

## AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE VACINA CONTRA A ENCEFALITE HUMANA CAUSADA PELO VÍRUS ROCIO

Oscar de Souza LOPES, Lia de Abreu SACCHETTA, Elza da Silva NASSAR, Maria Isabel de OLIVEIRA, Ivani BISORDI, Akemi SUZUKI e Elza Keiko KIMURA (1)

### RESUMO

Uma vacina contra encefalite humana causada pelo vírus Rocio foi aplicada em empregados de fábrica localizada no Município de Jacupiranga, Estado de São Paulo. A vacina foi inoculada em três doses no espaço de um mês e nova dose injetada após 15 meses. A avaliação sorológica constituiu-se de exames de quatro amostras de sangue, obtidas uma antes da vacinação, uma sete dias e, outra, seis meses após a terceira dose. Nova amostra de sangue foi colhida um mês após a quarta dose. Foram utilizadas as provas de Inibição da Hemaglutinação, Fixação do Complemento e Neutralização. Verificou-se uma taxa de conversão baixa, com o máximo de 22% e que os anticorpos induzidos pelos estímulos vacinais foram fugazes, pois, seis meses após a vacinação, grande parte da população vacinada não tinha mais anticorpos detectáveis. Há necessidade de se buscar vacina mais eficiente para tentar prevenir a encefalite causada pelo vírus Rocio.

### INTRODUÇÃO

Em abril de 1975 observou-se a emergência de epidemia de encefalite humana em vários municípios do litoral sul do Estado de São Paulo. O agente etiológico foi um arbovírus do gênero *Flavivírus*, o vírus Rocio (LOPES & col. 6,7) e foram notificados 825 casos de doença e 95 mortes atribuídas à ação do vírus. Uma das tentativas para combater esta doença foi a elaboração, pelo Instituto Butantan, da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, da vacina contra a encefalite, a partir do vírus Rocio (amostra SPH 34675), inoculado em cérebro de camundongos recém-nascidos e inativado pelo formol.

O presente trabalho relata os dados sorológicos resultantes da avaliação desta vacina aplicada em seres humanos, bem como o desenvolvimento e a duração dos anticorpos induzidos.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Os pormenores sobre a fabricação e a avaliação experimental da vacina contra encefalite,

sua administração e o desenvolvimento de possíveis reações secundárias, não foram atribuições da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz. É necessário citar, entretanto, que esta vacina foi inoculada, experimentalmente, em empregados de empresa da cidade de Jacupiranga (24°45'S, 48°00'W), Estado de São Paulo, em 4 doses aplicadas nos dias 16 e 23 de novembro de 1977, 14 de dezembro de 1977 e 4 de março de 1979.

Os soros humanos utilizados para esta avaliação foram obtidos por meio de punção venosa e recebidos, refrigerados, na Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos, imediatamente separados de seus coágulos, rotulados e guardados em congeladores -20°C até o momento do exame.

Em 16 de novembro de 1977 recebemos 1803 soros, correspondentes às amostras de sangue colhidas antes da inoculação da primeira dose de vacina.

Em 21 de dezembro de 1977 foram recebidos 1196 soros correspondentes à sangria efetuada no sétimo dia após a inoculação das três doses de vacina.

(1) Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos. Instituto Adolfo Lutz — Caixa Postal 7027 — 01000 — São Paulo — SP

Seis meses após a aplicação da terceira dose de vacina, em 21 de junho de 1979, recebemos 1291 soros para avaliação da duração do nível de anticorpos. Finalmente, em 4 de abril de 1979 (data que corresponde à sangria feita 30 dias após a aplicação da quarta dose de vacina), recebemos 420 soros.

As provas sorológicas utilizadas nesta avaliação foram as da Inibição da Hemaglutinação (IH) e da Fixação do Complemento (FC) de acordo com as técnicas desenvolvidas por CASALS<sup>1</sup>; os antígenos empregados foram preparados pelo método de sacarose-acetona e nas provas de IH os soros a examinar, extraídos com acetona, para eliminar os inibidores inespecíficos e diluídos, inicialmente, a 1:10; nas provas de FC a diluição inicial foi 1:4. Nas provas de neutralização (N), em camundongos de três semanas de idade, usou-se a inoculação por via intracerebral<sup>11</sup>. Os soros foram testados puros, adicionados de fator acessório, utilizando-se 20-50 LD<sub>50</sub> do vírus Rocio (amostra SPH 34675) e o período de incubação da mistura soro-vírus foi de uma hora a 37°C.

