

# VACINAS ANTI-RÁBICA FLURY DE ALTA PASSAGEM. II - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS PROVAS DE VIABILIDADE EM CAMUNDONGOS E DE POTÊNCIA EM COBAIAS

M.R., NILSSON\*  
J.A., CÔRTEZ\*\*

RFMV -A/ 31

NILSSON, M. R. & CÔRTEZ, J.A. *Vacinas anti-rábica Flury de alta passagem. II. Estudo comparativo entre as provas de viabilidade em camundongos e de potência em cobaias.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S.Paulo, 15(2): -, 215-24, 1978.

**RESUMO:** Estudando comparativamente os testes de viabilidade em camundongos e de potência em cobaias com vistas à avaliação da eficiência de vacinas anti-rábica, Flury HEP verificou-se a existência de uma estreita relação positiva entre o título infectante em camundongos e a percentagem de proteção dos cobaias. Constatou-se ainda que, embora o teste não se constitua em prova para a verificação da capacidade imunizante da vacina, títulos infectantes iguais ou superiores a  $10^{3.1}$  indicam que a vacina seria aprovada no teste de potência em cobaias.

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

## INTRODUÇÃO

As dificuldades encontradas com a prova de potência em cobaias para avaliação da eficiência de vacinas anti-rábica Flury de alta passagem (HEP)<sup>16</sup> têm levado os especialistas a empregar procedimentos alternativos comparáveis, entre os quais inclui-se a prova de viabilidade em camundongos lactentes como indicador da qualidade destas vacinas.

Neste sentido, a despeito de opiniões divergentes<sup>11,18</sup>, tem sido verificada uma estreita associação entre os títulos infectantes em camundongos e os resultados das provas de potência em cobaias, tanto em vacinas Flury de baixa passagem<sup>4,5,19,21</sup>, como nas de alta passagem<sup>21</sup>, não sendo, contudo, aconselhável uma total confiança na prova de viabilidade<sup>4</sup>.

Embora considerando a cautela que deve cercar o estabelecimento de critérios para julgamento de tais produtos<sup>17</sup>, tem sido sugerido que títulos iguais ou superiores a  $10^{3.4}$  para a vacina de alta passagem corresponderiam a uma proteção suficiente em cobaia<sup>21</sup>.

Com o presente trabalho, tivemos por objetivo estudar comparativamente as provas de viabilidade em camundongos e de potência em cobaias, aplicadas ao controle da qualidade das vacinas anti-rábica Flury de alta passagem.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS:

### Vacinas:

Empregamos vacinas avianizadas Flury HEP, preparadas segundo KOMAROV<sup>8</sup>. A técnica de elaboração das vacinas obedeceu à mesma seqüência descrita em trabalho anterior<sup>13</sup>.

\* Pesquisador científico PQ-6 Instituto Biológico de São Paulo.

\*\* Professor Livre Docente

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

#### *Animais:*

*Camundongos:* brancos, suíços, originários da Fundação Rockefeller, da criação do Instituto Biológico de São Paulo. Os lactentes, utilizados na determinação do título infectante das vacinas, possuíam 4 a 5 dias de idade, enquanto os adultos, empregados nas diversas titulações dos vírus de confronto, tinham idade igual ou superior a 11 dias e peso entre 15 e 25 gramas.

*Cobaias:* empregadas nas provas de potência, procediam igualmente da criação do citado Instituto, eram albinas e apresentavam peso situado entre 350 e 400 gramas.

#### *Diluyente:*

Consistiu de água destilada com 2% de soro de cavalo normal inativado, adicionada de 1.000 unidades de Penicilina e 1,25 miligramas de estreptomina por mililitro.

#### *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 IC, em camundongos.
- b) M.95/60 - amostra isolada de bovino raivoso, do município de Santa Isabel, em 1960<sup>14</sup>, com várias passagens em cobaias via intramuscular, e em camundongos via intracerebral.
- c) M.37/60 - amostra isolada de cão, recebida para diagnóstico em abril de 1960, do município de Santo André, com duas passagens via intracerebral em camundongos.

Todas as amostras foram conservadas em congelador a temperatura de 15°C a -25°C, sob as formas de cérebro ou suspensão de cérebro a 20% em diluyente.

### **PROVA DE VIABILIDADE**

Verificamos, nesta prova, o título infectante do vírus contido na vacina.

