

# Resposta imune humoral de cães domésticos que receberam dose única de vacina antivírus da raiva

## Humoral immune response of domestic dogs that received a single dose of rabies vaccine

### Resumo

O Programa Nacional de Profilaxia da Raiva tem como objetivo manter níveis imunogênicos protetores nos animais vacinados, com títulos de anticorpos neutralizantes (AcN)  $\geq 0,5$ UI/mL. O objetivo deste estudo foi avaliar, de acordo com a idade, raça e o período entre a aplicação da vacina e a colheita do sangue, a resposta imunológica de cães que receberam dose única de vacina antivírus da raiva de cultivo celular. Neste estudo foram analisadas 432 amostras recebidas no Instituto Pasteur de São Paulo no triênio 2009-2011. Os dados foram analisados e a avaliação de AcN para o vírus da raiva foi realizada por meio do teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT). Do total das amostras analisadas, 21,76% não possuíam títulos protetores. Dentre essas, 67,02% das amostras eram de filhotes e quando considerado o intervalo entre a data de aplicação da vacina e a colheita do sangue, 60,63% amostras não atingiram a titulação nos seis primeiros meses. Concluiu-se a partir do estudo desta amostragem a necessidade de uma segunda dose de vacina em filhotes, pois estes ficam mais suscetíveis à infecção pelo vírus da raiva, o que aumentaria a possibilidade de uma resposta rápida e duradoura.

### Summary

The National Programme for Rabies Prevention aims to maintain immunogenic protective levels in vaccinated animals, with titers of neutralizing antibodies (VNA)  $\geq 0.5$  IU / mL. The aim of this study was to evaluate, according to age, race, and the period of vaccination and blood collection, the immune response in dogs that received a single dose of rabies vaccine virus in cell culture. In this study 432 samples received at the Pasteur Institute of São Paulo in the triennium 2009-2011 were analyzed. Data were analyzed and the evaluation of the VNA to rabies virus was performed by rapid fluorescent inhibition test foci (RFFIT). Of the total samples analyzed, 21.76% did not have protective titers. Among these, 67.02% samples were considered puppies and when the interval between the date of vaccine administration and blood collection, 60.63% samples did not reach the titration in the first six months. It was concluded from this study sample the need for a second dose of vaccine in puppies, as they are more susceptible to infection by rabies virus, which would increase the possibility of a rapid and durable response.

Viviane Alcântara da Silva<sup>1</sup>

Thais Helena Martins Gamon<sup>2</sup>

Andréa de Cássia Rodrigues da Silva<sup>1</sup>

Graciane Maria Medeiros Caporale<sup>1</sup>

Luciana Botelho Chaves<sup>1</sup>

Karin Corrêa Scheffer<sup>1</sup>

Avenida Paulista, 393, Cerqueira César

CEP 01311-000, São Paulo – SP, Brasil

☎ +55 11 3145 3145

✉ ksferreira@pasteur.saude.sp.gov.br



#### Palavras-chave

Anticorpos neutralizantes. Resposta imune.  
Cães. Raiva. RFFIT.

#### Keywords

Neutralizing antibodies. Immune response.  
Dogs. Rabies. RFFIT.

A raiva é considerada uma das mais importantes zoonoses e acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) de todas as espécies homeotérmicas domésticas e selvagens, incluindo os seres humanos, causando encefalite, quase sempre fatal (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Assim, todos os cuidados devem ser tomados a fim de que se possa preservar as espécies suscetíveis, e a sua profilaxia é a medida mais importante, seja pelos aspectos de saúde pública, seja pelos aspectos econômicos (ANDRADE et al., 1999).

Hardt (2012) refere que, entre os anos de 1986 e 1997, no estado de São Paulo, houve cerca de 1.200 casos de cães e gatos diagnosticados positivos para raiva, sendo 96% em cães e 4% em gatos, tendo a variante 2, de cão, como a principal variante circulante. 1998 foi o último ano em que foram registradas ocorrências (7 casos) de cães com a variante 2; já entre 1999 e 2012, foram registrados cerca de 40 casos, sendo 70% em cães e 30% em gatos, tendo a variante 3, de morcego hematófago, como a principal variante circulante.