As amostras de flavivírus utilizadas nesta avaliação foram:

1 — Vírus Rocio (ROC), amostra SPH 34675 isolada a partir de fragmento do cérebro humano<sup>1</sup>, a mesma fornecida para a fabricação da vacina, objeto da presente avaliação; 2 — Vírus da encefalite de São Luís (SLE), amostra SPAn 11916, isolada em São Paulo a partir de camundongo sentinela<sup>8</sup>; 3 — Vírus Ilhéus (ILH), amostra de protótipo, recebida dos "Rockefeller Foundation Virus Laboratories", de Nova Iorque, EUA.

Seguimos, para a interpretação dos dados sorológicos obtidos, os seguintes critérios:

**Negativo** — Ausência de anticorpos detectáveis na menor diluição da prova sorológica utilizada, ou seja, 1:10 em IH, 1:4 em FC e 1:2 em N.

**Conversão não significativa** — Casos em que houve elevação de título em somente uma diluição na prova sorológica utilizada, ou seja, elevação em uma das amostras de apenas o dobro do título quando comparada com os soros colhidos anteriormente.

**Conversão significativa** — Casos em que houve elevação de título em duas ou mais diluições na prova sorológica utilizada, ou seja, elevação de 4 ou mais vezes do título, na amostra, em relação àquele existente nos soros colhidos anteriormente.

**Sem alteração de título** — Casos de indivíduos com anticorpos no soro pré-vacinal e que não tiveram elevação significativa deste título após o estímulo da vacina.

**Taxa de conversão** — A relação observada entre o número de indivíduos que converteram (significativa e não significativamente) e o número de pessoas examinadas.

Devemos assinalar que todos os soros de um indivíduo foram sempre testados simultaneamente, qualquer que fosse o tipo de prova sorológica utilizada.

## RESULTADOS

Parte das pessoas que forneceram amostras de sangue para a avaliação sorológica da vacina contra encefalite não recebeu todas as doses vacinais ou falhou quanto ao fornecimento de uma ou mais amostras de sangue. Os resultados dessas amostras não serão discutidos neste trabalho.

As Tabelas I e II mostram os resultados gerais das provas de IH e FC.

Recebemos amostras pares de 944 pessoas que foram inoculadas com três doses de vacina e forneceram, portanto, duas amostras de sangue (uma pré-vacinal e outra 7 dias após a terceira dose). Examinamos 871 (92,3%) em provas de IH e 620 (65,7%) em provas de FC. Deste grupo, 706 pessoas forneceram uma terceira amostra de sangue, seis meses após a vacinação e delas foram examinadas 705 (99,9%) em IH e 598 (84,7%) em FC.

As pessoas que haviam recebido três doses da vacina em 1977, foram inoculadas com nova dose em 1979 e, trinta dias após, forneceram nova amostra de sangue. De 390 pessoas, que haviam cumprido totalmente o esquema de vacinação e sangria, obtivemos quatro amostras seriadas. Destas foram examinadas 389 (99,9%) em IH e 327 (83,8%) em FC.

Examinamos, em provas de IH (Tabela I), pares de soros de 871 pessoas.

T A B E L A I

Provas de Inibição da Hemaglutinação realizadas em soros de pessoas vacinadas contra encefalite em Jacupiranga, Estado de São Paulo, 1977-1979.

Soros	Recebidos	Examinados	Negativos		Conversões		Com anticorpos nas amostras anteriores		Taxa de conversão
			Sem anticorpos	Sem elevação de título	Não significativo	Significativo	Negativo	Positivo	
Pares	944	871	597 (68,5%)	79 (9,1%)	93 (10,7%)	102 (11,7%)	—	—	22,4%
Triplos	706	705	488 (69,2%)	69 (9,8%)	0	0	112 (15,9%)	36 (5,1%)	0,0%
Quádruplos	390	389	217 (55,8%)	39 (10,0%)	15 (3,9%)	12 (3,1%)	32 (8,2%)	74 (19,0%)	7,0%

De acordo com esses testes, 597 (68,5%) não apresentaram anticorpos detectáveis em nenhuma das duas amostras, sendo, portanto, consideradas como negativas e 79 (9,1%) que possuíam anticorpos pré-vacinais para ROC, SLE e ILH não apresentaram elevação significativa de título, para qualquer um dos antígenos. As restantes, 195 pessoas, mostraram elevação no título de anticorpos com taxa de con-

versão de 22,4%, sendo que em 93 (10,7%) esta elevação foi significativa.