Obtivemos a diluição 10<sup>1</sup> adicionando 10 ml de diluyente a cada dose de vacina. A partir desta, efetuamos as diluições em série, múltiplas de 10, de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup> ou 10<sup>-6</sup>. Cada diluição era inoculada na dose de 0,01 ml, via IC, em 8 camundongos de 4 a 5 dias de idade, mantidos na mesma caixa com a mãe. Observamos os camundongos pelo menos uma vez por dia, durante 14-15 dias, quando a prova era dada por encerrada. Os animais que morriam antes do 6º dia da inoculação não eram computados. Usamos como critério para a contagem os sintomas de raiva, culminando com paralisias e morte, que ocorriam entre o 7º e o 13º dia, mais comumente. Calculamos o título infectante do vírus, expresso em logaritmo da DL500,01ml, pelo método de REED & MUENCH<sup>20</sup>.

### **PROVAS DE POTÊNCIA EM COBAIAS.**

Seguimos em essência o preconizado por KOPROWSKI<sup>9</sup>, exceto que não utilizamos vírus de glândula salivar de cão raivoso para a comprovação, mas sim, cérebros de cobaias e camundongos.

Tendo em conta que tanto a dose insuficiente quanto a dose excessiva de vírus constituem-se em variáveis capazes de interferir no resultado da prova de potência em cobaia e visando assegurar maior confiabilidade aos resultados deste confronto adotamos como critérios de julgamento para a referida prova os princípios estabelecidos anteriormente<sup>16</sup>.

### **RESULTADOS**

Os resultados obtidos estão condensados na tabela I.

Das 198 partidas de vacina incluídas na Tabela I apenas 50 delas satisfizeram às condições estabelecidas no presente estudo em relação à prova de potência em cobaias, como pode ser facilmente apreciado na Tabela II.

Uma observação mais detida desta tabela mostra uma maior concentração de resultados satisfatórios entre as vaci-

nas que apresentaram título infectante mais elevado.

De fato, o tratamento estatístico destes dados de acordo com GOLDS-TEIN <sup>7</sup> revela, preliminarmente, para a regressão linear, os valores, 2,2761 e 0,0206 correspondentes, respectivamente, aos parâmetros a e b.

A seqüência da análise forneceu para r o valor 0,76, indicando estreita relação positiva entre as duas variáveis, isto é, quanto mais se eleva o título infectante da vacina, maior a porcentagem de proteção dos cobaios vacinados.

O valor t de "Student" igual a 8,1

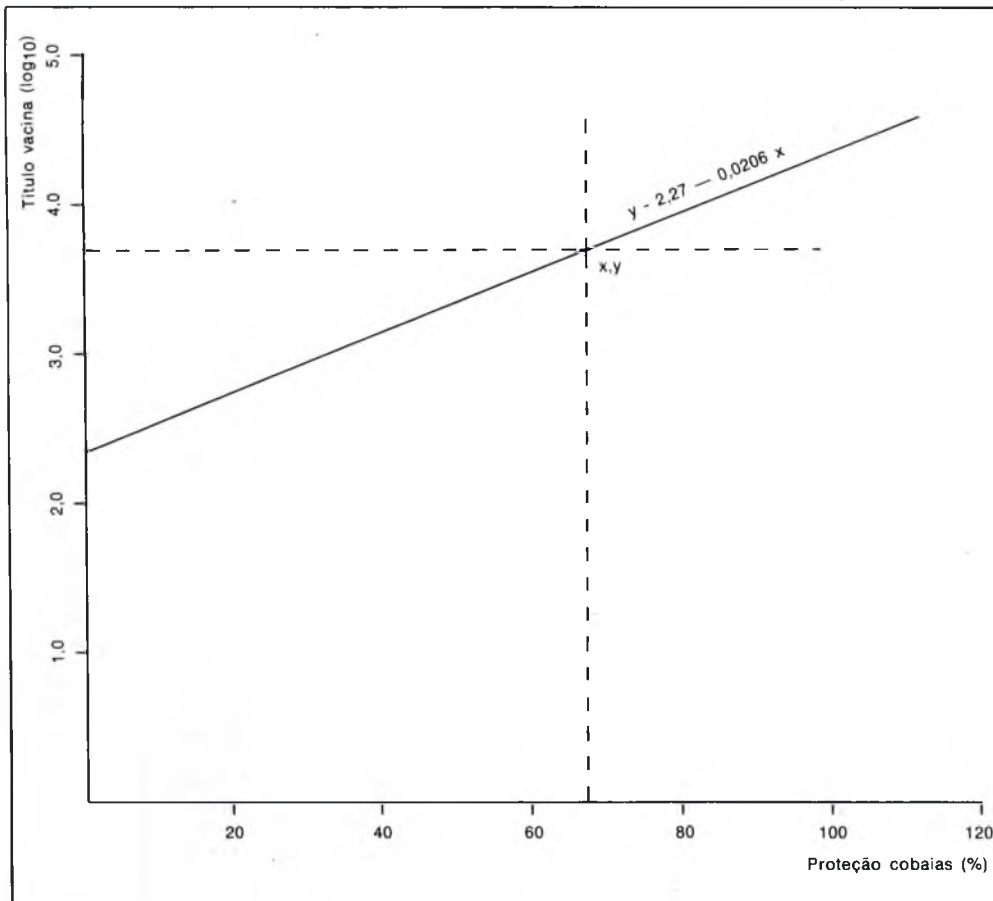
revelou-se significativo ao nível de 5%.

