

ROSALVO GUIDOLIN

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO IMUNITÁRIO  
DA VACINAÇÃO ANTI-RÁBICA

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da U  
niversidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de Doutor

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
BIBLIOTECA  
T27D

PIRACICABA - SP

1976

A minha esposa

e aos meus filhos

pelo interesse e compreensão  
que sempre demonstraram em  
relação ao meu trabalho

## R A B I E S

"The best mode that can be adopted is, immediately after the part has been bitten, to cut it out, you should first ascertain at what depth the teeth have entered, by means of a probe, and then take care to excise a sufficient quantity, and leave no part of the injured integument, cellular membrane, or muscle to remain. If persons should object to the use of the knife - foolishly object to have the poisoned part cut away - I advise you in such cases to let sink into the wound a small piece of potassa fusa (potassium hydroxide) ...

The best plan decidedly is the immediate excision of the part, and, where it has been done directly after the injury, it has, I believe, in every instance been successful in preventing the disease".

*Sir Astley Paston Cooper*

*Cooper, A. Lancet 2: 166, 1823*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração inestimável de um grupo de pessoas de elevado nível profissional e, principalmente, dotado de excepcional boa vontade.

Assim, externamos os nossos agradecimentos:

ao Prof. Dr. PEDRO BERTOLINI, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Unicamp, a quem devemos a orientação científica e a confiança recebida que, sem qualquer sombra de dúvida, foram fatores decisivos para esta apresentação;

aos Profs. Drs. REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO, Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e FLÁVIO ZELANTE, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo estímulo, ensinamentos e conselhos que, guiando-nos, culminaram com a concretização de nossos ideais;

ao Sr. ELIAS JOSÉ LIPHAUS, técnico da Pfizer Química Limitada, pelas inúmeras experiências que realizou, dentro de absoluto rigor científico, graças aos conhecimentos que absorveu convivendo com os problemas do controle da vacina anti-rábica, naquele laboratório;

ã direção da Pfizer Química Limitada, por facilitar a realização das provas, a nossa gratidão e, ainda, as nossas congratulações por abrigar em seu quadro, funcionários como o acima citado, que orgulham e dignificam a organização a que pertencem;

ao Dr. DOMINGOS DE LUCCA NETO, Veterinário, assistente técnico da Pfizer Química Limitada, pela preparação das lâminas para os testes de imunofluorescência;

ao Dr. JOSÉ LUÍS DE LORENZO, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela correção do vernáculo;

às Srtas. EUNISIA PAULA MUNCK e AMELIA IZABEL NATALINO pela preparação das tabelas e serviços de datilografia;

ã Sra. ANNELIESE CARNEIRO DA CUNHA, pela normalização das referências bibliográficas;

ao Prof. Dr. SEBASTIÃO TIMO IARIA, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e ao Dr. MOACYR R. NILLSON, do Instituto Biológico de São Paulo, pelas valiosas su gestões apresentadas;

a todos enfim que, mesmo no anonimato, contribuíram direta ou indiretamente para esta realização, os nossos sinceros agradecimentos.

## Í N D I C E

1.	INTRODUÇÃO .....	3
2.	PROPOSIÇÃO .....	7
3.	LITERATURA CONSULTADA .....	9
3.1	- Propagação do vírus rábico no organismo .....	10
3.1.1	- Através de via nervosa .....	11
3.1.2	- Através de via hemática .....	14
3.2	- Imunoproteção .....	15
3.2.1	- Inoculação da vacina por diferentes vias ..	15
3.2.2	- Replicação viral nos tecidos do sistema ner voso central .....	17
3.2.3	- Interferon .....	20
3.3	- Cura espontânea da raiva .....	21
4.	SINOPSE DOS TRABALHOS ANALISADOS .....	22
5.	MATERIAL E MÉTODOS .....	25
5.1	- Condições técnicas comuns às várias provas efetuadas ..	26
5.1.1	- Esterilização .....	26
5.1.2	- Vacina FLURY HEP .....	26
5.1.3	- Diluição dos vírus .....	27
5.1.4	- Temperatura de manutenção dos vírus durante as operações .....	27
5.1.5	- Vírus de provas .....	27
5.1.6	- Soro normal de cavalo, inativado e esterili zado .....	28
5.1.7	- Provas de esterilidade do soro ou das solu ções .....	28
5.1.8	- Sinais e sintomas de raiva em animais inocu lados experimentalmente .....	28
5.1.9	- Destino dos animais utilizados nas provas .	28

5.2	-	Animais de laboratório .....	28
5.2.1	-	Cobaias .....	28
5.2.2	-	Camundongos .....	28
5.2.3	-	Hamsters .....	29
5.2.4	-	Acomodação e manutenção .....	29
5.2.5	-	Verificação dos sintomas .....	30
5.3	-	Inoculações e sangrias dos animais de laboratório ...	30
5.3.1	-	Via intramuscular .....	30
5.3.2	-	Via intracerebral .....	30
5.3.3	-	Via intracardíaca .....	30
5.3.4	-	Sangrias .....	31
5.4	-	Vírus rábicos .....	31
5.4.1	-	Obtenção do vírus FLURY HEP modificado ..	32
5.4.2	-	Obtenção dos vírus de provas CVS e PV ...	38
5.4.3	-	Titulação dos vírus .....	39
5.5	-	Provas de proteção .....	40
5.5.1	-	Vacina FLURY HEP liofilizada (vírus modi- ficados) .....	40
5.5.2	-	Vacina tipo Fuenzalida .....	42
5.5.3	-	Vacina FLURY HEP inativada .....	43
5.5.4	-	Vacina tipo Fuenzalida .....	45
5.6	-	Prova de soro-neutralização .....	45
5.6.1	-	Titulação do vírus CVS - Controle ....	45
5.6.2	-	Neutralização soro/vírus .....	46
5.7	-	Prova de cérebro-neutralização .....	47
5.8	-	Prova de imunofluorescência .....	48
5.9	-	Deteção do vírus rábico no sangue de cobaias.....	48
6.		RESULTADOS .....	50
7.		DISCUSSÃO .....	77
8.		CONCLUSÕES .....	88
9.		REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a literatura clássica, a raiva é uma doença infecciosa cujo agente etiológico tem predileção por instalar-se e replicar-se nas células do sistema nervoso central (SNC), não só do homem como de todos os animais homeotérmicos. Estas células nobres, quando infectadas, sofrem profundas alterações morfofisiológicas: são rapidamente lesadas, determinando sinais e sintomas característicos, conduzindo o animal a um quadro clínico que, em última análise, corresponde ao da encefalite aguda. A evolução é geralmente rápida e fatal.

Na literatura especializada, encontram-se casos de cura espontânea em animais natural ou artificialmente inoculados com o vírus rábico<sup>2, 4, 11, 12, 13, 14, 20, 25, 28, 30, 45, 46, 47, 53, 57.</sup>

Constitui uma consideração importante para nós a observação de que, em animais nos quais o processo infeccioso evoluiu para a cura, foi constatada a presença de anticorpos neutralizantes específicos no soro, líquido céfalo-raquídeo e no próprio tecido cerebral<sup>14, 20, 66.</sup> Ocorrências desta natureza permitem acreditar na possibilidade da multiplicação viral aparentemente não lesiva, em células nervosas ou, talvez, em células não especificamente pertencentes ao sistema nervoso central.

A inoculação, pelas vias subcutânea ou intramuscular, de vírus inativados por processos físicos ou químicos que não interfiram intensamente na sua integridade antigênica, ou então a inoculação de vírus modificados, induzem à formação dos anticorpos específicos. Estes podem ser detectados por diferentes técnicas no soro sanguíneo, no líquido céfalo-raquídeo e no tecido cerebral. Ocorre, todavia, que o nível da resposta imunológica dos animais submetidos àquele tratamento, varia segundo o caso. Considerando a inoculação intraperitoneal de um determinado número de partículas virais, inativas ou ligeiramente modificadas, obtem-se maior teor de anticorpos no tecido cerebral quando os animais são inoculados com o vírus ativo<sup>43.</sup>

Este fato é fundamental para a preferência que é dada às vacinas constituídas de microrganismos com virulência diminuída, quando tecnicamente possíveis de serem obtidas.

A nossa experiência neste campo permitiu verificar que a inoculação intracerebral do vírus rábico modificado em animais de laboratório, induzia a uma elevada resistência à subsequente inoculação do vírus fixo patogênico, quer por via intramuscular, quer por via intracerebral. Além desse aspecto, pudemos observar, também, que a resposta antigênica de uma dada partida de vírus FLURY HEP, variava de um lote de animais para outro. Imaginamos, então, que fatores próprios desses animais pudessem impedir o acesso do vírus aos tecidos nervosos, partindo do pressuposto que a sua via de progressão no organismo e a sua replicação, obedecem aos mesmos mecanismos observados quando da infecção natural. Neste último caso, são observadas manifestações clínicas que denotam lesões do sistema nervoso central. Todavia, esta verdade não é válida para o que é observado quando da inoculação do vírus FLURY HEP. Nestas condições, não são detectadas, clinicamente, lesões cerebrais, embora ocorra uma replicação viral, que pode ser verificada pelo teste de imunofluorescência no sistema nervoso central e que induz ao aparecimento de títulos de anticorpos séricos ao nível de proteção.

Como expusemos anteriormente, existem relatos na literatura, de casos de infecções rábicas experimentais e mesmo naturais, que evoluíram para uma cura espontânea. Ora, é princípio dogmático de que a célula nervosa lesada não se recupera. Tais curas, mesmo aquelas posteriores à manifestação de paresias graves, denotam que a replicação viral ocorreu sem dano permanente para a célula hospedeira. Estas observações invalidam a convicção de que uma infecção rábica é sempre letal.

Em nossa experiência pessoal, verificamos, em várias oportunidades, estes fatos. Cobaias inoculadas com o vírus FLURY LEP, que apresentaram paresias e mesmo paralisias de membros posteriores, evoluíram para a cura espontânea sem aparente ocorrência de seqüelas.

O que parece ser uma constante - e a literatura o demonstra - é que, em casos de infecções não fatais, os animais apresentam altos títulos de anticorpos neutralizantes no líquido cérebro-espinhal e no soro<sup>14</sup>.

Como a resposta imune está diretamente relacionada à massa antigênica inoculada, no caso específico dos vírus rábicos, os títulos resultantes induzem a acreditar na replicação viral ao nível do sistema nervoso central, sem que haja danos aparentes às suas células, de acordo com as observações de KOPROWSKI, BLACK e NELSEN<sup>41</sup> (1954). Ora, sendo o sistema nervoso central um tecido imunologicamente segregado, nestas condições deverá haver mecanismos diversos na resposta imune, quando da vacinação intramuscular e intraneural, pois observações de RIBEIRO<sup>58</sup> (1970) demonstraram a existência de diferentes níveis de resposta, conforme a via de inoculação do antígeno.

## 2. PROPOSIÇÃO

## 2. PROPOSIÇÃO

Baseados nas considerações expostas no capítulo "INTRODUÇÃO" ,  
objetivamos verificar:

1. qual a intensidade da resposta imunitária em animais de laboratório ,  
inoculados intramuscular e intracerebralmente com vacina anti-rábica  
preparada com a amostra FLURY HEP.
2. se com a utilização dessas vias de inoculação haveria a instalação e  
replicação da amostra FLURY HEP no tecido cerebral desses animais.
3. qual a importância relativa dos anticorpos séricos e, possivelmente ,  
da imunidade celular do sistema nervoso central na proteção dos ani -  
mais tratados quando reinoculados com "vírus fixo".

### 3. LITERATURA CONSULTADA

### 3. LITERATURA CONSULTADA

Para melhor compreensão do problema ao qual nos propusemos a abordar e para melhor atingir aos objetivos colimados, dividimos os trabalhos consultados nos seguintes tópicos:

- 3.1 - Propagação do vírus rábico no organismo
  - 3.1.1 - Através de via nervosa
  - 3.1.2 - Através de via hemática
  
- 3.2 - Imunoproteção
  - 3.2.1 - Inoculação da vacina por diferentes vias
  - 3.2.2 - Replicação viral nos tecidos do sistema nervoso central
  - 3.2.3 - Interferon
  - 3.2.4 - Anticorpos humorais e imunidade celular
  
- 3.3 - Cura espontânea da raiva

#### 3.1 - PROPAGAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO NO ORGANISMO

##### 3.1.1 - Através de via nervosa

MORGAGNI<sup>49</sup> (1769) postulou a possibilidade de que o vírus rábico fosse conduzido ao sistema nervoso central através da via nervosa.

GALTIER<sup>26</sup> (1879) publicou os primeiros resultados a respeito da doença experimental e, entre outras verificações, sugeriu a propagação do vírus da raiva por via nervosa.

SCHINDLER<sup>60</sup> (1961) não demonstrou a ocorrência do vírus rábico no sangue, após a inoculação experimental em camundongos. Verificou que o soro anti-rábico, inoculado por via intracerebral mais do que 10 minutos após a inoculação intracerebral do vírus patogênico, não apresentava efeito protetor significativo. A rápida combinação entre vírus e células susce

tíveis, formando um complexo não neutralizável, seria a causa da ineficácia do soro nestas condições, segundo as suas conclusões. Além desses aspectos, o autor verificou que o vírus rábico perderia a sua atividade infectante 360 minutos após a inoculação intracerebral, sugerindo que no interior da célula, na fase de eclipse, o vírus rompe-se em partículas menores, não infectantes. Por outro lado, no tecido muscular o vírus reteria a sua infectividade por um tempo muito maior. Estas experiências demonstraram, assim, a maior afinidade do vírus rábico pelas células nervosas. Outra observação interessante do mesmo autor, diz respeito à maior concentração de vírus necessária para determinar a doença, quando inoculada por via intramuscular. Parece que grande parte das partículas virais não encontra, por qualquer razão, oportunidade de combinar-se com as células nervosas suscetíveis. Schindler, "loc.cit.", concluiu que ocorre a progressão do vírus através da via nervosa, baseado nas seguintes observações:

- 1a.) no período de incubação, o vírus não é encontrado no sangue;
- 2a.) o período de incubação depende da distância entre o ponto de penetração do vírus e o sistema nervoso central;
- 3a.) na inoculação experimental, o vírus foi encontrado nos nervos periféricos antes de seu aparecimento no sistema nervoso central;
- 4a.) em seguida, foi detectado primeiramente na medula espinhal e, posteriormente, no cérebro (inoculação feita por via intramuscular no membro posterior).

DEAN, EVANS & MCLURE<sup>19</sup> (1963) verificaram em camundongos, cobaias, ratos, hamsters, raposas e cães, que a neurectomia prévia (ciático e safênico) realizada na pata que sofreu inoculação, impedia as mortes consequentes da inoculação com vírus CVS. Por outro lado, 95% dos animais controles não neurectomizados, morreram como consequência da inoculação da mesma dose. Verificaram, ainda, que a neurectomia era eficaz até 2 horas após a inoculação do vírus. Quando se usava o hamster como animal experimental, a neurectomia não impedia totalmente a morte, fato que sugere uma maior suscetibilidade deste animal, permitindo a disseminação provável do vírus rábico através da via hemática. O mesmo ocorreria, conforme os autores, com outros animais altamente suscetíveis, como a raposa e o boi.

JOHNSON<sup>34</sup> (1965), através da imunofluorescência, trabalhando com camundongos, verificou a presença do vírus em células nervosas da raiz dorso-lombar e da região lombar da medula espinhal, 3 dias após a inoculação subcutânea do vírus rábico. Ao contrário, o tecido subcutâneo e o músculo da região inoculada, assim como os linfonodos e os nervos periféricos regionais, não apresentaram vírus. Durante o período de incubação, o autor não encontrou, com frequência, vírus no sangue ou nas vísceras desses animais.

BAER, SHANTHAVEERAPPA e BOURNE<sup>6</sup> (1965) e BAER SHANTHA e BOURNE<sup>7</sup> (1968), concluíram, em ambos os trabalhos, que tanto o vírus fixo como o vírus das ruas, progridem rapidamente através do nervo ciático do rato, quando os vírus são inoculados no coxim plantar deste animal. A neurectomia total, antes da inoculação, evitava a morte de, praticamente, 100% dos ratos inoculados. Os autores verificaram que as estruturas perineurais pareciam não participar da progressão dos vírus, uma vez que a remoção cirúrgica dessas estruturas não reduzia significativamente a mortalidade. Por outro lado, a retirada dos fascículos nervosos, mesmo com a permanência das estruturas perineurais, evitou a morte dos ratos inoculados. A existência de endotélio perineural metabolicamente ativo, como uma extensão das meninges, constitui uma barreira celular que envolve os fascículos nervosos. Os autores não acreditam que o anticorpo anti-rábico circulante teria condições de ultrapassar esta barreira e, assim, exercer eficazmente a neutralização dos vírus, quando localizados nos nervos periféricos. Nestas condições, a sobrevivência dos animais dependia da presença de anticorpos circulantes, antes que o vírus atingisse o sistema nervoso central. Verificaram, ainda, não ser possível isolar o vírus do nervo ciático da pata inoculada, senão 9 dias após a inoculação. Demonstraram, também, que a ocorrência de mortes em alguns animais neurectomizados 1, 2 e 3 dias após a inoculação, indica que o vírus pode atingir o sistema nervoso central antes da sua detecção nos nervos regionais, pelas técnicas de diagnóstico disponíveis. Da medula espinhal, os vírus disseminam-se rapidamente para outras partes do sistema nervoso central. No 9º dia após a inoculação são detectados na glândula salivar e na gordura parda, sugerindo progressão centrífuga através da inervação periférica, após a progressão centrípeta.

LEPINE e GAMET<sup>44</sup> (1969) mencionam que: "nos animais infectados pelo vírus da raiva, a virulência dos órgãos é função da quantidade de tecido nervoso que eles possuem. As cápsulas supra-renais, as glândulas salivares,

as glândulas lacrimais, apresentam título infectante para o animal bem superior ao do fígado, do baço, dos rins e dos pulmões". Opinam, por outro lado, que: "os tecidos pobres em elementos nervosos apresentam virulência das mais irregulares" e, ainda: "para o animal raivoso é essencialmente o sistema nervoso central e periférico a sede do vírus rábico". (As traduções são nossas). Os mesmos autores "loc. cit.", consideram, ainda, a existência de diferentes "intensidades de virulência" segundo as diferentes porções do sistema nervoso. O corno de Ammon, o cerebelo e o bulbo raquidiano são os mais ricos em vírus. Esta variação, que depende da maior ou menor concentração viral do tecido nervoso, seria função da quantidade de células sensíveis (células neuro-ganglionares) nestes tecidos. Quanto à propagação propriamente dita do vírus, desde o ponto de inoculação até o sistema nervoso central, afirmam que: "a virulência do sangue é um problema ainda obscuro. Parece não haver viremia durante o período de incubação. Por outro lado, no animal raivoso o sangue é virulento". Concluem, finalmente, que a via de propagação do vírus rábico, inoculado natural ou experimentalmente, é um problema que não tinha recebido, até então, uma resposta satisfatória.

