

VACINAS ANTI-RÁBICA FLURY DE ALTA PASSAGEM. I. ESTUDO CRÍTICO DA PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIOS

M. R. NILSSON*

J. A. CÔRTEZ**

RFMV-A/30

NILSSON, M.R. & CÔRTEZ, J.A. Vacinas anti-rábicas Flury de alta passagem. I. Estudo crítico da prova de potência em cobaias. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S.Paulo.* 5 (2): -, 205-14, 1978.

RESUMO: Uma apreciação crítica do teste de potência em cobaias para a avaliação da eficiência de vacinas anti-rábicas foi realizada utilizando-se 198 partidas de vacina Flury de alta passagem (H.E.P). O estudo revelou uma baixa reprodutividade deste procedimento expressa, de um lado, pelo elevado número de provas, 88 (44,5%) que deixaram de satisfazer os critérios mínimos de julgamento (mortalidade de pelo menos 80% dos animais do grupo-controle) e, de outro, pela expressiva parcela de provas, 60 (30,3%) que, embora satisfazendo tais requisitos não propiciaram elementos suficientes para garantir a comparabilidade de seus resultados em virtude da morte de todos os animais do grupo-testemunha, não possibilitando determinar-se a quantidade de vírus-desafio efetivamente empregada. Os autores sugerem que, ressalvadas as demais características desta prova, um critério mais conveniente para julgamento de seus resultados deveria estabelecer uma mortalidade entre 80% e menos 100% dos animais do grupo testemunha.

UNITERMOS: Raiva*; Vacina Flury HEP*; teste de potência em cobaias.

1. INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de produtos biológicos destinados ao uso humano ou veterinário constitui-se numa permanente preocupação por parte de todos que se dedicam aos problemas de saúde.

No caso da raiva pode-se dizer que a primeira prova de eficiência surgiu com a descoberta, por PASTEUR e cols.^{20, 21}, da vacina contra esta doença.

Desde então numerosos estudos têm sido realizados visando a descoberta de um procedimento capaz de avaliar, com fidelidade, a qualidade das vacinas anti-rábicas¹⁸.

O emprego da cobaia introduzido por KOPROWSKI¹⁴ para o teste das va-

cinas avianizadas veio superar algumas dificuldades decorrentes da adaptação do próprio vírus. Esta prova que se resumia em inocular a vacina pela via intramuscular (IM), vírus virulento de prova pela mesma via, 21 dias depois, devendo sobreviver 70% das cobaias vacinadas contra a morte de 80% das testemunhas, revelou-se satisfatória por apresentar correlação entre seus resultados e aqueles obtidos em testes realizados em cães¹⁴.

A despeito destas observações iniciais, este teste tem sido objeto de severas críticas em vista das dificuldades encontradas para sua padronização de forma a possibilitar a comparabilidade dos resultados obtidos em diferentes oportunidades¹⁸.

Neste sentido objetivamos, com o

* Pesquisador Científico (PQ.6). Instituto Biológico de São Paulo.

** Livre Docente Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

presente, proceder a uma apreciação crítica da prova de potência em cobaias quando aplicada ao controle oficial de vacina anti-rábica Flury de alta passagem (HEP)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1) Vacinas

Empregamos vacinas avianizadas Flury de alta passagem (HEP), preparadas segundo KOMAROV (1954)¹². A técnica de elaboração das vacinas encontra-se descrita em trabalho anterior¹⁶.

2.2) Animais

Camundongos: brancos, suíços, originários da Fundação Rockefeller, da criação do Instituto Biológico de São Paulo. Estes animais, empregados para as diversas titulações dos vírus de confronto, tinham mais de 21 dias de idade e pesavam 12 a 30 gramas.

Cobaias: albinas, da criação do Instituto Biológico de São Paulo, com peso entre 350 a 400 gramas.

2.3) Diluente

Água destilada com 2% de soro de cavalo normal, inativado a 56°C por 30 minutos, adicionada de 1000 unidades de penicilina e 1,25 mg de estreptomicina por mililitro.