O gráfico incluído, representa a reta de regressão obtida a partir dos valores constantes da tabela II, figurando no eixo da variável X as porcentagens de proteção das cobaias vacinadas e variável Y, os títulos infectantes em camundongos lactentes expressos em logaritmos de base 10.

Esta relação positiva entre as provas de potência em cobaias e de infecciosidade em camundongos lactentes admite a utilização da última para a avaliação das vacinas.

### GRÁFICO

Reta de regressão calculada com base nos dados da Tabela II, São Paulo, 1974



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

VACINAS		PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS					
Nº	Título *	Vacinas		Testemunhas		Vírus	Resultado
		M/I	** Proteção %	M/I	** Mortalidade %		
001	1,39	6/10	40	4/5	80	M.95/60	R
002	2,00	4/8	50	5/5	100	M.95/60	R
003	2,00	7/10	30	4/5	80	M.95/60	R
004	2,00	9/10	10	5/5	100	M.95/60	R
005	2,00	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
006	2,00	8/10	20	4/5	80	M.95/60	R
007	2,00	14/14	0	10/10	100	CVS	R
008	2,12	9/10	10	4/5	80	CVS	R
009	2,13	2/10	80	0/5	0	CVS	?
010	2,23	9/13	31	5/10	50	CVS	?
011	2,36	7/9	22	3/6	50	CVS	?
012	2,39	5/10	50	5/7	71	CVS	?
013	2,40	10/10	0	5/5	100	M.95/60	R
014	2,50	7/9	22	5/5	100	M.95/60	R
015	2,50	3/9	66	5/7	71	CVS	?
016	2,57	4/9	55	5/7	71	CVS	?
017	2,58	10/10	0	9/10	90	CVS	R
018	2,58	2/9	77	3/6	50	M.95/60	?
019	2,59	8/10	20	5/5	100	M.95/60	R
020	2,68	10/10	0	5/5	100	M.95/60	R
021	2,68	15/15	0	8/8	100	CVS	R
022	2,74	5/10	50	4/6	66	M.95/60	?
023	2,74	4/10	60	3/6	50	CVS	?
024	2,86	6/10	40	4/5	80	M.95/60	R
025	2,86	6/10	40	4/6	66	M.95/60	?
026	2,87	6/8	25	9/10	90	M.95/60	R
027	2,89	5/10	50	3/5	60	CVS	?
028	3,00	7/9	22	4/5	80	M.95/60	R
029	3,00	6/10	40	5/5	100	M.95/60	R
030	3,00	10/10	0	5/5	100	M.95/60	R
031	3,00	4/9	55	5/10	50	M.95/60	?
032	3,01	4/10	60	8/10	80	M.37/60	R
033	3,10	7/10	30	5/5	100	CVS	R
034	3,10	6/8	25	9/10	90	CVS	R
035	3,14	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
036	3,17	9/10	10	3/6	50	CVS	?
037	3,17	7/9	23	4/5	80	M.95/60	R
038	3,18	3/9	66	3/5	60	CVS	?
039	3,18	5/7	28	9/10	90	CVS	R
040	3,23	6/10	40	3/6	50	M.95/60	?
041	3,24	6/10	40	5/5	100	CVS	R
042	3,24	1/15	93	4/10	40	CVS	?
043	3,24	4/8	50	5/7	71	CVS	?
044	3,24	9/15	40	9/10	90	CVS	R
045	3,26	7/7	0	11/11	100	CVS	R
046	3,27	7/10	30	10/10	100	M.95/60	R
047	3,28	3/8	62	8/8	100	CVS	R
048	3,28	5/11	54	7/10	70	M.95/60	?
049	3,29	7/10	30	2/5	40	M.95/60	?
050	3,30	4/9	55	6/9	66	M.95/60	?
051	3,30	2/10	80	3/5	60	M.95/60	?
052	3,31	8/12	35	11/11	100	CVS	R
053	3,33	6/10	40	4/6	66	M.95/60	?
054	3,33	5/9	44	5/7	71	CVS	?
055	3,33	10/11	9	10/10	100	CVS	R
056	3,35	10/10	0	11/11	100	CVS	R