Os dados obtidos por provas de FC em pares de soros (Tabela II) foram ainda mais pobres, pois, 490 (79,0%) pessoas foram negativas e 40 (6,5%) não tiveram o título de anticorpos pré-vacinais alterado. Apenas 90 converteram, significativamente ou não, dando uma taxa de conversão de 14,5%.

T A B E L A II

Provas de Fixação do Complemento realizadas em soros de pessoas vacinadas contra encefalite em Jacupiranga, Estado de São Paulo, 1977-1979.

Soros	Recebidos	Examinados	Negativos		Conversões		Com anticorpos nas amostras anteriores		Taxa de conversão
			Sem anticorpos	Sem elevação de título	Não significativo	Significativo	Negativo	Positivo	
Pares	944	620*	490 (79,0%)	40 (6,5%)	79 (12,7%)	11 (1,8%)	—	—	14,5%
Triplos	706	598§	475 (79,4%)	34 (5,7%)	0	0	68 (11,4%)	21 (3,5%)	0,0%
Quádruplos	390	327+	232 (70,9%)	15 (4,6%)	26 (8,0%)	3 (0,9%)	31 (9,5%)	20 (6,1%)	8,9%

\* — Não computados 71 pares com, pelo menos, um soro anticomplementar

§ — Não computados 55 triplos com, pelo menos, um soro anticomplementar

+ — Não computados 27 quádruplos com, pelo menos, um soro anticomplementar

A etapa seguinte da presente avaliação foi o exame de soros de pessoas que haviam tomado as três doses de vacina, já haviam forneci-

do duas amostras de sangue e que foram sangradas após seis meses, para verificação da duração do nível de anticorpos.

Pela Tabela I, podemos verificar que, em provas de IH, o número das pessoas cujos soros foram negativos e das que não apresentaram alteração no título de anticorpos, foi aproximadamente igual ao da avaliação anterior. Porém, das 148 pessoas que haviam desenvolvido anticorpos após o estímulo vacinal, 112 deixaram de apresentá-los, mostrando que 75% daquelas que tiveram anticorpos induzidos pela vacina perderam-nos, decorridos seis meses da vacinação.

As provas de FC em soros triplos (Tabela II) mostraram que esses anticorpos foram, também, muito fugazes pois, apenas 21 (3,5%) pessoas tinham anticorpos fixadores do complemento seis meses após a vacinação.

Examinamos, em provas de neutralização, os soros de 37 pessoas que forneceram três amostras seriadas de sangue. Dezoito delas, cujos soros haviam sido negativos em provas de IH e FC também o foram por essa prova; das 19 pessoas selecionadas dentre as que tiveram elevado o título de anticorpos séricos em provas de IH e FC, 14 tinham anticorpos neutralizantes, pelo menos na segunda amostra, e cinco foram negativas.

A última etapa da presente avaliação foi feita após a aplicação da quarta dose de vacina.

Em prova de IH (Tabela I), dos 389 soros quádruplos examinados 217 (55,8%) não tiveram anticorpos detectados e 39 (10,0%) não tiveram alteração de título. Verificamos, também, que houve conversão sorológica em 27 soros de pessoas que não tinham mostrado elevação de anticorpos nas três amostras anteriores, com taxa de conversão de 7,0% e que, das 106 pessoas (27,2%) com anticorpos em pelo menos uma das amostras anteriores, 32 (8,2%) não demonstraram anticorpos inibidores da hemaglutinação. Em provas de FC (Tabela II), das 327 pessoas examinadas, 232 (70,9%) não tiveram anticorpos séricos demonstráveis e 15 (4,6%) não tiveram alteração de título. Verificamos, ainda, conversão sorológica em 29 pessoas, com uma taxa de 8,9%.