Em São Paulo, o último relato de raiva humana transmitida por cães foi em 1997, porém, em 2005, foi registrado um caso de raiva humana transmitida por gato doméstico infectado com a variante 3.

No Brasil, no período de 2006 a 2013, foram registrados 29 casos de raiva humana, sendo que 16 (55,17%) foram transmitidos por cães, 6 (20,69%) por morcegos e 7 (24,14%) por outras espécies (CALDAS, 2013).

<sup>1</sup> Laboratório de Diagnóstico da Raiva, Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup> Mestranda do departamento de Patologia Experimental e Comparada da FMVZ/ USP, SP, Brasil

Em diversos países, a raiva canina tem sido controlada devido à adoção de programas de controle da raiva por meio de vacinação maciça dos animais domésticos, consistindo em um processo bastante satisfatório (ANDRADE et al., 1999).

A importância dos anticorpos neutralizantes (AcN) antivírus da raiva na profilaxia da infecção pelo vírus da raiva vem sendo demonstrada. Esses anticorpos são essenciais na imunidade por intervirem já nos primeiros estágios da infecção pelo vírus (BALTAZAR; BAHAMANYAR, 1955). Desse modo, a titulação desses anticorpos é usada como referência de status de proteção do indivíduo contra o vírus da raiva.

A Organização Mundial da Saúde e a Oficina Internacional de Epizootias consideram como indicador para avaliar a eficácia da vacina e do tratamento em humanos e animais a determinação de AcN contra o vírus da raiva, e considera que um título igual ou superior a 0,5UI/mL representa um estado imunitário suficiente para proteger indivíduos expostos ao risco de infecção pelo vírus da raiva (BRASIL, 2008).

Estudos mostram que cães vacinados e que apresentam no soro níveis detectáveis de anticorpos antivírus da raiva raramente ficam doentes quando submetidos a um desafio com o vírus; porém, os cães vacinados que não apresentam níveis de anticorpos detectáveis morrem devido à doença (DEAN; EVANS; THOMPSON, 1964).

## Objetivo

Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta imunológica de cães que receberam dose única de vacina de cultivo celular antivírus da raiva, por meio da quantificação de Anticorpos Neutralizantes (AcN) pelo teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT), e analisar o padrão de resposta de acordo com a idade, raça e o período entre a aplicação da vacina e a colheita da amostra.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras de soros

Foram examinadas 432 amostras de soros de cães, recebidas de diferentes estados do Brasil, pelo Laboratório de Sorologia do Instituto Pasteur de São Paulo no triênio 2009-2011. Com base nas requisições de exame, foram escolhidas amostras de animais que receberam apenas uma dose de vacina até o momento da colheita do sangue, e foram avaliadas as informações sobre idade, raça e período entre a aplicação da vacina e a colheita do sangue.

Para este estudo, foram considerados animais com idade até 12 meses como filhotes e acima de 12 meses, adultos.

## Cepa Viral

A cepa de vírus da raiva utilizada foi CVS132-11A (*Challenge Virus Standard*), adaptada à cultura de células BHK-21, cedida pelo Laboratório de Raiva do Instituto Butantan.

## Linhagem Celular

Foi utilizada a linhagem de células BHK-21 (C-13 - ATCC<sup>®</sup> CCL-10). As células foram cultivadas em frascos para cultura celular de 25cm<sup>2</sup> (T25) com meio essencial mínimo de Eagle (MEM) e sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os frascos foram mantidos a 37°C por 72 horas, para a obtenção de monocamadas confluentes.

