

# NÍVEIS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES EM BOVINOS VACINADOS CONTRA RAIVA<sup>1</sup>

PAULO M. ROEHE<sup>2</sup>, AUGUSTO C. CUNHA<sup>2</sup> e ARTHUR KING<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Roehé P.M., Cunha A.C. & King A. 1987. [Neutralizing antibody levels in cattle vaccinated against rabies.] Níveis de anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados contra raiva. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(3):63-65. Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS, 90001, Brazil.

Three modified live virus vaccines and one inactivated vaccine against rabies were purchased in the market and applied into cattle, aiming the determination of neutralizing antibody levels induced. Each vaccine was injected as a single dose into groups of 10 animals/vaccine, according to manufacturer's recommendations, plus 10 uninoculated controls. Cattle serum samples were collected on days 0, 30 and 60 post-vaccination. The samples were tested against the strain CVS in the mouse neutralization test, and against CVS and ERA strains in the cell culture virus-neutralization test. All the four vaccines were shown not to be good rabies neutralizing antibody inducers. The results obtained with the two tests, despite the low titers observed in both, were not comparable, probably because of the differences in the amount of virus used for challenge.

INDEX TERMS: Rabies, neutralizing antibody, cattle.

**SINOPSE.-** Três vacinas antirábicas com vírus modificado e uma vacina inativada foram adquiridas no comércio e aplicadas em bovinos, visando a determinação dos níveis de anticorpos neutralizantes induzidos. Cada vacina foi injetada em dose única em grupos de 10 animais/vacina, de acordo com as recomendações dos fabricantes, além de 10 controles não inoculados. Amostras de soro foram coletadas nos dias 0, 30 e 60 pós-vacinação. As amostras foram testadas contra a cepa CVS no teste de vírus-neutralização em camundongos, e contra as cepas CVS e ERA no teste de vírus-neutralização em cultivos celulares. Todas as quatro vacinas demonstraram não ser boas indutoras de anticorpos neutralizantes. Os resultados obtidos com os dois testes, apesar dos baixos títulos observados em ambos, não foram comparáveis, provavelmente devido à diferença na quantidade de vírus utilizada no desafio.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Raiva, anticorpos neutralizantes, bovinos.

## INTRODUÇÃO

A raiva dos bovinos é ainda na América do Sul um problema de grandes dimensões. Anualmente, um elevado número de animais são mortos pela enfermidade, ocasionando perdas de grande significado econômico, além da perda de proteína animal (Acha 1967, Baer 1975).

Além disso, os custos sociais de cada caso são muitas vezes altos, devido à preocupação gerado por eventuais contatos com

animais enfermos e problemas relativos à necessidade ou não de tratamento de pessoas expostas.

No período 1970-1980, 41.756 casos de raiva bovina foram registrados nas Américas (Acha 1981). No Brasil, no mesmo período foram registrados 19.546 casos, aproximadamente metade do total verificado no continente. Deve-se salientar que os casos notificados seguramente representam uma sub-estimativa da real incidência (Roehé et al. 1987, no prelo).

No Rio Grande do Sul, a partir de 1983 tem se verificado uma epizootia de raiva bovina na zona serrana do Estado (Roehé et al., no prelo). Nessa ocasião, entre 1983 e 1985, foram registrados 1.410 casos da enfermidade, e até abril de 1986, já haviam sido registrados 80 novos focos (Serviço de Doenças Infecciosas, DPA - Registro de casos de raiva dos herbívoros).

Na tentativa de contribuir para o esclarecimento de fatores que possam determinar o controle da epizootia, concentramo-nos no estudo da potência de vacinas, uma vez que a vacinação é uma das alternativas de controle acessíveis aos produtores (Diego & Valotta 1979).

Nesse sentido, este trabalho foi executado visando a determinação de níveis de anticorpos neutralizantes no soro de bovinos vacinados com as vacinas antirábicas disponíveis comercialmente no Estado do Rio Grande do Sul, em determinado momento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Vacinas

Foram adquiridas no comércio quatro vacinas contra a raiva bovina, de diferentes laboratórios, com as seguintes características:

Vacina A: vacina liofilizada produzida com vírus vivo modificado, amostra ERA, em cultivo celular.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 8 de abril de 1987.