2.4) Vírus

Empregamos três diferentes amostras:

- a) CVS ("challenge virus standard") — vírus fixo padrão fornecido pelo Centro Panamericano de Zoonoses, da Organização Sanitária Panamericana. A amostra, quando recebida, foi a 23-4 e sofreu, em nosso laboratório, várias passagens, via intracerebral (IC), em camundongos.
- b) M. 95/60 — amostra isolada de bovino raivoso, do município de Santa Isabel, em 1960 (NILSSON et alii)¹⁷, com várias passagens em cobaias, via IM, e camundongos, via IC.
- c) M. 37/60 — amostra isolada de cão,

recebida para diagnóstico em abril de 1960, do município de Santo André, com duas passagens via IC em camundongos. Todas as amostras foram conservadas em congelador a temperaturas de -15°C a -25°C, sob as formas de cérebro ou suspensão de cérebro a 20% em diluente.

PROVAS DE POTÊNCIA

Seguimos em essência o preconizado por KOPROWSKI¹³, exceto que não utilizamos vírus de glândula salivar de cão, raivoso para a comprovação, mas sim, de cérebro de cobaias e de camundongos.

Dez ou mais cobaias eram inoculadas, via IM, na coxa, com 0,25 ml da vacina diluída a 5×10^{-2} . Pelo menos 5 cobaias eram separadas e deixadas como controle. Decorridos 21 dias da vacinação, inoculamos as cobaias vacinadas e as do grupo-controle com vírus virulento, via IM, na coxa oposta àquela em que foi aplicada a vacina, em dose variável de 0,1 ml a 0,5 ml e diluição entre 10^{-1} e $1,25 \times 10^{-2}$. Observamos os animais durante 30 dias, anotando-se os que adoeciam com sintomas de raiva e que apresentavam sempre paralisia precedendo a morte.

O requisito mínimo exigido para o teste era sobrevivência de pelo menos 70% das cobaias vacinadas, contra morte de pelo menos 80% das cobaias testemunhas. Quando havia qualquer dúvida em relação às cobaias mortas, verificamos o diagnóstico pelas técnicas usuais^{8,23,27}.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se agrupados nas Tabelas I e II apresentadas a seguir.

A Tabela I registra os resultados das provas de potência em cobaias, de 198 partidas de vacina anti-rábica Flury-HEP.

Uma apreciação preliminar dos elementos desta Tabela mostra que das 198 provas realizadas somente em 110

(55,5%) os requisitos mínimos da prova (mortalidade de pelo menos 80% dos animais do grupo testemunha) foram alcançados, o que revela um baixo grau de reprodutividade deste procedimento.

Os referidos dados revelam ainda que, em tais condições, apenas 58 partidas de vacina (52,7%) poderiam ser consideradas de qualidade satisfatória para o consumo.

Ao atentarmos para o fato de que uma dose excessiva de vírus desafio poderia influenciar o resultado desta prova, veremos, com base nos dados desta mesma tabela, que em 60 dos testes realizados a quantidade de vírus empregada ao desafio foi suficiente para matar pelo menos 100% dos animais do grupo-controle, não sendo, pois, possível manter-se, com segurança, a comparabilidade da dose de vírus efetivamente empregada em diferentes oportunidades.

Assim sendo, resolvemos apreciar os resultados das provas em que a mortalidade dos animais do grupo testemunha ficasse compreendida numa faixa possível de ser comparada em todos os casos, ou seja, entre 80% (mínimo exigido) e menos de 100%. Os resultados obtidos com base neste critério estão incluídos na Tabela II.

Os valores desta tabela revelam que das 110 provas consideradas válidas pelo critério anterior apenas 50 apresentaram condições de julgamento por este novo critério; todavia, o grau de aprovação das vacinas ascendeu de 52,7 para 62%.

4. DISCUSSÃO

A prova de eficiência em cobaias para vacinas avianizadas Flury de alta passagem, em nossas condições, revelou-se de baixa reprodutibilidade, desde que realizamos 198 testes para aproveitamento de apenas 110 (55,5%), que preencheram os requisitos mínimos, isto é, mortalidade de pelo menos 80% das cobaias do grupo testemunha. Dificuldades semelhantes têm sido assinaladas^{4,5,6,15,26}.

