43; higher than the mice that received 2 doses of vehicle only with 0,13; and 0,31 e 0,09 ($P = 0,0001$), respectively, diluted 1:25 and 1:50. The results could be used to direct the development of an antirabies oral vaccine for the main vector of rabies in Brazil, the vampire bat.

Keywords: Rabies, oral vaccine, mice, ELISA.

1. INTRODUÇÃO

Animais silvestres infectados constituem um reservatório de vírus rábico tanto para humanos quanto para animais domésticos (RUPPRECHT *et al.*, 1986). No Brasil o principal vetor da raiva é o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*), tendo sido isolado o vírus também de outros animais silvestres terrestres, como o lobo-guará, coiote, mangusto, quati, cangambá, guaxinim e raposas e sagüis (LIMA *et al.*, 2005).

Vacinas anti-rábicas constituem o mais eficiente método de intervenção médica (XIANG *et al.*, 2003). Como exemplos de sucesso, a Europa e América do Norte demonstraram que a vacinação anti-rábica do vetor é a única maneira de restringir a circulação viral em áreas rurais (BLANCOU *et al.*, 1986; BINGHAM *et al.*, 1997). Considerando as dificuldades de uma vacinação massal de um vetor silvestre e o comportamento em específico do *Desmodus rotundus*, a única via de vacinação viável e testada em laboratório (ALMEIDA, *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2008;) é a vacinação oral. Com o intuito de desenvolver-se uma tecnologia nacional e baseados na eficácia das vacinas anti-rábicas orais de carnívoros selvagens (SALOME, 2010) realizou-se a vacinação oral de camundongos com uma vacina anti-rábica desenvolvida nacionalmente.

1.1 VACINAÇÃO ORAL DE CAMUNDONGOS

Logo após a ingestão voluntária ou administração forçada de um imunógeno, este é apresentado ao tecido linfóide gastrointestinal, em específico às placas de Peyer pelas células macrófagos M (WILDING *et al.*, 1994). Iniciam-se em seguida adventos da resposta imunológica com linfócitos B antígeno-específicos (XU-AMANO *et al.*, 1993), citocinas e fator de necrose tumoral (TNF)- α 1 (LAMBOT *et al.*, 2001), todos envolvidos na estimulação proporcionada por vacinas orais. O estímulo específico causado pela vacina oral anti-rábica em carnívoros silvestres foi descrito por Blancou *et al.* (1986), Artois *et al.* (1992), Bingham, *et al.* (1997), Almeida *et al.* (2005) e Cliquet e Nancy (2008).

Publicações sobre vacinas orais anti-rábicas em camundongos não foram encontradas na literatura revisada, apesar de existirem desde 1983 evidências da efetiva indução de anticorpos intestinais e séricos de ratos por Klipstein *et al.* (1983) contra antígenos outros que não o vírus rábico.

1.2 AÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA EM CAMUNDONGOS

Partículas do vírus rábico, geralmente transmitidas por mordidas de animais migram para o cérebro e causam encefalite aguda associada à intensa replicação no SNC. Injeções de vírus rábico em cérebro levam ao desenvolvimento dos mesmos sinais (SEIF *et al.*, 1985).

O vírus rábico em camundongos se liga aos receptores na junção neuromuscular, segue pelos axônios dos nervos periféricos e neurônios motores da medula espinal, ascendendo até o cérebro, onde causa inflamação aguda, apoptose e degeneração neural. Ocorre então disseminação centrífuga através de nervos até a glândula salivar, pele, córnea e outros órgãos, desencadeando a resposta do sistema imunológico e produção dos anticorpos (WARREL e WARREL, 2004).

Clinicamente, camundongos rábicos demonstraram pelos eriçados, agressividade, anorexia, emaciação e ataxia aos 5 dias após a inoculação experimental. Entretanto, paralisia não foi reportada nestes camundongos (KOJIMA *et al.*, 2010).

1.3 TESTE ELISA PARA A DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA VACINAL ANTI-RÁBICA

Inúmeros tipos de testes ELISA têm sido reportados como sendo capazes de detectar efetivamente e quantificar anticorpos antirrâbicos no soro de animais ou humanos vacinados (CLIQUET *et al.*, 2000). No teste ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked Immunosorbent assay*). O antígeno viral é ligado a uma fase sólida (membranas de nitrocelulose ou placas ou tiras de polietileno com poços de polietileno, onde são adicionados diluições do soro-teste, permitindo a reação com os antígenos. Após lavagem, antiglobulinas conjugadas a enzimas são adicionadas e, após posterior incubação e lavagem, um substrato e um cromógeno apropriado são adicionados. Um produto colorido é formado e a intensidade da alteração de cor é proporcional à quantidade de anticorpos no soro-teste e a quantidade de anticorpo colorido. Conjugados policlonais ou monoclonais marcados podem ser usados; sua escolha depende do isotipo de imunoglobulinas requerido para estimar a duração da infecção (QUINN *et al.*, 2007).

A sensibilidade do teste ELISA com 10^{-4} E.U. somente é menor que o radioimunoensaio competitivo e a neutralização viral com titulação viral 10^{-5} nos testes imunológicos que visam a detecção de anticorpos (TIZARD *et al.*, 2008).