HUMMELER e KOPROWSKI<sup>32</sup> (1969), aceitam os nervos periféricos como a via de propagação do vírus. Estes podem ser detectados, regularmente, através da imunofluorescência, inicialmente nas células ganglionares da medula espinhal; a invasão do sistema nervoso central seria explicada pelo deslocamento do vírus através da substância cinzenta. A replicação ocorre quase que exclusivamente nos neurônios. Os autores acreditam que o vírus rábico possui seletividade para determinados neurônios, tais como os do corno de Ammon e os das células de Purkinge. "Apesar da instalação e re - plicação viral, estas células permanecem estruturalmente intactas, não ocorrendo neuroniolise ou neuroniofagia" (o grifo é nosso).

MURPHY, BAUER, HARRISON e WINN<sup>50</sup> (1973) e MURPHY, HARRISON, WINN e BAUER<sup>51</sup> (1973), trabalhando com hamsters confirmaram, através da microscopia eletrônica, a infecção dos miócitos e, em seguida, a dos fusos neuromuscular e neurotendinoso, próximos do local da inoculação. A este envolvimento, segue-se o comprometimento do nervo periférico do membro infectado. Ainda através da microscopia eletrônica, os autores verificaram que nos nervos periféricos apenas os axônios suportam o desenvolvimento viral.

Em seguida, o vírus foi detectado no gânglio da raiz dorsal do segmento ipsilateral da medula lombar. Concluem que a via passiva centrípeta de passagem do vírus para o sistema nervoso central parece ser o axoplasma do nervo periférico. A partir do ponto de inoculação intramuscular, no membro posterior, conforme relatam os autores, o vírus chega aos neurônios da medula espinal lombar em 60 horas e progride rapidamente para o cérebro. Em seguida, pela via nervosa centrífuga, dirige-se para os olhos (retina e córnea), terminações periféricas associadas aos pelos, intestinos e camada medular das adrenais. É encontrado, ainda, no nariz e na boca, sendo que estas áreas parecem estar mais infectadas do que o epitélio da glândula salivar. O vírus pode ser detectado, também, no pâncreas, na gordura parda e no miocárdio.

BAER<sup>5</sup> (1972), inoculando o vírus numa concentração adequada, necessária para causar morte de cerca de 50% dos camundongos, entre 17 e 120 dias (procurando, pois, imitar a doença natural do homem), verificou que, se fosse feita a amputação da pata inoculada até 18 dias após a introdução do vírus no coxim plantar, esta operação possibilitaria salvar a vida dos animais. Isto indica que o vírus permanece no local de introdução, durante a maior parte do período de incubação.

### 3.1.2 - *Através da via hemática*

KOPROWSKI, BLACK e NELSEN<sup>41</sup> (1954), inoculando a amostra FLURY HEP no saco da gema de ovos embrionados de galinha, verificaram a presença do vírus (10 dias após) em concentração elevada, em todo o embrião. Na membrana cório-alantóide, na gema e nos fluídos amniótico e alantóide, ao contrário, a concentração do vírus era mais baixa.

KRAUSE<sup>42</sup> (1970) relata que, logo após a infecção, o vírus rábico é transportado pelo sangue, podendo ser detectado em diferentes órgãos, como o fígado, pulmão e rins.

ZUNKER<sup>67</sup> (1970), estudando a infecção rábica em ratos parabióticos, com circulação comum, porém sem conexão neural, transmitiu o vírus de um animal para outro. Todavia, no seu entender, deve ser admitida também a possibilidade da passagem de células retículo-endoteliais de descamação pela corrente circulatória.

### 3.2 - IMUNOPROTEÇÃO

De acordo com o WHO Expert Committee on Rabies<sup>16</sup> (1954), "desde a introdução por PASTEUR, em 1885, da vacinação profilática contra a raiva do homem, relativamente poucas inovações tem ocorrido neste campo". Esta observação tem pouco mais de 20 anos e, apesar dos métodos de estudos atuais, existem ainda muitos pontos obscuros ou controvertidos na literatura, quanto à patogenia e profilaxia da doença.

A bibliografia relativa a este tema é extensa e a simples menção dos trabalhos existentes seria fastidiosa; assim, estão citados aqueles que, direta ou indiretamente, julgamos pertinentes às nossas observações.

#### 3.2.1 - *Inoculação da vacina por diferentes vias*

Para o nosso objetivo, foram selecionados, na literatura, aqueles trabalhos que usaram duas vias principais de introdução do antígeno rábico: a intramuscular e intracerebral.

A via intramuscular é classicamente adotada para a aplicação de vacinas preparadas com vírus ativos modificados, enquanto que as vacinas inativadas podem ser inoculadas intramuscular ou subcutaneamente. Todavia, alguns autores especularam, através da inoculação intracerebral, especialmente com vacinas de vírus ativos modificados.

Para KUBES e GALLIA<sup>43</sup> (1944), existem dois tipos de anticorpos antirrâbicos: o anticorpo ou fator celular (cerebral) e o anticorpo sérico ou fator humoral. Estes autores sugerem que o anticorpo celular seria o mais específico, podendo aumentar, em relação ao sérico, quando da inoculação intracerebral da vacina. Verificaram que a atividade neutralizante "in vitro" do anticorpo cerebral apresentava-se constantemente menor do que a atividade do anticorpo humoral. Admitem que o nível neutralizante relativamente baixo do anticorpo cerebral, seria devido à sua localização intracelular, com dependência funcional do metabolismo das células. De acordo com os referidos autores, "as vacinas vivas induzem a títulos de anticorpo cerebral mais elevados do que aquelas preparadas com vírus inativado" (o grifo é nosso). Para eles, a prova de neutralização cerebral seria a verdadeira imagem da imunidade anti-rábica de um organismo.

KOPROWSKI e BLACK<sup>40</sup> (1954) não conseguiram evidenciar anticorpos no tecido cerebral de cobaias vacinadas intramuscularmente com o vírus FLURY LEP (baixa passagem), apesar de estar presente o anticorpo neutralizante sérico.

KOPROWSKI<sup>37</sup> (1954) observou, por outro lado, que o vírus FLURY HEP, quando introduzido intracerebralmente em camundongos com 14 ou mais dias de idade, induzia a uma "resistência" à inoculação do vírus rábico das quatro semanas após. Verificou, também, a existência de estreita correlação entre a presença de anticorpos circulantes e a resistência à infecção.

Continuando seus estudos, KOPROWSKI<sup>38</sup> (1971), estudou o papel da imunidade celular na proteção contra a raiva experimental. Preparou grupos de coelhos em parabiose, com circulação comum. Um animal de cada grupo foi vacinado contra a raiva e, em intervalos variados após a vacinação, um outro coelho do grupo foi separado, sendo ambos os animais "desafiados" com o vírus rábico patogênico. O autor observou que todos os animais vacinados, de cada grupo, sobreviveram após "desafio". Por outro lado, entre os animais não vacinados, somente resistiram aqueles que foram "desafiados" durante o estágio em parabiose, ou aqueles que tivessem sido separados 10 dias após a vacinação. Estes resultados sugerem uma participação da imunidade celular na proteção contra a infecção rábica. Os coelhos não vacinados, que foram separados no 10º dia após a vacinação, ou então os que foram separados dos vacinados, resistiram ao "desafio" viral patogênico, provavelmente mediante uma "transfusão" de anticorpos.

BAER, SHADDOCK e WILLIAMS<sup>8</sup> (1975) inocularam cães, via cisterna magna, com vacina inativada e com vacina com vírus atenuados, verificando que:

- 1º) no líquido cérebro-espinhal, houve desenvolvimento de anticorpos ao redor do 4º dia após a inoculação de qualquer uma das duas vacinas mencionadas. O título de anticorpos, induzido pela inoculação da vacina atenuada, foi aproximadamente quatro a cinco vezes superior;
- 2º) ocorria uma atividade neutralizante no tecido cerebral, apenas entre os cães inoculados com a vacina de vírus atenuados.

Segundo estes autores, em outra série de experiências, foram obtidos resultados indicativos que, apesar de que ambos os tipos de vacinas utilizadas (inativada e de vírus modificados) fossem capazes de induzir à formação de anticorpos e de interferon no líquido cérebro-espinhal, a cura ou o prolongamento do período de sobrevivência dos cães, cujo sistema nervoso central estava infectado, poderiam estar relacionados com fatores adicionais. Esta observação baseia-se na verificação de que a administração de vacina inativada, altamente concentrada, durante os primeiros sinais da doença, não somente falhou no sentido de prolongar o período da doença, como também encurtou-o acentuadamente. Em contraposição, a vacina de vírus atenuado mostrou tendências de promover o prolongamento do período de doença e afetou, radicalmente, a sintomatologia de alguns cães doentes.

Assim, os autores concluíram que a estimulação de células imunes competentes do cérebro, interferência ou outros fatores dependentes da replicação do vírus atenuado, foram os fatores críticos implicados no prolongamento do período de doença e, ocasionalmente, na cura dos animais.

### 3.2.2 - *Replicação viral nos tecidos do sistema nervoso central*

SCHWAB, FOX e CONWELL<sup>61</sup> (1954) mencionam que, no homem, a relação direta entre a dose vacinante e a resposta imunológica, indicaria que o vírus FLURY HEP não se multiplica de modo significativo no organismo.

FERNANDES, WIKTOR e KOPROWSKI<sup>24</sup> (1964) verificaram a propagação indefinidamente, do vírus fixo em culturas de células endoteliais de coelho, sem interferência na multiplicação celular. Estes autores denominaram o fenômeno de "relação endossimbiótica", e emitiram a hipótese segundo a qual, por um processo deste tipo, poderia ser explicada a prolongada persistência do vírus rábico nas células animais. Nestas condições, o vírus não causaria danos às células, a menos que esta relação fosse rompida através de mecanismos desconhecidos.

BELL, LODMELL, MOORE e RAYMOND<sup>12</sup> (1966) inocularam camundongos jovens, intraperitonealmente, com o vírus das ruas e com a vacina de vírus fixo preparada em tecido nervoso de camundongos, inativados pela luz ultravioleta. Nestas condições, os autores imaginam que, para um mesmo a

nimal, o título neutralizante cerebral de aproximadamente 1:10 do título sérico, sugeriria vacinação. Títulos cerebrais elevados, comparáveis aos encontrados no soro, seriam observados em animais que recuperaram-se de uma infecção rábica. Estes autores opinam, em seu trabalho, que linfócitos e células plasmáticas, encontrados no tecido nervoso e nas meninges dos animais infectados, seriam os fatores responsáveis pela produção local de anticorpos; acreditam que é necessária a infecção ativa do sistema nervoso central para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes cerebrais em altos títulos, pois camundongos sobreviventes sem sintomas, ordinariamente não os apresentam nas concentrações encontradas. Concluem, pois, que a infecção ativa - e não apenas a presença do vírus ativo - constitui o estímulo imunitário crítico. A relação inversa (aumento do título de anticorpos cerebrais e redução do título de vírus) demonstraria a ação do anticorpo na eliminação da infecção.

BARTH e JAEGER<sup>10</sup> (1967), inoculando intramuscularmente dose única ou doses múltiplas de amostra FLURY HEP em cães, não evidenciaram o vírus no cérebro, através da imunofluorescência, ou da inoculação do tecido cerebral em camundongos, em diferentes intervalos.

BROWN, DAVIS, MERRY e BECKNHAUER<sup>15</sup> (1967) verificaram que o vírus FLURY HEP desenvolvido em cultura de células renais de cão, quando inoculado intracerebralmente na mesma espécie, imunizava os animais contra o vírus das ruas. Concluíram que a imunidade adquirida pelos animais era devida à multiplicação do vírus em seus cérebros, sem lesar as células. Estes autores não comprovaram a presença do vírus no tecido cerebral e, tampouco, referiram-se à possibilidade da existência de algum tipo de imunidade local.

ATANASIU, FUENZALIDA, ACHA e SZYFRES<sup>3</sup> (1968) consideram que o vírus atenuado pode continuar ativo no organismo. Afirmam que, provavelmente, um mecanismo de infecção endossimbiótica celular o protegeria da ação neutralizante dos anticorpos e, assim, o vírus estimularia o organismo tardiamente.

RIBEIRO<sup>58</sup> (1970) verificou que a inoculação via sub-occipital do vírus HEP ativo, em cães, revelou-se totalmente inócua e que 90,4% dos a

normais inoculados resistiram à dose desencadeante de vírus das ruas. O nível de anticorpos sérico, induzido pela inoculação sub-ocipital, foi nítidamente superior àquele induzido pela vacinação intramuscular, apesar do volume de vacina inoculado ter sido seis vezes menor. Acredita o autor "loc. cit.;" que o vírus inoculado via sub-ocipital encontra no tecido nervoso melhores condições de multiplicação induzindo, conseqüentemente, a títulos de anticorpos séricos mais elevados (o grifo é nosso). Esse autor não encontrou relação entre os títulos de anticorpos circulantes e a resistência ao vírus de prova. Animais vacinados e que oito meses após não apresentavam anticorpos circulantes, resistiram perfeitamente à inoculação "desafiante". Não foram pesquisados, neste trabalho, vírus e imunidade celular do tecido cerebral.

SIKES, PEACOCK, ACHA, ARKO e DIERKS<sup>62</sup> (1971), trabalhando com cães, julgam que os vírus modificados mantêm por muito tempo o título de anticorpos circulantes, devido à sua multiplicação ou à manutenção do antígeno. Deste modo, estando o antígeno disponível, novos estímulos imunitários ocorreriam após a redução dos anticorpos.

ZLOTNIK e GRANT<sup>66</sup> (1973), inoculando camundongos intracerebralmente com o vírus fixo CVS, concluíram que índices neutralizantes cerebrais elevados são indicativos de infecção ativa. A verificação da persistência de lesões sub-agudas do sistema nervoso central, segundo estes autores, demonstra que a raiva pode ser curável e que a doença crônica é mediada por uma resposta de anticorpos. Relatam, outrossim, ter isolado o vírus do tecido cerebral durante a primeira semana após a inoculação.

FISCHMAN e STRANDBERG<sup>25</sup> (1973) obtiveram evidência direta de infecção abortiva no sistema nervoso central, através da inoculação intracere

rebral, em camundongos, do vírus FLURY HEP modificado. O vírus CVS, inoculado intraperitonealmente, não infectou, consistentemente, esses animais e, dos sobreviventes, não conseguiram isolar o vírus do tecido cerebral. Os autores não encontraram o vírus HEP no cérebro após a inoculação periférica. No entanto, os camundongos assim inoculados estavam solidamente imunes ao "desafio" periférico, porém não ao "desafio" intracerebral precoce pois, neste caso, a resistência foi muito pequena. Por outro lado o vírus FLURY HEP modificado inoculado intracerebralmente foi detectado no cérebro, por meio da imunofluorescência. Verificaram, ainda, o desaparecimento deste vírus do tecido cerebral, à medida que a taxa de anticorpos sanguíneos aumentava.

GRIBENCHA e SELIMOV<sup>28</sup> (1974) concluíram que os títulos mais elevados de anticorpos neutralizantes cerebrais, quando comparados aos encontrados no soro, indicaria imunidade induzida por infecção ativa do sistema nervoso central. Estes autores verificaram que, quando camundongos eram inoculados intraperitonealmente com o vírus das ruas e, em seguida, intracerebralmente com o vírus fixo, apresentavam títulos elevados de anticorpos séricos e cerebrais. Acreditam que o fato sugere infecção sub-clínica pelo vírus das ruas e que a inoculação intracerebral do vírus fixo, promoveria a elevação dos títulos de anticorpos.

KOPROWSKI<sup>39</sup> (1972) acredita que a resposta imune poderia estar envolvida na patologia da doença e, ainda, que a simples presença de concentrações elevadas de anticorpos, não constitui garantia de proteção. É essencial, para a proteção, a ocorrência de estímulo ativo do sistema celular-imune, pelo antígeno rábico, aumentando a população celular do sistema imune, mantendo, conseqüentemente, uma síntese constante de anticorpos que, em última instância, manteria as suas concentrações elevadas.

### 3.2.3 - Interferon

A ação protetora do INTERFERON contra o vírus rábico foi verificada pela sua administração em animais de laboratório, no momento ou logo após a inoculação do vírus<sup>22, 23, 25, 29, 31, 33, 55, 64</sup>.

WIKTOR, KOPROWSKI e RORKE<sup>65</sup> (1972) demonstraram que o vírus FLURY HEP, inoculado intracerebralmente em camundongos, induziu à formação

de interferon cerebral 14 horas após. A concentração máxima foi atingida no 3º - 4º dia, desaparecendo a partir do 7º dia. Por outro lado, estes autores encontraram interferon sérico a partir de sete horas após a inoculação, atingindo o ponto máximo na 10ª hora, deixando de ser detectado a partir de 48 horas após. Verificaram, ainda, que camundongos podiam ser protegidos contra o vírus das ruas quando inoculados com o vírus HEP até 24 horas após a exposição ao vírus patogênico. O mesmo resultado foi obtido em camundongos cuja resposta imune fora suprimida por irradiação. Nestas condições, concluem que a disseminação do vírus patogênico foi contida devido à rápida formação de interferon sangüíneo e cerebral.

FISCHMAN e STRANDBERG<sup>25</sup> (1973) inocularam o vírus HEP em camundongos pelas vias intravenosa e intracerebral e verificaram uma resistência precoce ao vírus rábico patogênico, quando este era inoculado intracerebralmente. Esta resistência foi verificada apenas nos animais vacinados intracerebralmente. Os autores relacionaram a proteção precoce à formação de interferon, que atuou eficazmente apenas nos primeiros dias após a inoculação indutora.

HO, NASH, MORGAN, ARMSTRONG, CARROL e POSTIC<sup>31</sup> (1974) verificaram que a administração do interferon, diretamente no líquido cérebro-espinhal de coelhos, não se mostrou totalmente eficaz. Acreditam que o vírus se multiplicaria no ponto de penetração e, assim, o sistema nervoso central seria atingido por grande número de partículas virais; dessa forma, a ação do interferon seria pouco pronunciada.

### 3.3 - CURA ESPONTÂNEA DA RAIVA

BELL, SANCHO, DIAZ e MOORE<sup>14</sup> (1972) produziram a raiva experimental em cães jovens, pela inoculação do vírus LEP intracerebralmente, seguida de inoculação intraperitoneal de vírus LEP ou vírus das ruas. Em 11 cães obtiveram os seguintes resultados: cinco cães ficaram doentes, dos quais três recuperaram-se entre quatro e 21 dias após o início dos sintomas de raiva. Os outros dois cães morreram 10 dias após o início primeiros sintomas. Verificaram assim, experimentalmente, a possibilidade de cura espontânea da raiva.