## Teste rápido de inibição de focos fluorescentes (SMITH, et. al, 1996)

A dosagem de AcN para raiva nos soros desses animais foi realizada por meio do teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT), os soros foram inativados, em banho-maria, a 56°C por 30 minutos. Foram realizadas seis diluições seriadas de cada soro, na razão 2, começando de 1:5 (Figura 1), colocando-se 25µL de soro no primeiro orifício e adicionando-se 37,5µL de MEM, com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Depois de terminada a diluição, foram adicionados 50µL de vírus cepa CVS, diluído previamente em banho de gelo, e as placas foram incubadas em estufa com CO<sub>2</sub> a 37°C por 1h30min. Após a incubação foram adicionados 50µL de células BHK-21 na concentração de 2,5X10<sup>4</sup> células/mL. As microplacas foram novamente incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 20 horas. As células foram fixadas, em banho de gelo, utilizando acetona 80% gelada (SMITH; YAGER; BAER, 1996; CHAVES et al., 2006). A reação foi revelada com adição de conjugado antivírus da raiva previamente diluído, produzido no Instituto Pasteur (CAPORALE et al., 2009). A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência invertido LEICA<sup>®</sup> DMIL com aumento de 200X (Figura 2). Os resultados foram expressos em UI/mL.

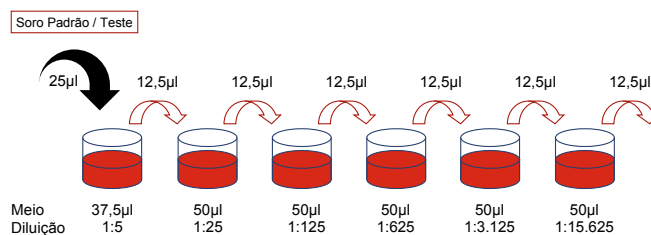
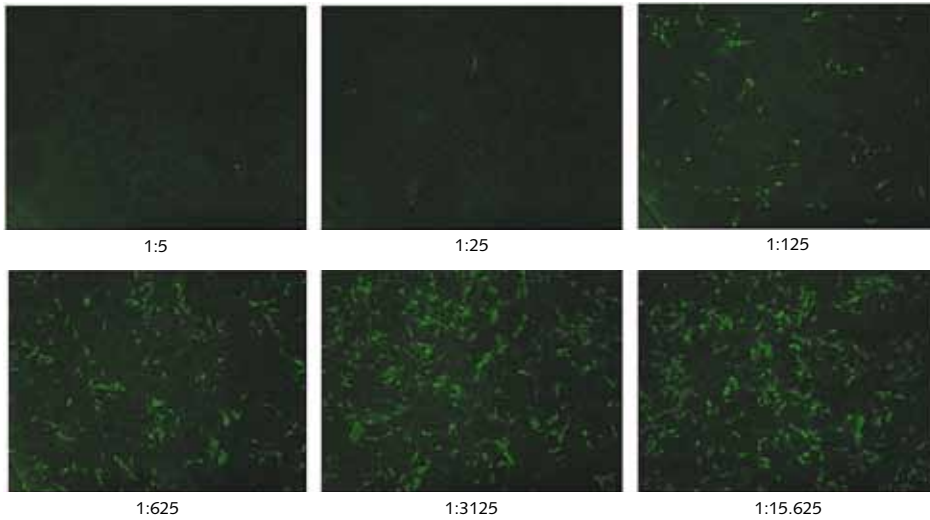


Figura 1 – Representação esquemática da diluição seriada, na razão 2, começando de 1:5



**Figura 2** – Focos fluorescentes observados na leitura realizada em microscópio de fluorescência invertido, diluições de 1:5 a 1:15.625

**Resultados**

Das 432 amostras, 21,76% (94) não apresentaram títulos satisfatórios (<0,5UI/mL) e 78,24% (338) possuíam títulos protetores contra o vírus da raiva.