Finalmente, das 51 (17,5%) pessoas com anticorpos em pelo menos uma das três amostras anteriores, 31 (9,5%) não tiveram anticorpos fixadores do complemento após a administração da quarta dose de vacina.

Selecionamos, para testes de neutralização, soros de 40 pessoas que não haviam mostrado anticorpos detectáveis, em nenhuma das quatro amostras de sangue, nas provas de IH e FC. Todas as 40 foram negativas, sem qualquer aumento significativo do tempo médio da sobrevida dos animais inoculados, fato que sugere, em concordância com as duas provas anteriores, que a vacina avaliada também não induziu anticorpos neutralizantes.

A Tabela III mostra, por provas de IH, o nível dos títulos de anticorpos, induzidos pela vacina, em pessoas que não possuíam anticorpos pré-vacinais para os três flavivírus estudados. Podemos verificar que a grande maioria mostrou títulos de 1:10 e 1:20 sendo que apenas 3 pessoas levantaram-nos a 1:80, o máximo por nós observado. Pela Tabela IV verifica-se que a maioria dos soros das pessoas sem anticorpos pré-vacinais mostrou anticorpos, fixadores do complemento, ao nível de 1:4 e apenas 11 pessoas fixaram o complemento à diluição de 1:8, título máximo observado.

TABELA III

Nível de anticorpos obtidos em provas de Inibição da Hemaglutinação realizadas em soros de pessoas que não tinham anticorpos pré-vacinais e vacinadas contra encefalite em Jacupiranga, Estado de São Paulo, 1977-1979

Soros	Títulos				Total
	1:10	1:20	1:40	1:80	
Pares	90	96	21	1	208
Triplos	30	15	1	0	46
Quádruplos	35	46	19	2	102
Total	155	157	41	3	356

TABELA IV

Nível de anticorpos obtidos em provas de Fixação do Complemento realizadas em soros de pessoas sem anticorpos pré-vacinais e vacinadas contra encefalite em Jacupiranga, Estado de São Paulo, 1977-1979

Soros	Títulos		Total
	1:4	1:8	
Pares	80	5	85
Triplos	22	0	22
Quádruplos	27	6	33
Total	129	11	140

## DISCUSSÃO

Para o controle de várias doenças causadas por vírus são utilizadas vacinas preparadas com vírus inativados por meios físicos ou químicos. Assim, entre outras, a influenza e a encefalite japonesa empregam este tipo de vacina, além da vacina contra poliomielite que foi substituída pela de vírus vivos. Evidentemente, a eficácia de uma vacina inativada é função da potência antigênica obtida e do esquema eficiente de sua aplicação. É o caso da vacina inativada de poliomielite que, em testes de campo efetuados na Suécia em 1955, produziu anticorpos em 99% das pessoas inoculadas e reduziu, praticamente a zero, a incidência da doença<sup>3</sup>. As vacinas monovalentes de vírus de influenza também mostram índice apreciável de anticorpos<sup>2</sup> e a vacina contra encefalite japonesa, preparada a partir do vírus replicado em cérebro de camundongos adultos, purificado e inativado pelo formol, chega a estimular o aparecimento de anticorpos em até 95% das pessoas inoculadas com duas doses<sup>4,5</sup>.

A duração dos anticorpos, produzidos pela vacina inativada de poliomielite, foi estimada em cerca de um ano e, em caso de dose de reforço, observou-se elevação de anticorpos, típica de respostas secundárias<sup>3</sup>. Também na vacina desenvolvida contra a encefalite japonesa, verificou-se que cerca de 60% dos indivíduos imunizados com a amostra Nakayama, mantiveram anticorpos de título 1:10, ou mais, decorrido um ano da vacinação e, após dose de reforço, os anticorpos foram detectados até dois anos<sup>4</sup>.

A vacina contra a encefalite causada pelo vírus Rocio, objeto da presente avaliação sorológica, mostrou, a julgar pelos dados obtidos por nós, um estímulo antigênico muito inferior ao das outras vacinas virais inativadas.

Assim, grande número de vacinados (217 de 390 pessoas) não desenvolveu anticorpos pelas provas escolhidas para esta avaliação, nem mesmo após a inoculação de quatro doses de vacina.