TABELA I — (continuação)

VACINAS		PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS					
Nº	Título *	Vacinas		Testemunhas		Vírus	Resultado
		M/I**	Proteção %	M/I**	Mortalidade %		
057	3,37	4/10	60	4/5	80	M.95/60	R
058	3,38	5/9	44	4/5	80	CVS	R
		0,8	100	3/5	60	M.95/60	?
059	3,39	8/12	34	9/10	90	CVS	R
060	3,40	3/10	70	3/6	50	CVS	?
061	3,42	10/15	33	8/8	100	CVS	R
062	3,42	0/10	100	0/5	0	CVS	?
063	3,42	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
064	3,47	1/9	89	5/5	100	M.95/60	Ap.
065	3,47	2/10	80	3/5	60	CVS	?
066	3,48	8/10	20	5/5	100	CVS	R
067	3,48	3/10	70	10/10	100	CVS	Ap.
068	3,50	0/10	100	0/5	0	CVS	?
069	3,50	2/10	80	4/5	80	CVS	Ap.
070	3,50	4/10	60	5/5	100	M.95/60	R.
071	3,50	2/10	80	3/5	60	CVS	?
072	3,50	2/12	84	5/8	62	CVS	?
073	3,50	0/10	100	3/3	60	CVS	?
074	3,50	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
075	3,50	1/10	90	4/5	80	CVS	Ap.
076	3,50	4/10	60	10/10	100	M.95/60	R
077	3,50	0/10	100	2/5	40	M.95/60	?
078	3,54	0/10	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
079	3,56	1/10	90	1/5	20	CVS	?
080	3,56	0/10	100	4/5	80	CVS	Ap.
081	3,57	3/9	66	5/5	100	CVS	R
082	3,57	0/10	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
083	3,57	0/10	100	3/10	30	M.95/60	?
084	3,58	0/10	100	3/5	60	M.95/60	?
085	3,60	4/10	60	9/10	90	CVS	R
086	3,61	3/10	70	3/5	60	CVS	?
087	3,62	0/10	100	3/5	60	CVS	?
088	3,62	0/10	100	4/10	40	CVS	?
089	3,62	1/15	93	4/5	80	CVS	Ap.
090	3,66	2/10	80	9/10	90	CVS	Ap.
091	3,66	2/12	84	3/5	60	CVS	?
092	3,66	3/10	70	2/5	40	CVS	?
093	3,66	4/10	60	5/5	100	M.95/60	R
094	3,69	5/10	50	5/5	100	M.95/60	R
095	3,69	2/10	80	1/5	20	CVS	?
096	3,69	2/10	80	4/10	40	CVS	?
097	3,69	1/10	90	0/5	0	M.95/60	?
098	3,70	0/10	100	9/9	100	M.37/60	Ap.
099	3,70	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
100	3,71	0/10	100	4/10	40	M.37/60	?
101	3,71	3/10	70	4/5	80	M.95/60	Ap.
102	3,75	0/12	100	3/5	60	M.95/60	?
103	3,79	1/12	91	1/10	10	CVS	?
104	3,79	3/11	72	1/10	10	CVS	?
105	3,80	2/12	83	5/10	50	M.95/60	?
106	3,80	0/10	100	3/10	30	M.95/60	?
107	3,80	1/10	90	5/5	100	M.95/60	Ap.
108	3,82	2/10	80	4/5	80	M.95/60	Ap.
109	3,83	1/10	90	3/5	60	M.95/60	?
110	3,86	0/9	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
111	3,87	3/12	75	3/5	60	CVS	?
112	3,87	0/10	100	3/5	60	M.95/60	?
113	3,88	3/10	70	4/5	80	M.95/60	Ap.
114	3,89	0/10	100	3/5	60	CVS	?
115	3,89	1/10	90	5/5	100	M.95/60	Ap.
116	3,89	1/10	90	3/5	60	M.95/60	?