A finalidade do presente estudo foi verificar: a viabilidade do uso do camundongo como modelo experimental para o desenvolvimento de vacinas anti-râbicas orais para o morcego hematófago; o desenvolvimento de um veículo vacinal adequado; a adaptação da vacina de uso veterinário do Instituto de Tecnologia do Paraná para a via oral e a soroconversão de camundongos vacinados oralmente com a vacina anti-rábica através do imunoensaio enzimático (ELISA).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CAMUNDONGOS

Os camundongos são animais de experimentação de referência para experimentos com vacina anti-rábica (XIANG *et al.*, 2003). Fizeram parte deste experimento, 70 camundongos, de ambos os gêneros. Utilizou-se a linhagem Calb de 21 dias do biotério classe um, da divisão de antígenos do TECPAR.

Os camundongos do presente experimento pesaram entre 20 e 25g e foram mantidos em ambiente controlado com temperatura média de 21-22° C ($\pm 2^\circ$ C) e umidade relativa de 50-55% em gaiolas com cama de cepilho autoclavado em grupos de até 10 animais, recebendo dietas padronizadas para animais de laboratório (CHORILI, *et al.*, 2007). O acesso tanto ao alimento quanto à água era livre.

Os animais do experimento foram divididos de forma casualizada em sete grupos em 7 caixas de 10 animais, respectivamente: A, B, C1, C2, D, E1, E2. Afora os procedimentos de vacinação e colheita do soro, os camundongos foram manipulados somente para a limpeza rotineira das caixas.

Seguiram-se os seguintes protocolos de tratamento:

- A: Grupo controle do experimento, aos animais não foi aplicado nem vacina nem veículo.

- B: Grupo que recebeu a aplicação de uma dose de veículo.

- C1: Grupo que recebeu uma dose de vacina.

- C2: Grupo que recebeu uma dose de vacina.

- D: Grupo que recebeu duas doses de veículo.

- E1: Grupo aplicado com duas doses de vacina.

- E2: Grupo aplicado com duas doses de vacina.

- Dia 0: Colheita de soro dos animais do grupo A; grupos B e D: Aplicação do veículo vacinal; grupos C1, C2, E1 e E2: Aplicação da vacina experimental.

- Dia 21: colheita de soro dos camundongos dos grupos B, C1 e C2, aplicação da 2^a dose de veículo no grupo D. Vacinação com a 2^a dose de vacina nos grupos E1 e E2.

- Dia 42: colheita dos soros dos grupos D, E1 e E2.

A colheita sanguínea e sacrifício dos camundongos foi realizada de acordo com a técnica descrita por Hoff (2000). O material colhido pela via intracardiaca em seringas de 3 mL, foi analisado pela técnica de ELISA nas dependências do Instituto de Tecnologia do Paraná.

Todos os camundongos foram inspecionados diariamente durante todo o período experimental visando a observação de reações colaterais locais ou sistêmicas à vacina ou ao veículo.

2.2 LOCALIZAÇÃO E PERÍODO DE AVALIAÇÃO

O estudo foi conduzido no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), unidade Juvevê, divisão de antígenos (DAN) e no laboratório BHK no período decorrido entre fevereiro e setembro de 2010.

2.3 VÍRUS

O vírus utilizado no presente estudo foi o vírus da raiva cepa PV em suspensão viral. A suspensão viral armazenada à temperatura de -80 °C foi descongelada em banho-maria na garrafa roller Corning® com capacidade para 2.000 ml usando-a integralmente. O descongelamento se deu em 3 horas no banho-maria entre 28 a 30 °C. O roller foi girado no banho-maria aproximadamente a cada 15 minutos de acordo com as boas práticas de laboratório. Os vírus PV ativos foram produzidos no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) em culturas de células BHK.

2.3.1 Processo de Clarificação e Concentração Viral

A suspensão viral ativa produzida em células de rim de camundongo neonato (BHK) foi submetida à centrifugação na centrífuga Beckman® I₂ com refrigeração e 6 caçapas, programada para 5.000 RPM por 20 minutos à 4 °C para a formação de pellets de debris celular no processo de clarificação. A clarificação foi procedida em 30 frascos de centrífuga Beckman® descartáveis com capacidade de 400 ml. Para verter os 6 litros inicialmente armazenados em garrafas roller Corning®, para os frascos de centrífuga foi utilizado a cabine de fluxo laminar Veco® modelo ULFS 18, e tubo proveta de 100 ml.

A suspensão viral com vírus ativo foi concentrada em sistema de filtração tangencial da marca Pellicon-Millipore® utilizando filtro de 100 Kda para a concentração final de 400 ml. Para preparar as membranas filtrantes utilizou-se a solução PBS (*phosphate buffered saline*) de pH 7,2. A clarificação é realizada com o objetivo de formação de sedimentação de peso molecular maior que as partículas infectantes virais resultantes dos debris celulares que restaram do cultivo do vírus

em células BHK. Estes pellets são separados da suspensão, descartados e a suspensão concentrada na relação 1:15.

2.3.2 Inativação do Vírus

A inativação viral do *Lyssavirus* cepa PV foi feita com β -propiolactona na proporção de 1:8.000 ml de suspensão viral conforme protocolo interno do TECPAR baseado na Portaria nº 176/MS/SNVS, de 11 de novembro de 1996 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. A utilização de β -propiolactona foi descrita em estudos de inativação viral do preparo da vacina anti-rábica Fuenzalida & Palácios (SILVA *et al.*, 1967).

2.4 FORMULAÇÃO DA VACINA ANTI-RÁBICA DE VIA ORAL

A vacina anti-rábica experimental com *Lyssavirus* cepa PV inativado produzida neste presente estudo, foi formulada e incorporada em veículo pastoso para a ingestão por camundongos. O volume inicial da vacina foi concentrado em volume menor, tendo-se como meta a futura ingestão por morcegos hematófagos conforme proposto por Almeida (2003).