Talvez uma das causas de nosso insucesso, possa ser atribuída ao fato de não utilizarmos amostra de vírus de glândula salivar de cão e temperatura de - 70 °C para a conservação das amostras de vírus, tal como recomenda originalmente^{13,14}. Neste sentido, tem sido proposto o uso de glândulas salivares virulentas liofilizadas²⁵.

A amostra de vírus empregada na comprovação não parece exercer influência no mau aproveitamento dos testes, uma vez que as falhas ocorreram com todas as amostras de vírus e em 4 oportunidades, onde empregamos no mesmo teste 2 diferentes vírus (CVS e M.95/60), obtivemos coincidentemente 3 falhas com ambas as amostras e, na restante, o CVS funcionou, mas não o M.95/60 (Tabela I: vacinas 058, 127, 162 e 191). JOHNSON¹¹ referiu-se a vacinas que protegeram animais de laboratório contra vírus de rua, o mesmo não ocorrendo em relação ao vírus fixo, fato este também citado por outros autores^{1,4}.

TABELA I — Provas de potência em cobaias, de vacinas anti-rábica Flury HEP, São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972.

VACINAS Nº	PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS				Vírus	Resultado
	Vacinas		Testemunhas			
	M/I**	Proteção %	M/I**	Mortalidade%		
001	6/10	40	4/5	80	M.95/60	R
002	4/8	50	5/5	100	M.95/60	R
003	7/10	30	4/5	80	M.95/60	R
004	9/10	10	5/5	100	M.95/60	R
005	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
006	8/10	20	4/5	80	M.95/60	R
007	14/14	0	10/10	100	CVS	R
008	9/10	10	4/5	80	CVS	R
009	2/10	80	0/5	0	CVS	?
010	9/13	31	5/10	50	CVS	?
011	7/9	22	3/6	50	CVS	?

TABELA I - (Continuação)

VACINAS		PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS				
Nº	Vacinadas M/I**	Proteção %	Testemunhas M/I**	Mortalidade %	Vírus	Resultado
012	5/10	50	5/7	71	CVS	?
013	10/10	0	5/5	100	M.95/60	R
014	7/9	22	5/5	100	M.95/60	R
015	3/9	66	5/7	71	CVS	?
016	4/9	55	5/7	71	CVS	?
017	10/10	0	9/10	90	CVS	R
018	2/9	77	3/6	50	M.95/60	?
019	8/10	20	5/5	100	M.95/60	R
020	10/10	0	5/5	100	M.95/60	R
021	15/15	0	8/8	100	CVS	R
022	5/10	50	4/6	66	M.95/60	?
023	4/10	60	3/6	50	CVS	?
024	6/10	40	4/5	80	M.95/60	R
025	6/10	40	4/6	66	M.95/60	?
026	6/8	25	9/10	90	M.95/60	R
027	5/10	50	3/5	60	CVS	?
028	7/9	22	4/5	80	M.95/60	R
029	6/10	40	5/5	100	M.95/60	R
030	10/10	0	5/5	100	M.95/60	R
031	4/9	55	5/10	50	M.95/60	?
032	4/10	60	8/10	80	M.37/60	R
033	7/10	30	5/5	100	CVS	R
034	6/8	25	9/10	90	CVS	R
035	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
036	9/10	10	3/6	50	CVS	?
037	7/9	23	4/5	80	M.95/60	R
038	3/9	66	3/5	60	CVS	?
039	5/7	28	9/10	90	CVS	R
040	6/10	40	3/6	50	M.95/60	?
041	6/10	40	5/5	100	CVS	R
042	1/15	93	4/10	40	CVS	?
043	4/8	50	5/7	71	CVS	?
044	9/15	40	9/10	90	CVS	R
045	7/7	0	11/11	100	CVS	R
046	7/10	30	10/10	100	M.95/60	R
047	3/8	62	8/8	100	CVS	R
048	5/11	54	7/10	70	M.95/60	?
049	7/10	30	2/5	40	M.95/60	?
050	4/9	55	6/9	66	M.95/60	?
051	2/10	80	3/5	60	M.95/60	?
052	8/12	35	11/11	100	CVS	R
053	6/10	40	4/6	66	M.95/60	?
054	5/9	44	5/7	71	CVS	?
055	10/11	9	10/10	100	CVS	R
056	10/10	0	11/11	100	CVS	R
057	4/10	60	4/5	80	M.95/60	R
058	5/9	44	4/5	80	CVS	R
058	0,8	100	3/5	60	M.95/60	?
059	8/12	34	9/10	90	CVS	R
060	3/10	70	3/6	50	CVS	?
061	10/15	33	8/8	100	CVS	R
062	0/10	100	0/5	0	CVS	?
063	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
064	1/9	89	5/5	100	M.95/60	Ap.
065	2/10	80	3/5	60	CVS	?
066	8/10	20	5/5	100	CVS	R
067	3/10	70	10/10	100	CVS	Ap.
068	0/10	100	0/5	0	CVS	?
069	2/10	80	4/5	80	CVS	Ap.
070	4/10	60	5/5	100	M.95/60	R
071	2/10	80	3/5	60	CVS	?