#### 4. SINOPSE DOS TRABALHOS ANALISADOS

#### 4. SINOPSE DOS TRABALHOS APRESENTADOS

A análise da literatura consultada e julgada de nosso interesse, forneceu-nos os seguintes dados:

- 1º) Parece não ocorrer viremia durante o período de incubação da raiva . No entanto, o vírus pode ser encontrado no sangue quando o animal a apresenta a sintomatologia clínica da doença.
- 2º) O vírus introduzido no tecido subcutâneo ou muscular, propaga-se centripetamente, pelas vias nervosas periféricas, até o sistema nervoso central. Neste tecido, encontrando as células eletivas, instala-se , multiplica-se e, em seguida, por meio de um sistema centrífugo, distribui-se pelos filetes nervosos, atingindo outros órgãos. A atividade virulenta, encontrada nesses órgãos, dependeria da quantidade de tecido nervoso neles existentes.
- 3º) A difusão por via sangüínea dos vírus rábicos modificados, parece que somente foi comprovada em embrião de galinha.
- 4º) A inoculação do vírus rábico modificado diretamente no sistema nervoso central de animais de laboratório, determina um estado de resis - tência precoce. Esta resistência estaria relacionada à produção de interferon no tecido cerebral. Após esta fase, evidencia-se o estado de imunidade, caracterizado pela presença dos anticorpos neutralizantes.
- 5º) Alguns autores, em trabalhos mais antigos, admitem a existência de anticorpo tecidual (cerebral), em nível inferior ao sérico, porém com especificidade superior.
- 6º) Para os autores que admitem a existência do anticorpo local, este seria, provavelmente, produzido por linfócitos e células plasmáticas , encontrados no tecido nervoso e nas meninges dos animais infectados.

- 7º) Parece que títulos elevados de anticorpos cerebrais somente são encontrados como decorrência de uma infecção ativa e não como conse -  
quência da simples presença do vírus no sistema nervoso central.
- 8º) A participação da imunidade celular na proteção contra a infecção rá  
bica tem sido investigada e parece ser de relevante importância.
- 9º) A cura espontânea da raiva tem sido observada, natural ou experimen  
talmente, em vários animais.
- 10º) Parece-nos lícito afirmar que foi demonstrada a possibilidade de e  
quilíbrio entre vírus rábico e células cultivadas "in vitro". Al  
guns autores aceitam a hipótese da existência de sistema semelhante  
no organismo vivo superior. Por este mecanismo, o vírus permanece -  
ria por tempo relativamente prolongado nas células do hospedeiro ,  
antes de iniciar a infecção clínica, que ocorreria após a ruptura  
daquele equilíbrio.
- 11º) Continua inexplicado o mecanismo de liberação do vírus das células  
infectadas nos casos de cura, bem como o da recuperação dos animais  
que apresentam sinais de resoluções inflamatórias celulares no sis  
tema nervoso central.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 - CONDIÇÕES TÉCNICAS COMUNS ÀS VÁRIAS PROVAS EFETUADAS

#### 5.1.1 - Esterilização

5.1.1.1 - *Material*: todo o instrumental utilizado nas sangrias, remoções de tecidos, inoculações, diluições, etc., foi previamente esterilizado em autoclave a 121<sup>o</sup> C, sob 15 libras de pressão, durante 20 a 30 minutos.

5.1.1.2 - *Soluções salinas*: foram esterilizadas em autoclave a 121<sup>o</sup> C, sob 15 libras de pressão, durante 30 minutos.

5.1.1.3 - *Soro equino*: foi esterilizado por filtração em placas tipo Seitz EKS 1, com pressão positiva.

#### 5.1.2 - Vacina FLURY HEP - Doses: a vacina foi preparada sob 2 apresentações:

5.1.2.1 - *Dose individual para cães*: 1,5 ml de suspensão virulenta, liofilizada contendo 66% de tecidos. A ressuspensão foi feita em 3 ml de água destilada estéril.

5.1.2.2. - *Doses múltiplas para cães*: 25 ml de suspensão virulenta, liofilizada contendo 79,2% de tecidos. A ressuspensão foi feita em 60 ml de água destilada. Nestas condições o frasco continha 20 x 3 ml, ou sejam, 20 doses para cães.

### 5.1.3 - Diluição dos vírus

As diluições do vírus-vacina e vírus de provas, foram feitas em solução salina fisiológica (solução a 0,85% p/v de NaCl p.a.), adicionada de 2% v/v de soro normal de cavalo, inativado e esterilizado. Concionamos chamar esta solução de "diluyente", que foi resfriado a 4° C, sendo assim mantido até o momento de sua utilização.

### 5.1.4 - Temperatura de manutenção dos vírus durante as operações

Os frascos contendo as vacinas e os vírus de provas foram mantidos imersos em mistura de água e gelo, durante todas as fases operacionais.

### 5.1.5 - Vírus de provas

#### 5.1.5.1 - Amostra PV: vírus fixo em suspensão-estoque a 1:5 em líquido de

Bedson, que apresenta a seguinte composição:

Água destilada .....	400	ml
Glicerina neutra .....	500	ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O - sol. M/15 .....	85,5	ml
KH <sub>2</sub> .PO <sub>4</sub> sol. M/15 .....	13,5	ml
pH ajustado para 7.5 - 7.6		

A suspensão-estoque consistiu de cérebros de cobaias inoculadas pela via intramuscular com a amostra, triturados com assepsia; esta suspensão foi mantida em congelador a -70° C.

#### 5.1.5.2 - Amostra CVS: vírus fixo em suspensão-estoque a 1:5 em líquido

de Bedson. A suspensão-estoque consistia de cérebros de camundongos adultos, inoculados pela via intracerebral com a amostra, triturados com assepsia; a manutenção também foi feita em congelador a -70° C.

5.1.6 - *Soro normal de cavalo, inativado e esterilizado*

Preparado a partir de sangue de cavalo não vacinado contra raiva. O sangue foi obtido por punção da veia jugular. Após a coagulação e mantendo-se o sangue em geladeira a 4° C durante 24 horas, o soro foi separado por decantação e centrifugado a 1.500 rpm durante 20 minutos, à temperatura ambiente de 24° C.

A inativação foi feita em banho-maria a 56° C durante 30 minutos. O soro foi distribuído em frascos esterilizados, contendo 10 ml cada um, sendo os frascos armazenados a -70° C até o momento do uso.

5.1.7 - *Provas de esterilidade do soro ou das soluções*

Semeadura de 1 ml do material-problema em dois tubos contendo, cada um, 40 ml de meio de cultura à base de ácido tioglicólico\*. Um dos tubos foi incubado a 36° C e o outro a 30° C, ambos durante sete dias.

5.1.8 - *Sinais e sintomas de raiva em animais inoculados experimentalmente*

Foram considerados, como sinais característicos: o pelo eriçado, a inapetência, a incoordenação dos movimentos, as paresias e paralisias dos membros.

5.1.9 - *Destino dos animais utilizados nas provas*

Os animais sobreviventes, inclusive as mães, no caso de camundongos em amamentação, foram sacrificados por inalação de clorofórmio e incinerados imediatamente após o término das provas. Todos os animais mortos durante as provas foram imediatamente incinerados.

5.2 - *ANIMAIS DE LABORATÓRIO*

De acordo com a metodologia constante na literatura, foram utilizadas três espécies de animais:

5.2.1 - *Cobaias, machos brancos de 400 ± 20 g*

5.2.2 - *Camundongos*

5.2.2.1 - *machos, brancos, jovens de 14 ± 1 g*

---

\* Bacto Thioglycollate Medium (B363), DIFCO Laboratories

5.2.2.2 - lactentes com quatro a seis dias, não levando-se, em conta, os seus sexos.

5.2.3 - *Hamsters*, machos de  $200 \pm 20$  g

Os animais foram obtidos sempre do mesmo biotério\*de criação; as dietas alimentares não variaram durante as provas.

Após a seleção por espécie, sexo, peso ou idade, de modo a atender às especificações das provas, os animais selecionados foram misturados numa caixa, de onde foram retirados ao acaso.

Os camundongos lactentes foram mantidos com as respectivas mães.

Os animais experimentais, após serem inoculados, foram sempre mantidos em isolamento.

5.2.4 - *Acomodação e manutenção*

5.2.4.1 - *Cobaías*: em gaiolas com cinco animais, alimentados com ração granulada, capim e água "ad libitum".

5.2.4.2 - *Camundongos*: os adultos jovens foram mantidos em caixas com dez animais, alimentados com ração granulada e água "ad libitum".

5.2.4.3 - *Camundongos recém-nascidos*: crias de cinco a seis animais, em caixas, foram mantidos com as mães. Estas foram alimentadas com a mesma dieta para camundongos já mencionada.

5.2.4.4 - *Hamsters*: em gaiolas com cinco animais, alimentados com ração granulada e água "ad libitum".

---

\* Pfizer Química Ltda.

#### 5.2.5 - *Verificação dos sintomas*

As verificações foram realizadas diariamente, pela manhã e à tarde. Foram anotados sinais, sintomas e mortes. Os períodos de observação variaram segundo o tipo de prova e serão mencionados especificamente.

### 5.3 - INOCULAÇÕES E SANGRIAS DOS ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Vias de inoculações utilizadas: intramuscular, intracerebral e intracardíaca.

#### 5.3.1 - *Via intramuscular*

Utilizada para cobaias, camundongos e hamsters. O material foi inoculado profundamente, no músculo gastrocnêmio, próximo ao osso e aos troncos nervosos. Foram usadas agulhas 20 x 6 para as cobaias e para os hamsters, e 10 x 5 para os camundongos.

#### 5.3.2 - *Via intracerebral*

As inoculações foram feitas num ponto equidistante entre o olho e a orelha direitos, sobre u'a linha imaginária ligando aqueles dois órgãos. Esta via foi utilizada para a introdução do "inoculum" em cobaias, camundongos e hamsters, após a prévia perfuração da lâmina óssea dos seus crânios. Para as cobaias, foram utilizadas agulhas de 10 x 5, introduzidas 5 mm em suas caixas cranianas; para os camundongos e hamsters, foram usadas agulhas 10 x 3, que foram introduzidas 2mm. O material foi injetado lentamente, sendo a agulha mantida no local durante alguns segundos, para evitar refluxo de líquidos.

#### 5.3.3 - *Via intracardíaca*

Foi utilizada para cobaias. A região torácica lateral esquerda foi desinfetada com tintura de iodo e, por palpação, foi localizado o coração. Uma agulha de 30 x 9 foi introduzida no espaço intercostal, até atingir uma das cavidades cardíacas, o que era constatado pela aspiração de sangue. Nesse local, o material foi inoculado lentamente. Após as inoculações, todos os animais foram mantidos em observação para, na eventualidade de morte traumática durante os primeiros 60 minutos, inocular um novo animal substituto. Foram consideradas inespecíficas as mortes ocorridas até 72 ho

ras após as inoculações.

#### 5.3.4 - *Sangrias*

5.3.4.1 - *Cobaias*: sangradas por punção cardíaca, obtendo-se 2 ml do sangue de cada animal. A coagulação ocorreu à temperatura de 25° C durante 30 minutos e, em seguida, os tubos eram resfriados a 4° C. Aproximadamente 24 horas após, o soro, resfriado e decantado, era centrifugado a 1.500 rpm durante 15 minutos e congelado a -70° C, sendo mantido nesta temperatura até o momento de seu uso. O descongelamento foi feito à temperatura de 25° C.

5.3.4.2 - *Camundongos*: foram anestesiados em jarra contendo algodão embebido em clorofórmio. O tórax dos animais era aberto e, com seringa equipada com agulha 10 x 5, era aspirado 0,5 ml do sangue de cada animal. A coagulação ocorria em tubos capilares, a 25° C durante 15 minutos. Em seguida, os tubos eram resfriados a 4° C durante uma noite. O soro foi aspirado, então, com seringa de 0,25 ml e agulha 10 x 5, obtendo-se, de cada animal, 0,25 ml. Os soros, misturados e centrifugados a 1.500 rpm durante 15 minutos, eram congelados a -70° C, sendo mantidos nesta temperatura até o momento de seu uso. O descongelamento era feito a 25° C.

#### 5.4 - *VÍRUS RÁBICOS*

Em nossas observações, foram utilizados três tipos de vírus:

Vírus rábico modificado, amostra FLURY HEP (High Egg Passage, ou de alta passagem em ovos embrionados de galinha): esta amostra foi isolada, em 1939, do tecido nervoso e de glândulas salivares e lacrimais de uma criança acometida de raiva (GASPARINI e CIACCIO<sup>27</sup>, (1971)).

O vírus foi adaptado ao tecido cerebral de pintos de 1 dia de idade e cultivado, nestas condições, até a 136ª. passagem. Em seguida, foi adaptado ao ovo embrionado de sete dias de idade e, nestas condições, cultivado até a 180ª. passagem. (GASPARINI e CIACCIO "loc.cit.").

A amostra FLURY HEP, usada por nós, com 209 passagens, foi utilizada nas vacinações periféricas ou intracerebrais de cobaias, camundongos e hamsters.

Amostra CVS (Challengee Virus Standard): vírus fixo derivado da amostra original de Pasteur. Trata-se de amostra-padrão, cujas variações de patogenicidade conservam-se dentro de limites aceitáveis. O vírus CVS é fornecido pela Organização Mundial da Saúde.

A amostra CVS foi usada como vírus patogênico nas provas de proteção em camundongos e, como antígeno, nas provas de soro e cerebro-neutralização e imunofluorescência.

Amostra PV: vírus fixo derivado da amostra original de Pasteur, fornecida pelo Grupo Estadual de Produção Animal, do Ministério da Agricultura de Belo Horizonte. A amostra PV foi usada nas provas de proteção, realizadas em cobaias e hamsters.

#### 5.4.1 - *Obtenção do vírus FLURY HEP modificado*

A amostra original foi fornecida, sob a forma liofilizada pela "American Type Culture Collection", identificada como VR-139, com 201 passagens em ovos embrionados de galinha com sete dias de incubação. Após a ressuspensão em 5 ml de solução salina, 0,2 ml foram inoculados via saco da gema, em ovos embrionados de galinha com sete dias de incubação.

Técnica de obtenção: os ovos embrionados, pesando em média 50 g, eram examinados ao ovoscópio para eliminar aqueles que apresentavam embriões mortos, deficientemente vascularizados ou, ainda, sem movimentação ativa.

Tendo sido delimitado o contorno da câmara de ar, as cascas dos ovos selecionados foram desinfetadas com tintura de iodo. Aproximadamente no centro do polo da câmara de ar, com o auxílio de estilete esterilizado, foram abertos os orifícios, com diâmetro suficiente para a posterior penetração de uma agulha de 1 x 20 mm, usada na inoculação do material.

Por meio de seringa automática (B-D - Cornwall), cada ovo foi inculado no saco da gema, com a suspensão original mencionada, evitando-se o contato da agulha com o embrião ou com vasos sangüíneos.

Imediatamente após a inoculação, os orifícios foram fechados com colódio elástico. Os ovos voltaram à incubadora, a 37° C, onde permaneceram durante nove dias.

Coleta do material virulento: pela ovoscopia, os ovos foram examinados, sendo eliminados aqueles cujos embriões estivessem mortos ou mal desenvolvidos. A seguir, as cascas foram desinfetadas com tintura de iodo e cortadas com tesoura, seguindo a linha demarcatória da câmara de ar. Os embriões foram pinçados na altura do pescoço. Após serem separados das gemas, fluidos e tecidos extra-embriônicos, os embriões foram imediatamente colocados em recipientes de aço inoxidável mergulhados em banho de gelo, determinando-se o peso do material e, a seguir, foram armazenados a -50° C até o momento do seu processamento.

Nossa experiência particular tem demonstrado que, nestas condições, o título infectante pode, no máximo, ser reduzido de 1 log após um período de seis meses. Todavia, o processamento final sempre foi feito antes de transcorridos dois meses da coleta.

Processamento: a uma mistura de volumes iguais de soluções de glicocola a 12% p/v e glicose a 6% p/v, em água destilada, foi adicionada uma quantidade de embriões suficiente para a obtenção de uma concentração equivalente a 66% p/v.

Em liquidificador esterilizado e resfriado, os embriões foram triturados durante dez minutos, evitando-se que o material sofresse um aquecimento acima do limite de 1° C. Assim, obtivemos uma suspensão de tecido grosseiramente homogênea, à qual foram adicionados 0,00023 g de oxitetraci<sup>l</sup>ina\*, 0,00028 g de cloranfenicol\*\* e 0,000015 g de Micostatin\*\*\*, por ml de suspensão.

A suspensão, mantida em câmara fria a 4° C durante 30 minutos ,

---

\* Pfizer  
\*\* Lepetit  
\*\*\* Squibb

com agitação periódica, foi centrifugada a 1.500 rpm, durante 20 minutos, em centrífuga refrigerada (5° C).

Distribuímos 25 ml do sobrenadante em cada frasco e cada um destes foi estocado a -70° C. Este material constituiu a semente-mãe para a produção da vacina, que foi preparada, essencialmente, através da mesma técnica descrita para a semente, exceto quanto ao equipamento, em razão dos volumes maiores processados. A suspensão de vacina, distribuída em frascos, foi liofilizada e estocada a 5° C, podendo ser utilizada enquanto o título fosse igual ou superior a  $10^{-3.3} \text{DL}_{50}/0,03 \text{ ml}$ , determinado em camundongos lactentes (KAPLAN e KOPROWSKI<sup>36</sup>, 1973).

#### 5.4.1.1 - *Provas efetuadas com a vacina*

##### a) Prova prévia de esterilidade: antes

da liofilização, 5 ml de suspensão foram semeados em dois frascos contendo 300 ml de meio de cultura à base de ácido tioglicólico. Os frascos foram incubados durante dez dias, um a 32° C e o outro a 36° C. Um terceiro frasco, com 200 ml de meio líquido de Sabouraud\* foi semeado com 5 ml da vacina e incubado a 25° C durante 14 dias. Os meios foram examinados diariamente a partir do 3º dia de incubação.

##### b) Prova de segurança bacteriana: as

vacinas anti-rábicas para uso veterinário, avianizadas, não requerem esterilidade, admitindo-se até 100 colônias de bactérias não patogênicas por dose. Nestas condições, quando a prova prévia de esterilidade acusava contaminação, 0,1 ml de vacina reconstituída era espalhado, por meio de uma alça de Drigalsky sobre placas de Petri com Ágar-Tryptose\*\*; estas eram incubadas, durante 72 horas, a 36° C. Após o crescimento, as colônias eram contadas.

A partir do frasco contendo meio de tioglicolato com eventual crescimento (prova prévia de esterilidade), eram feitos dois repiques de 0,5 ml para 40 ml do mesmo meio de cultura, sendo um dos tubos incubado a 32° C e, o outro, a 36° C.

---

\* Bacto Sabouraud Liquid Medium (B382) DIFCO Laboratories

\*\* Bacto Tryptose Agar (B64) DIFCO Laboratories

No terceiro dia de incubação, 10 camundongos de  $20 \pm 2$  g eram inoculados subcutâneamente, com 0,5 ml de cada uma das culturas e observados durante sete dias. A contaminação era considerada não patogênica desde que nove camundongos sobrevivessem durante o período de observação.

Eram ainda inoculados, subcutâneamente, oito camundongos de  $20 \pm 2$  g com 0,5 ml de vacina reconstituída (3 ml de diluente / dose canina), admitindo-se a morte de um animal do lote em sete dias de observação ( KAPLAN e KOPROWSKI, "loc.cit".).

c) Prova para a presença de *Salmonella*  
sp: efetuada antes da adição dos antibióticos, por semeadura do material triturado em meio de Selenito\* e, posteriormente, em meios seletivos e diferenciais como: Agar McConckey\*\*, Agar SS\*\*\*, Tríplice Açúcar-Ferro\*\*\*\*.