<sup>2</sup> Equipe de Virologia e Imunologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, 90001.

<sup>3</sup> Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey, UK.

Vacina B: suspensão de tecido nervoso de bovinos neonatos (40 mg/ml) infectados com vírus fixo (CVS) inativada por betapropiolactona e adicionada de glicerina e saponina.

Vacina C: vacina liofilizada produzida com vírus vivo modificado, amostra ERA, em cultivo celular.

Vacina D: vacina liofilizada produzida com vírus vivo modificado, amostra ERA, em cultivo celular.

Todas as vacinas encontravam-se dentro dos respectivos prazos de validade, e foram mantidas à temperatura de 4<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C até o momento de sua aplicação, em condições idênticas.

#### Bovinos

Cinquenta bovinos sadios, não vacinados, de idade entre 1 1/2 e 3 anos foram selecionados do plantel do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" (IPVDF). Os animais foram mantidos em condições uniformes de manejo até o final dos experimentos.

Grupos de dez bovinos foram vacinados com cada uma das quatro vacinas, usando seringas e agulhas diferentes e de acordo com as instruções dos fabricantes. Um grupo de 10 animais foi mantido como controle não vacinado.

As amostras de soro foram coletadas nos dias 0, 30 e 60 após a vacinação.

#### Testes de anticorpos neutralizantes em camundongos

Os soros coletados foram testados com a técnica descrita por Atanasiu (1973), frente à cepa CVS 31/4 de vírus rábico. Resumindo, diluições de soro de 1:5 a 1:3125 foram colocadas frente a aproximadamente 20 DL<sub>50</sub> de vírus, incubadas a 37<sup>o</sup>C por 90 minutos e inoculadas em camundongos albinos suíços de 3 a 4 semanas de idade por via intra-cerebral, na dose de 0,03 ml. Os títulos foram calculados pelo método de Reed e Muench (Lorenz & Bögel 1973), e expressos como a recíproca da diluição de soro que protegeu 50% dos camundongos inoculados.

#### Testes de anticorpos neutralizantes em cultivos celulares

Os testes de avaliação de níveis de anticorpos neutralizantes foram executados no Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey, conforme a seguinte metodologia:

Células BHK-21 foram cultivadas em meio EAGLE-MEM com 10% de soro fetal bovino e 10% de caldo triptose fosfato (E.MEM). As células foram incubadas por 3 dias a 37<sup>o</sup>C. Após, as células de uma garrafa de 80 cm<sup>2</sup> foram dispersas com tripsina 0,125% e ressuspensas a uma concentração aproximada de 25.000 células/50 µl.

Os soros foram testados em duplicada frente às cepas CVS e ERA. Em placas de microtécnica de 96 orifícios, 50µl de E.MEM foram adicionados a cada poço. Vinete e quatro microlitros de cada soro foram adicionados às primeiras duas linhas e diluídos (fator de diluição 3). Após, 50µl de uma diluição de vírus CVS ou ERA contendo aproximadamente 200 doses infectantes para cultivos celulares (DICC<sub>50</sub>) foi adicionado a cada diluição e incubados a 35<sup>o</sup>C por 60 minutos. Controles de vírus (back titration), células e soros positivo e negativo, foram incluídos na prova. A seguir, 50µl da suspensão de células foi adicionada aos poços e incubada por 4 dias a 35<sup>o</sup>C.

As placas foram então fixadas em 80% acetona por 10 minutos e secas à temperatura ambiente. Após, conjugado FITC - soro anti-nucleocapsídeo de vírus rábico (Instituto Pasteur, França), foi colocado nas placas, seguido de incubação por 30 minutos. A lavagem foi feita com PBS (pH 7,2) por 10 minutos e a leitura feita em microscópio Leitz para fluorescência com lâmpada XENON 75, objetiva 25X de longo alcance e oculares 6,3X. Os orifícios foram lidos como positivos (= vírus presente) ou negativos (= vírus ausente). O cálculo dos títulos obtidos foi feito pelo método de Reed e Muench (Lorenz & Bögel 1973) e expresso como a recíproca da diluição de soro que neutralizou o vírus em 50% dos orifícios inoculados.