TABELA I — (continuação)

VACINAS		PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS					
Nº	Título *	Vacinadas		Testemunhas		Vírus	Resultado
		M/I**	Proteção %	M/I**	Mortalidade %		
117	3,89	2/10	80	4/5	80	M.95/60	Ap.
118	3,90	4/9	56	10/10	100	M.37/60	R
119	4,00	3/10	70	5/5	100	M.95/60	Ap.
120	4,00	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
121	4,00	4/10	60	4/5	80	M.95/60	R
122	4,00	2/10	80	3/5	60	CVS	?
123	4,00	2/10	80	5/5	100	M.95/60	Ap.
124	4,00	2/10	80	5/5	100	M.95/60	Ap.
125	4,00	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
126	4,00	3/10	70	5/5	100	M.95/60	Ap.
127	4,00	0/10	100	0/5	0	M.95/60	?
		0/10	100	2/5	40	CVS	?
128	4,00	3/10	70	9/10	90	CVS	Ap.
129	4,01	0/10	100	7/9	77	M.37/60	?
130	4,01	0/10	100	5/5	100	M.37/60	Ap.
131	4,01	0/10	100	3/10	30	M.95/60	?
132	4,03	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
133	4,10	2/11	81	9/10	90	CVS	Ap.
134	4,11	0/15	100	0/10	0	CVS	?
135	4,12	0/10	100	0/5	0	CVS	?
136	4,14	3/14	78	4/5	80	CVS	Ap.
137	4,15	2/11	81	5/5	100	M.95/60	Ap.
138	4,18	2/10	80	9/10	90	M.37/60	Ap.
139	4,19	2/10	80	4/5	80	M.95/60	Ap.
140	4,19	4/10	180	5/5	100	CVS	R
141	4,19	0/10	100	2/5	40	CVS	?
142	4,19	0/10	100	2/5	40	CVS	?
143	4,19	2/10	80	5/5	100	M.95/60	Ap.
144	4,19	3/9	66	5/5	100	CVS	R
145	4,20	0/10	100	3/10	30	M.95/60	?
146	4,22	0/12	100	3/7	42	CVS	?
147	4,24	1/8	87	5/5	100	M.95/60	Ap.
148	4,24	0/10	100	1/5	20	M.95/60	?
149	4,24	0/9	100	1/5	20	M.95/60	?
150	4,24	3/10	70	5/5	100	CVS	Ap.
151	4,24	1/10	90	4/5	80	CVS	Ap.
152	4,24	3/12	75	5/5	100	CVS	Ap.
153	4,32	0/10	100	5/5	100	CVS	?
154	4,33	3/10	70	3/5	60	CVS	?
155	4,35	1/10	90	4/7	57	M.95/60	?
156	4,37	2/10	80	6/8	75	M.95/60	?
157	4,37	0/10	100	0/5	0	M.95/60	?
158	4,39	1/10	90	4/5	80	M.95/60	Ap.
159	4,40	0/10	100	0/5	0	M.95/60	?
160	4,41	0/11	100	4/5	80	CVS	Ap.
161	4,42	3/10	70	5/5	100	M.95/60	Ap.
162	4,42	0/10	100	0/5	0	M.95/60	?
		0/10	100	2/5	40	CVS	?
163	4,42	5/10	50	5/5	100	CVS	R
164	4,42	0/10	100	5/5	100	CVS	Ap.
165	4,43	1/9	88	4/5	80	CVS	Ap.
166	4,43	0/9	100	3/5	60	CVS	?
167	4,47	2/15	86	8/10	80	CVS	Ap.
168	4,47	1/15	94	5/5	100	CVS	Ap.
169	4,49	3/15	80	4/5	80	M.95/60	Ap.
170	4,49	0/8	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
171	4,50	0/12	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
172	4,50	1/14	92	5/5	100	M.95/60	Ap.
173	4,50	0/10	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
174	4,50	0/9	100	1/5	20	M.95/60	?

TABELA I — (continuação)

VACINAS		PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS					
N°	Título*	Vacinadas		testemunhas		Vírus	Resultado
		M/I **	Proteção %	M/I**	Mortalidade %		
175	4,50	4/10	60	4/5	80	M.95/60	R
176	4,50	0/10	100	3/5	60	M.95/60	?
177	4,50	2/10	80	5/5	100	M.95/60	Ap.
178	4,50	1/10	90	4/5	80	M.95/60	Ap.
179	4,50	4/10	60	10/10	100	CVS	R
180	4,50	1/10	90	3/5	60	CVS	?
181	4,50	0/10	100	4/5	80	CVS	Ap.
182	4,50	1/12	96	4/5	80	CVS	Ap.
183	4,50	2/10	80	3/5	60	CVS	?
184	4,50	1/10	90	1/5	20	CVS	?
185	4,50	0/10	100	3/5	60	M.95/60	?
186	4,50	3/10	70	5/5	100	CVS	Ap.
187	4,50	5/10	50	5/5	100	CVS	R.
188	4,50	0/13	100	3/7	42	CVS	?
189	4,51	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
190	4,59	3/9	67	5/5	100	CVS	R
191	4,66	0/8	100	0/5	0	M.95/60	?
		0/8	100	2/5	40	CVS	?
192	4,66	4/11	63	5/5	100	CVS	R
193	4,68	0/8	100	5/5	100	M.95/60	Ap.
194	4,83	0/10	100	4/5	80	M.95/60	Ap.
195	4,85	1/10	90	5/10	50	M.95/60	?
196	5,00	0/10	100	4/7	57	M.95/60	?
197	5,09	1/10	90	4/5	80	M.95/60	Ap.
198	5,10	0/10	100	0/5	0	CVS	?