TABELA I - (Continuação)

VACINAS	PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS					
	Nº	Vacinas		Testemunhas		Virus
	M/I**	Proteção %	M/I**	Mortalidade %		
072	2/12	84	5/8	62	CVS	?
073	0/10	100	3/8	60	CVS	?
074	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
075	1/10	90	4/5	80	CVS	Ap.
076	4/10	60	10/10	100	M.95/60	R
077	0/10	100	2/5	40	M.95/60	?
078	0/10	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
079	1/10	90	1/5	20	CVS	?
080	0/10	100	4/5	80	CVS	Ap.
081	3/9	66	5/5	100	CVS	R
082	0/10	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
083	0/10	100	3/10	30	M.95/60	?
084	0/10	100	3/5	60	M.95/60	?
085	4/10	60	9/10	90	CVS	R
086	3/10	70	3/5	60	CVS	?
087	0/10	100	3/5	60	CVS	?
088	0/10	100	4/10	40	CVS	?
089	1/15	93	4/5	80	CVS	Ap.
090	2/10	80	9/10	90	CVS	Ap.
091	2/12	84	3/5	60	CVS	?
092	3/10	70	2/5	40	CVS	?
093	4/10	60	5/5	100	M.95/60	R
094	5/10	50	5/5	100	M.95/60	R
095	2/10	80	1/5	20	CVS	?
096	2/10	80	4/10	40	CVS	?
097	1/10	90	0/5	0	M.95/60	?
098	0/10	100	9/9	100	M.37/60	Ap.
099	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
100	0/10	100	4/10	40	M.37/60	?
101	3/10	70	4/5	80	M.95/60	Ap.
102	0/12	100	3/5	60	M.95/60	?
103	1/12	91	1/10	10	CVS	?
104	3/11	72	1/10	10	CVS	?
105	2/12	83	5/10	50	M.95/60	?
106	0/10	100	3/10	30	M.95/60	?
107	1/10	90	5/5	100	M.95/60	Ap.
108	2/10	80	4/5	80	M.95/60	Ap.
109	1/10	90	3/5	60	M.95/60	?
110	0/9	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
111	3/12	75	3/5	60	CVS	?
112	0/10	100	3/5	60	M.95/60	?
113	3/10	70	4/5	80	M.95/60	Ap.
114	0/10	100	3/5	60	CVS	?
115	1/10	90	5/5	100	M.95/60	Ap.
116	1/10	90	3/5	60	M.95/60	?
117	2/10	80	4/5	80	M.95/60	Ap.
118	4/9	56	10/10	100	M.37/60	R
119	3/10	70	5/5	100	M.95/60	Ap.
120	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
121	4/10	60	4/5	80	M.95/60	R
122	2/10	80	3/5	60	CVS	?
123	2/10	80	5/5	100	M.95/60	Ap.
124	2/10	80	5/5	100	M.95/60	Ap.
125	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
126	3/10	70	5/5	100	M.95/60	Ap.
127	0/10	100	0/5	0	M.95/60	?
127	0/10	100	2/5	40	CVS	?
128	3/10	70	9/10	90	CVS	Ap.
129	0/10	100	7/9	77	M.37/60	?
130	0/10	100	5/5	100	M.37/60	Ap.
131	0/10	100	3/10	30	M.95/60	?