Em caso de dúvida quanto à sua espécie, a bactéria isolada deveria ser submetida às provas sorológicas de identificação.

d) Prova de ausência de patogenicidade do vírus rábico: de acordo com os conceitos básicos, a amostra FLURY HEP não é patogênica para camundongos de 15 g quando inoculada intracerebralmente. Assim, após a liofilização de cada lote de vacina, o material de dois frascos contendo uma dose canina era ressuspensão, cada um, em 3 ml de água destilada estéril, conservada a  $4^{\circ}$  C. De cada um dos frascos eram retirados 1,5 ml e adicionados 7 ml de água destilada estéril a  $4^{\circ}$  C. Desta diluição, considerada  $10^{-1}$ , era preparada a diluição  $10^{-2}$ , com "diluente" a  $4^{\circ}$  C.

Dez camundongos de  $14 \pm 1$  g eram inoculados intracerebralmente com 0,03 ml da diluição  $10^{-2}$  e observados durante 21 dias, a partir do 3º dia. Não ocorreram sintomas ou mortes devidos ao vírus rábico.

---

\* Bacto Selenite Broth (B275) DIFCO Laboratories

\*\* Bacto McConckey Agar (B75) DIFCO Laboratories

\*\*\* Bacto SS Agar (B74) DIFCO Laboratories

\*\*\*\* Bacto Tríplice Sugar Iron Agar (B265) DIFCO Laboratories

e) Determinação da DL<sub>50</sub> em camundongos:  
segundo

KAPLAN e KOPROWSKI, "loc. cit.", a amostra FLURY HEP é patogênica para camundongos com quatro a seis dias de idade, quando inoculada intracerebralmente.

Técnica: após a liofilização do lote de vacina, o conteúdo de dois frascos, tomados ao acaso, era ressuspensado, cada um, em 3 ml de água destilada estéril, mantida a 4<sup>o</sup> C (uma dose canina). De cada frasco eram retirados 1,5 ml da suspensão e adicionados a 7 ml de "diluyente" a 4<sup>o</sup> C. Esta foi considerada a diluição 10<sup>-1</sup>, a partir da qual foram feitas as seguintes, até 10<sup>-7</sup>.

Dessas diluições inoculavam-se 0,03 ml, intracerebralmente, em cada um de seis camundongos de quatro a seis dias de idade, pertencentes à mesma cria. Os animais eram observados durante 21 dias, duas vezes ao dia, considerando-se específicas as mortes ocorridas a partir do 3<sup>o</sup> dia, desde que acompanhadas dos sintomas de raiva. A prova era considerada válida se até o 3<sup>o</sup> dia após a inoculação, sobrevivessem pelo menos cinco animais de cada grupo.

Nesta oportunidade e em todos os demais experimentos em que houve a necessidade de ser calculada a DL<sub>50</sub>, optamos pelo método de REED e MUENCH<sup>56</sup> (1938).

f) Prova final de esterilidade: efetuada com a mesma técnica e critério usados na prova prévia, ítem a.

g) Prova de proteção em cobaias: dez cobaias de 400 ± 20 g foram vacinadas intramuscularmente. Decorridos 21 dias, todos os animais, além de cinco controles idênticos não vacinados, foram inoculados, intramuscularmente, com o vírus fixo, amostra PV.

Técnica: dois frascos de vacina liofilizada eram misturados e homogeneizados. Do total, eram retirados 3 ml e adicionados a 17 ml de "diluyente". Nestas condições, era obtida uma suspensão, a 5% de teci-

dos infectados com a mostra FLURY HEP, partindo-se da concentração de 33% existente na vacina.

Dez cobaias, isoladamente, foram inoculadas com 0,25 ml dessa vacina, injetada profundamente, no músculo gastrocnêmio.

No 21º dia, todas as cobaias, inclusive as controles, eram inoculadas, profundamente, no músculo gastrocnêmio, com 0,5 ml de diluição de vírus PV\*, duas vezes menor do que a diluição que, em provas prévias, houvesse matado no mínimo 80% das cobaias inoculadas nas mesmas condições.

Os animais eram observados durante 21 dias, sendo anotados os sinais e as mortes características. A vacina era considerada satisfatória quando protegia 70% dos vacinados, contra 80% de mortes entre os animais controles, no mínimo.

A prova era considerada válida quando no mínimo sete cobaias vacinadas sobreviviam sem sintomas até o final da observação.

n) Prova de vácuo e umidade residual:

após a liofilização, o vácuo foi verificado por passagem de corrente de alta frequência.

A umidade residual era verificada pelo método de KARL-FISCHER<sup>63</sup> (1965), não tendo sido superior a 3%.

A vacina era, então, armazenada a 4º C.

---

\* A patogenicidade do vírus fixo de prova foi considerada satisfatória quando a inoculação, via intramuscular (músculo gastrocnêmio), de 0,5 ml da diluição a 1:80 em "diluyente" matava, no mínimo, quatro entre cinco cobaias de 400 ± 20 g, em 21 dias.

#### 5.4.2 - Obtenção dos vírus de provas CVS e PV

Amostra CVS: obtida em cérebros de camundongos

Técnica: Camundongos normais, pesando  $20 \pm 2$  g, eram inoculados profundamente, no músculo gastrocnêmio, com 0,3 ml de suspensão de tecido nervoso de camundongos, infectados com o vírus CVS, diluído em "diluíente" a  $10^{-3.0}$ .

Cinco a dez dias após, os animais apresentaram-se em fase pré-agônica ou agônica, sendo sacrificados por inalação de clorofórmio; os cérebros foram, então, colhidos e pesados.

Ao total de material cerebral obtido, era adicionado líquido de Sedson a  $4^{\circ}$  C, suficiente para obter-se uma suspensão a 20% p/v. O material era triturado e homogeneizado em triturador BELLCO. As partículas grosseiras eram separadas por centrifugação a  $5^{\circ}$  C, 20 minutos a 1.000 rpm; 2 ml do sobrenadante eram colocados em frascos e congelados a  $-70^{\circ}$  C.

Prova de esterilidade bacteriana: de um frasco apanhado ao acaso, foi semeado 1 ml em cada um de dois tubos contendo 40 ml de meio à base de ácido tioglicólico; os tubos foram incubados, durante sete dias, a  $36^{\circ}$  C e a  $32^{\circ}$  C, respectivamente.

Amostra PV: obtida em cérebros de cobaias.

Técnica: cobaias de  $380 \pm 20$  g eram inoculadas com 0,3 ml de tecido nervoso de animais da mesma espécie infectados com o vírus PV, diluído em "diluíente" a  $10^{-2.0}$ . A inoculação foi feita, profundamente, no músculo gastrocnêmio.

Os animais apresentaram-se em fase pré-agônica ou agônica entre o 7º e 10º dia após a inoculação.

As demais fases da preparação foram feitas exatamente como foi mencionado em relação à amostra CVS.

#### 5.4.3 - *Titulação dos vírus*

Realizamos três tipos de titulações, segundo as necessidades das experiências:

##### 5.4.3.1 - *Titulação do vírus FLURY HEP modificado e liofilizado*

Técnica: O material de cada um de dois frascos, contendo uma dose de vacina para cães (3 ml de suspensão a 33%), foi ressuspenso em 3 ml de água destilada estéril a 4° C.

De cada frasco, foram retirados 1,5 ml, misturados e adicionados a 7 ml de "diluyente". Esta diluição foi considerada como  $10^{-1}$ , a partir da qual, com o "diluyente", foram preparadas as seguintes, de razão 10, até  $10^{-7}$ .

Seis camundongos, com quatro a seis dias de idade, foram inoculados, intracerebralmente, com 0,03 ml de cada diluição.

As mortes eventuais, ocorridas até o 3º dia após a inoculação, foram consideradas inespecíficas. A prova deveria ser repetida caso ocorresse, nesse período, mais do que uma morte em cada grupo de seis animais.

Os animais foram observados durante 21 dias, duas vezes por dia, quanto a sinais, sintomas e mortes, tendo sido calculada a  $DL_{50}$  da suspensão do vírus.

##### 5.4.3.2 - *Titulação do vírus CVS*

Técnica: foi considerada como inicial, a diluição a 1:5 (item 5.4.2 - Obtenção do vírus CVS), a partir da qual foram feitas as diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-9}$ , com a mesma técnica descrita para a titulação do vírus FLURY HEP modificado. A única exceção é que, neste caso, foram utilizados camundongos jovens, de  $14 \pm 1$  g.

5.4.3.3 - *Titulação do vírus CVS para soro-neutralização*

Técnica: foi usada a mesma técnica descrita para a titulação do vírus CVS (5.4.3.2), exceto que, após a preparação das diluições, os tubos foram incubados a 36° C, durante 90 minutos.

5.5 - **PROVAS DE PROTEÇÃO**

5.5.1 - *Vacina FLURY HEP liofilizada (vírus modificados)*

Nestas provas utilizamos três espécies de animais: cobaia, camundongo, e hamster.

a) Provas em cobaias

1a.) Vacinação intramuscular: foi usada a técnica clássica descrita por KAPLAN e KOPROWSKI<sup>36</sup> (1973).

2a.) Vacinação intracerebral: a vacina liofilizada foi reconstituída com água destilada estéril, na proporção de 3 ml por dose canina e, em seguida, diluída, de modo a conter 5% de tecidos (concentração original: 33% de tecidos).

Cobaias de 400 ± 20 g foram inoculadas com 0,25 ml da diluição, intracerebralmente.

No 30º dia após a vacinação, todas as cobaias - e pelo menos cinco idênticas, usadas como controles - foram "desafiadas" pela inoculação do vírus fixo, amostra PV.

A amostra PV foi diluída em "diluyente", de modo a conter duas vezes mais vírus do que o necessário para matar pelo menos 80% de cobaias idênticas, tal como foi verificado em provas prévias. Em geral, eram usadas as diluições a 1:20 ou 1:40. As inoculações foram realizadas no músculo gastrocnêmio de cada cobaia, através da injeção de 0,5 ml da diluição adequada.

Todos os animais foram observados durante 21 dias, considerando-se específicas as mortes ocorridas a partir do 4º dia da inoculação "desafiante", desde que houvessem demonstrado os sintomas de raiva.

3a.) Vacinação intracardíaca: Foi usada a mesma técnica e critérios descritos no item a.2a., exceto quanto à via de inoculação.

b) Provas em camundongos

1a.) Vacinação intramuscular: da vacina reconstituída - como mencionado no item a.2a. - diluída a  $10^{-2}$ , tomaram-se 0,3 ml, que foram inoculados profundamente, no músculo gastrocnêmio de camundongos com  $20 \pm 2$  g de peso.

Dez camundongos idênticos, no mínimo, foram reservados para controle.

No 21º dia após à vacinação, todos os animais foram inoculados com o vírus de prova CVS, como segue:

Título do vírus CVS em camundongos de  $14 \pm 1$  g: igual ou maior que  $10^{-7}/0,03$  ml. Em "diluyente", este vírus foi diluído a  $10^{-6}$ .

Cada camundongo foi inoculado, intracerebralmente, com 0,03 ml da diluição a  $10^{-6}$ .

Os animais foram observados durante 21 dias, considerando-se específicas as mortes ocorridas a partir do 3º dia, com sintomas prévios de raiva.

2a.) Vacinação intracerebral: foram usadas as mesmas técnicas e critérios descritos no item b.1a., exceção feita quanto à dose vacinante que, neste caso, tinha o volume de 0,03 ml, contendo 3,3% de tecidos.

c) Provas em hamsters

1a.) Vacinação intramuscular: hamsters de  $190 \pm 10$  g receberam inoculações, profundamente no músculo gastrocnêmio, de 0,25 ml de vacina contendo 5% de tecidos. A vacina foi reconstituída e diluída

conforme descrito no ítem a.2a.(provas em cobaias, vacinação intracerebral).

No mínimo cinco hamsters idênticos foram reservados para controle.

No 21º dia após a vacinação, em todos os animais, promoveu-se a inoculação de 0,5 ml do vírus fixo PV, injetado no músculo gastrocnêmio, profundamente. Esta amostra foi diluída em "diluyente" de modo a conter duas vezes mais vírus que o necessário para matar 80% de hamsters idênticos, verificado em provas prévias. Em geral, usamos a diluição a 1:800.

Todos os animais foram observados durante 21 dias, considerando-se específicas as mortes ocorridas a partir do 4º dia da inoculação "desafiante", desde que esses animais exibissem os sintomas típicos da raiva.

2a.) Vacinação intracerebral: foi realizada em hamsters de  $190 \pm 10$  g, através da inoculação intracerebral de 0,03 ml de vacina contendo 3,3% de tecido.

A vacina foi reconstituída e diluída tal como foi descrito no ítem a.2a.(provas em cobaias, vacinação intracerebral).

No 21º dia após a vacinação todos os animais - e pelo menos cinco controles idênticos - foram "desafiados" pela inoculação profunda, no músculo gastrocnêmio, de 0,5 ml de vírus fixo, amostra PV. Esta amostra foi diluída em "diluyente", de modo a conter duas vezes mais vírus do que o necessário para matar no mínimo 80% dos hamsters idênticos, verificado em provas prévias. Em geral, usamos a diluição a 1:800.

Todos os animais foram observados durante 21 dias, considerando-se específicas as mortes ocorridas a partir do 4º dia da inoculação "desafiante", desde que houvessem demonstrado os sintomas de raiva.

#### 5.5.2 - Vacina tipo Fuenzalida\*

Esta vacina foi preparada a partir do desenvolvimento do vírus fixo em cérebro de camundongos recém-nascidos; esse vírus foi inativado por radiação ultra-violeta. A vacina não foi adicionada de fenol,

---

\* Sintex do Brasil

como é feito normalmente, objetivando excluir as possibilidades de reações, quando inoculada intracerebralmente.

d) Provas em cobaias

1a.) Vacinação intramuscular: vacina tipo Fuenzalida, título em camundongos de  $14 \pm 1$  g, antes da inativação:  $10^{-5,13}$  / 0,03 ml.

A vacina inativada foi diluída em "diluyente" de modo a conter 10.000 partículas virais em 0,1 ml, em relação ao título inicial. Desta diluição, 0,1 ml foi inoculado, profundamente, no músculo gastrocnêmio de cobaias com  $400 \pm 20$  g de peso.

No 30º dia após a vacinação, todas as cobaias - e pelo menos cinco idênticas reservadas para controle - receberam inoculações no músculo gastrocnêmio, profundamente, de 0,5 ml de suspensão, em "diluyente", de vírus PV. Esta suspensão continha duas vezes mais vírus do que o necessário para matar no mínimo 80% de cobaias, verificado em provas prévias. Em geral usamos diluições a 1:20 ou a 1:40.

Todos os animais foram observados durante 21 dias, considerando se específicas as mortes ocorridas a partir do 4º dia da inoculação "desafiante", desde que houvessem demonstrado os sintomas de raiva.

2a.) Vacinação intracerebral: foram utilizadas as mesmas técnicas e os critérios descritos no item d.1a., exceto quanto à via de inoculação da vacina.

5.5.3 - *Vacina FLURY HEP inativada*

e) Provas em camundongos

1a.) Vacinação intramuscular: foi usada uma vacina com título de  $10^{-4,5}$ /0,03 ml, determinado, antes da inativação do vírus; para esta finalidade, utilizaram-se camundongos de quatro a seis dias de idade. Essa vacina foi reconstituída em 3 ml de água destilada estéril (uma dose canina).

A suspensão foi diluída a 1:10 em "diluyente" e inativada a 56° C, durante 60 minutos.

Após a inativação, a vacina foi diluída a 10<sup>-1</sup> em "diluyente", e 0,03 ml desta diluição foram inoculados intracerebralmente em 24 camundongos de quatro a seis dias de idade.

Os animais não apresentaram sintomas ou mortes atribuíveis à raiva, durante os 21 dias de observação.

Camundongos de 20 ± 2 g foram inoculados com 0,3 e 0,03 ml de vacina diluída em "diluyente", de modo a conter 10.000 partículas virais em 0,03 ml. A inoculação foi realizada, profundamente, no músculo gastrocnêmio.

Dez camundongos idênticos foram reservados para controle.

Após o 21º dia, todos os camundongos foram inoculados com o vírus de prova CVS, como segue:

Título do vírus CVS, em camundongos de 14 ± 1 g, igual ou maior do que 10<sup>-7</sup>/0,03 ml. Em "diluyente", este material foi diluído a 10<sup>-6</sup>.

Cada camundongo foi inoculado, intracerebralmente, com 0,03 ml da diluição a 10<sup>-6</sup>.

Os animais foram observados durante 21 dias, considerando-se inespecíficas as mortes ocorridas até o 3º dia após a inoculação.

Os sinais, sintomas e mortes foram anotados, sendo calculadas as porcentagens de sobreviventes e de mortes entre os vacinados e os controles respectivamente.

2a.) Vacinação intracerebral: Foram usados a mesma técnica e critérios descritos no item e.1a., exceto quanto à dose vacinante que, neste caso, foi de 0,03 ml.

#### 5.5.4 - Vacina tipo Fuenzalida

##### f) Provas em camundongos

1a.) Vacinação intramuscular: a vacina tipo Fuenzalida, cujo título da suspensão dos vírus antes da sua inativação, era  $10^{-5.1}/0,03$  ml para camundongos de  $14 \pm 1$  g, foi diluída em "diluyente" de modo a conter 10.000 partículas virais em 0,03 ml.

Grupos de camundongos foram inoculados com doses diferentes da vacina (0,3 e 0,03 ml), profundamente, no músculo gastrocnêmio.

Após 21 dias, todos os animais - e pelo menos dez controles i dênticos - foram inoculados com o vírus de prova CVS, como segue:

Título do vírus CVS em camundongos de  $14 \pm 1$  g, igual ou maior do que  $10^{-7}/0,03$  ml; este material foi diluído a  $10^{-6}$ , no "diluyente".

Cada camundongo foi inoculado, intracerebralmente, com 0,03 ml da diluição  $10^{-6}$ .

Os animais foram observados durante 21 dias, considerando-se i nespecíficas as mortes ocorridas até o 3º dia, com sintomas prévios de rai va.

2a.) Vacinação intracerebral: foram usadas a mesma técnica e critérios descritos no item f.1a., exceção feita quanto à dose vacinante que, neste caso, foi de 0,03 ml.

#### 5.6 - PROVA DE SORO-NEUTRALIZAÇÃO

Diferentes diluições de soro foram colocadas em presença de do se fixa de vírus CVS, previamente titulada em camundongos.

##### 5.6.1 - Titulação do vírus CVS - Controle

O vírus CVS, diluído a 1:5 e mantido em congelador a  $-70^{\circ}$  C (item 5.4.2 "Obtenção dos vírus de provas CVS e PV" e item 5.4.3 "Titulação"), foi descongelado à temperatura ambiente ( $24^{\circ}$  C).

Em "diluyente", foram preparadas diluições a  $2 \times 10^{-2}$  até  $2 \times 10^{-6}$ . De cada diluição, 0,5 ml foi colocado em tubo de hemólise, ao qual foi adicionado 0,5 ml de soro normal de cavalo, inativado e estéril. Este soro havia sido previamente diluído a 1:5, em solução salina fisiológica.

Após a homogeneização, as misturas foram incubadas a  $36^{\circ} \text{C}$  durante 90 minutos e, em seguida, colocadas em banho de gelo durante toda a operação.

Cinco camundongos de  $14 \pm 1$  g foram inoculados, intracerebralmente, com 0,03 ml de cada diluição.