Após inativação da vacina, estabilizou-se o pH entre 8,0 – 8,2 com 0,4 ml (400 μ l) de tampão glicocola e adicionou-se 400 μ l de conservante timerosal.

A fórmula permaneceu em agitação na câmara fria a 2 a 8 °C por 48 horas a contar a partir do final da formulação com os reagentes. Ao final das 48 horas em agitação na câmara fria, a solução posta durante o período recomendado à temperatura de 4 °C sob o agitador em velocidade de 240 RPM foi novamente colocada em ambiente limpo em cabine de fluxo laminar e submetida ao potenciômetro para a mensuração de pH.

Do volume total da vacina (400 ml) foi amostrado 15 ml para teste de potência vacinal (NIH) e teste de inativação viral de acordo com as normas processuais do laboratório responsável do TECPAR, conforme indicado na portaria nº 228 de 25 de outubro de 1988, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O volume de 385 ml restante foi manipulado em condições estéreis e incorporado a 300 gramas de pasta neutra composta de lanovaselina estéril.

A vacina foi distribuída em doses de 3 ml para ser administrada via oral, diretamente em 3 gramas de pasta de lanovaselina neutra no pelame dos animais

experimentais na concentração de 1 ml de vacina para cada 1 grama de pasta, como demonstrado na figura 1.

A lanovaselina foi eleita o veículo vacinal de escolha do experimento, pois nos testes de homogeneidade, apresentou melhor incorporação da vacina do que a vaselina e a lanolina-anidra em separado. Os testes de homogeneidade foram realizados adicionando-se em proporção experimental a vacina à pasta, misturando o conteúdo calculado, resultando na concentração homogênea de vacina em lanovaselina.



Figura 1: Camundongo CALB 21 dias lambuzado com uma dose de pasta vacinal.

Em testes piloto confirmara-se previamente a ingestão por parte dos camundongos da pasta de lanovaselina, através do hábito de limpeza do pelame besuntado pelo próprio indivíduo e demais membros da colônia, à semelhança do morcego, em período menor que 5 dias.

2.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS VACINAIS

2.5.1 Determinação da concentração de proteínas virais do teste de ELISA.

Para os testes de detecção de concentração protéica para a realização do teste ELISA, utilizou-se vírus rábico concentrado por ultra-filtro e semi-purificado por ultra-centrifuga para a determinação de teor proteico do antígeno. Definiu-se-se como diluição ideal a relação de 1:20 em PBS devido o volume total referente a capacidade das cubetas de quartzo do espectrofotômetro ser de 1,5 ml.

Considerando-se a quantidade necessária de proteína viral de 5 µg por poço para que haja a reação mínima de ligação ao antígeno, calculou-se uma porção total de 500 µg para a placa de teste. A seguir efetuou-se uma leitura em espectrofotômetro (Bio-Tek®, SP 2000 1B) com cubetas de quartzo, utilizando-se os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A concentração de proteínas foi estabelacida pela fórmula:

$$[(\text{Absorbância } 280) \times 1,55 - (\text{Transmitância } 260) \times 0,76] \times \text{FD (Fator de diluição)} = \text{Concentração em mg de proteína por mL}$$

De acordo com a fórmula, o resultado da quantidade total de proteínas virais contidas em 1 mL de antígeno foi de 9320 µg. A quantidade necessária para a placa com 96 poços foi 54 µg em 5 ml de tampão Carbonato-Bicarbonato.

2.5.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação de anticorpos contra o vírus da raiva.

A técnica de ELISA utilizada foi uma adaptação do método descrito por Cliquet *et al.* (2000).

2.5.3 Interpretação da leitura

A leitura dos resultados foi obtida com base na densidade óptica (D.O.) determinada em espectrofotômetro (modelo µQuant- Bio-Tek Instruments, INC) com comprimento de onda de 490 nm. Após a leitura, foram determinadas as médias das D.O. de cada soro em teste, e dos soros controle positivo e negativo. Os soros controles positivos e negativos foram fornecidos pelo TECPAR. O soro negativo foi obtido de um camundongo saudável, não exposto ao vírus rábico, armazenado para comparações congelado em freezer, e o soro positivo foi obtido de um camundongo

imunizado intraperitonealmente com duas doses de vírus rábico da vacina anti-rábica de cultivo celular BHK-21 (TECPAR), da mesma forma armazenado para testes.

3. RESULTADOS

3.1. VACINA ANTI-RÁBICA

A vacina anti-rábica experimental preparada por cultivo de células BHK-21 e inativação viral com β -propiolactona em suspensão líquida pode ser adequada à via oral por mudança em pH sem o comprometimento da formulação. Foi adicionado, para o equilíbrio do pH, em 8,2, o tampão glicocola e ácido clorídrico (HCl) uma vez que o pH normal da suspensão vacinal está entre 6,4 e 7,8. Considerou-se necessária a elevação do pH, por se supor que esta, ao reagir com o pH gástrico reduzisse demasiadamente seu pH, comprometendo a geração de resposta imune à aplicação da vacina.