TABELA I — (Continuação)

VACINAS		PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS				
Nº	Vacinas M/I ** Proteção %		Testemunhas M/I** Mortalidade %		Vírus	Resultado
132	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
133	2/11	81	9/10	90	CVS	Ap.
134	0/15	100	0/10	0	CVS	?
135	0/10	100	0/5	0	CVS	?
136	3/14	78	4/5	80	CVS	Ap.
137	2/11	81	5/5	100	M.95/60	Ap.
138	2/10	80	9/10	90	M.37/60	Ap.
139	2/10	80	4/5	80	M.95/60	Ap.
140	4/10	60	5/5	100	CVS	R
141	0/10	100	2/5	40	CVS	?
142	0/10	100	2/5	40	CVS	?
143	2/10	80	5/5	100	M.95/60	Ap.
144	3/9	66	5/5	100	CVS	R
145	0/10	100	3/10	30	M.95/60	?
146	0/12	100	3/7	42	CVS	?
147	1/8	87	5/5	100	M.95/60	Ap.
148	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
149	0/9	100	1/5	20	M.95/60	?
150	3/10	70	5/5	100	CVS	Ap.
151	1/10	90	4/5	80	CVS	Ap.
152	3/12	75	5/5	100	CVS	Ap.
153	0/10	100	5/5	100	CVS	?
154	3/10	70	3/5	60	CVS	?
155	1/10	90	4/7	57	M.95/60	?
156	2/10	80	6/8	75	M.95/60	?
157	0/10	100	0/5	0	M.95/60	?
158	1/10	90	4/5	80	M.95/60	Ap.
159	0/10	100	0/5	0	M.95/60	?
160	0/11	100	4/5	80	CVS	Ap.
161	3/10	70	5/5	100	M.95/60	Ap.
162	0/10	100	0/5	0	M.95/60	?
162	0/10	100	2/5	40	CVS	?
163	5/10	50	5/5	100	CVS	R
164	0/10	100	5/5	100	CVS	Ap.
165	1/9	88	4/5	80	CVS	Ap.
166	0/9	100	3/5	60	CVS	?
167	2/15	86	8/10	80	CVS	Ap.
168	1/15	94	5/5	100	CVS	Ap.
169	3/15	80	4/5	80	M.95/60	Ap.
170	0/8	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
171	0/12	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
172	1/14	92	5/5	100	M.95/60	Ap.
173	0/10	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
174	0/9	100	1/5	20	M.95/60	?
175	4/10	60	4/5	80	M.95/60	R
176	0/10	100	3/5	60	M.95/60	?
177	2/10	80	5/5	100	M.95/60	Ap.
178	1/10	90	4/5	80	M.95/60	Ap.
179	4/10	60	10/10	100	CVS	R
180	1/10	90	3/5	60	CVS	?
181	0/10	100	4/5	80	CVS	Ap.
182	1/12	96	4/5	80	CVS	Ap.
183	2/10	80	3/5	60	CVS	?
184	1/10	90	1/5	20	CVS	?
185	0/10	100	3/5	60	M.95/60	?
186	3/10	70	5/5	100	CVS	Ap.
187	5/10	50	5/5	100	CVS	R.
188	0/13	100	3/7	42	CVS	?
189	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
190	3/9	67	5/5	100	CVS	R

Tabela I - (continuação)

Vacinas	Prova de Potência em Cobaias					
	Vacinas		Testemunhas		Vírus	Resultado
	Nº	M/I ** Proteção %	M/I** Mortalidade %			
191	0/8	100	0/5	0	M.95/60	?
191	0/8	100	2/5	40	CVS	?
192	4/11	63	5/5	100	CVS	R
193	0/8	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
194	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
195	1/10	90	5/10	50	M.95/60	?
196	0/10	100	4/7	57	M.95/60	?
197	1/10	90	4/5	80	M.95/60	Ap.
198	0/10	100	0/5	0	CVS	?