#### 5.6.2 - *Neutralização soro/vírus*

Os soros em exame foram previamente inativados, em banho-maria, a  $56^{\circ} \text{C}$  durante 30 minutos.

Em solução salina fisiológica, foram preparadas diluições com fator constante. De cada diluição, foi transferido 0,5 ml para um tubo de hemólise, ao qual foi adicionado 0,5 ml de suspensão de vírus CVS, contendo 20 a 50  $\text{DL}_{50}$ .

O vírus CVS foi novamente titulado, para confirmação do seu título.

As misturas soro/vírus e vírus para titulação foram incubadas a  $37^{\circ} \text{C}$  durante 90 minutos e, em seguida, imediatamente colocadas em banho de gelo, onde permaneceram durante toda a operação.

Grupos de seis camundongos de  $14 \pm 1$  g foram inoculados, intracerebralmente, com 0,03 ml de cada mistura soro/vírus e com cada uma das diluições de vírus CVS controle.

Os animais utilizados em todas as provas de soro-neutralização foram observados durante 21 dias, tendo sido consideradas específicas as mortes ocorridas após o 5º dia, acompanhadas dos sintomas de raiva.

A dose protetora 50% foi calculada pelo método de REED e MÜNCH<sup>56</sup> (1938).

### 5.7 - PROVA DE CÉREBRO-NEUTRALIZAÇÃO

Os pontos básicos da técnica são os descritos por KUBES e GALLIA<sup>43</sup> (1944).

No 21º dia após a imunização, os camundongos foram sacrificados por inalação de clorofórmio, sendo seus cérebros extraídos. Os cérebros foram, então, mergulhados e mantidos durante dez minutos em 10 ml de solução salina fosfatada\*, pH 7.0, a 4º C. A solução foi trocada três vezes, para eliminação da maior parte do sangue contido na superfície dos tecidos. O material foi congelado a -70º C, até o momento de sua utilização.

Para a prova, os cérebros foram descongelados à temperatura ambiente (24º C), sendo eliminado o excesso de líquido em papel de filtro. Após essas operações os cérebros foram reunidos e pesados.

O material total foi triturado (triturador BELLECO) e diluído em solução fisiológica, na proporção de 1:2 p/v. A suspensão foi centrifugada durante cinco minutos a 500 rpm, para eliminação de partículas grosseiras.

Em solução salina fisiológica, foram preparadas as seguintes diluições de tecidos: 1:20, 1:200 e 1:2000.

A partir desta etapa, a técnica desenvolveu-se de acordo com o que foi descrito para a prova de soro-neutralização (ítem 6), exceto que, em lugar do soro, foi utilizada a suspensão de tecido cerebral, inclusive cérebros de camundongos normais, como controle.

---

\* NaCl p.a. .... 8,5 g  
 Solução de fosfato monopotássico M/15 ..... 10 ml  
 Solução de fosfato dissódico M/15 ..... 40 ml  
 Água destilada q.s. .... 1000 ml

## 5.8 - PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

As provas foram feitas segundo a técnica descrita por CHERRY, GOLDMAN e CARSKI<sup>17</sup> (1960).

Os cérebros dos camundongos foram cortados no sentido ântero - posterior. Foram preparadas impressões da parte central do órgão, em lâmina de vidro; a seguir, estas impressões foram tratadas com o conjugado (soro anti-rábico/isotiocianato de fluoresceína) fornecido pelo Centro Panamericano de Zoonosis (Buenos Aires, Argentina).

Os resultados dos testes pilotos, revelaram ser satisfatória a diluição do conjugado a 1:60, em solução salina fisiológica.

As lâminas foram examinadas em campo escuro, com o auxílio de microscópio LEITZ, modelo 250, equipado com lâmpada de vapor de mercúrio CS-150W, filtro primário BG-12 e secundário LEITZ K 530.

As observações foram feitas com 400 aumentos.

A presença de agregados "corpúsculares", em número variado por campo, era indício de positividade da prova. Segundo KOPROWSKI<sup>38</sup> (1971), este tipo de fluorescência citoplasmática corresponde à presença de corpúsculos de inclusão, possíveis de serem confirmados através da microscopia eletrônica. Não levamos em consideração a fluorescência granular ou da membrana celular.

## 5.9 - DETECÇÃO DE VÍRUS RÁBICO NO SANGUE DE COBAIAS

Doze cobaias de  $350 \pm 10$  g, foram inoculadas intracerebralmente com 0,05 ml de vírus CVS, diluído a  $10^{-3}$  em "diluyente". A  $DL_{50}$  deste vírus, em camundongos de  $14 \pm 1$  g, era de  $10^{-6,5}/0,03$  ml.

Por meio de observações diárias, realizadas entre o 5º e 7º dia após a inoculação, foram selecionadas quatro cobaias que apresentaram-se em estado agônico, com sintomatologia característica de raiva.

De cada cobaia, foram extraídos 5 a 10 ml de sangue, por punção cardíaca.

O sangue foi desfibrinado por agitação com pérolas de vidro ; 0,03 ml do sangue de cada cobaia foi inoculado, intracerebralmente, em grupos de oito camundongos de quatro a seis dias de idade.

Os camundongos foram observados durante 16 dias, tendo sido anotados o número de mortos e sobreviventes, e consideradas específicas as mortes que ocorreram a partir do 3º dias da inoculação, desde que houvessem demonstrado, previamente, sintomatologia de raiva.

Os cérebros das quatro cobaias foram submetidos à coloração de SELLERS, segundo a técnica descrita por KAPLAN e KOPROWSKI<sup>36</sup> (1973), para pesquisa de corpúsculo de Negri.

## 6. RESULTADOS

RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DO VALOR IMUNIZANTE DA VACINA  
FLURY HEP VÍRUS MODIFICADO, EM VÁRIAS ESPÉCIES  
ANIMAIS, SEGUNDO A DOSE E A VIA DE ADMINISTRAÇÃO

TABELA I

NÍVEL PROTETOR CONFERIDO A ANIMAIS DE LABORATÓRIO, QUANDO INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE E INTRAMUSCULARMENTE COM A VACINA FLURY HEP\* (VÍRUS MODIFICADOS), VARIANDO-SE A DOSE INOCULADA

Vacina: partida nº	Espécie animal	Via de inoculação	Sobrevi- ventes:  Total	RESULTADOS		
				% de proteção	Controles	
					Mortos Total	% de mortos
I	Cobaia Camundongo	intramuscular	2/10	20	4/5	80
		intracerebral	18/20	90	9/10	90
II	Cobaia Camundongo	intramuscular	6/10	60	5/5	100
		intracerebral	18/20	90	10/10	100
III	Cobaia Camundongo	intramuscular	5/10	50	5/5	100
		intracerebral	14/20	70	10/10	100
IV	Hamster Camundongo	intramuscular	2/10	20	5/5	100
		intracerebral	17/20	85	9/10	90
V	Hamster Camundongo	intramuscular	2/10	20	4/5	80
		intracerebral	19/20	95	9/10	90
VI	Hamster Camundongos	intramuscular	1/10	10	3/5	60
		intracerebral	18/20	90	9/10	90
VII	Hamster Camundongo	intramuscular	1/10	10	5/5	100
		intracerebral	18/20	90	10/10	100
VIII	Hamster Camundongo	intramuscular	2/10	20	5/5	100
		intracerebral	18/20	90	10/10	100
IX	Hamster Camundongo	intramuscular	2/10	20	4/5	80
		intracerebral	19/20	95	10/10	100
X	Hamster Camundongo	intramuscular	0/10	00	4/5	80
		intracerebral	18/20	90	10/10	100
XI	Hamster Camundongo	intramuscular	2/10	20	5/5	100
		intracerebral	13/20	65	10/10	100

Vírus "desafiante" : PV 1:40 (2DL<sub>100</sub>) - aplicado em cobaias, por via intramuscular

PV 1:800 (2DL<sub>100</sub>) - aplicado em hamsters, por via intramuscular

CVS 10<sup>-6.0</sup> (10DL<sub>50</sub>) - aplicado em camundongos, por via intramuscular

## Comentários sobre a tabela I

Os resultados constantes da tabela I, referem-se às nossas observações iniciais, que consideramos válidas, pois demonstram níveis de proteção superiores quando a vacina FLURY HEP foi inoculada intracerebralmente. Estes resultados foram obtidos pelo aproveitamento dos animais que sofreram inoculações intracerebrais, para verificação da inocuidade do vírus FLURY HEP.

Este processo, que comporta a crítica de que as espécies animais utilizadas variaram segundo a via de inoculação da vacina, justificou inicialmente, o nosso trabalho.

As técnicas utilizadas nestas provas, conforme descritas em "MATERIAL E MÉTODOS" (item cinco), podem ser caracterizadas como:

### 5.5 - Provas de proteção

#### 5.5.1 - Vacina FLURY HEP liofilizada (vírus modificado)

##### a) Provas em cobaias

1a.) Vacinação intramuscular

##### b) Provas em camundongos

1a.) Vacinação intracerebral

##### c) Provas em hamsters

1a.) Vacinação intramuscular

Considerando a quantidade de material virulento inoculado por ambas as vias e, ainda, a concentração inicial e as diluições da vacina usada nas provas, verificamos que as cobaias receberam, intramuscularmente, 0,0125 g de material, enquanto que os camundongos e os hamsters receberam 0,00099 g, intracerebralmente. Não houve, nestas condições, possibilidade de estabelecermos comparações, devido à diferença de peso corporal entre as espécies que receberam as inoculações.

Por essa razão foram realizadas as experiências, constantes nas tabelas seguintes, nas quais, sobre cada espécie animal, em separado, fizemos variar somente a via de inoculação e a dose vacinante.

A tabela II apresenta os resultados obtidos quando da inoculação da vacina FLURY HEP em hamsters, através das vias intramuscular e intracerebral.

TABELA II

NÍVEIS PROTETORES CONFERIDOS PELA INOCULAÇÃO INTRAMUSCULAR E INTRACEREBRAL, EM HAMSTERS, DE DOSES DIFERENTES DA VACINA FLURY HEP (VÍRUS MODIFICADO)

Vacina* : partida nº	Espécie animal	Via de inoculação	Sobrevi- ventes:  Total	RESULTADOS		
				% de proteção	Controles	
					Mortos Total	% de mortos
XII	Hamster	intramuscular	5/10	50	5/5	100
	Hamster	intracerebral	10/10	100	5/5	100
XIII	Hamster	intramuscular	1/10	10	5/5	100
	Hamster	intracerebral	8/10	80	5/5	100
XIV	Hamster	intramuscular	5/10	50	5/5	100
	Hamster	intracerebral	10/10	100	5/5	100

\* Vacina anti-rábica veterinária, amostra FLURY HEP (vírus modificado)

Vírus "desafiante" : PV 1:800 (2DL<sub>100</sub>)

*Comentários sobre a tabela II*

As técnicas utilizadas nestas provas, conforme descritas em "MATERIAL E MÉTODOS" (item cinco), podem ser caracterizadas como:

5.5 - *Provas de proteção*

5.5.1 - *Vacina FLURY HEP liofilizada (vírus modificado)*

c) Provas em hamsters

1a.) Vacinação intramuscular

2a.) Vacinação intracerebral

Nesta caso, os hamsters receberam, respectivamente, 0,0125 g e 0,00099 g de vacina por via intramuscular e intracerebral. Observamos que, apesar de termos efetuado, nesses animais, as inoculações por via intracerebral com quantidade significativamente menor de vacina, esta via parece ter sido a responsável pela apresentação de níveis protetores substancialmente elevados. Tal observação nos levou a pesquisar, no mesmo animal (hamster), os níveis protetores que seriam conferidos pela mesma dose da vacina, quando inoculada por via intramuscular e intracerebral (tabela III).

TABELA III

NÍVEIS PROTETORES CONFERIDOS PELA INOCULAÇÃO DA VACINA FLURY HEP (VÍRUS MODIFICADO ) VIAS INTRAMUSCULAR E INTRACEREBRAL, EM HAMSTERS, EM DOSES CONSTANTES

Vacina* partida nº	Espécie animal	Via de inoculação	Sobrevi- ventes:  Total	R E S U L T A D O S		
				% de proteção	Controles	
					Mortos Total	% de mortos
XV	Hamster	intramuscular	1/10	10	5/5	100
	Hamster	intracerebral	7/10	70	5/5	100

\* Vacina anti-rábica veterinária, amostra FLURY HEP (vírus modificado )

Vírus "desafiante" : PV 1:800 (2DL<sub>100</sub>)

*Comentários sobre a tabela III*

A tabela III apresenta os resultados observados quando da vacinação de hamsters com 0,3 ml e 0,03 ml de vacina diluída a 1:100 e a 1:10, respectivamente, através das vias intramuscular e intracerebral.

Nesta experiência a dose administrada por via intramuscular foi reduzida em relação às anteriores, para evitar excesso de antígeno e possibilitar melhor comparação. A proteção conferida por 0,03 ml de vacina diluída a 1:10, aplicada intracerebralmente, havia sido satisfatória.

A inoculação de quantidades iguais de antígeno rábico através das duas vias escolhidas, parece demonstrar novamente a superioridade da via intracerebral na indução de um nível protetor mais elevado.

Na tabela seguinte (IV), além dos níveis protetores, procuramos verificar os títulos de anticorpos circulantes que seriam induzidos pela inoculação da vacina, por vias intramuscular e intracerebral.

TABELA IV

VACINA FLURY HEP (VÍRUS MODIFICADO) INOCULADA INTRAMUSCULAR E INTRACEREBRALMENTE, EM COBAIAS E EM DOSES CONSTANTES. RELAÇÃO ENTRE PROTEÇÃO E TÍTULO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES\* DO SORO

PROVA DE PROTEÇÃO						SORO-NEUTRALIZAÇÃO				
Via de inoculação	Nº de cobaias (inoculadas) sobreviventes	Mortes inespecíficas	Nº de mortes após a inoculação do vírus	Sobreviventes	Porcentagem de proteção	Diluições do soro das cobaias				Resultados
						1:2	1:10	1:50	1:250	
						Camundongos sobreviventes				
						Total				
intramuscular	12	3	4	8	66,5	5/5	4/5	1/5	0/5	1:22
intracerebral	13	2	1	12	92,3	5/5	5/5	5/5	0/5	1:112

Vírus PV 1:40 (2DL<sub>100</sub>) mortalidade entre os animais controles =  $\frac{4 \text{ mortos}}{5} = 80\%$

\* Para a soro-neutralização, foram inoculadas 10 DL<sub>50</sub>, conforme descrito no capítulo "MATERIAL E MÉTODOS".

### Comentários sobre a tabela IV

A tabela IV apresenta os resultados observados quando da ino  
culação, em cobaias, por via intramuscular e intracerebral, da mesma do  
de de vacina FLURY HEP.

As técnicas utilizadas nestas provas, conforme descritas em  
"MATERIAL E MÉTODOS" (item cinco), podem ser caracterizadas como:

#### 5.5 - Provas de proteção

##### 5.5.1 - Vacina FLURY HEP liofilizada (vírus mo dificado )

##### a) Provas em cobaias

1a.) Vacinação intramuscular

2a.) Vacinação intracerebral

#### 5.6 - Prova de soro-neutralização

A prova de soro-neutralização realizada, justifica  
se porque a presença de anticorpos neutralizantes, mesmo em baixas co  
ncentrações, é considerada como indicadora de imunidade à raiva, no homem  
(KAPLAN e KOPROWSKI<sup>36</sup> (1973)) e em animais (ATANASIU e cols.<sup>3</sup> (1968)).

Através de cada uma das vias citadas, inoculamos a vacina em  
15 cobaias. Devido a causas não determinadas, porém aparentemente não a  
tribuiveis à vacinação, 21 dias após as inoculações, constatamos morte  
de três cobaias quando a via adotada foi a intramuscular e de duas co  
baias quando da via intracerebral. As sobreviventes foram sangradas no  
21º dia após a vacinação. As misturas de partes iguais de seus soros, re  
septedas as vias de inoculação, foram submetidas à prova de soro-neutra-  
lização.

No 30º dia, o vírus de prova PV foi inoculado em todas as co  
baias, inclusive em cinco animais controles.

Consideramos necessário um período de nove dias entre a sa  
ngria e a agressão viral patogênica, baseados na possibilidade da ocorrên-  
cia de traumatismos relativamente importantes, advindos da punção cardí  
a

ca, além da expoliação sangüínea causada pela retirada de 3 ml de sangue. Haveria a possibilidade, também, do título de anticorpos encontrados não ser exatamente o mesmo quando da agressão pelo vírus de prova. Todavia, a creditamos que a resistência orgânica tenha se restabelecido durante aqule período e, ainda, que as diferenças de níveis de anticorpos seriam relativamente pequenas.

O resultado da experiência constante da tabela IV parece demonstrar a existência de uma correlação entre proteção e título de anticorpos circulantes, sendo ambos superiores quando da inoculação intracerebral de vacina.

No transcorrer das experiências anteriores, ocorreu-nos que poderia ter existido a possibilidade de penetração de parte da vacina inoculada intracerebralmente, diretamente na via sangüínea, através dos "sinus" cranianos ou mesmo de capilares. Desconhecíamos, do ponto de vista imunológico, qual a ação que a vacina composta por vírus modificado teria nestas condições. Não dispúnhamos de tecnologia apropriada para verificar se, realmente, a inoculação havia sido totalmente intracerebral. Resolvemos, então, comparar os resultados determinados pela inoculação direta na corrente circulatória (via cardíaca) e intramuscular clássica, da vacina FLURY HEP (vírus modificado ). Os resultados observados constituem a tabela V.

TABELA V

VACINA FLURY HEP (VÍRUS MODIFICADO ). ESTUDO COMPARATIVO ENTRE PROTEÇÃO E SORO-NEUTRALIZAÇÃO\*, CONFERIDA PE-  
LA INOCULAÇÃO INTRAMUSCULAR E INTRACARDÍACA , EM COBAIAS

PROVA DE PROTEÇÃO					SORO-NEUTRALIZAÇÃO				
Via de inoculação	Nº de cobaias (inoculadas) sobreviventes	Nº de mortes após a inoculação do vírus	Sobreviventes	Porcentagem de proteção	Diluições do soro das cobaias				Resultados
					1:2	1:10	1:50	1:250	
					Camundongos sobreviventes				
					Total				
intramuscular	13	7	6	46	2/5	1/5	0/5	0/5	menor do que 1:2
intracardíaca	13	9	4	30	2/5	0/5	0/5	0/5	menor do que 1:2

Vírus "desafiante": PV 1:40 (2DL<sub>100</sub>) mortalidade entre os animais controles =  $\frac{4 \text{ mortos}}{5} = 80\%$

\* Para a soro-neutralização foram inoculadas 75 DL<sub>50</sub>

*Comentários sobre a tabela V*

As técnicas utilizadas nestas provas, conforme descritas em "MATERIAL E MÉTODOS" (ítem cinco), podem ser caracterizadas como:

5.5 - *Provas de proteção*

5.5.1 - *Vacina FLURY HEP liofilizada (vírus mo  
dificado )*

a) Provas em cobaias

1a.) Vacinação intramuscular

3a.) Vacinação intracardíaca

5.6 - *Prova de soro-neutralização*

A análise dos dados constantes na tabela V permite verificar que a proteção conferida pela vacinação intramuscular foi superior àquela conferida pela vacinação intracardíaca. Quanto à soro-neutralização, o teste não foi conclusivo, em razão da excepcional atividade infectante da amostra de vírus CVS usada. Nestas provas, foram utilizadas 75 DL<sub>50</sub> em lugar de 20 a 50, como recomendaram KAPLAN e KOPROWSKI<sup>36</sup> (1973). Assim procedemos, baseados na hipótese de que a vacinação intracardíaca induzisse a elevados títulos de anticorpos neutralizantes, o que parece não ocorrer.

RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DO VALOR IMUNIZANTE DA VACINA  
FLURY HEP, COM OUTRAS VACINAS INATIVADAS, EM VÁRIAS ES  
PÉCIES ANIMAIS SEGUNDO A DOSE E A VIA DE ADMINISTRAÇÃO

Na segunda parte experimental deste trabalho, decidi mos comparar o poder imunizante da vacina FLURY HEP com vacinas inativadas; para tanto, iniciamos a comprovação entre a vacina FLURY HEP e a vacina tipo FUENZALIDA, em cobaias, inoculadas por meio das vias intramuscular e intracerebral. No decorrer destas experimentações, julgamos que seria também interessante comparar, nas mesmas condições, o poder imunizante da vacina FLURY HEP (vírus modificado), com a mesma vacina inativada pelo calor, conforme especificado no ítem cinco do capítulo "MATERIAL E MÉTODOS" . Aproveitamos a oportunidade para, ao mesmo tempo, comparar aquelas vacinas com a vacina tipo FUENZALIDA. Como estas últimas experimentações exigissem grande número de animais, foram elas feitas em camundongos, exceto as provas constantes da tabela VI, onde utilizamos cobaias. Os resultados encontram-se na tabela VI e respectivo gráfico nº 1 e nas tabelas VII e VIII, IX e X, apresentados a seguir.

TABELA VI

COMPARAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE PROTEÇÃO E SORO-NEUTRALIZAÇÃO, OBTIDOS COM VACINAS FLURY HEP E TIPO FUENZALIDA. INOCULAÇÃO EM COBAIAS ATRAVÉS DAS VIAS INTRAMUSCULAR E INTRACEREBRAL

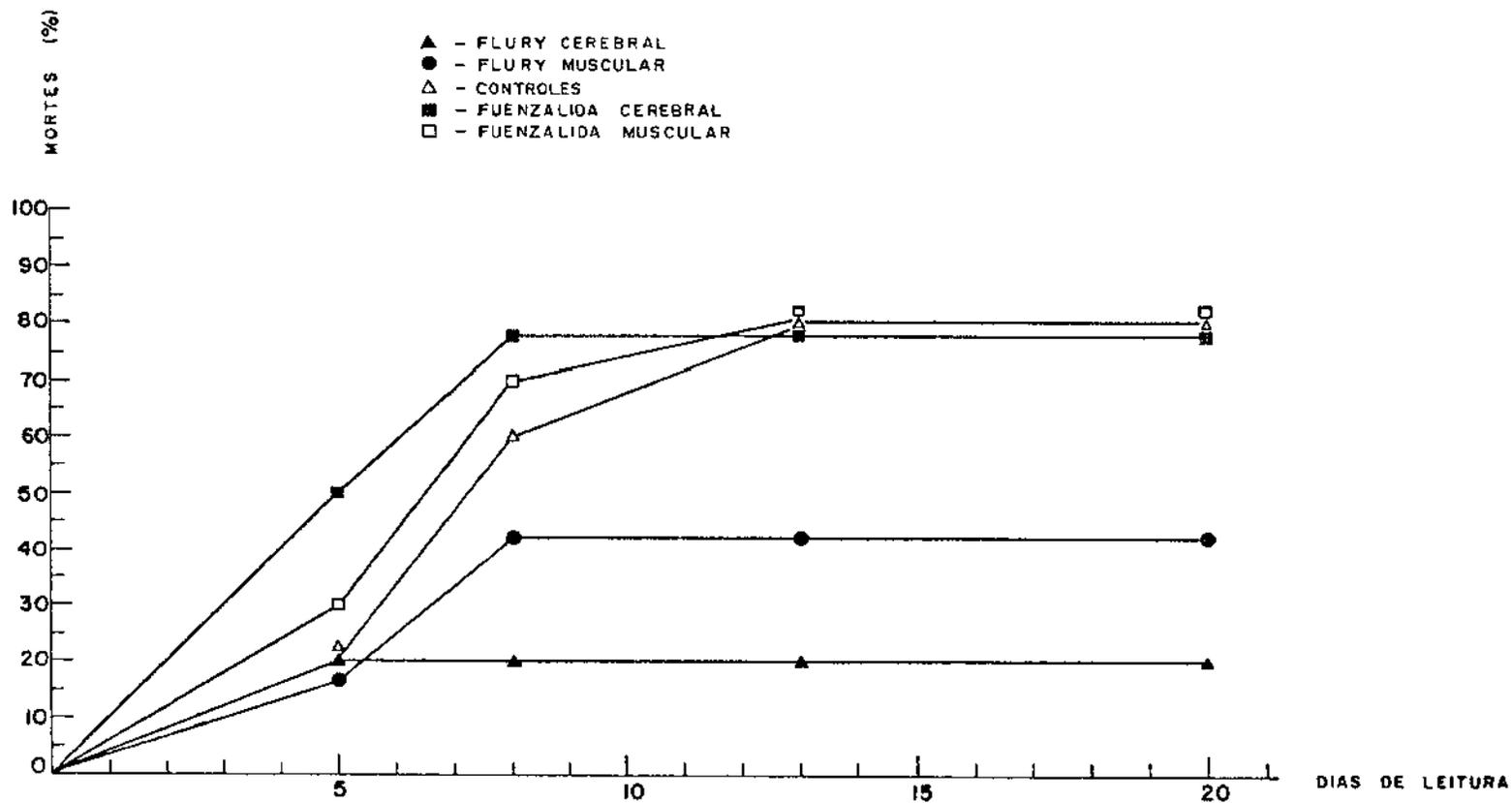
PROVA DE PROTEÇÃO						SORO-NEUTRALIZAÇÃO					
Grupo	Vacina	Nº de cobaias	Via de inoculação	Sobreviventes		% de proteção	Diluições dos soros	Sobreviventes		Título	
				Total	Total			Total	Total		
A	FLURY HEP*	15	Intracerebral	12/15		80	1:10 1:50 1:250 1:1250	6/6 2/6 0/6 0/6		33,5	
B	FLURY HEP*	15	Intramuscular	7/12		58	1:10 1:50 1:250 1:1250	0/6 1/6 0/6 0/6		< 1:10	
C	Tipo FUENZALIDA**	15	Intracerebral	3/13		23	1:10 1:50 1:250 1:1250	2/6 1/6 0/6 0/6		< 1:10	
D	Tipo FUENZALIDA**	15	Intramuscular	3/15		20	1:10 1:50 1:250 1:1250	1/6 0/6 0/6 0/6		< 1:10	
CONTROLE						CONTROLE					
Grupo	Vírus	Nº de cobaias	Via	Volume	Diluição	DL <sub>100</sub>	Sobreviventes		% de mortalidade	Título do vírus em camundongos	Nº de DL <sub>50</sub> misturadas a diluições de soro
E	PV	10	intra - muscular	0,5 ml	1:40	2	0/10		100	10 <sup>-5.4</sup> /0,03 ml	50

\* Título = 10<sup>-4.5</sup>/0,03 ml

\*\* Título antes da inativação = 10<sup>-6.5</sup>/0,03 ml

# GRÁFICO Nº 1

(Composto com os dados obtidos da Tabela VI)



*Comentários sobre a tabela VI e gráfico nº1*

As técnicas utilizadas nestas provas, conforme descritas em "MATERIAL E MÉTODOS" (item cinco), podem ser caracterizadas como:

5.5 - *Provas de proteção*

5.5.1 - *Vacina FLURY HEP liofilizada (vírus mo  
dificado )*

a) Provas em cobaias

1a.) Vacinação intramuscular

2a.) Vacinação intracerebral

5.5.2 - *Vacina tipo FUENZALIDA*

d) Provas em cobaias

1a.) Vacinação intramuscular

2a.) Vacinação intracerebral

5.6 - *Prova de soro-neutralização*

Preliminarmente, queremos deixar claro que, conside  
rados os títulos iniciais das duas vacinas, estas foram diluídas de modo a conter 10.000 partículas virais em 0,1 ml; este foi o volume inoculado nas cobaias, por ambas as vias.

A tabela VI permite verificar que houve melhor proteção com a vacina FLURY HEP (vírus modificado ) principalmente quando inoculada in  
tracerebralmente. Nestas observações, pode ser notada diferença quanto ao nível de anticorpos circulantes obtido com a vacina FLURY HEP inoculada intracerebralmente. Tal aumento de anticorpos, neste caso, não foi acompa  
nhado por uma proporcional elevação do nível de proteção.

Analisando-se o gráfico nº 1 e, tomando por base a porcenta  
gem de mortes ocorridas a partir do 5º dia após a inoculação "desafiante", verificamos, em relação aos controles que:

- 1º) a vacina FLURY HEP (vírus modificado ) inoculada intramuscularmente, parece ter proporcionado uma proteção ligeiramente maior em relação à inoculação intracerebral;
- 2º) a vacina tipo FUENZALIDA, principalmente quando inoculada intracerebralmente, apresentou número de mortes significativamente maior do que o próprio grupo controle.

Tais resultados são surpreendentes e nos fazem pensar na possibilidade de que a vacina inativada sensibiliza o animal à ação patogênica do vírus "desafiante", principalmente por via intracerebral, durante o período em que o título de anticorpos é nulo ou muito baixo.

Convém lembrar que a vacina tipo FUENZALIDA, na nossa experimentação, foi administrada em dose única. Se fossem administradas outras doses de reforço os resultados possivelmente seriam completamente diferentes.

TABELA VII

COMPARAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS PROTETORES E SORO-NEUTRALIZANTES, CONFERIDOS PELAS VACINAS\* FLURY HEP - VÍRUS MODIFICADO, FLURY HEP - VÍRUS INATIVADOS E FUENZALIDA, EM CAMUNDONGOS, QUANDO INOCULADOS INTRAMUSCULARMENTE COM DOSES DIFERENTES E, INTRACEREBRALMENTE, COM DOSES IGUAIS.

PROVA DE PROTEÇÃO					PROVA DE SORO-NEUTRALIZAÇÃO		
Tipo de vacina	Via e volume	Nº de animais (camundongos)	Sobreviventes / Total	% de proteção	Diluições dos soros	Sobreviventes / Total	Título
FLURY HEP - VÍRUS ATIVO MODIFICADO	intramuscular 0,3 ml	19	8/19	42,1	1:2 1:10 1:50	2/5 1/5 0/5	< 1:2,0
	intramuscular 0,03 ml	20	9/20	45	1:2 1:10 1:50	3/5 2/5 1/5	1:5,8
	intracerebral 0,03 ml	18	15/18	83,3	1:2 1:10 1:50	4/5 1/5 0/5	1:4,47
FLURY HEP INATIVADA A 56° C por 30 minutos	intramuscular 0,3 ml	18	6/18	33,3	1:2 1:10 1:50	1/5 1/5 0/5	< 1:2
	intramuscular 0,03 ml	20	3/20	15	1:2 1:10 1:50	0/5 0/5 0/5	< 1:2
	intracerebral 0,03 ml	18	10/18	55,5	1:2 1:10 1:50	3/5 1/5 0/5	3,2
TIPO FLUENZALIDA INATIVADA	intramuscular 0,3 ml	19	5/19	26,3	1:2 1:10 1:50	3/5 2/5 1/5	1:5,8
	intramuscular 0,03 ml	19	7/19	36,8	1:2 1:10 1:50	2/5 2/5 0/5	< 1:2
	intracerebral 0,03 ml	17	6/17	35,3	1:2 1:10 1:50	0/5 3/5 0/5	< 1:2
CONTROLES					CONTROLES		
VÍRUS CVS	intracerebral 0,03 ml da diluição $10^{-6}$ ( $250 \text{ DL}_{50}$ )	10	10 mortos 10 total	100% de mortes	Vírus CVS Título original = $10^{-6,9}/0,03 \text{ ml}$ Após incubação = $10^{-6,0}/0,03 \text{ ml}$ Inoculadas $117 \text{ DL}_{50}$		

\* Todas as vacinas foram diluídas de modo a conter 10.000 partículas virais por 0,03 ml.

TABELA VIII

COMPARAÇÃO ENTRE OS TÍTULOS CÉREBRO-NEUTRALIZANTES MÉDIOS OBTIDOS PELA INOCULAÇÃO INTRAMUSCULAR E INTRACEREBRAL, EM 20 CAMUNDONGOS, DAS VACINAS FLURY HEP, VÍRUS MODIFICADO, FLURY HEP, VÍRUS INATIVADO e FUENZALIDA, COM DOSES CONTENDO A MESMA CONCENTRAÇÃO VIRAL (10.000 PARTÍCULAS INFECTANTES)

Vacina	Via	Volume (em ml)	Nº de DL <sub>50</sub>	Diluições do tecido cerebral			
				Nº de mortos / Nº total inoculado			
				1:2	1:20	1:200	1:2000
HEP Vírus modificado	intracerebral	0,03	25	2/5	3/5	4/5	5/5
HEP Vírus modificado	intramuscular	0,3	25	3/5	4/5	5/5	5/5
FUENZALIDA	intramuscular	0,3	25	5/5	5/5	5/5	5/5
FUENZALIDA	intracerebral	0,03	25	5/5	5/5	5/5	5/5
HEP inativada	intracerebral	0,03	25	5/5	5/5	5/5	5/5
HEP inativada	intramuscular	0,3	25	5/5	5/5	5/5	5/5

As vacinas utilizadas são as mesmas que serviram para a inoculação dos animais constantes da tabela VI

*Comentários sobre as tabelas VII e VIII*

As tabelas VII e VIII resumem os resultados das provas em que foram comparadas as capacidades imunogênicas das vacinas FLURY HEP vírus modificado , FLURY HEP inativada e tipo FUENZALIDA.

As técnicas utilizadas nestas provas, conforme descritas em "MATERIAL E MÉTODOS" (item cinco), podem ser caracterizadas como:

- 5.5 - *Provas de proteção*
  - 5.5.1 - *Vacina FLURY HEP liofilizada (vírus modificado )*
    - b) Provas em camundongos
      - 1a.) Vacinação intramuscular
      - 2a.) Vacinação intracerebral
  - 5.5.3 - *Vacina FLURY HEP inativada*
    - e) Provas em camundongos
      - 1a.) Vacinação intramuscular
      - 2a.) Vacinação intracerebral
  - 5.5.4 - *Vacina tipo FUENZALIDA*
    - f) Provas em camundongos
      - 1a.) Vacinação intramuscular
      - 2a.) Vacinação intracerebral
- 5.6 - *Prova de soro-neutralização*
- 5.7 - *Prova de cérebro-neutralização*
- 5.8 - *Prova de imunofluorescência*

A análise dos resultados constantes da tabela VII permite verificar que a vacina FLURY HEP vírus modificado, quando em igualdade de número de partículas virais inoculadas, se comparada com as vacinas FLURY HEP

inativada e tipo FUENZALIDA, é capaz de induzir a níveis protetores mais elevados, especialmente quando se usa a via intracerebral. Verificamos também que, comparativamente, não há relação entre os títulos de anticorpos circulantes e as porcentagens de proteção observadas.

Como foram inoculadas doses diferentes por via intramuscular, uma dez vezes superior à outra, de vírus FLURY HEP ativo e não houve praticamente diferenças nos níveis de proteção, e, além disso, não houve correlação proporcional com o título de anticorpos circulantes, somos levados a crer que aquela via não seja a ideal para a vacinação. A inoculação por via intracerebral, em contraposição, conduz a níveis mais elevados quanto à porcentagem de proteção, apesar de que os títulos de anticorpos séricos apresentaram-se praticamente iguais ou mesmo inferiores. Tais observações podem sugerir a existência de outros fatores envolvidos na imunoproteção, como por exemplo a imunidade celular.

Comparando a vacina FLURY HEP ativa com as vacinas inativadas, fica também bastante clara a sua superioridade, quer quando aos níveis de proteção, quer quanto ao conjunto de resultados de anticorpos circulantes. Por outro lado, parece-nos lícito admitir que não existe correlação entre o nível de proteção e o título de anticorpos circulantes. Afim de tentar esclarecer melhor a questão da maior proteção obtida pela inoculação intracerebral, decidimos realizar a experiência cujos resultados constam da tabela VIII.

Os resultados contidos na tabela VIII (cérebro-neutralização), parecem demonstrar que apenas o vírus FLURY HEP ativo foi capaz de induzir a uma atividade cérebro-neutralizante, apesar de fracamente evidenciável.

Após estes resultados, resolvemos verificar a presença de partículas virais evidenciáveis no cérebro de animais inoculados com a vacina FLURY HEP vírus modificado, por via intramuscular e intracerebral. Utilizamos, para esta finalidade, o teste de imunofluorescência; os resultados constam da tabela IX.

TABELA IX

RESULTADO DA PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA REALIZADA EM TECIDO CEREBRAL DOS CAMUNDONGOS INOCULADOS, VIAS INTRAMUSCULAR E INTRACEREBRAL, COM DOSES DIFERENTES DA VACINA FLURY HEP VÍRUS MODIFICADO. MÉDIA DE CORPÚSCULOS POR CAMPO MICROSCÓPICO OBSERVADO

Via de inoculação	Dose* (em ml)	Prova de imunofluorescência	Positivos Total	Nº médio de corpúsculos por campo examinado (10 campos)					Porcentagem de positividade
				0	1	2-3	4-5	+5	
intramuscular	0,3	4 dias após	5/5	-	2	2	1	-	100
intramuscular	0,03		5/6	1	5	-	-	-	83,3
intracerebral	0,03		5/5	-	1	3	1	-	100
intramuscular	0,3	8 dias após	5/5	-	5	-	-	-	100
intramuscular	0,03		10/10	-	2	2	2	4	100
intracerebral	0,03		5/5	-	-	2	3	-	100
intramuscular	0,3	12 dias após	0/7	7	-	-	-	-	0
intramuscular	0,03		3/8	5	3	-	-	-	37,5
intracerebral	0,03		6/9	3	-	3	3	-	70

\* 10.000 partículas virais por 0,03 ml

*Comentários sobre a tabela IX*

Tomando como base o período máximo de nossas observações (12 dias), parece que, em geral, o vírus mantém-se ativo nos tecidos do sistema nervoso central até o 12º após a inoculação pelas vias intramuscular e intracerebral.