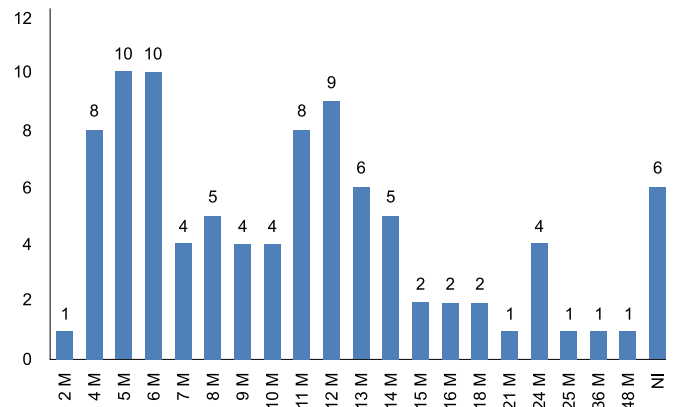
Entre as 94 amostras que não apresentaram títulos, 63 (67,02%) eram de cães filhotes, ou seja, com até 12 meses de idade. Os dados completos são apresentados no quadro 1.

Idade dos cães em Meses	Quantidade de amostras de soros
1	14
2	12
3	13
4	4
5	4
6	10
7	4
8	4
9	9
10	2
11	3
12	2
15	1
Não Informado	12
<b>Total</b>	<b>94</b>

**Quadro 1** – Idade dos animais, expressa em meses, no momento da colheita de amostras de soro para exame de titulação de AcN. Instituto Pasteur - 2013

O gráfico 1 mostra que 60,64% (57) dos animais que não apresentaram títulos protetores fizeram o exame nos 6 primeiros meses após a aplicação da vacina.

Entre as 94 amostras estudadas, foram registradas 34 diferentes raças. Dentre essas, nenhuma mostrou importância expressiva.



Legenda: NI (Não Informado)

**Gráfico 1** – Intervalo entre a vacinação e a colheita da amostra de soro. Instituto Pasteur – 2013

**Discussão**

O Programa Nacional de Profilaxia contra a Raiva (PNPR) é realizado a fim de que a raiva seja controlada. A vacinação canina é uma das atividades mais importantes e tem como objetivo principal manter níveis imunológicos protetores em animais domésticos, diminuindo assim, o número de animais suscetíveis.

Ao comparar os métodos sorológicos utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas, é importante avaliar, particularmente, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (BRIGGS et al., 1998).

O teste rápido de inibição de focos fluorescentes utilizado nesse estudo é recomendado pela WHO, por apresentar alta sensibilidade, especificidade e rapidez na obtenção dos resultados (WHO, 1992).

Rigo e Honer (2006) verificaram que de 272 cães primo vacinados, 48,5% não foram reagentes, ficando abaixo dos níveis protetores recomendados. Ramanna,