\* Expresso em log, base 10, da DL<sub>50</sub>/0,01 ml, intracerebral, camundongos lactentes, calculado pelo método de Reed & Muench.

\*\*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.

No prosseguimento da análise dos dados obtidos, procuramos determinar um título infectante a partir do qual a vacina pudesse, dentro de certos limites de confiabilidade, ser considerada aprovada.

Construímos, então, a Tabela III, que agrupa em classes os resultados das provas de viabilidade incluídos na Tabela II, registrando as correspondentes freqüências absolutas e acumuladas segundo a condição de aprovação na prova de potência em cobaias.

Observando a Tabela III vemos que nenhuma vacina com títulos infectantes inferior a  $10^{3.4}$  conseguiu aprovação no teste de potência em cobaias,

enquanto que foram aprovadas 70% das vacinas com títulos situados entre  $10^{3.4}$  e  $10^{3.7}$ .

Admitindo-se a validade de um valor intermediário ( $10^{3.5}$ ), como título indicador para aprovação das vacinas, construímos a Tabela IV com base ainda nos elementos da Tabela II. Nesta Tabela procuramos associar a condição de aprovação ou não da vacina à prova de potência em cobaias, aos títulos infectantes maiores ou iguais a  $10^{3.5}$  e menores que  $10^{3.5}$ , obtidos em camundongos lactentes (prova de viabilidade).

O valor de  $X^2$  (qui quadrado) calculado com base nos dados da Tabela IV foi de 30,91 que se revelou altamente

**TABELA II — Vacinas anti-rábica Flury HEP: Títulos infectantes em camundongos lactentes e provas de potência em cobaias, cuja mortalidade no grupo testemunha situou-se entre 80 - 100%. São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972.**

VACINAS		PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS		
Nº	Título	Vacinadas% de proteção	Testemunhas% de mortalid.	Resultado
001	1,39	40	80	R
003	2,00	30	80	R
006	2,00	20	80	R
008	2,12	10	80	R
017	2,58	0	90	R
024	2,86	40	90	R
026	2,87	25	90	R
028	3,00	22	80	R
032	3,01	60	80	R
034	3,10	25	90	R
037	3,17	23	80	R
039	3,18	28	90	R
044	3,24	40	90	R
057	3,37	60	80	R
058	3,38	44	80	R
059	3,39	34	90	R
063	3,42	100	80	Ap
069	3,50	80	80	Ap
074	3,50	100	80	Ap.
075	3,50	90	80	Ap.
080	3,56	100	80	Ap.
085	3,60	60	90	R
089	3,62	93	80	Ap.
090	3,66	80	90	Ap.
101	3,71	70	80	Ap.
108	3,82	80	80	Ap.
110	3,86	100	80	Ap.
113	3,88	70	80	Ap.
117	3,89	80	80	Ap.
121	4,00	60	80	R
128	4,00	70	90	Ap.
132	4,03	100	80	Ap.
133	4,10	81	90	Ap.
136	4,14	78	80	Ap.
138	4,18	80	90	Ap.
139	4,19	80	80	Ap.
151	4,24	90	80	Ap.
158	4,39	90	80	Ap.
160	4,41	100	80	Ap.
165	4,43	88	80	Ap.
167	4,47	86	80	Ap.
169	4,49	80	80	Ap.
171	4,50	100	80	Ap.
175	4,50	60	80	R
178	4,50	90	80	Ap.
181	4,50	100	80	Ap.
182	4,50	96	80	Ap.
189	4,51	100	80	Ap.
194	4,83	100	80	Ap.
197	5,09	90	80	Ap.

\*Expresso em log, base 10, da DL<sub>50</sub>/0,01ml, intracerebral, camundongos lactentes, calculado pelo método de Reed & Muench.

Ap.: Aprovada  
R.: Reprovada

significante ao nível de 1%, quando comparados ao valor crítico desta estatística para um grau de liberdade.

O tratamento exato de Fischer<sup>6</sup> para tabela de contingência 2 x 2, aplicado aos valores da tabela IV, revelou alta significância ao nível de 1%, indicada pelo resultado da fórmula P - 3,069 x 10<sup>9</sup>.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e sua correspondente análise estatística ressaltam alguns aspectos de grande relevância.