A pasta neutra de lanovaselina pôde, para fins de viabilização da rota oral de imunização, ser usada como componente veículo vacinal quando manipulada em ambiente limpo seguindo-se os padrões de acondicionamento. Para fins deste estudo, encontrou-se a proporção ideal de 1g de pasta para 1ml de concentrado viral para a imunização oral de camundongos, contendo uma potência infectiva de antígeno aproximadamente igual a $10^{7,5}$ DL₅₀/0,03 ml por dose, considerando-se “*a priori*” esta quantidade vacinal suficiente para auferir uma resposta imune humoral de camundongos. O veículo a base de lanovaselina, embora apresentasse consistência pastosa, não escorria do pelame do animal, absorvia totalmente a quantidade da vacina, ao contrário das pastas de vaselina e lanolina-anidra separadamente.

3.2. ACEITABILIDADE DA VIA ORAL

A ingestão da pasta de lanovaselina foi considerada não-tóxica para os camundongos, suposição esta confirmada através da constância de massa, apresentada pelos animais após a ingestão, porque visualmente não perderam massa. A pasta era aplicada no dorso e ventre do animal, entretanto algumas horas

depois, a pasta estava distribuída pelo corpo (patas, polegar, orelhas, etc.), demonstrando, portanto um efeito de migração de acordo com a plasticidade da mistura. Observava-se igualmente perda indesejável da pasta aplicada no dorso e ventre do animal, quando este esbarrava na parede da caixa. Essa perda não foi quantificada, mas considerou-se pequena. Não houve a perda de vacina por contato com o cepilho, pois o cepilho foi introduzido na caixa somente 48 horas após a aplicação da vacina nos animais.

Após 24 horas, todos os animais do grupo de 10 animais apresentaram sinais da ingestão da pasta e aceitabilidade da via oral, por exemplo, redução no nível de pasta aplicada no pelame, indicando o comportamento de limpeza por ingestão e lambedura do pelame. Estes sinais ainda estavam presentes 48 horas após a aplicação da vacina. Todos os animais apresentavam-se limpos da pasta até o máximo de 5 dias após a aplicação conforme pode ser observado na Figura 2.

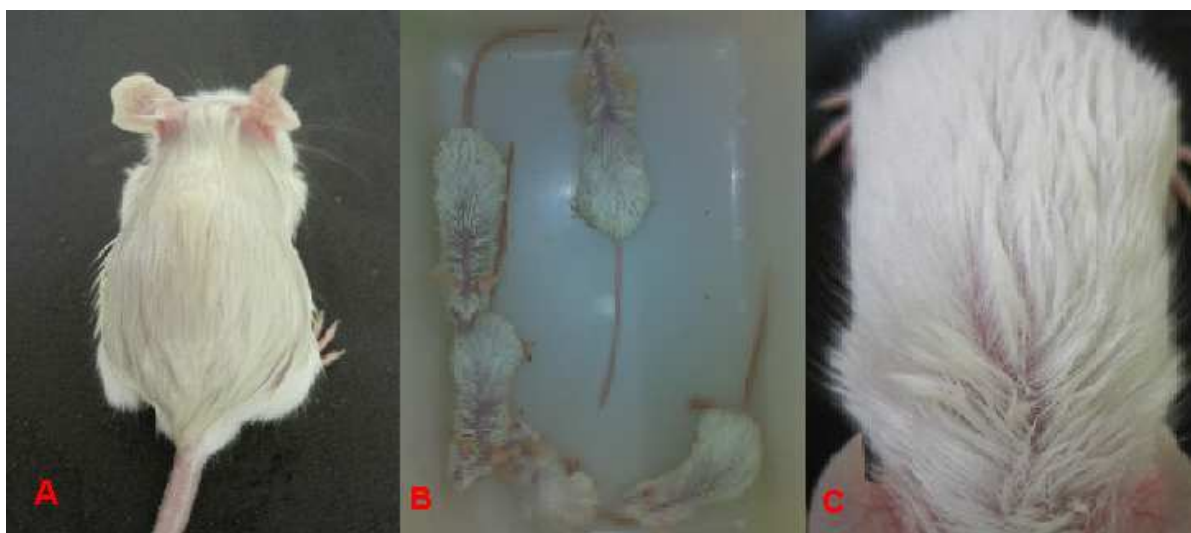


Figura 2: Animal A: Aplicação de veículo vacinal, dia 1, Animais B: Dia 2 do experimento, após 24 horas da aplicação de pasta vacinal, nota-se considerável diminuição da quantidade de pasta no pelame. Animal C: Dia 3 do experimento. Visualização do pelame no dorso, seco, com resquícios de pelos ainda colados após 48 horas da aplicação.

Dos 59 camundongos, aos quais foi aplicada a vacina em pasta, todos sobreviveram à aplicação. Destes, dois animais apresentaram sinais de alopecia e descamação epitelial em dorso, na região cervical sob as escápulas, e entre os ombros. Outros sinais observados após a aplicação foi aumento de agressividade, determinante de lesões por mordidas, nos animais, provavelmente por condições estressantes decorrentes da própria manipulação e pelos eriçados.

3.3. TESTES SOROLÓGICOS

Os dados apresentados na tabela 1 e tabela 2 a seguir refletem os resultados obtidos através de teste ELISA nos soros sanguíneos dos camundongos do experimento.

Tabela 1 – Média, mediana e erro padrão, medidos em densidade óptica por ELISA, de soros de 66 camundongos na diluição 1:25, utilizados em experimento de vacinação oral com vacina anti-rábica PV (TECPAR).

