

## TITULAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A RAIVA EM SOROS DE CÃES UTILIZANDO A TÉCNICA DE CONTRAIMUNOELETROFORESE

ALMEIDA, G. S.<sup>1\*</sup>; SOUZA, H. C.<sup>1</sup>; MATTOS, G. L. M.<sup>2</sup>; DIAS, A. V. A. B.<sup>2</sup>; MOREIRA, W. C.<sup>3</sup>

### RESUMO

A Raiva é uma zoonose letal tendo como agente etiológico o vírus pertencente à Ordem Mononegavirales e Família Rhabdoviridae. A doença é transmitida pela mordedura de animais infectados, afetando o sistema nervoso central de mamíferos. Os caninos são importantes transmissores do vírus, e difundem a Raiva através da saliva infectada de um animal doente em ambientes urbanos. A vacina Fuenzalida e Palácios modificada é uma vacina inativada contra a Raiva, produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos, inoculados com a cepa Pasteur de vírus fixo (PV). O Programa Nacional de Profilaxia contra a Raiva (PNPR) é realizado a fim de que a Raiva seja controlada no Rio de Janeiro e no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunidade dos cães à vacinação anti-rábica com a vacina Fuenzalida e Palácios utilizada na Campanha de Vacinação no município do Rio de Janeiro pela CIE. Selecionaram-se trinta cães provenientes da Subgerência de Destinação Animal (DAS) do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” e os soros foram titulados pela técnica de Contraimunoelectroforese (CIE). Os resultados obtidos demonstraram que os animais apresentavam título protetor ( $\geq 0,5$  UI/mL) após a 1ª dose de vacina. As diferenças nos títulos de anticorpos entre os dias 0 e 28º de coleta tiveram significância estatística.

**PALAVRAS-CHAVE:** Contraimunoelectroforese, Raiva, Sorologia, Vacinação Anti-rábica.

### INTRODUÇÃO

A Raiva é uma zoonose viral letal transmitida principalmente pela mordedura de animais infectados, afetando o sistema nervoso central de mamíferos (MURPHY e BAUER, 1974). Os principais transmissores são os cães e os morcegos. O vírus pertence à Ordem Mononegavirales, Família Rhabdoviridae, gênero Lyssavirus,

---

<sup>1</sup> Acadêmico Bolsista da Seção de Virologia do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, Rio de Janeiro, R.J. e graduando de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, R.J.

<sup>2</sup> Médico Veterinário da Seção de Virologia do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, Rio de Janeiro, R.J.

<sup>3</sup> Médico Veterinário da FIOCRUZ/CECAL.

possui forma de projétil, apresentando uma extremidade arredondada e outra plana. O genoma é constituído por fita simples de RNA, não segmentado e de polaridade negativa. Apresenta dois antígenos principais, a glicoproteína G (externa) e a nucleoproteína N (interna) (TORDO et al., 1996).

Em áreas urbanas, os cães são mencionados como o principal elo da cadeia epidemiológica. Entretanto, é importante que a evolução da população felina também seja avaliada, pois esta vem apresentando indícios de significativo incremento em diversas cidades, pelo fato de os gatos estarem se tornando animais de companhia, e assim apurar sua importância epidemiológica na transmissão da Raiva.

Com a criação do Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR), o índice da Raiva urbana tem se reduzido (SCHNEIDER, 1990). A vacinação Anti-rábica é realizada anualmente na Campanha Nacional Anti-rábica no mês de setembro. No município do Rio de Janeiro, a campanha é dividida em 5 etapas, de setembro a dezembro.

A vacina Fuenzalida & Palácios modificada é produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos, inoculados com as cepas PV (*Pasteur Virus*) ou CVS (*Challenge Virus Standard*). Tem alto poder antigênico e baixa concentração de substância nervosa (cerca de 2%) (ALMEIDA et al., 1997).

A técnica de Contraimunoeletroforese (CIE) utilizada para diagnóstico sorológico, tem por fundamento a ligação entre os anticorpos presentes em diluições seriadas do soro com o antígeno. A concentração de 0,5 UI/mL é considerada protetora (SILVA et al., 2002).

No presente trabalho verificou-se a resposta imunológica dos cães, pela CIE com o objetivo de avaliar a imunidade à vacinação anti-rábica com a vacina Fuenzalida & Palácios utilizada nas campanhas de vacinação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados trinta cães provenientes do Setor de Destinação Animal do Instituto Municipal de Medicina Veterinária "Jorge Vaitsman" (IMMVJV), 17 machos e 13 fêmeas, sem raça definida (SRD), sadios, de comportamento linfático e adultos com idade estimada de 3 a 5 anos. Os cães foram separados nos grupos A, B e C, com 10 cães por grupo. O grupo A foi composto por 10 fêmeas; o grupo B por 1 fêmea e 9 machos; e o grupo C por 2 fêmeas e 8 machos. Os cães eram separados em lotes de animais pertencentes a um mesmo sexo, o que justifica a formação dos grupos a fim de facilitar o manejo. Entretanto, já foi comprovado na literatura, que o sexo não interfere na resposta imunológica do animal (MANSFIELD et al., 2004).