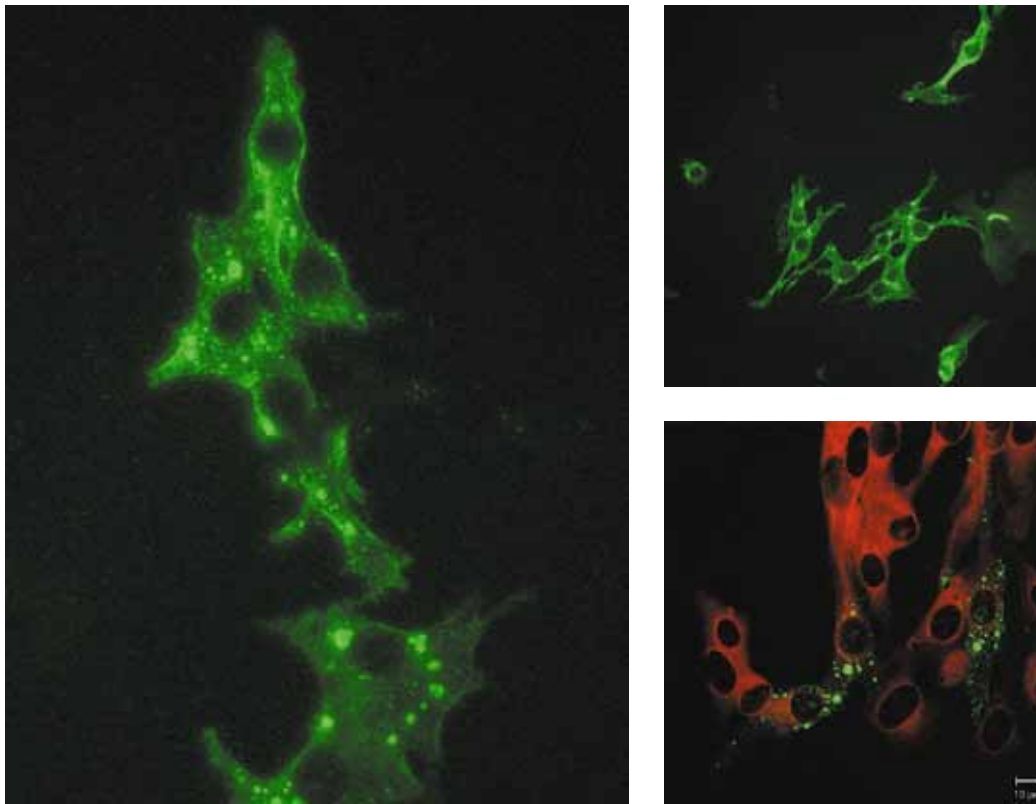


Figura 3 – Linhagem celular BHK-21 infectada com vírus da raiva, revelado pela Microtécnica Simplificada de Inibição de Fluorescência

Swain e Wakankar (2007) observaram que, depois de dose única de vacina antivírus da raiva, apenas 56% dos cães desenvolveram títulos protetores. Neste estudo, a porcentagem de animais que não apresentaram títulos satisfatórios de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva foi de 21,76%, podendo esse índice inferior ser explicado pelo fato de que as amostras analisadas eram de animais domiciliados que ingressariam na Comunidade Europeia e que supostamente poderiam ter estado nutricional e de saúde adequados.

Quando comparada a idade dos animais, 67,02% eram filhotes, resultado já esperado, como mostrado nos estudos de Teepsumethanon et al. (1991), que descreveram a cinética de AcN em três faixas etárias: 3 semanas a 3 meses, 6 a 12 meses, e mais de 12 meses. Sempre que o nível médio de AcN foi avaliado após a vacinação, os cães mais velhos apresentaram os maiores níveis de resposta. A resposta imune superior em cães mais velhos pode estar relacionada com um sistema imunológico mais desenvolvido e pelo número de doses de vacinas anuais durante esse período.

Almeida et al. (1997), investigando o título protetor de cães um ano após a vacinação e nova avaliação 30 dias após o reforço vacinal, nos municípios de São Paulo e Paulínia,

usando a técnica de RFFIT, verificaram que 74,1% dos animais possuíam títulos menores que 0,5UI/ml após 12 meses de vacinação. Rigo e Honer (2006) observaram que, após doze meses da última vacinação, houve uma queda em torno de 50% dos níveis de imunidade nos cães anteriormente vacinados. Quando analisado o intervalo entre a aplicação da vacina e a colheita da amostra de soro para a realização do exame, 60,64% dos animais não apresentaram títulos protetores nos 6 primeiros meses; porém, quando avaliado no mesmo período de 12 meses, esse número é elevado para 86,17%.

Ramanna, Swain e Wakankar (2007) mostraram que, quando uma dose de reforço foi administrada no período de 12 meses, os níveis consideráveis de anticorpos persistiram até 24 meses. Portanto, a dose de reforço anual da vacina melhoraria a resposta imune e ajudaria na persistência de níveis protetores de anticorpos em cães imunizados.