M/I: Número de cobaias mortas/número de cobaias inoculadas.

R: Reprovada

Ap.: Aprovada

?: Resultado indefinido, porque não atendido o critério mínimo de 80% de morte das cobaias não vacinadas.

CVS: "Challenge virus standard" - amostra de vírus fixo.

M.95/60: Amostra de vírus isolada de bovino.

M.37/60: Amostra de vírus isolada de cão.

Tabela II - Vacinas anti-rábicas Flury HEP: Título infectante em camundongos lactentes e provas de potência em cobaias, cuja mortalidade no grupo testemunha situou-se entre 80 e 100%. São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972.

VACINAS	PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS			VACINAS	PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS		
	Nº	Vacinadas % de proteção	Testemunhas % de mortalidade		Resultado	Nº	Vacinadas % de proteção
001	40	80	R	108	80	80	Ap.
003	30	80	R	110	100	80	Ap.
006	20	80	R	113	70	80	Ap.
008	10	80	R	117	80	80	Ap.
017	0	90	R	121	60	80	R
024	40	90	R	128	70	90	Ap.
026	25	90	R	132	100	80	Ap.
028	22	80	R	133	81	90	Ap.
032	60	80	R	136	78	80	Ap.
034	25	90	R	138	80	90	Ap.
037	23	80	R	139	80	80	Ap.
039	28	90	R	151	90	80	Ap.
044	40	90	R	158	90	80	Ap.
057	60	80	R	160	100	80	Ap.
058	44	80	R	165	88	80	Ap.
059	34	90	R	167	86	80	Ap.
063	100	80	Ap.	169	80	80	Ap.
069	80	80	Ap.	171	100	80	Ap.
074	100	80	Ap.	175	60	80	R
075	90	80	Ap.	178	90	80	Ap.
080	100	80	Ap.	181	100	80	Ap.
085	60	90	R	182	96	80	Ap.
089	93	80	Ap.	189	100	80	Ap.
090	80	90	Ap.	194	100	80	Ap.
101	70	80	Ap.	197	90	80	Ap.

* Expresso em log, base 10, da $DL_{50}/0,01$ ml, intracerebral, camundongos lactentes, calculado pelo método de Reed Muench.

Ap.: Aprovada

R.: Reprovada

A dependência do acaso da prova de potência em cobaias é evidenciada por si mesma, pois exige, para aprovação das vacinas, proteção de 70% dos animais do grupo vacinado e morte de 80% das testemunhas. A observação da Tabela I permite a comprovação do que afirmamos, quando vemos, por exemplo, que 35 provas deixaram de apresentar condições de julgamento pelo fato de uma cobaia testemunha não ter morrido (vacinas 0, 12, 015, 016, 022, 025, 027, 038, 043, 048, 051, 053, 054, 058, 065, 071, 073, 084, 086, 087, 091, 102, 109, 111, 112, 114, 116, 122, 129, 154, 156, 166, 176, 180, 183 e 185). Se esta morte tradicional houvesse ocorrido, o número de provas em condições de julgamento passaria de 110 (55,5%) a 145 (73,2%). O mesmo se pode dizer de 14 vacinas não aprovadas em virtude da morte adicional de uma cobaia vacinada, casos das vacinas 0,32, 057, 070, 076, 081, 085, 093, 121, 140, 144, 175, 179, 190 e 192. Não morreu uma destas cobaias em cada prova, o número de vacinas aprovadas ascenderia de 58 (52,7%) a 72 (65,4%). Em situação idêntica são vacinas tangencialmente aprovadas, modificando-se totalmente a situação se morresse uma cobaia a mais.