Foi utilizada a vacina Fuenzalida & Palácios do laboratório TECPAR (Instituto de Tecnologia do Paraná / Curitiba, Paraná, Brasil). O grupo A recebeu três doses (dias 0, 7 e 14) o grupo B duas doses (dias 0 e 7) e o grupo C uma única dose de vacina (dia 0).

A coleta de sangue totalizou 120 amostras de soro. De cada cão foram coletadas quatro amostras nos dias 0, 7, 14 e 28, inativadas a 56°C por 30 minutos e

armazenadas em freezer a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram tituladas nas diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 pela técnica de CIE (DIAZ e MYERS, 1980).

Com os resultados obtidos foi realizada a análise estatística utilizando a análise de variância (ANOVA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do início do esquema de vacinação, 80% dos cães não apresentaram o título mínimo protetor na técnica de CIE ( $0,5 \text{ UI/mL}$ ) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992) e os 20 % restantes possuíam títulos baixos, sugerindo já terem sido vacinados anteriormente. Todos os animais possuíam título  $\geq 0,5 \text{ UI/mL}$  sete dias após a 1ª dose de vacina. Ao final do esquema, 50 % dos animais do grupo C, apresentaram título  $< 0,5 \text{ UI/mL}$ . As médias geométricas dos títulos de cada dia de coleta foram plotadas (Figura 1).

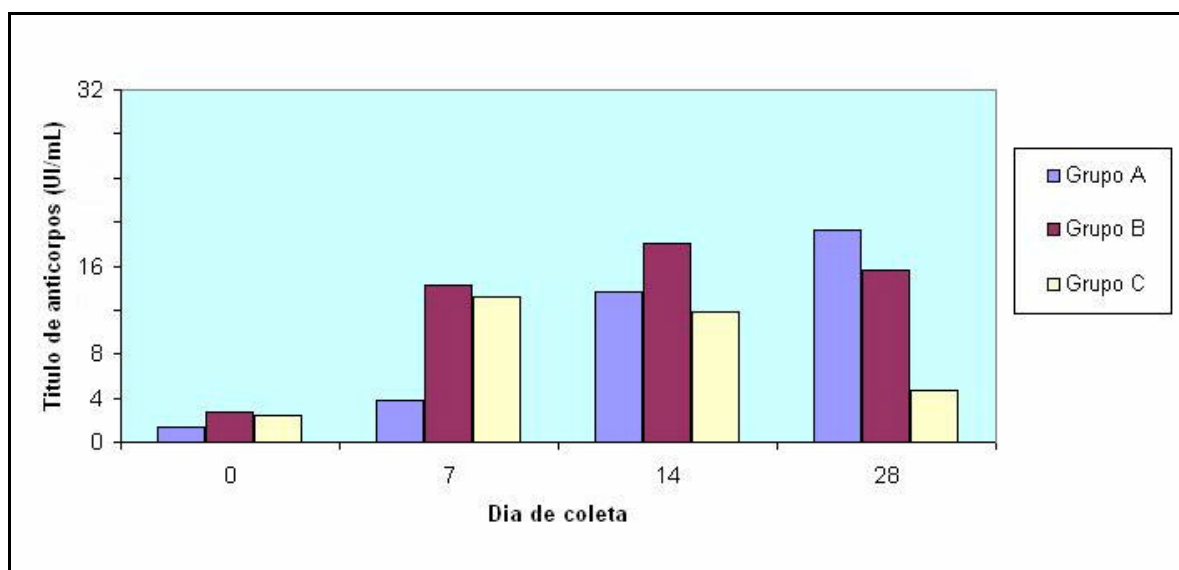


Figura 1: Gráfico das médias geométricas dos títulos de anticorpos nos grupos A, B e C, nos dias 0, 7, 14 e 28

No grupo A foi notado um aumento gradativo dos títulos no intervalo observado e o pico de anticorpos ocorreu no dia 28. No grupo B houve um aumento progressivo com quase constância entre os dias 14 e 28, sendo o pico de anticorpos no dia 14. No grupo C foi verificado um pico de anticorpos no dia 7 da coleta.

Os resultados de análise de variância do modelo de regressão dos títulos de anticorpos obtidos nos dias 0 e 28, pelos grupos A, B e C, estão representados na Tabela 1. Nos grupos A e B, foi observado que não há similaridade entre os resultados devido a um aumento gradativo dos títulos de anticorpos. Já o grupo C

apresentou similaridade entre os resultados ( $F = 6,594$ ;  $p = 0,033$ ), pois houve um declínio dos títulos de anticorpos no 28º dia.