Grupo Animal	Média	Mediana	Erro padrão de Média
A (n= 7)	0,21 ^a	0,2	0,024
B (n=9)	0,17 ^a	0,2	0,013
C (n= 20)	0,15 ^{a, c}	0,2	0,008
D (n= 10)	0,13 ^{b, c}	0,1	0,012
E (n= 20)	0,43 ^b	0,3	0,08

Grupo A: Nenhuma aplicação, animais abatidos no dia 0. Grupo B: Animais aplicados com 1 dose de veículo, abatidos com 21 dias. Grupo C: animais vacinados com 1 dose abatidos com 21 dias. Grupo D: Animais aplicados com 2 doses de veículo, abatidos com 42 dias. Grupo E: Animais aplicados com 2 doses vacinais, abatidos com 42 dias.

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($P < 0,05$ ^{a b} e ^{b c} ; $P < 0,001$ ^{b c}) pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 2 – Média, mediana e erro padrão, medidos em densidade óptica por ELISA, de soros de 66 camundongos na diluição 1:50, utilizados em experimento de vacinação oral com vacina anti-rábica PV (TECPAR).

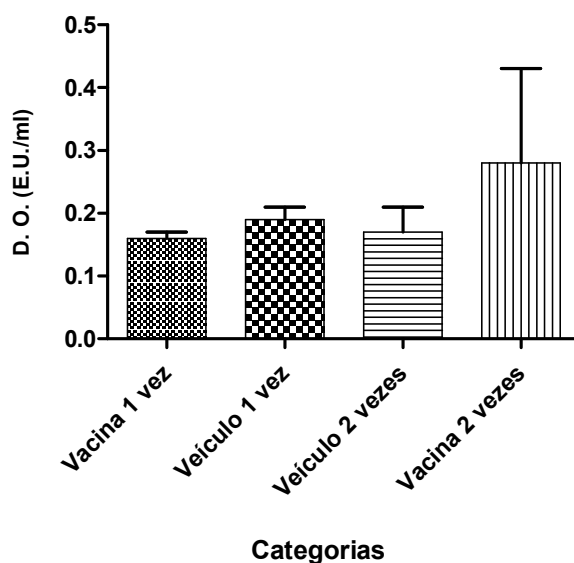
Grupo Animal	Média	Mediana	Erro padrão de Média
A (n= 7)	0,14 ^a	0,14	0,002
B (n=9)	0,13 ^a	0,13	0,001
C (n= 20)	0,12 ^{a, c}	0,13	0,0005
D (n= 10)	0,09 ^{b, c}	0,1	0,006
E (n= 20)	0,31 ^b	0,18	0,06

Grupo A: Nenhuma aplicação, animais abatidos no dia 0. Grupo B: Animais aplicados com 1 dose de veículo, abatidos com 21 dias. Grupo C: animais vacinados com 1 dose abatidos com 21 dias. Grupo D: Animais aplicados com 2 doses de veículo, abatidos com 42 dias. Grupo E: Animais aplicados com 2 doses vacinais, abatidos com 42 dias.

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($P < 0,05$ ^{a b} e ^{b c} ; $P < 0,001$ ^{b c}) pelo teste de Mann-Whitney.

O delineamento estatístico utilizado foi o teste Mann-Whitney, não-paramétrico. Na análise dos resultados, os 66 valores de densidade óptica obtidos dos soros dos animais testados foram comparados. Os soros padrões utilizados com valores de referência obtiveram valores na diluição 1:25 negativo e positivo respectivamente de 0,127 e 1,989. Os soros dos animais que receberam duas aplicações de vacina, do grupo D, nos dias 21 e 42 do experimento, demonstraram a densidade óptica que é uma medida indireta de anticorpos antirrábicos todas significativamente acima do soro negativo, porém mantendo-se abaixo do soro considerado positivo. Comparativamente com os grupos controle do próprio experimento, os animais do grupo D apresentaram valores altamente significativos maiores para com todos os demais grupos. Comparando-se o grupo A e E, as análises mostraram uma probabilidade igual a 97% de obtenção de valores maiores de diferenciação dos resultados do grupo controle (sem vacinação) do grupo vacinado com duas doses da vacina experimental. Visualmente, o desempenho do grupo E vacinado com duas doses em comparação com a dose única e o uso somente do veículo pode ser averiguado no gráfico 1, elaborado a partir das médias das diluições, observando-se a diferença previamente corroborada pela análise estatística.

Gráfico 1. Valores médios de densidade óptica de soros (n=66) de camundongos vacinados oralmente contra a raiva com vacina PV (TECPAR).



O uso de duas doses do veículo resulta em valores menores de densidade ótica do que o valor base dos animais ao início do experimento (dia 0), não havendo diferenças entre uso de uma dose de veículo e 2 doses.

4. DISCUSSÃO

A vacinação dos principais vetores silvestres da raiva é considerada chave para o sucesso do controle da raiva rural e urbana no mundo (ARTOIS *et al.*, 1992; LAMBOT *et al.*, 2000; VOS, 2003; RUPPRECHT *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; CROSS *et al.*, 2007). O Brasil possui um programa de controle da raiva desde 1966, porém não foi capaz ainda de erradicar esta enfermidade principalmente no meio rural com casos clínicos de raiva sendo relatados ano após ano (MAPA, 2010). O principal vetor da raiva no meio rural brasileiro é o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (KOTAIT, 2005; NEVES, 2008; NOVAIS, 2008). Portanto, esforços deveriam ser dispensados para focar o controle da raiva neste vetor, porém não somente com medidas de controle populacional desumanos e como demonstrado por Mebatsion *et al.* (2001) Vos (2003) e Follmann *et al.* (2004) pouco eficientes.