Importante argumento contra a prova em cobaias é oferecido por DEANE cols.⁷ e CABASSO e cols.² que trabalharam com vacinas para cães, preparadas a partir de cultivos celulares, as quais não passaram no teste em cobaias, mas protegeram cães contra inoculação de vírus de prova. BROWN et alii¹ consideraram severo o teste em cobaias e sugeriram fossem as vacinas no referido teste utilizadas a 1:20 da dose-cão e não 1:80.

Ainda na Tabela I pode ser visto que em 60 dos 110 testes aproveitados, houve morte de todas as cobaias teste-

munhas (100%), o que pode indicar excesso de vírus usado, impedindo correta avaliação quantitativa. CARNEIRO³ dá importância à qualidade de vírus e considera que uma dose de vírus a ser utilizada na comprovação deve matar somente 70 a 80% dos animais do grupo testemunha.

Os resultados da Tabela II, criada com o objetivo de melhor avaliar a quantidade de vírus utilizada, em tentativa para corrigir a falha apontada no parágrafo anterior, indicam claramente maior número de vacinas aprovadas, isto é, 31 em 50 (62%), em lugar das 58 em 110 (52,7%) da Tabela I, embora com redução numérica dos testes aproveitados, que ficaram diminuídos de 110 a 50. Apesar desta restrição, os resultados são bem mais aceitáveis, pois abrem a possibilidade de quantificar o vírus usado.

Crítica importante a ser feita ao nosso trabalho é termos utilizado na maioria dos testes só 5 cobaias, ao invés do mínimo de 10 hoje recomendado pela OMS¹⁹. A este respeito, DEAN e SHERMAN⁵ recomendaram o mínimo de 14 cobaias vacinadas e 10 testemunhas e IRAIZOZ-LABARTA¹⁰ vinte vacinadas e igual número de testemunhas.

Em resumo, as dificuldades para se conseguir cobaias uniformes e a ausência de regularidade para a reprodução da raiva em pelo menos 80% das cobaias testemunhas, conforme verificamos em nosso resultado, reduzem o valor da referida prova, não obstante a existência de várias recomendações enfáticas^{7,9,19}. Ressalte-se, contudo, que entraves de natureza diversa tem sido encontrados para a realização deste teste^{5,6,15,22,24,26}. Outras agravantes a estas críticas são o elevado custo das cobaias e a longa duração do teste, que se prolonga por até 42 dias.

NILSSON, M. R. & CÔRTEZ, J. A. Antirabies vaccine Flury-HEP. I. Critical study of the guinea pigs potency test. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 15(2): -, 205-14, 1978.

SUMMARY: A critical study of the guinea pigs potency test for efficiency evaluation of antirabies vaccines was performed by using 198 batches of High Egg Passage Flury vaccine. The results revealed a low reproductivity: 88 (44,5%) tests did not get the minimum standards limits (mortality of at least 80% in the control group), and 60 (30,3%) tests although satisfying such requirements did not give enough information to quantify the amount of challenge virus really employed. The authors suggest that this test might include as a judgment criteria a mortality between 80% and less than 100% of the animals from the control group.