Os resultados obtidos parecem demonstrar que haveria a replicação do vírus rábico modificado no tecido cerebral. Tal interpretação, aliada ao fato demonstrado de ocorrer uma imunidade mais intensa quando da inoculação intracerebral, levou-nos a procurar saber se existe a possibilidade de sua passagem para a corrente circulatória. Haveria, nestas condições, oportunidades de contatos mais íntimos entre o vírus e os sistema imunocompetente. Decidimos pesquisar com a inoculação intracerebral do vírus FLURY HEP modificado, em cobaias de  $400 \pm 20$  g. Trabalhamos com um vírus que, previamente inoculado em camundongos de quatro a seis dias de idade, demonstrou título infectante, por via intracerebral, igual a  $10^{-6.0}/0,03$  ml. Quando 0,03 ml da diluição  $10^{-1.0}$  deste vírus foram inoculados nas cobaias, por via intracerebral, não conseguimos reisolares o vírus do sangue, através da técnica de inoculação intracerebral em camundongos lactentes. O reisolamento foi tentado no 5º, 8º e 10º dia após a inoculação intracerebral.

Com a mesma finalidade acima descrita, repetimos, então, as nossas tentativas de reisolamento do vírus rábico do sangue, utilizando a amostra CVS. Dentre as cobaias que tinham recebido inoculação por via intracerebral, foram selecionadas quatro que apresentavam sintomatologia característica de raiva. Os animais foram sangrados e, do sangue obtido de cada um, 0,03 ml foram inoculados em cada um de oito camundongos lactentes, por via intracerebral.

As técnicas utilizadas nestas provas estão descritas no capítulo "MATERIAL E MÉTODOS" (item 5.9 - "Detecção do vírus rábico no sangue de cobaias").

Os resultados obtidos constam da tabela X.

TABELA X

RESULTADOS DAS PROVAS DE DETECÇÃO DO VÍRUS RÁBICO CVS, NO SANGUE DE QUATRO COBAIAS, APÓS A INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL DE 0,03 ML DE SANGUE, EM CAMUNDONGOS LACTENTES

Cobaia nº	Pesquisa de corpúsculos de Negri* nos cérebros das cobaias	Nº de camundongos** inoculados intracerebralmente com o sangue das cobaias	Mortos Total
1	negativa	8	0/8
2	positiva	8	2/8
3	negativa	8	2/8
4	negativa	8	0/8

\* Método de SELLERS

\*\* Animais com quatro a seis dias de idade

#### Comentários sobre a tabela X

A análise da tabela X permite verificar que, apesar de pouco freqüentemente, o vírus rábico CVS pode ser detectado no sangue circulante de duas entre quatro cobaias testadas, durante o período em que apresentaram-se em estado pré-agônico ou agônico (entre cinco e dez dias após a inoculação). Verificamos ainda que, no exame anatomo-patológico do tecido cerebral, foram constatados corpúsculos de Negri, por meio do método de coloração de Sellers, em apenas uma das quatro cobaias. Os corpúsculos de Negri normalmente não se desenvolvem em animais infectados com o vírus fixo (JOHNSON, R.T., <sup>34</sup> 1965).

## 7. DISCUSSÃO

## 7. DISCUSSÃO

Sabe-se que qualquer agente imunizante não inativado, mas atenuado, para que atinja seus objetivos, deve preencher determinados requisitos indispensáveis:

- 1º) deve causar, no hospedeiro, uma infecção inaparente ou de discreta sintomatologia, cuja intensidade está diretamente relacionada ao grau de atenuação obtido pelo tratamento do microrganismo e inversamente relacionada com a resistência individual;
- 2º) para que ocorra a infecção benigna torna-se necessária, evidentemente, a multiplicação ou a replicação do agente infectante no hospedeiro, geralmente observada em determinadas células eletivas do organismo receptor, na dependência do organotropismo do agente infectante. Assim, o sucesso de uma vacinação deste tipo depende muito da possibilidade que tenha o microrganismo de atingir as células eletivas e nelas multiplicar-se.

Muitas vezes, inconvenientes de ordem prática, impossibilidades técnicas ou, ainda, riscos de acidentes graves, impedem que determinados antígenos sejam inoculados diretamente nos tecidos eletivos. Todavia, faz-se necessário assegurar que o antígeno ativo modificado, possa atingir, ainda íntegro, aqueles locais suscetíveis ao seu desenvolvimento.

Na impossibilidade de que o destino celular final seja atingido, a vacina agiria, então, como um antígeno inativado, com agravante de que as vacinas ativas são, em geral, relativamente pouco concentradas em agentes imunizantes, quando comparadas com aquelas preparadas com microrganismos inativados.

EISEN<sup>21</sup> (1973) relaciona os sucessos obtidos com as vacinas atenuadas contra a poliomielite, a influenza e o tracoma, administradas, respectivamente, por via oral, por via aérea superior e por instilação na conjuntiva, a uma ativação preferencial de grupos localizados de células

antígeno-sensíveis. Haveria, segundo a opinião deste autor, uma concentração da resposta imune em locais que normalmente são alvos da invasão por estes microrganismos.

Pelos resultados de nossas observações, parece-nos que condições semelhantes às mencionadas por EISEN ocorrem quando inoculamos a vacina anti-rábica FLURY HEP preparada com vírus modificado. A inoculação direta no tecido cerebral induz a resultados mais satisfatórios porque, neste tecido, o vírus encontra as células eletivas para sua replicação (tabelas I, II, III e VII). Todavia, a formação dos anticorpos circulantes teria, provavelmente, um mecanismo diferente em relação ao mencionado por EISEN.

Tratando-se de um tecido segregado, dentro de certos limites, o sistema nervoso central permitiria a replicação viral em suas células, sem a ocorrência de lesões destrutivas. Nestas condições, haveria uma liberação lenta e contínua de vírus, estimulando a resposta específica, o que confirmaria as observações de BELL e cols.<sup>12</sup> (1966), de RIBEIRO<sup>58</sup> (1970) e de GRIBENCHA e col.<sup>28</sup> (1974).

FERNANDES e cols.<sup>24</sup> (1964) verificaram que o vírus rábico pode infectar células de mamíferos cultivadas "in vitro" e propagar-se nestas células, durante períodos de tempo prolongados, talvez indefinidamente. Os vírus não interferiram no mecanismo de multiplicação celular. Trabalhando com células endoteliais de coelho, estes autores verificaram que o vírus CVS determinava o aparecimento de inclusões, cujo tamanho era variável entre pequeno e médio. A este equilíbrio vírus-células, deram o nome de RELAÇÃO ENDOSIMBIÓTICA, diferente de um sistema veiculador usual no qual ocorre continuamente a lise celular. Os autores observaram, ainda, que a pesar de todas as células da cultura estarem infectadas, apenas 4 a 5% de las liberavam vírus num dado momento, sem a ocorrência de lise. Consideram, finalmente, ser possível a existência de um mecanismo semelhante no organismo animal; este mecanismo seria responsável pela prolongada permanência do vírus rábico nas células sem lhes causar danos.

Os nossos resultados parecem indicar que a inoculação intracerebral da vacina FLURY HEP em animais de laboratório, induz a uma maior proteção do que quando inoculada intramuscularmente (tabelas I, II e III)

e que os níveis de proteção mais elevados, conferidos pela vacinação intra cerebral, não dependem simplesmente da quantidade de vírus introduzida, mas parecem sugerir a existência de outros fatores envolvidos, possivelmente a imunidade celular. Conforme demonstram os resultados inseridos na tabela III, os dois grupos de hamsters vacinados por via muscular e intracerebral, com a mesma quantidade de antígeno, apresentaram índices protetores de 10% e 70%, respectivamente. Destes resultados, podemos ainda inferir que a va cinação intracerebral é, pelo menos para o camundongo e para o hamster, a via mais eficaz de introdução do antígeno rábico modificado. No hamster, a observação é mais preciosa, considerando a sua grande suscetibilidade ao vírus. Em relação a este animal, o vírus FLURY HEP não se revelou patogênico até 30 dias após a inoculação intracerebral. Este fato confirma as observações de KOPROWSKI e cols.<sup>41</sup> (1954) e de KOPROWSKI<sup>37</sup> (1954).

A tabela IV, inserindo os resultados comparativos entre proteção e soro-neutralização, obtidos com a mesma dose de vacina FLURY HEP ino culada intramuscular e intracerebralmente em cobaias, permite verificar que a concentração de anticorpos neutralizantes específicos no soro, geralmente utilizada como medida da eficácia de uma vacinação anti-rábica, talvez não represente o grau de proteção real devido à oscilação observada nos re sultados, conforme demonstram os dados da tabela VII. Assim, parece-nos que inexistem dados suficientes que possibilitem esclarecer qual é o título mí nimo necessário para a proteção. Neste particular, nossos resultados não concordam com os de ATANASIU e cols.<sup>3</sup> (1968), que concluíram, através de experiências em bovinos vacinados com diferentes tipos de vacinas, que a sobrevivência após uma infecção experimental, relaciona-se à presença de anticorpo detectável, mesmo em títulos baixos, tais como diluições finais de soro a 1:2. Esclarecem, porém, que parece persistir apreciável resistên cia à inoculação experimental de vírus patogênico, mesmo quando o anticorpo sérico tenha diminuído a níveis não detectáveis, em animais que apresen taram, previamente, anticorpos detectáveis. Estes autores admitem que a i noculação do vírus patogênico, nestas condições, agiria como uma dose de reforço, indutora de rápida resposta imune.

Segundo KAPLAN e KOPROWSKI<sup>36</sup> (1973), o homem é considerado imu ne à raiva desde que tenha anticorpos neutralizantes "demonstráveis" sem preocuparem-se com o título mínimo circulante. Os nossos resultados constan tes da tabela IV, pelo menos em nossas condições experimentais, contradi-

zem estas afirmações. O título soro-neutralizante das 12 cobaias e a porcentagem de proteção, induzidos pela administração intramuscular de vacina FLURY HEP, foram 1:22 e 66,6%, respectivamente. Adaptando as observações de ATANASIU e cols.<sup>3</sup> (1968) aos nossos resultados, um título de 1:22 seria, na prática, suficientemente elevado para a proteção de 100% dos animais, fato que não ocorreu em nossas experiências pois, das 12 cobaias, quatro não sobreviveram à dose "desafiante".

Deve ser levada em consideração a possibilidade da existência de títulos individuais muito baixos - ou mesmo nulos - entre as 12 cobaias examinadas. Todavia, nas 13 cobaias que receberam inoculações intracerebrais, o título médio sérico foi de 1:112 e, a proteção de 92,3%. Nas duas provas mencionadas, realizadas paralelamente, utilizamos o mesmo vírus e mesma dose "desafiante".

Estas observações nos levam a acreditar que, pelo menos após a primo-vacinação, os animais necessitam apresentar título relativamente e levado para proteção adequada.

Não nos foi possível verificar se a inoculação "desafiante" agiu como dose de reforço, para comprovar a hipótese formulada por ATANASIU e cols. (loc. cit.).

O nosso objetivo principal, nestas experiências, consistiu em verificar a importância dos anticorpos neutralizantes séricos, para a proteção de animais vacinados intracerebralmente. Pelos resultados observados (tabela IV), verifica-se que o título de anticorpos induzido quando da vacinação via cerebral é mais elevado do que aquele obtido pela vacinação intramuscular. Parece-nos que é viável, neste ponto, emitir a hipótese de que a inoculação intracerebral permitiria uma multiplicação relativamente mais intensa do vírus nas células eletivas, provavelmente do sistema nervoso central. Caracteristicamente, o vírus rábico é neurotrópico e a inoculação, diretamente no sistema nervoso central, tecnicamente facilitaria a sua replicação. Nestas condições, as partículas virais seriam periodicamente eliminadas para a circulação promovendo, dessa forma, um prolongado estímulo antigênico e, conseqüentemente, induzindo a títulos de anticorpos séricos bem mais elevados.

Os mecanismos de liberação das partículas virais das células do sistema nervoso central infectadas e a ativação do sistema imunocompetente, são ainda desconhecidos. Em nossa opinião, o vírus rábico modificado seria passível de sofrer alterações, tanto em sua composição química, como alterações estruturais ou genéticas, tornando-se, dessa forma, apto a replicar-se em células não nobres, existentes no tecido do sistema nervoso central, cuja destruição não determinaria lesões com sinais clinicamente evidenciáveis.

Parece que pudemos demonstrar, conforme pode-se verificar pela análise dos dados constantes da tabela V, que a obtenção de níveis de proteção e soro-neutralização quando da inoculação intracerebral, não é devida a uma difusão sistêmica do vírus, pois a sua inoculação intracardíaca proporciona nível de proteção e título soro-neutralizante mais baixos, semelhantes à via intramuscular, como era, aliás, esperado. Nesta prova de soro-neutralização, cujos resultados constam da tabela V, utilizamos amostra de vírus CVS de título elevado ( $10^{-7.87}/0,03$  ml). Possivelmente, esta tenha sido a causa de termos encontrado títulos aparentemente baixos de anticorpos, quando comparados com aqueles obtidos na experiência anterior (tabela IV), pois conforme o demonstrado por CÔRTEZ e NILSSON<sup>18</sup> (1974), dentro de certos limites, o título de anticorpos séricos diminui à medida que o número de  $DL_{50}$  de vírus aumenta, na prova de soro-neutralização em raiva.

Estes resultados nos permitem acreditar que ocorra multiplicação viral no organismo inoculado com a vacina FLURY HEP vírus modificado. Os dados constantes da tabela VI, resumizam os resultados das observações que realizamos com o objetivo de verificar esta multiplicação que, pelas características do agente, ocorreria no sistema nervoso central.

A inoculação intramuscular e intracerebral das vacinas FLURY HEP vírus modificado, e do tipo FUENZALIDA, inativada, demonstrou a superior proteção e indução à formação de anticorpos neutralizantes, pela vacina FLURY HEP vírus modificado, inoculada intracerebralmente, em relação à via intramuscular.

Analisando o gráfico nº 1, elaborado com os dados obtidos da tabela VI, verifica-se que, em relação aos controles, no 5º dia após a inoculação "desafiante", a vacina FLURY HEP aplicada por via intramuscular con

feriu proteção ligeiramente mais precoce do que a mesma vacina inoculada intracerebralmente. Com a vacina tipo FUENZALIDA, principalmente quando inoculada intracerebralmente, após a dose "desafiante", o número de mortes no 5º dia foi significativamente maior do que entre os controles. Tal fato não é devido à diferença de título de anticorpos circulantes pois este, em ambos os casos, foi  $\leq 1:10$ .

A superioridade protetora da vacina FLURY HEP poderia ser atribuída à maior imunogenicidade deste vírus, quando comparada com a do vírus fixo utilizado na preparação da tipo FUENZALIDA, ou então, poderia ser devido à desnaturação parcial do vírus fixo da vacina tipo FUENZALIDA, causada pela agressão física da radiação ultra violeta, usada em sua inativação.

Assim, conduzimos a série de provas nas quais foi introduzida a amostra FLURY HEP inativada, para possibilitar uma comparação com a amostra FLURY HEP vírus vivo modificado e a vacina FUENZALIDA. Os dados constantes da tabela VII, que sumarizam os resultados obtidos, possibilitam verificar que o vírus FLURY HEP inativado apresentou uma atividade antigênica maior do que a vacina tipo FUENZALIDA, também inativada. Tal fato seria devido à diferenças das técnicas de inativação ou, do substrato utilizado para o desenvolvimento do vírus fixo ou, ainda, a estes dois fatores associados, revelados principalmente quando da inoculação intracerebral.

Quanto à imunogenicidade das vacinas, houve correlação entre níveis de anticorpos e de proteção nos três grupos inoculados com o vírus FLURY HEP inativado. O mesmo não ocorreu entre os três grupos inoculados com a vacina tipo FUENZALIDA. A inoculação intramuscular, com 0,3 ml, induziu a um nível relativamente elevado de anticorpos circulantes não promovendo, todavia, um nível protetor correspondente.

Não foi verificada também, uma concordância entre níveis de anticorpos circulantes e proteção, quando da inoculação das vacinas FLURY HEP inativada e tipo FUENZALIDA. A inoculação intramuscular de 0,3 ml de vacina tipo FUENZALIDA, determinou um nível médio de 1:5,8 de anticorpos circulantes, enquanto que a proteção foi apenas de 26,3%. A vacina FLURY HEP inativada, induzindo a um nível médio de anticorpos circulantes igual a 1:3,2, possibilitou proteção de 55,5%, quando inoculada intracerebralmente. Extendendo ainda mais estas comparações, verificamos que títulos soro-neu-

tralizantes relativamente próximos a 1:5,8, obtidos com o vírus HEP modificado, aplicado intramuscularmente, 1:4,47, obtido com o vírus HEP modificado, inoculado intracerebralmente e 1:5,8, obtido com a vacina tipo FUENZALIDA injetada intramuscularmente, apresentaram níveis protetores muito diferentes, ou seja, 45%, 83,9% e 26,3%, respectivamente.

As diferenças observadas sugerem a existência de fatores de proteção local. Por outro lado, a comparação dos níveis de proteção entre o vírus FLURY HEP modificado e as vacinas inativadas, confirmou a hipótese mencionada. O grupo inoculado com o vírus FLURY HEP modificado apresentou proteção superior, especialmente o grupo inoculado intracerebralmente.

Quanto aos títulos de anticorpos detectados nos três grupos, nos dos vacinados com o vírus FLURY HEP modificado não houve concordância entre proteção e títulos médios de anticorpos. Em geral, os títulos médios neutralizantes foram mais elevados e consistentes no grupo inoculado com o vírus FLURY HEP modificado; no entanto, os índices protetores verificados com os três tipos de vacinas não são concordantes dentro dos grupos e nem entre as vacinas (tabela VII).

Estas observações reforçam a sugestão anteriormente emitida sobre a possibilidade da existência de uma proteção específica do tecido cerebral, especialmente quando das inoculações intracerebrais com o vírus modificado.

Os nossos resultados, ademais, sugerem a existência de outros fatores envolvidos na proteção dos animais inoculados. Estes fatores não podem ser imputados à presença do interferon, pois este age somente durante um curto período após a inoculação<sup>22, 23, 25, 29, 31, 33, 55, 64</sup> e nem ao nível de anticorpos circulantes, segundo os dados constantes da tabela VII e do gráfico nº 1.

Dessa forma, conduzimos os experimentos cujos resultados estão sumarizados na tabela VIII, na qual a inoculação intramuscular e intracerebral em grupos de camundongos com as mesmas vacinas e mesmas doses utilizadas no experimento constante da tabela VII, procurou estabelecer a atividade neutralizante do tecido cerebral. Assim, pudemos verificar que a atividade neutralizante deste tecido sobre o vírus rábico CVS, quando presen

te, foi relativamente baixa, sendo somente demonstrada quando da inoculação do vírus FLURY HEP modificado, especialmente quando inoculado por via intra cerebral (tabela VIII).

Houve concordância entre proteção, soro-neutralização e cérebro neutralização, no grupo inoculado intracerebralmente com o vírus HEP modificado, sendo este grupo que apresentou a melhor proteção (83,3%) (tabelas VII e VIII).

Uma relativa concordância entre proteção e cérebro-neutralização foi verificada no grupo inoculado com a vacina FLURY HEP, vírus modificado, inoculado por via intramuscular, com a dose de 0,3 ml. A proteção, neste grupo, foi de 42,1%, apesar de um título sérico menor do que 1:2 (tabelas VII e VIII).

As vacinas tipo FUENZALIDA e FLURY HEP inativadas, em nossas condições experimentais, não demonstraram atividade indutora cérebro-neutralizante, sugerindo que esta atividade, verificada com o vírus modificado vivo, seja devida à sua replicação no tecido cerebral.