#### Análise estatística

Os dados obtidos com as duas técnicas foram analisados pelo teste de análise de variância (Daniel 1977).

## RESULTADOS

### Virusneutralização em camundongos frente à cepa CVS

As vacinas apresentaram aos 0, 30 e 60 dias pós-vacinação

(d.p.v.) os seguintes resultados, considerando-se a média geométrica dos títulos observados: vacina A: 0, 0,07 e 0,62, respectivamente; vacina B: 0, 0,41 e 0,40; vacina C: 0, 0,38 e 0,99; vacina D: 0, 0,33 e 0,70. Os controles não revelaram a presença de anticorpos aos 0, 30 e 60 dias.

Os títulos observados naqueles animais que reagiram positivamente variaram de 1:5 a 1:30, sendo que este último foi obtido em somente um caso, com a vacina B aos 30 d.p.v. As médias mais altas foram obtidas aos 60 d.p.v., com exceção da vacina B, que manteve média constante aos 30 e 60 d.p.v.

### Virusneutralização em cultivos celulares

Todos os animais não apresentaram anticorpos no dia zero. Aos 30 e 60 d.p.v. a vacina A apresentou médias geométricas 0,22 e 0,09 frente à cepa ERA, bem como 0,22 e 0,21 frente a cepa CVS. A vacina B: 0,08 aos 30 d.p.v. e ausência de anticorpos (<3) aos 60 d.p.v., com ambas as cepas de vírus. A vacina C: 0,25 e 0,06 frente à ERA, e 0,25 e <3 frente à CVS. A vacina D: 0,08 e <3 frente à ERA, 0,15 e 0,05 frente à CVS.

O Quadro 1 representa o número de animais com títulos de anticorpos (<1:5 ou <1:3 nos testes *in vivo* e *in vitro*, respectivamente) em proporção ao número de animais vacinados.

Quadro 1. Número de reagentes com título igual ou superior a 1:5 (nos testes de anticorpos neutralizantes em camundongos) e 1:3 (testes *in vitro*), aos 30 e 60 dias pós-vacinação

Vírus de desafio Dias pós-vacinação	Anticorpos neutralizantes					
	Em camundongos		In vitro			
	CVS		CVS	ERA		
	30	60	30	60	30	60
Vacina A	1/9 <sup>a</sup>	5/8	2/9	2/9	2/9	1/8
Vacina B	4/10	5/10	1/9	0/9	1/9	0/9
Vacina C	4/10	8/9	3/9	0/8	4/10	1/8
Vacina D	4/10	7/10	2/10	1/10	1/10	0/10
Controles	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

<sup>a</sup> x/y = número de reagentes / número de animais em teste.

Observou-se grande variabilidade nos títulos obtidos com o teste de anticorpos neutralizantes em camundongos, em comparação com os resultados em cultivos celulares. A dose de vírus de desafio utilizada no teste *in vivo* (aprox. 20 DL<sub>50</sub>) foi um logaritmo menor que a dose utilizada no teste *in vitro* (200 TCID<sub>50</sub>), o que aparentemente refletiu-se na sensibilidade das técnicas.

A análise de variância dos títulos obtidos após a utilização das quatro vacinas não revelou diferença significativa (P<0,05).

## DISCUSSÃO

Em nosso País, as vacinas antirábicas são controladas oficialmente pelo Ministério da Agricultura (Diário Oficial da União 1975), utilizando normas preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1973).

Os testes de potência são, no entanto, métodos indiretos, isto é, não são realizados na espécie à qual as vacinas se destinam.

As vacinas destinadas a uso bovino não são testadas nessa espécie, por razões de custo e pragmaticidade. As determinações de níveis de anticorpos exigiriam um grande número de bovinos sensíveis. Além disso, se realizados testes de agressão, muitos animais teriam suas carcaças inutilizadas.

A validade da utilização de medidas de anticorpos humorais na avaliação da eficácia de vacinas antirábicas é matéria de discussão, principalmente levando-se em conta o papel da imunidade celular na proteção de indivíduos vacinados (Wiktor et al. 1977, Miller et al. 1978).