Tabela 1: Análise de variância (ANOVA) do modelo de regressão linear dos títulos de anticorpos anti-rábicos entre os dias 0 e 28

Análise de Variância (ANOVA)						
Grupos		Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	$F$	$p$
A	Regressão	0,001	1	0,001	0,018	0,896
	Residual	0,443	8	0,055		
	Total	0,444	9			
B	Regressão	0,216	2	0,108	1,461	0,295
	Residual	0,518	7	0,074		
	Total	0,734	9			
C	Regressão	0,999	1	0,999	6,594	0,033
	Residual	1,212	8	0,151		
	Total	2,211	9			

Silva et al. (1967) descrevem que a vacina Fuenzalida & Palácios possui uma elevada condição imunogênica nas provas de potência, e neste trabalho, quanto maior o número de doses administradas, maiores foram os títulos de anticorpos.

A vacinação em cães deve ser realizada anualmente em campanha utilizando a vacina Fuenzalida & Palácios. Esta vacinação é uma das atividades mais importantes e o seu objetivo principal é manter índices imunogênicos protetores em animais domésticos, principalmente cães e gatos (SILVA et al. 2002). Notou-se que quando ao menos duas doses de vacina foram administradas, os títulos se mantiveram até o 28º dia de coleta, porém na campanha de vacinação é administrada apenas uma dose da vacina conforme indicado por Reichmann et al. (1999).

Rigo e Honer (2006), também referem que muitos animais podem não estar protegidos no período compreendido entre uma campanha de vacinação e outra, como sugerido por nossos resultados.

O Parlamento Europeu e o Conselho da União Européia (2003) preconizam a coleta do sangue do animal com no mínimo 30 dias da vacinação e três meses antes

da viagem para efeito de permissão do trânsito internacional de cães. Em nossa observação, verificou-se que 50% dos animais que receberam uma dose, no 28° dia de coleta de sangue, não possuíam títulos  $\geq 0,5$  UI/mL embora todos apresentassem esses títulos nos dias 7 e 14 do esquema vacinal, o que inviabilizaria o trânsito desses animais.

Germano et al. (1982) ao analisarem a resposta imune de cães primovacinados com a vacina Fuenzalida & Palácios, também observaram rápido declínio dos títulos de anticorpos com uma dose de vacina, embora a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984) 2 a 4 semanas após o início do tratamento, espera obter um título de pelo menos 0,5 UI/mL, que é o recomendado como índice mínimo de proteção.

## CONCLUSÕES

A Contraimuno eletroforese é uma técnica laboratorial que poderá ser utilizada para verificar o título de anticorpos anti-rábicos de cães.

Animais vacinados com uma dose da vacina Fuenzalida & Palácios, 28 dias após o início da vacinação, podem não apresentar títulos de anticorpos  $= 0,5$  UI/mL na CIE.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.F. et al. Resposta imune humoral de cães à vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. **Rev. Saúde Pub.**, v. 31, n. 5, p. 502-507, 1997.

DIAZ, A.M.; MYERS, D.M. Determinação of serum neutralization antibodies to rabies virus by a modified counterimmunoelectrophoresis test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 12, n. 2, p. 175-179, 1980.

GERMANO, P.M.L. et al. Avaliação da resposta imunitária da vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes aplicada em cães primo vacinados em condições naturais. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.**, v. 19, n. 1, p. 67-74, 1982.

MANSFIELD, K. L. et al. Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination. **The Vet. Rec.**, v. 154, n. 14, p. 423-426, 2004.

MURPHY, F.A.; BAUER, S.P. Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. **Intervirol.**, v. 3, n. 4, p. 256-268, 1974.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPÉIA. **Regulamento nº 998/2003 de 26 de maio de 2003**. Bruxelas, Bélgica, 2003; [http://eur-lex.europa.eu/pri/pt/oj/dat/2003/l\\_146/l\\_14620030613pt00010009.pdf](http://eur-lex.europa.eu/pri/pt/oj/dat/2003/l_146/l_14620030613pt00010009.pdf) ; em 10/04/08.

REICHMANN, M.L.A.B. et al. Vacinação contra a raiva de cães e gatos. **Manuais nº3**, Inst. Pasteur, 32p., 1999.

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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 39, n 6, p. 553-555, 2006.

SCHNEIDER, M.C. Estudo de avaliação sobre área de risco para a raiva no Brasil. 1990, **Dissertação de Mestrado**, FIOCRUZ/ENSP, 230p.

SILVA, L.H.Q. et al. Comparison between the Counter Immunoelectrophoresis Test and Mouse Neutralization Test for the Detection of Antibodies against Rabies Virus in Dog Sera. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 97, n. 2, p. 259-261, 2002.

SILVA, N.N. et al. MARKUS, H.L.; PADILHA, A.A. **Bol. Of. San. Pan.** 39 (27): 223-226, 1967.

TORDO, N. In: MESLIN, F.X. et al. **Laboratory techniques in rabies**. Genebra: World Health Organization, 1996, p. 30-31.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Committee on Rabies**. Seventh report. Genebra, 709 p.,1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Committee on Rabies**, Eighth report. Genebra, 824p.,1992.