As provas de imunofluorescência direta (tabela IX) parecem de mostrar que o vírus HEP pode ser encontrado no tecido cerebral, pelo menos até o 12º dia após a sua inoculação, independentemente da via utilizada. A sua multiplicação parece ocorrer durante um tempo mais ou menos longo, em função da via de inoculação. Quanto a intracerebral, verificamos que, no 12º dia, 70% dos camundongos apresentavam vírus intracelulares, sendo este o máximo período de observação. Quando da inoculação intramuscular de 0,3 ml da suspensão do vírus, 100% dos tecido cerebrais apresentaram reação de imufluorescência positiva, sendo observada a maior intensidade da reação no 4º dia após a inoculação. No 12º dia, não foi constatada fluorescência nos tecidos. Os animais inoculados com 0,03 ml da suspensão de vírus, apresentaram 83% de positividade no 4º dia e o máximo de intensidade foi observado no 8º dia. Esta dosagem possibilitou maior persistência do vírus nos tecidos, pois, no 12º dia, 37,5% dos animais ainda demonstraram positividade da reação. A análise da tabela VII demonstra que os animais que receberam aplicações intramusculares apresentaram títulos de anticorpos séricos 1:2 e de 1:5,8 nas doses de 0,3 (100.000 partículas) e de 0,03 ml (10.000 partículas), respectivamente. Estes valores são, pelo menos aparentemente, paradoxais e poderiam ser, provavelmente, relacionados à persistência do vírus por

maior tempo nos tecidos, determinando um prolongamento do estímulo antigênico. Visto que uma grande dose de antígeno poderia induzir a títulos precoces de anticorpos ou mesmo de interferon<sup>25</sup>, neutralizando os vírus e impedindo-os de se replicar durante um tempo maior no tecido cerebral. Uma comprovação dessa hipótese seria o desaparecimento do vírus do tecido nervoso a partir do 12º dia, nos animais inoculados intramuscularmente com a dose de 0,3 ml. Poderíamos admitir a ocorrência de neutralização pelos anticorpos formados rapidamente (detectados a partir do 2º dia, conforme demonstrado por WIKTOR e cols.<sup>65</sup> (1972), e em concentrações relativamente elevadas num dado período, devido ao maior número de partículas virais presentes. Não foi observado fato semelhante quando da inoculação intracerebral.

Estas observações deverão ser ampliadas no futuro, pois, sendo comprovadas, viriam indicar que, sob o ponto de vista imunológico, não seria interessante a administração de doses excessivas de partículas virais ativas para a imunização dos animais contra a raiva.

Os animais que receberam inoculações intracerebrais demonstraram um título de anticorpos neutralizantes séricos ligeiramente inferior aos vacinados com dose de 0,03ml intramuscularmente; demonstraram, também, um nível de proteção sensivelmente superior. Este nível protetor mais elevado poderia, provavelmente, ser atribuído ao tempo maior de persistência do vírus no tecido cerebral, o que possibilitaria um estímulo antigênico mais prolongado resultando, direta ou indiretamente, na presença de fatores ou anticorpos cerebrais em nível mais elevado. Tal hipótese nos parece ser a mais provável, em função dos resultados apresentados na tabela VIII.

Dessa forma, de conformidade com os resultados por nós obtidos, parece que os anticorpos neutralizantes em circulação não representam o único fator decisivo na profilaxia da raiva.

Conforme os trabalhos analisados no capítulo "LITERATURA CONSULTADA", verificamos que, na doença naturalmente adquirida, o vírus rábico pode ser isolado do sangue circulante, durante o período clínico<sup>44</sup>. Neste aspecto, conduzimos nossas observações e os resultados obtidos constituem a tabela X. Pudemos verificar que a inoculação intracerebral, de sangue total obtido de cobaias clinicamente raivosas em fase pré-agônica ou agônica, em camundongos de quatro a seis dias de idade, foi positiva para

a presença de vírus em baixa frequência, pois na série de quatro provas realizadas, somente em duas oportunidades pudemos detectar esta presença.

Observa-se que, apesar da elevada suscetibilidade do camundongo lactente ao vírus da raiva segundo NILSSON e SUGAY<sup>52</sup> (1966); PILO-MORON e cols.<sup>54</sup> (1967); BAGNAROLI e cols.<sup>9</sup> (1970), em nossas condições experimentais, o isolamento do vírus a partir das cobaias raivosas ocorreu em baixa frequência (tabela X).

As observações de que dispomos, neste sentido, não são suficientes para indicar se, realmente, o vírus é ocasionalmente encontrado no sangue ou se ele não é revelado devido à inexistência de técnicas mais sensíveis.

## 8. CONCLUSÕES

## 8. CONCLUSÕES

Dos resultados experimentais por nós observados, parece lícito podermos tirar as seguintes conclusões:

- 8.1 - as experimentações conduzidas em cobaias, camundongos e hamsters, parecem demonstrar que a inoculação intracerebral da vacina preparada com a amostra FLURY HEP de vírus rábico modificado, induziu a uma proteção substancialmente mais elevada do que quando a vacina foi inoculada intramuscularmente;
- 8.2 - em cobaias, a inoculação de quantidades iguais de partículas de vírus FLURY HEP modificado e de vírus fixo inativado (vacina tipo FUENZALIDA), pelas vias intramuscular e intracerebral, demonstrou a superioridade de proteção conferida pelo vírus FLURY HEP, especialmente quando inoculado intracerebralmente;
- 8.3 - parece ser possível que haja replicação viral da amostra FLURY HEP em tecidos do sistema nervoso central, pois camundongos inoculados com o mesmo número de partículas virais da amostra FLURY HEP modificada, da amostra FLURY HEP inativada e de vírus fixo inativado (vacina tipo FUENZALIDA), aplicadas intramuscular e intracerebralmente, demonstraram que a concentração de anticorpos no sangue não é o único fator responsável pela proteção dos animais frente ao efeito agressivo de um vírus "desafiante". Os testes de imunofluorescência direta, realizados no tecido cerebral, reforçam esta possibilidade, pois o vírus pode ser detectado até o 8º dia após a inoculação intramuscular e, pelo menos, até o 12º dia após a inoculação intracerebral;
- 8.4 - os resultados observados nas provas de cérebro-neutralização nos possibilitam acreditar na existência de um ou mais fatores, nas células do próprio sistema nervoso central, que apresenta uma ação neutralizante para o vírus rábico;

- 8.5 - Nossas experiências nos levam a crer que o nível protetor é tan  
to mais favorável, dentro de certos limites, quanto maior for  
a persistência do vírus ativo no tecido cerebral.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. ANDRAL, L. & SÉRIÉ, C. - Études experimentales sur la rage en Ethiopie. IV - Infection rabique latente. Porteur asymptotique o porteur silencieux. Ann.Inst.Pasteur (Paris), 108: 442-50, 1965.
2. ARKO, R.J.; SCHNEIDER, L.G.; BAER, G.M. - A case of nonfatal canine rabies. Amer.J.vet.Res., 34: 937-8, 1973.
3. ATANASIU, P.; FUENZALIDA, E.; ACHA, P.; SZYFRES, B. - Inmunidad antirrabica en bovinos vacunados. Bol.Ofic.sanit.panamer., 64:431-40, 1968.
4. BADIALI, L. & ABOU-YOUSEFF, M. - Contributo al problema della rabia abortiva o sub-letale. Vet.ital., 19: 807-35, 1968.
5. BAER, G.M. - "Rabies: mode of infection and pathogenesis. III - Pathogenesis and immunopathology". In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RABIES, 2º, Lyon, 1972. p.80-4. (Symp.Series Immunobiol.Standard, 21).
6. BAER, G.M.; SHANTHAVEERAPPA, T.R.; BOURNE, G.H. - The pathogenesis of fixed rabies virus in rats. Bull.Wld Hlth Org., 33: 783-94, 1965.
7. BAER, G.M.; SHANTA, T.R.; BOURNE, G.H. - The pathogenesis of street rabies in rats. Bull. Wld Hlth Org., 38: 119-25, 1968.
8. BAER, G.M.; SHADDOCH, J.H.; WILLIAMS, L.W. - Prolonging morbidity in rabid dogs by intratechal infection of attenuated rabies vaccine. Infect.Immun., 12: 98-103, 1975.

---

\* De acordo com as normas preconizadas pela ABTN - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1969. As abreviaturas dos títulos de periódicos foram feitas de acordo com o World Medical Periodicals. 3rd. ed. New York, 1961.

9. BAGNAROLI, R.A.; LARGHI, O.P.; MARCHEVSKY, N. - Susceptibilidad de ratones lactentes y adultos al virus rabico demostrada por immuno fluorescencia. Bol.Ofic.sanit.panamer., 68: 388-92, 1970.
10. BARTH, R. & JAEGER, O. - Über die nachweisbarkeit von tollwutvirus stamm FLURY-LEP im gehirn vacciniertes hunde. Berl.Münch.tierärztl., 80: 141-4, 1967.
11. BELL, J.F. - Abortive rabies infection. J.infect.Dis., 114: 249-57, 1964.
12. BELL, J.F.; LODMELL, D.L.; MOORE, G.J.; RAYMOND, G.H. - Brain neutralization of rabies virus to distinguish recovered animals from previously vaccinated animals. J.Immunol., 97: 747-53, 1966.
13. BELL, J.F.; GONZALES, M.A.; DIAZ, A.M.; MOORE, G.J. - Nonfatal rabies in dogs. Experimental studies and results of a survey. Amer.J.vet. Res., 32: 2049-58, 1971.
14. BELL, J.F.; SANCHO, M.I.; DIAZ, A.M.; MOORE, G.J. - Nonfatal rabies in an enzootic area: results of a survey and evaluation of techniques. Amer.J.Epidemiol., 95: 190-8, 1972.
15. BROWN, A.L.; DAVIS, E.V.; MERRY, Jr. D.L.; BECKENHAUER, W.H. - Comparative potency tests on modified live-virus rabies vaccine produced from Flury high-egg-passage virus grown on permanent dog kidney cell line. Amer.J.vet.Res., 28: 751-9, 1967.
16. BULL.WLD HLTH ORG., 10: 703-5, 1954 - Editorial.
17. CHERRY, W.B.; GOLOMAN, M.; CARSKI, T.R. - Fluorescent antibody techniques in the dianosis of communicable diseases. Atlanta, U. S. Department of Health, Education and Welfar, 1960.
18. CÔRTEZ, J. DE A. & NILSSON, M.R. - Influência da dose de vírus sobre o resultado da prova de soro-neutralização em camundongos, objetivando a determinação da taxa de anticorpos anti-rábicos. Rev.Fac. Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo, 11: 95-106, 1974.

19. DEAN, D.J.; EVANS, W.M.; McCLURE, R.C. - Pathogenesis of rabies .  
Bull.Wld Hlth Org., 29: 803-11, 1963.
20. DIAZ, A.M.; FUENZALIDA, E.; BELL, J.F. - Nonfatal rabies in dogs  
and cats. Ann.Microbiol. (Paris), 126 B: 503-9, 1975.
21. EISEN, H.N. - An introduction to molecular and cellular principles  
of the immune-responses. London, Harper and Row, 1973.
22. FENJE, P. & POSTIC, B. - Protection of rabbits against experimental  
rabies by Poly I: Poly C. Nature, 226: 171-2, 1970.
23. FENJE, P. & POSTIC, B. - Prophylaxis of experimental rabies with  
polyriboinosinic-polyribocytidylic acid complex. J.infect.Dis. .  
123: 426-8, 1971.
24. FERNANDES, M.V.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H. - Endosymbiotic  
relationship between animal viruses and host cells. J.exp.Med. ,  
120:1099-116, 1964
25. FISCHMAN, H.R. & STRANDBERG, J.D. - Inapparent rabies virus  
infection of the central nervous system. J.Amer.vet.Med.Ass., 163:  
1050-55, 1973.
26. GALTIER, apud: Rivers, T.M. & Horsfall, F.L.
27. GASPARINI, G. & CIACCIO, G. - Vaccini contro il virus della rabia.  
Veterinaria (Milano), 20: 17-53, 1971.
28. GRIBENCHA, S.V. & SELIMOV, M.A. - Non-fatal rabies in white mice .  
Ann.Microbiol. (Paris), 125 A: 227-33, 1974.
29. HARMON, M.W. & JANIS, B. - Therapy of murine rabies after exposure:  
efficacy of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid alone and in  
combination with three rabies vaccines. J.infect.Dis., 132: 241-  
9, 1975.

30. HATTWICK, M.A.; WEISS, T.T.; STECHSCHULTE, J.; BAER, G.M.; GREGG, M. B. - Recovery from rabies: a case report. Ann.int.Med., 76:931-42, 1972.
31. HO, M.; NASH, C.; MORGAN, C.W.; ARMSTRONG, J.A.; CARROL, R.G.;POSTIC, B. - Interferon administered in the cerebrospinal space and its effect on rabies in rabbits. Infect.Immun., 9: 286-93, 1974.
32. HUMMELER, K. & KOPROWSKI, H. - Investigating the rabies virus . Nature, 221: 418-21, 1969.
33. JANIS, B. & HABEL, K. - Rabies in rabbits and mice: protective effect of polyribonucleosinic and polyribocytidylic acid. J. infect. Dis., 125: 345-52, 1972.
34. JOHNSON, R.T. - Experimental rabies: studies of cellular vulnerability and pathogenesis using fluorescent antibody staining. J.neuropath.exp.Neurol., 24: 662-74, 1965.
35. JOHNSON, R.T. - "The pathogenesis of experimental rabies". In : WORKING CONFERENCE ON RABIES , Tokyo, 1970. Rabies: proceedings of Working Conference on rabies, edited by Yasuiti Nagano and Fred M. Davenport. Baltimore, University Park-Press, 1971. p. 59-75.
36. KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. - Laboratory techniques in rabies . Geneva, World Health Organization, 1973.
37. KOPROWSKI, H. - Biological modification of rabies virus as a result of its adaptation to chick embryos. Bull.Wld Hlth Org. , 10: 709-24, 1954.
38. KOPROWSKI, H. - "Pre-and postexposure prophylaxis: present status and current trends". In: WORKING CONFERENCE ON RABIES, Tokyo, 1970. Rabies: proceedings of Working Conference on rabies, edited by Yasuiti Nagano and Fred M. Davenport. Baltimore, University Park Press, 1971. p. 111-26.

39. KOPROWSKI, H. - "Immunopathology of rabies virus infection. III - Pathogenesis and immunopathology". In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RABIES, 2<sup>o</sup>, Lyon, 1972. p. 89-101. (Symp.Series immunobiol. Standard, 21).
40. KOPROWSKI, H. & BLACK, J. - Studies on chick-embryo-adapted rabies virus. IV - Immunization of guinea-pigs and description of a potency control test. J.Immunol., 72: 79-84, 1954.
41. KOPROWSKI, H.; BLACK, J.; NELSEN, D.J. - Studies on chick-embryo-adapted rabies virus. VI - Further changes in pathogenic properties following prolonged cultivation in the developing chick embryo. J.Immunol., 72: 94-106, 1954.
42. KRAUSE, W.W. apud Matsumoto, S.
43. KUBES, V. & GALLIA, F. - Brain-tissue neutralization. A new biological reaction for rabies virus. Its relation to the protection and serum-neutralization tests. Canad.J.comp.Med., 7: 48-60, 1944.
44. LEPINE, P. & GAMET, P. - La Rage. Maladies animales a virus. Paris, Expansion Scientifique Française, 1969.
45. LODMELL, D.L.; BELL, J.F.; MOORE, G.J.; RAYMOND, G.H. - Comparative study of abortive and nonabortive rabies in mice. J.infect.Dis., 119: 569-80, 1969.
46. MARKUS, H.L.; JOBIN, G.O.; JOBIN, G.B. - Cura espontânea de raiva em cão experimentalmente infectado. Estudo de um caso. Bol.Ofic. sanit.panamer., 67: 101-7, 1969.
47. MARTIN, L.A. - Infection rabique et rage curable. Maroc med., 42: 467-73, 1963.
48. MATSUMOTO, S. - Rabies virus. Advanc.Virus Res., 16: 257-301, 1970.

49. MORGAGNI, J.B. apud:Johnson, R.T.
50. MURPHY, F.A.; BAUER, S.P.; HARRISON, A.K.; WINN, Jr., W.C. - Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. Lab.Invest., 28: 361-76, 1973.
51. MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; WINN, W.C.; BAUER, S.P. - Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. Lab.Invest., 29: 1-16, 1973.
52. NILSSON, M.R. & SUGAY, W. - O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. Arq.Inst.biol. (São Paulo), 33: 47-8, 1966.
53. NILSSON, M.R. & CÔRTEZ, J. de A. - Recuperação espontânea de um cão raivoso, experimentalmente infectado. Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ. S.Paulo, 12: 229-34, 1975.
54. PILO-MORON, E.; VINCENT, J.; SUREAU, P.; NÉEL, R. - Diagnostic rapid de la rage par l'inoculation du cervau et de la glande sous-maxillaire aux souriceaux et par la immunofluorescence. Arch. Inst.Pasteur Algér., 45: 5-10, 1967.
55. POSTIC, B. & FENJE, P. - Effect of administered interferon on rabies in rabbits. Appl.Microbiol., 22: 426-31, 1971
56. REED, L.J. & MÜNCH, H. - A simple methode of stimating 50 per cent end points. Amer.J.Hyg., 27: 493-7, 1938.
57. REMLINGER, J. & BAILLY, J. - Sur la presence du virus rabique dans la salive des chiens sans, Arch.Inst.Pasteur Algér., 24: 289-93, 1946.
58. RIBEIRO, M. - Sur l'immunité antirabique des chiens vaccinés avec le vaccin Flury hep préparé sur embryon de poulet. Arch.Inst.Pasteur Algér., 48: 139-49, 1970.

59. RIVERS, T.M. & HORSFALL, F.L., ed. - Viral and rickettsial infections of man. 3th ed. Philadelphia, Lippincot, 1959. p.406.
60. SCHINDLER, R. - Studies on the pathogenesis of rabies. Bull. Wld Hlth Org., 25: 119-26, 1961.
61. SCHWAB, M.P.; FOX, J.P.; CONWELL, D.P. - Avianized rabies virus vaccination in man. Bull. Wld Hlth Org., 10: 823-35, 1954.
62. SIKES, R.K.; PEACOCK, G.V.; ACHA, P.; ARKO, R.J.; DIERKS, R. - Rabies vaccines. Duration of immunity study in dogs. J.Amer.vet.med.Ass., 159: 1491-9, 1971.
63. THE PHARMACOPOEIA of the Unite States of America. 17<sup>9</sup> rev. New York, Mc Printing, 1965. 1156 p.
64. WIKTOR, T.J.; POSTIC, B.; HO, M.; KOPROWSKI, H. - Role of interferon in the protective activity of rabies vaccines. J.infect.Dis., 125: 408-18, 1972.
65. WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H.; RORKE, L.B. - Localized rabies infection in mice. Pro.Soc.exp.Biol., 140: 759-64, 1972.
66. ZLOTNIK, I. & GRANT, D.P. - The relationship between immunity and the pathology of the central nervous system of mice infected with CVS strain of rabies. Brit.J.exp.Path., 54: 534-52, 1973.
67. ZUNKER, M. apud: Matsumoto, S.