A prova de viabilidade em camundongos lactentes, possibilita o aproveitamento de todos os testes realizados em flagrante contraste com a prova de potência em cobaias que só admitiu a utilização de 50 das 198 provas efetuadas nas condições do presente estudo.

Vantagens outras desta prova sobre a de potência em cobaias, são seu custo reduzido e exigência de menor período de observação para a leitura final.

Muito embora não se constitua em prova para a verificação da capacidade imunizante da vacina, o teste de viabilidade tem sido sugerido como indicador de real valor para a apreciação preliminar de tal condição<sup>2,5,12,19,21</sup>.

Nossos resultados (Tabela II) mostram estreita associação positiva entre os títulos infectantes das vacinas e os correspondentes valores dos testes de potência em cobaia.

Os resultados expressos na Tabela III indicam que as vacinas com título igual ou superior a 10<sup>3,5</sup>, passam no teste em cobaias, o que encontra apoio na literatura<sup>3,19,21</sup>. De fato tem sido indicado para as vacinas de baixa passagem (LEP), título não menor do que 10<sup>3,3</sup> DL<sub>50</sub> por 0,03 ml e sugerido o título de 10<sup>3,8</sup> DL<sub>50</sub>/0,03 ml para liberação da vacina<sup>10</sup>. A legislação específica brasileira<sup>1</sup> exige este mesmo título de 10<sup>3,3</sup>/0,01 ml para as vacinas HEP. Opiniões discordantes tem contestado a existência da relação entre o conteúdo de vírus na vacina e a prova de potência em cobaias<sup>18</sup>. Por outro lado, embora desacon-



selhando uma total confiança no teste de viabilidade outros autores têm insistido na existência de tal relação<sup>4</sup>.

A tabela IV também comprova a afirmação de que títulos maiores ou iguais a  $10^{3.5}$  DL<sub>50</sub>/0,01ml, correspondem à aprovação das vacinas no teste em cobaias.

Realmente a análise estatística dos dados desta tabela revela valores do qui quadrado e do teste exato de Fischer significantes do nível de rejeição adotado.

Vemos ainda na tabela IV que das 33 partidas com títulos iguais ou maiores do que  $10^{3.5}$ , apenas 3 foram rejeitadas, ou seja 9,1%. Casualmente poderíamos esperar rejeição em 35% das vezes se a

vacina fosse boa (probabilidade de 70%). Logo, podemos supor que a capacidade de proteção seja até maior do que 70%. As 3 únicas partidas não aprovadas, como se observa na Tabela II, vacinas números 085, 121, 175, protegeram 6 cobaias das 10 inoculadas. Se não morresse uma só das 4 cobaias, a vacina seria aprovada e, neste caso, todas as vacinas com título igual ou maior do que  $10^{3.5}$  preencheriam a condição mínima exigida de 70% de proteção.

Consideramos válida, portanto, a apreciação que a prova de viabilidade pode substituir a de potência em cobaias, desde que observadas as condições do presente estudo.

**TABELA III - Vacinas anti-rábica Flury HEP: condição de aprovação na prova de potência em cobaias, segundo os títulos infectantes em camundongos lactentes (frequências absolutas e acumuladas). São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972.**

TÍTULO *	Frequências absolutas		Frequências acumuladas	
	Aprovadas	Reprovadas	Aprovadas	Reprovadas
1,30 - 1,60	0	1	0	19
1,60 - 1,90	0	0	0	18
1,90 - 2,20	0	3	0	18
2,20 - 2,50	0	0	0	15
2,50 - 2,80	0	1	0	15
2,80 - 3,10	0	4	0	14
3,10 - 3,40	0	7	0	10
3,40 - 3,70	7	1	7	3
3,70 - 4,00	5	0	12	2
4,00 - 4,30	7	1	19	2
4,30 - 4,60	10	1	29	1
4,60 - 4,90	1	0	30	0
4,90 - 5,20	1	0	31	0

\*Expresso em log, base 10, da DL<sub>50</sub>/0,01 ml, inoculação intracerebral em camundongos lactentes e calculado pelo método de Reed & Muench.  
Obs.: Esta tabela foi construída com dados da tabela II.

**TABELA IV - Vacinas anti-rábica Flury HEP, relacionadas na tabela I, segundo o título infectante em camundongos lactentes e a condição no teste de potência em cobaias.**

Título * / Condição	≥ 3,5	< 3,5	Total
Aprovadas	30	1	31
Reprovadas	3	16	19
Total	33	17	50

\* Expresso em log, base 10, DL<sub>50</sub>/0,01 ml, e resultante de inoculação intracerebral de camundongos lactentes, sendo o cálculo efetuado pelo método de Reed & Muench.  
 $\chi^2$  (qui-quadrado) - 30,91

NILSSON, M.R. & CORTES, J.A. *Antirabies vaccines Flury HEP. II. Comparative study between the mice viability and the guinea pig potency test.* Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S.Paulo, 15(2): 215-24, 1978.