Na espécie bovina, alguns autores têm reportado que títulos altos de anticorpos estão fortemente correlacionados com proteção (Koprowski 1955, Gomez et al. 1955). Outros situam a correlação em níveis tão baixos como 1:2 (Kalmar & Tadmor 1968, Hubbard et al. 1969), 1:5 (Abelseth 1964) ou 1:10 (Ribeiro Netto et al., sem data). Ainda, alguns trabalhos não revelaram qualquer correlação (Ribeiro Netto et al. 1971, Arellano et al. 1972), o que ressalta o papel da imunidade celular no processo.

Não obstante, através deste tipo de teste têm sido estudadas várias vacinas de uso bovino, bem como são determinadas condições ótimas de dosagem, vias de aplicação e duração de imunidade (Gomez et al. 1955, Koprowski 1955, Abelseth 1964, Fábrega et al. 1965, Atanasiu et al. 1968, Fuenzalida et al. 1978).

Os resultados aqui apresentados com as quatro vacinas testadas, tanto frente à cepa CVS como à cepa ERA evidenciaram baixos níveis de anticorpos em comparação com os dados levantados por outros autores em testes similares (Atanasiu et al. 1968, Koprowski 1955, Baumgarten 1976, Dreesen et al. 1970). Embora seja impossível com os dados aqui obtidos correlacionar os títulos de anticorpos com a capacidade de induzir proteção, evidentemente a escolha da vacina mais apropriada recairia sobre a que induzisse maiores níveis de anticorpos. No presente estudo as quatro vacinas apresentaram performance similar, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos. Consequentemente, a possibilidade de escolha fica prejudicada.

Podemos, porém, afirmar com base nos resultados obtidos, que as vacinas testadas não são boas indutoras de anticorpos. Trabalhos estão em andamento para determinar a resistência de animais vacinados frente a uma agressão de vírus rábico, com cepas padrão (CVS), bem como com vírus isolado de casos de campo da presente epizootia da enfermidade.

Os dados obtidos com as técnicas *in vivo* e *in vitro* revelaram diferenças entre ambas, havendo uma maior sensibilidade em favor da primeira. Entretanto, a quantidade de vírus (CVS) de desafio utilizada nas provas apresentou uma diferença de um logaritmo, o que as tornou de difícil comparação. A quantidade maior de vírus explicaria também a maior homogeneidade dos resultados obtidos com os testes *in vitro*, bem como os títulos mais baixos e menor número de animais positivos.

Por outro lado, a variabilidade do sistema *in vivo* é bastante grande, levando a que alguns autores utilizem medianas para a expressão dos resultados (Ribeiro Netto et al. 1971, Fuenzalida et al. 1978). A correlação entre as duas técnicas em condições similares às do presente estudo foi determinada por Zalan et al. (1979). Estes autores encontraram uma significativa discrepância de 16,5% dos resultados em um total de 200 testes, apesar da correlação de 85% de sensibilidade.

Nossos dados permitem afirmar que as duas técnicas não são comparáveis quando utilizadas quantidades tão distintas de vírus na reação de soroneutralização.