O desenvolvimento de vacinas orais, com aceitabilidade refletida em resultados positivos foi proposto para controlar a raiva de animais silvestres (ARTOIS *et al.*, 1992; METBATSION *et al.*, 2001; VOS, 2003; CROSS *et al.*, 2007). A utilização de vacinas V-RG, SAG-2 para a vacinação via oral de cães, raposas, morcegos e guaxinins foi descrita com apresentação de resultados positivos por Rupprecht *et al.* (1986), Fekadu *et al.* (1996), Lambot *et al.* (2001), Follmann *et al.* (2004) e Almeida *et al.* (2008).

Os primeiros trabalhos na direção de uma vacinação do vetor brasileiro foram dados por Almeida (2003) e Almeida *et al.* (2005, 2008) trabalhando com uma vacina importada recombinante de glicoproteína viral.

Para o sucesso de um programa de controle nacional, seria vantajoso obter-se uma independência tecnológica, através do desenvolvimento de conhecimento nacional sobre vacinas e protocolos de vacinação.

O presente estudo, utilizando uma vacina nacional obtida em cultura celular baseada em vírus PV, cuja produção é dominada pelo TECPAR, contribui para compreensão deste processo. A formulação utilizada possibilitou a ingestão de vírus

vacinal pelos camundongos, como anteriormente obtido por Atanasiu *et al.* (1982) utilizando vacina concentrada produzida pelo Instituto Pasteur e por Artois *et al.* (1992) utilizando vacinas SAG-1 e V-RG.

A ocorrência de aumento de agressividade observados em nosso estudo, foi descrito também por Saudou *et al.* (1994), porém deve ser decorrente mais da excessiva manipulação dos animais, levando à “stress” dentro das gaiolas, também demonstrado pela aparente imunossupressão causada no grupo que recebeu somente o veículo comparado com os animais sacrificados no início do experimento. Este tipo de “stress” foi descrito por Schwab *et al.* (2005).

Entretanto, a utilização da vacina anti-rábica pela via oral, experimentalmente, não demonstrou efeitos patogênicos residuais em camundongos segundo Artois *et al.* (1992).

A mensuração de anticorpos pela técnica de ELISA é comumente utilizada para a determinação do nível de anticorpos contra a raiva em animais (CLIQUET *et al.*, 2000; WOLDEHIWET, 2005). Cliquet *et al.* (2000) aprovaram o uso do teste ELISA como suficientemente sensível e específico, comparado com o teste de soroneutralização (FAVN) para o acesso da eficiência em imunizar raposas após a vacinação oral contra a raiva. No entanto Woldehiwet (2005) considerou o ELISA menos sensível que o teste de imunofluorescência (FAT) para a detecção de anticorpos antirrâbicos, apesar dos resultados demonstrarem 96% de similaridade.

Observou-se neste estudo a insuficiência de uma aplicação única via oral para suscitar uma resposta imune mensuravelmente diferente, em acordo com os achados de Atanasiu *et al.* (1982), em cujos experimentos também houve necessidade de uma segunda dose vacinal para melhorar a resposta imune humoral. Este é um item que ainda terá que ser melhorado, pois idealmente a vacinação massal de morcegos, caso seja implementado, deveria ser baseado em doses únicas, com reforços o mais espaçados possíveis pelas dificuldades logísticas de acesso aos abrigos destes, assim como a captura dos morcegos para o uso de uma pasta vacinal (ALMEIDA, 2003; Almeida *et al.*, 2005, 2008).

Apesar de não ter se trabalhado com um desafio, evidenciou-se que a vacina PV (TECPAR) em pasta foi capaz de suscitar uma resposta imune humoral, observada também em outros estudos das vacinas HEP 176/BHK liofilizada e PV/RFB C88 usadas por via intraduodenal (ATANASIU *et al.*, 1982) e vacina derivada da expressão da glicoproteína G do vírus rábico por via intraperitonal em

camundongos (ASHRAF *et al.*, 2005). Também KALLEL *et. al.* (2006) consideraram a eficiência de vacinas produzidas por cultivo celular e inativação, de acordo com protocolos experimentais, comparável com a eficiência de resultados obtidos por uma vacina comercial.

4.1 PERSPECTIVAS

Futuros testes para elucidação do caminho viral após a sua ingestão poderão ser efetuados com a imunofluorescência, por esta ser mais específica (BOURHY *et al.*, 1989, WOLDEHIWET, 2005), assim como aplicando esta técnica em intestinos e placas de Peyer, no intuito de elucidar a patogenia do vírus vacinal no animal vacinado e as respostas elucidadas pelo corpo do camundongo, como proposto por Wilding *et al.* (1994).

Os resultados obtidos são o primeiro passo em direção ao desenvolvimento de uma vacina nacional para imunização oral de morcegos, porém terão que serem reforçados por mais estudos nas áreas de imunologia, farmacologia e, se pensarmos nas formas de aplicação que poderão incluir o animal parasitado (grandes herbívoros), comportamento animal.

O desafio viral poderá ser realizado como medida mais eficiente em conferir a potência da vacina nacional anti-rábica frente à infecção de camundongos pelo vírus rábico, os testes *in vivo* poderão servir de referência na avaliação da vacina e para a possível justificativa da produção nacional.

5. CONCLUSÃO

A formulação de uma pasta vacinal a partir da vacina de cultivo celular de vírus rábico PV do TECPAR para uso oral foi possível.

A utilização de vacina experimental veiculada por pasta e aplicada topicamente nos camundongos provou ser capaz de suscitar uma resposta imune humoral detectado por ELISA.