Concluiu-se a partir deste estudo, que os filhotes estão mais suscetíveis à infecção pelo vírus da raiva do que os adultos, indicando a necessidade de uma segunda dose de vacina antes dos 12 meses, o que aumentaria a possibilidade de uma resposta rápida, maior e mais duradoura. ☺

## Referências

- ALMEIDA, M. F.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, J. A. F. Resposta imune humoral de cães à vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 502-507, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101997000600009>>. Acesso em: 18/11/2013
- ANDRADE, M. C. R.; OLIVEIRA, A. N. de; ROMIJN, P. C.; KIMURA, L. M. S. Resposta imune produzida por vacinas anti-rábicas em sagüis (*Callithrix* sp.). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 533-540, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821999000500011>>. Acesso em: 19/11/2013
- BALTAZAR, M.; BAHAMANYAR, M. Essai pratique du sérum antirabique chez les mordus par les loups enragés. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 13, n. 5, p. 747-72, 1955.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de diagnóstico laboratorial da raiva**. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2008. 106 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRIGGS, D. J.; SMITH, J. S.; MUELLER, F. L.; SCHWENKE, J.; DAVIS, R. D.; GORDON, C. R.; SCHWEITZER, K.; ORCIARI, L. A.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. **Biologicals**, v. 26, p. 347-355, 1998.
- CALDAS, E. P. Situação epidemiológica da raiva no Brasil. In: SEMINÁRIO DO DIA MUNDIAL CONTRA A RAIVA, 6., 2013, Serra Negra, SP, 2013. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/instituto-pasteur/paginas-internas/world-rabies-day/dia-mundial-da-raiva-2013>>. Acesso em: 06 jan. 2014.
- CAPORALE, G. M. M.; SILVA, A. C. R.; PEIXOTO, Z. M. P.; CHAVES, L. B.; CARRIERI, M. L.; VASSÃO, R. C. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 7-13, 2009.
- CHAVES, L. B.; MAZUTTI, A. L. C.; CAPORALE, G. M. M.; SCHEFFER, K. C.; SILVA, A. C. R. Comparison of rffit performed in lab-tek® and in 96-well microtitre plates. In: RABIES IN THE AMERICAS CONFERENCE, 17., 2006, Brasília, DF, 2006. p. 161.
- DEAN, D. J.; EVANS, W. M.; THOMPSON, W. R. Studies on the low egg passage flury strain of modified live rabies virus produced in embryonating chicken eggs and tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 756-63, 1964.
- HARDT, L. Situação epidemiológica da raiva - Dados do Instituto Pasteur. In: CICLO DE SEMINÁRIOS DO PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL, 2012, Instituto Pasteur. São Paulo, SP. Comunicação Oral.
- RAMANNA, B. C.; SWAIN, A. K.; WAKANKAR, C. C. A study on the seroconversion in dogs vaccinated with cell culture rabies vaccine. **Journal of Communicable Diseases**, v. 39, n. 3, p. 165-170, 2007.
- RIGO, L.; HONER, M. R. Titulação de anticorpos contra o vírus da raiva em cães, em Campo Grande, MS, na campanha anti-rábica de 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 553-555, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000600008>>. Acesso em: 15/04/2013
- SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization. Geneva, 1996. p. 114-130.
- STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 1-24.
- TEEPSUMETHANON, W.; POLSUWAN, C.; LUMLERTDAECHA, B.; KHAWPLOD, P.; HEMACHUDHA, T.; CHUTIVONGSE, S.; WILDE, H.; CHIEWBAMRUNGIAT, M.; PHANUPHAK, P. Immune response to rabies vaccine in Thai dogs: a preliminary report. **Vaccine**, v. 9, p. 627-630, 1991.
- WHO. WORD HEALTH ORGANIZATION. **Expert committee on rabies**. Geneva: WHO, 1992. (Who Technical Report Series, n. 824).
- WHO. WORD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to good manufacturing practice (GMP) requirements**. Geneva, WHO, 1997. pt. 2.