## REFERÊNCIAS

- Abelseth M.K. 1964. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Canad. Vet. J.* 5:279-286.
- Acha P.N. 1967. Epidemiology of paralytic bovine Rabies and bat Rabies. *Bull. Off. Int. Epiz.* 67:343-382.
- Acha P.N. 1981. A review of rabies prevention and control in the Americas, 1970-1980. Overall status of Rabies. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93(1-2):9-52.
- Arellano S.C., Sureau P., Batalla C.D. & Morales J. 1972. Evaluación de la eficacia de la vacuna cepa Flury contra la rabia parálitica bovina. *Tec. Pec. en México* 19:9-14.
- Atanasiu P. 1973. Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin, p. 314-418. In: M.M. Kaplan & H. Koprowski (eds), *Laboratory Techniques in Rabies*. 3<sup>o</sup> ed., cap. 40. WHO, Genebra.
- Atanasiu P., Fuenzalida E., Acha P.N. & Szyfres B. 1968. Imunidade antirábica em bovinos vacunados. *Boln Ofic. Sanit. Panam.* 64:431-440.
- Baer G.M. 1975. Bovine paralytic Rabies and Rabies in the vampire bat, p. 155-175. In: G.M. Baer (ed). *The Natural History of Rabies*, Vol. 2. Academic Press, New York.
- Baumgarten E.H. 1976. Vacuna antirábica de origen de murciélago vampiro, cepa V-319 / Acatlan para proteger el ganado bovino contra la rabia parasitante en México. *Boletín sobre Rabia Parálitica (SAG, México)*, março. 5 p.
- Daniel W. 1977. Bioestadística. Base para el analisis de las ciencias de la salud, Editorial Limusa, México.
- Diego A.J. & Valotta J.R. 1979. Rabia transmitida por murciélagos. *Boln Ofic. Sanit. Panam.* 86(6):495-508.
- Dreesen D.W., Eubanks J.F. & Behymer D.E. 1970. Antibody responses in cattle vaccinated with various rabies vaccines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157(6):826-830.
- Fábrega F., Fuenzalida E. & Rodríguez R. 1965. Estudio de anticuerpos neutralizantes en el suero sanguíneo de bovinos tratados con vacuna antirábica. *Zoootría* 6:1-4.
- Fuenzalida E., Diaz A.M.O. & Rivenson S. 1978. Vacuna antirábica de cerebro de raton lactante y suplementada con adjuvante. Su aplicabilidad en bovinos. *Revta Asoc. Arg. Microb.* 10:47-53.
- Diário Oficial da União, dezembro/1975. Ministério da Agricultura, Portaria nº 881 (01/12/1975), p. 17232-17233.
- Gomez C., Black J. & Koprowski H. 1955. Rabies in cattle. III. Comparative studies on vaccination of cattle in Columbia with Flury Virus and chloroform-inactivated vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 127(10):360-363.
- Hubbard H.B., Fuenzalida E., Acha P.N., Atanasiu P., Larghi O. & Szyfres B. 1969. Rabies immunity in vaccinated cattle. *Proc. 73rd Annual Meeting of the U.S. Anim. Health Assoc.*, Oct. 12-17, p. 307-322.
- Kalmar E. & Tadmor A. 1968. Immunization of cattle against rabies with the Kelev strain vaccine. *Res. Vet. Sci.* 9:424-428.
- Koprowski H. 1955. Rabies in cattle. II. Review of immunization of herbivorous animals against rabies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 127(943):359-369.
- Lorenz R.J. & Bögel K. 1973. Methods of Calculation, p. 321-335. In: M.M. Kaplan & H. Koprowski (eds), *Laboratory Techniques in Rabies*, 3<sup>o</sup> ed., Appendix 1, WHO, Genebra.
- Miller A., Morse H.C., Winkelstein J. & Nathanson N. 1978. The role of antibody in the recovery of experimental rabies. I. Effect of depletion of B and T cells. *J. Immunol.* 121:321-326.
- Ribeiro Netto A., Nilsson M.R., Angelis Cortes J. & Miguel O. (sem data). Estudo comparativo de vacina anti-rábica de uso bovino. II. Proteção conferida pelas vacinas Alurabiffa, ERA e Formidogel. *Imunologia Veterinária, Rhodia-Mérieux*, São Paulo, 4 p.
- Ribeiro Netto A., Nilsson M.R., Miguel O., Mizuno M. & Nikitin T. 1971. Estudo comparativo de vacina anti-rábica de uso bovino. *Boln Ofic. Sanit. Panam.* 70(6):538-43.
- Roche P.M., Cunha A.C., Rodrigues R.R., Gonçalves A.R. & Ribeiro C.L.G. 1987. Diagnóstico laboratorial da Raiva no Rio Grande do Sul, Brasil: período 1979-1984. *Boln Ofic. Sanit. Panam.* (No prelo)
- Wiktor T.J., Doherty P.C. & Koprowski H. 1977. In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 74(1):334-338.
- WHO 1973. *Laboratory Techniques in Rabies*. M.M. Kaplan & H. Koprowski (eds) 3<sup>o</sup> ed., WHO, Genebra.
- Zalan E., Wilson C. & Pukitis D. 1979. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Standardization* 7:213-220.