UNITERMS: Rabies*; Vaccine Flury-HEP*; Guinea pigs potency test.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — BROWN, A.L.; DAVIS, E.V.; MERRY, D.L.; BECKNHAEUER, 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: 71, 1967.
- 2 — CABASSO, V.J.; STERBBINS, M.R.; DOUGLAS, A.; SHARPLESS, C.R. Tissue culture rabies vaccine (FLURY HEP) in dogs. *Amer. J. vet. Res.*, 26: 24-32, 1965.
- 3 — CARNEIRO, V. Problemas de vacinação anti-rábica. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE HIGIENE, 1., Havana, Cuba, 1952, p. 18.
- 4 — CORREA, G.P. & SOLANA, M.P. Potencia de vacunas contra el derrienge adquiridas en farmacias veterinarias y en sus laboratorios de producción. *Técnica Pecuaria*, 8: 10-18, 1967.
- 5 — DEAN, D.J. & SHERMAN, I. Potency testing of low egg passage modified live-virus rabies vaccines. *Amer. J. vet. Res.*, 22: 644-649, 1961.
- 6 — DEAN, D.J.; SHERMAN, I.; THOMPSON, W.R. The use of mice for the potency testing of modified live-virus rabies vaccine. *Amer. J. vet. Res.*, 24: 614-621, 1963.
- 7 — 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. *Amer. J. vet. Res.*, 25: 756-763, 1964.
- 8 — GOLDWASSER, R.A. & KISSNING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 98 (2): 219-23, 1958.
- 9 — HABEL, K. General considerations in safety and potency testing. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. *Laboratory techniques in rabies*. 3 ed. Geneva, 1973. p. 271-275. (WHO. Monogr. ser. 23)
- 10 — IRAIROZ-LABARTA, A. Estudios experimentales sobre el empleo de virus fijo (Cepa P.V. 1) para la determinación de la capacidad inmunizante en cobaya de las vacunas antirrábicas cultivadas em embrión de pollo (Cepa Flury H.E.P.). *Bull. Off. int. Epiz.*, 67: 419-438, 1967.
- 11 — JOHNSON, H.N. Rabies. In: RIVERS, T.M. & HORSFALL, F.L., ed. *Viral and Rickettsial infections of man*. 3 ed. Philadelphia, J.B. Lippincot, 1959. p. 417.
- 12 — KOMAROV, A. Chicken-embryo vaccine. In: *Laboratory techniques in rabies*. Geneva. (WHO Monogr. ser., 23) 1954. p. 99-105.
- 13 — KOPROWSKI, H. Guinea-pig test for chicken-embryo vaccine. In: *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, (WHO Monogr. ser., 23) 1954. p. 113-137.
- 14 — 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.
- 15 — MERED, B. & LEBEL, J. A propos de la préparation d' un vaccin antirabique avec la souche Flury HEP. *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 47: 118-127, 1969.
- 16 — NILSSON, M.R. Vacinas avianizadas contra a raiva. *Biológico*, 34: 29-32, 1968.
- 17 — NILSSON, M.R.; SUGAY, W.; CARVALHO, C.L. Considerações sobre um vírus rábico de curto período de incubação, isolado de bovino. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 31: 113-118, 1964.
- 18 — NILSSON, M.R. & CÔRTEZ, J.A. Provas de eficiência de vacinas contra a raiva. Revisão.
- 19 — ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité de expertos en Rabia. 6° Informe. Geneva, 1973. (WHO. Ser. Inf. tec., 523)
- 20 — PASTEUR, L.; CHAMBERLAND, C. ROUX, E. Nouvelle communication

- sur la rage. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 98: 457-463, 1884.
- 21 — PASTEUR, L.; CHAMBERLAND, C.; ROUX, E. Sur la rage. *C.R. Acad. Sci.*, 98: 1229-1231, 1884.
- 22 — PHILLIPS, C.E. Evaluation of rabies vaccines of chicken embryo origin. *J. Amer. vet. Med. Ass.*, 144: 276-280, 1964.
- 23 — SELLERS, T.F. A new method for staining Negri bodies of rabies. *Amer. J. Pub. Health*, 17: 1080-1081, 1927.
- 24 — VALDES-ORNELAS, O. & ROLDAN DE GORDON, M. Estudio comparativo de las pruebas de viabilidad antigenicidad en la titulación de vacunas antirrábicas cepa Flury. *Bull. Off. Épiz.*, 64: 709-718, 1965.
- 25 — VEERARAGHAVAN, N. Preparation of lyophilized rabies street virus material from infective submaxillary glands for challenge purposes. *Bull. Org. mond. Santé*, 17: 937-942, 1957.
- 26 — VEERARAGHAVAN, N. & GAJANANA, A. Intrasciatic nerve challenge test a modified post-infection guinea-pig protection test. *The Pasteur Institute Southern India, Coonoor, Scientific Report* (1972): 54-56, 1973a.
- 27 — WEBSTER, L.T. & DAWSON, J.R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 32: 570-3, 1935.

Aprovado para publicação em 4-9-1978