Novos estudos são necessários para adaptação desta vacina ao uso no vetor *Desmodus rotundus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.F. Imunização indireta de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* em cativeiro, com vacina anti-rábica V-RG, veiculada em pasta neutra. Dissertação de Mestrado. Área: Fisiologia experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, 126p. 2003.
- ALMEIDA, M.F.; MARTORELLI, L.F.A.; AIRES, C.C.; BARROS, R.F.; MASSAD, E. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. **Virus research**, v.137. 275-277. 2008.
- ALMEIDA, M.F.; MARTORELLI, L.F.A.; AIRES, C.C.; SALLUM, P.C.; MASSAD, E. Indirect oral imunization of captive vampires, *Desmodus rotundus*. **Virus research**, v. 111. 77-82. 2005.
- ARTOIS, M.; GUITTRÉ, C.; THOMAS, I.; LEBLOIS, H.; BROCHIER, B.; BARRAT, J. Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: a comparison. **Vaccine**, v. 10 (8). 524-528. 1992.
- ASHRAF, S.; SINGH, P.K.; YADAV, D.K.; SHAHNAWAZ, M.; MISHRA, S.; SAWANT, S.V.; TULI, R. High level expression of surface glycoprotein of rabies in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. **Journal of Biotechnology**, v. 119. 1-14. 2005.
- ATANASIU, P.; METIANU, T.; BOLANOS, A. Evaluation d'une vaccination rabique experimentale par la voie orale et intestinale avec des vaccins tues, concentres et non concentres. Company Immunogenic Microbiology. **Infeccious Disease**, v. 5 (1-3). 187-191. 1982.
- BLANCOU, J.; KIENY, M.P.; LATHE, R.; LECOCQ, J.P.; PASTORE, P.P.J.; SOULEBOT, P.; DESMETTRE, P. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. **Nature**, v.322. 373 – 375.1986.
- BINGHAM, J.; SCHUMACHER, C.; AUBERT, M.F.A.; HILLS, F.W.G.; AUBERT, A.A. Innocuiy studies of SAG-2 oral rabies vaccine in various Zimbabwean wild non-target species. **Vaccine**, v. 15 (9). 937-943. 1997.
- BOURHY, H.; ROLLIN, P.E.; VINCENT, J.; SUREAU, P. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture,

and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. **Journal of Clinic Microbiology**, v.27 (3). 519-523. 1989.

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. SVS em Rede – Edição Especial Raiva. **Terceiro Boletim Editorial**, junho de 2010.
- CHORILI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**. v. 28 (1).11-23. 2007.
- CLIQUET, F.; SAGNÉ, L.; SCHEREFFER, J.L.; AUBERT, M.F.A. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. **Vaccine**, v. 18. 3272-3279. 2000.
- CLIQUET, F.; NANCY, A.F.S.S.A. Laboratory of Research on Rabies and Wildlife Diseases – WHO Collaborating Centre for Research and Management in Zoonoses Control – OIE Reference Laboratory for Rabies – Community Reference Institute for Rabies Serology. Malzéville, France. 1-9.2008.
- CROSS, M.L.; BUDDLE, B.M.; ALDWELL, F.E. The potencial of oral vaccines for disease control in wildlife species. **The Veterinary Journal**, v. 174. 472-480. 2007.
- FEKADU, M.; NESBY, S.L.; SHADDOCK, J,H.; SCHUMACKER, S.B.; LINHART, S.B.; SANDERLIN, D.W. Immunogenicity, efficacy and safety of an oral rabies vaccine (SAG-2) in dogs. **Vaccine**, v. 14 (6) 465-468, 1996.
- FOLLMANN, E.H.; RITTER, D.G.; HARTBAUER, D.W. Oral Vaccination of Captive Arctic Foxes with Lyophilized SAG2 Rabies Vaccine. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 40 (2). 328-334. 2004.
- HOFF, J. Methods of blood collection in the mice. **Lab Animal Technique**, v. 29 (10). 47-53. 2000.
- KALLEL, H.; DIOUANI, M.F.; LOUKIL, H.; TRABELSI, K.; SNOUSSI, M.A.; MAJOUL, S.; ROUROU, S.; DELLAGI, K. Immunogenicity and efficacy of in-house developed cell-culture derived veterinary rabies vaccine. **Vaccine**, v. 24. 4856 – 4862. 2006.
- KLIPSTEIN, F.A.; ENGERT, R.F.; SHERMAN, W.T. Peroral immunization of rats with *Escherichia coli* heat- labile enterotoxin delivered by microspheres. **Infection and Immunity**, v. 39 (2). 1000-1003. 1983.