**SUMMARY:** A comparative study between the mice viability test and the guinea pig potency test for the efficiency evaluation of the Flury HEP vaccines revealed a strong positive association between the mice titer and the protection percent of the vaccinated guinea pigs. Although the mice viability test is not able to demonstrate the vaccine immune response, titers of  $10^{3.5}$  or higher constitute a good indication that the vaccine will be approved by the guinea pig potency test.

**UNITERMS:** Rabies\*; Vaccine Flury HEP\*; guinea pig potency test; mice viability test.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1 — BRASIL. MINISTÈRIO DA AGRICULTURA. Portaria nº 60 de 4 de março de 1974. Diário Oficial da União, Seção I, Parte I, 11 de março de 1974.
- 2 — BROWN, A.L.; DAVIS, E.V.; MERRY, D.L.; BECKENHAUER, W. H. Comparative potency tests on modified live-virus rabies vaccine produced from Flury high egg-passage virus grown on permanente dog kidney cell line. *Amer. J. Vet. Res.*, 28: 751, 1967.
- 3 — DEAN, D. J. The Nylar test for measuring potency antirabies vaccine. In: *Laboratory Techniques in rabies. 2* Geneva (WHO Monogr. ser. n° 23) 1966 a, p. 157.
- 4 — DEAN, D. J. & SHERMAN, I. Potency testing of low egg passage modified live-virus rabies vaccines. *Amer. J. Vet. Res.*, 22: 644-649, 1961.
- 5 — EL-SABBAN, M.S. Rabies and its control in the United Arab Republic using the LEP Flury vaccine. *Bull. Off. int. Epiz.*, 65: 81-98, 1966.
- 6 — FISHER, R.A. *Statistical methods for research workers.* 8, ed. London, Oliver & Boyd, 1941. 344p.
- 7 — GOLDSTEIN, A. *Biostatistics: an introductory text.* 2 ed. New York, McMillan, 1965.
- 8 — KOMAROV, A. Chicken-embryo vaccine. In: *Laboratory techniques in Rabies.* Geneva, (WHO Monogr. ser. 23) 1954, p. 99-105
- 9 — KOPROWSKI, H. Guinea-pig test for chicken-embryo vaccine. In: *Laboratory techniques in rabies.* Geneva, (WHO Monogr. ser., 23) 1954, p. 113-137.
- 10 — KOPROWSKI, H. Chicken-embryo vaccine. In: *Laboratory techniques in rabies* 2 ed. Geneva, (WHO Monogr. 23) 1966 p. 124-132.
- 11 — MATEWA, V. Titrierung des mit dem Stamm Flury hergestellten Tollwutimpfstoffen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig.*, 175: 59-62. 1959.
- 12 — MOHAMED, A. A.; HUSSEIN, N. A.; ANIS, A. O. HABASHI, Y. Z. Correlation between the mice titre and the results of the guinea pig potency test in the L. E. P. rabies vaccine. *J. Egyptian Vet. Med. Assoc.*, 29: 111-120, 1969.
- 13 — NILSSON, M. R. Vacinas avianizadas contra a raiva. *Biológico*, 34: 29-32, 1968.
- 14 — 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.
- 15 — NILSSON, M. R. & CORTES, J. A. Provas de eficiência de vacinas contra a raiva. Revisão.
- 16 — NILSSON, M. R. & CORTES, J. A. Vacinas anti-rábicas Flury de alta passagem. I. Estudo crítico da prova de potência em cobaios. (no prelo)
- 17 — ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD Comité de expertos en Rabia. 6° informe. (Org. Mund. Salud Ser. Inf. Técn., 523) 1973.
- 18 — OTT, G. L. & CARLSON, W. E. Potency testing of livre modified rabies vaccine. *Vet. Med.*, 55: 45-47, 1960.
- 19 — PHILLIPS, C. E. Evaluation of rabies vaccines of chicken embryo origin. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 144: 276-280, 1964.
- 20 — REED, L. J. & MUENCH, R. A Simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-497, 1938.
- 21 — VALDES-ORNELAS, O. & ROLDAN DE GORDON, M. Estudio comparativo de las pruebas de viabilidad y antigenicidad en la titulación de vacunas antirrábicas cepa Flury. *Bull. Off. int. Epiz.*, 64: 709-718, 1965.

Aprovado para publicação em 4-9-1978.