- KOJIMA, D.; PARK, C.H.; TSUJIKAWA, S.; KOHARA, K.; HATAI, H.; OYAMADA, T.; NOGUCHI, A.; INOUE, S. Lesions of the Central Nervous System Induced by Intracerebral Inoculation of BALB/c Mice with Rabies Virus (CVS-11). **Journal of Veterinary Medicine**, v. 72 (8).1011-6. Epub. 25. 2010.
- KOTAIT, I. Raiva em morcegos em áreas urbanas no Estado de São Paulo de São Paulo. BEPA. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 20. 7-9, 2005.
- LAMBOT, M.; BLASCO, E.; BARRAT, J.; CLIQUET, F.; BROCHIER, B.; RENDERS, C.; KRAFFT, N.; BAILLY, J.; MUNIER, M.; AUBERT, M.F.A.; PASTORET, P.P. Humoral and cell-mediated responses of foxes (*Vulpes vulpes*) after experimental primary and secondary oral vaccination using SAG₂ and V-RG vaccines. **Vaccine**, v. 19.1827-1835. 2001.
- LIMA, E.F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S.; GOMES, A.A.B.; LIMA, F.S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistemas nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasil**. v. 25 (4). 250-264. 2005.
- MEBATSION, T.; KILARI, S.; VISSER, N. Development of an oral rabies vaccine with improved safety and efficacy to control canine rabies in ownerless and stray dogs. **Virology R&D**. 1 – 8. 2001.
- NEVES, D.A. **Sazonalidade e ciclicidade da raiva em herbívoros domésticos no Estado do Mato Grosso do Sul, 1998 a 2006**. Mato Grosso do Sul, 2008. Tese (Mestrado em Ciência Animal). Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.
- NOVAIS, B.A.F. Raiva em bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI (10). 1-7. 2008.
- PORTARIA N°176/MINISTÉRIO DA SAÚDE/SNVS de 11 de novembro de 1996. Brasil, 1996.
- QUINN, P.J. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 512 p. 2007.
- RUPPRECHT, C.E.; WIKTOR, T.J.; JOHNSTON, D.H.; HAMIR, A.N.; DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W.H.; GLICKMAN, L.T. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 83. 7947-7950.1986.

- RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; SLATE, D. Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control. Control of infectious diseases by vaccination. **Developmental Biology Basel**. v. 119. 173-184. 2004.
- SALOME, G.; GOWDA, P.H.R. Oral Immunization of Mice with Rabies Vaccine Using Different Baits. **Online Veterinary Journal**, v. 5 (1). Article 59. 2010.
- SAUDOU, F.; AMARA, D.A.; DIERICH, A.; LEMEURE, M.; RAMBOZ, S.; SEGU, L.; BUHOT, M.C.; HEN, R. Enhanced aggressive behavior in mice: Lacking 5 – HT_{1B} receptor. **Science**, v. 285. 1875-1878. 1994.
- SCHWAB, C.L.; FAN, R.; ZHENG, Q.; MYERS, L.P.; HÉBERT, P.; PRUETT, S.B. Modeling and predicting stress-induced immunosuppression in mice using blood parameters. **Toxicological Science**, v. 83. 101-113. 2005.
- SEIF, I.; COULON, P.; ROLLIN, P.E.; FLAMANDI, A. Rabies Virulence: Effect on Pathogenicity and Sequence Characterization of Rabies Virus Mutations Affecting Antigenic Site III of the Glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53 (3). 926-934. 1985.
- SILVA, N.N.; MARKUS, H.L.; PADILHA, A.A. Vacina Anti-Rábica Tipo “Fuenzalida” Modificada. **Boletín De La Oficina Sanitaria Panamericana**. 1967.
- TIZARD, I. **Imunologia Veterinaria** - Edição: 8ª, Ano 2008.
- VOS, A. Oral vaccination against rabies and the behavioural ecology of the Red Fox (*Vulpes vulpes*). **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 50 (10). 477 – 483. 2003.
- XIANG, Z.Q.; GAO, G.P.; REYES-SANDOVAL, A.; LI, Y.; WILSON, J.M.; ERTL, H.C. Oral Vaccination of Mice with Adenoviral Vectors Is Not Impaired by Preexisting Immunity to the Vaccine Carrier. **Journal of Virology**, v. 77 (20). 10780–10789. 2003.
- XU-AMANO, J.; KIYONO, H.; RAYMOND, J.; STAATS, H.F.J.; FUJIIHASHI, K.; BURROWS, P.D.; ELSON, C.O.; PILLAI, S.; MCGHEE, J.R. Helper T Cell Subsets for Immunoglobulin A Responses: Oral Immunization with Tetanus Toxoid and Cholera as Adjuvant Selectively Induces Th2 Cells in Mucosa Associated Tissues. **Journal of Experimental Science**, v. 178. 1309-1320. 1993.

- WARRELL, M.J.; WARRELL, D.A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v. 363. 959 – 970. 2004.
- WILDING, I.R.; DAVIS, S.S.; O'HAGAN, D.T. Targeting of drugs and vaccines to the gut. **Pharmaceutical Therapies**, v. 62, 97-124. 1994.
- WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 351. 49 – 63. 2005.

ANEXO 1 – Soluções Elisa

A) Tampão de Adsorção

- 1,59 g Carbonato de Sódio
- 2,93 g Bicarbonato de Sódio
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.

B) Solução Lavagem

- 1,5 mL Tween 20
- 1000 mL Tampão TRIS q.s.p.

C) Tampão TRIS

- 8,7 g Cloreto de Sódio
- 0,372 g EDTA
- 6,05 g TRIS
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 7,4 com HCl 50%

99

D) Tampão Bloqueio e Diluição de Amostra

- 30 g BSA Fração V
- 1,5 mL Tween 20
- 1,0 g Azida Sódica
- 1000 mL Tampão TRIS q.s.p.

E) Tampão de Diluição de Conjugado

- 30 g BSA Fração V
- 1,5 mL Tween 20
- 100 mL Soro de Cavalo
- 1000 mL Tampão TRIS q.s.p.

F) Substrato

Solução Reveladora Cromógeno-Substrato (OPD)

- 400 mg OPD
- 1000 mL Tampão Citrato q.s.p.

G) Solução Reveladora

- 32 μ L Peróxido de Hidrogênio 30 Vol.
- 100 mL Solução Reveladora Cromógeno-Substrato (OPD)