Além disso, nos arbovírus e, em especial, nos flavivírus, existe o que se chamou de infecção secundária<sup>10</sup> ou superinfecção<sup>9</sup>. Isso se manifesta em indivíduos que tiveram no passado uma infecção causada por um flaviví-

rus e que, a uma nova infecção por outro vírus deste grupo, respondem com elevação rápida e alta do título de anticorpos, sendo que, por vezes, os heterólogos têm título mais alto do que os anticorpos homólogos.

Na presente avaliação, cerca de 10% das pessoas que possuíam anticorpos pré-vacinais demonstraram não ter recebido estímulo antigênico suficiente para elevar os anticorpos adquiridos no passado.

Este fato é ainda mais realçado porque, além da amostra SPH 34675 homóloga à da vacina, utilizamos, em todos os nossos testes, amostras dos vírus Ilhéus e da encefalite de São Luís, do mesmo grupo antigênico a que pertence o vírus Rocio. Além do mais, depois da aplicação da quarta dose da vacina, apenas 7% das pessoas cujos soros foram negativos, após a administração de três doses, mostraram conversão sorológica nas provas utilizadas. E, 8% daquelas que revelaram anticorpos detectáveis em, pelo menos, uma das amostras de sangue, foram negativas, não respondendo ao estímulo vacinal que deveria ter sido induzido pela quarta dose. Isto demonstrou que a inoculação de uma quarta dose não produziu os efeitos que seriam esperados de uma dose de reforço.

Também a duração dos anticorpos induzidos pela vacina foi fugaz, pois, das 148 pessoas que apresentaram conversão sorológica após a inoculação de três doses da vacina, 112 foram consideradas como negativas, decorridos seis meses do término do primeiro esquema de vacinação. Estes achados foram amparados pelo fato de que 32 pessoas, que tiveram elevação de anticorpos pela ação da vacina, foram consideradas como negativas em provas de IH e FC quando seus soros foram examinados após a aplicação do quarto estímulo vacinal.

A obtenção de vacina eficiente contra a encefalite causada pelo vírus Rocio é de extrema importância, pois a doença causada por este vírus é grave e, em muitos casos, leva à morte ou à incapacidade física. Resta, portanto, a busca de vacina mais potente, seja pela escolha de amostras mais antigênicas, seja principalmente pela elevação da potência desta vacina, de forma que a quase totalidade das pessoas vacinadas adquira anticorpos e que estes sejam duráveis.

Porém, esta vacina foi, até agora, avaliada apenas sorologicamente durante nossos estudos, uma vez não houve atividade epidêmica deste vírus o que possibilitaria, também, uma avaliação epidemiológica.

### SUMMARY

#### Serological evaluation of a vaccine against human encephalitis caused by Rocio virus

A vaccine against the encephalitis caused by Rocio virus was evaluated in humans by hemagglutination-inhibition, complement fixation and mouse-titration tests. The results have shown a low conversion rate (22%), and that the antibodies induced by the vaccine were short lasting.

### AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem aos Drs. José da Silva Guedes, Darcy Elias, Arary da Cruz Tiriba e Geraldo Henrique Pinto pelo fornecimento dos soros utilizados na presente avaliação, e à D.<sup>a</sup> Sandra Regina Mayer pela coordenação e tabulação dos dados obtidos.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CASALS, J. — Immunological techniques for animal viruses. In: *Methods in Virology*. Edited by K. Maramorosh & H. Koprowski, vol. 3. New York, Academic Press, 1967, pp. 113-118.
2. DAVENPORT, F. M. & HENNESSY, A. V. — A serologic recapitulation of past experiences with Influenza A: Antibody response to monovalent vaccines. *J. Exp. Med.* 104: 85-97, 1956.
3. GARD, S. — Inactivated Poliomyelitis Vaccine. Present and Future. In: *First International Conference on Vaccines against Viral and Rickettsial Diseases of Man*. Pan American Health Organization Scientific Publication n.º 147, Washington, 1967.
4. KANAMITSU, M. — Antibody response to inactivated Japanese encephalitis vaccine of man living in a non-endemic area. In: *Immunization for Japanese Encephalitis*. Edited by Hammon, W.M., Kitaoka, M. & Downs, W.G. Tokio, Igaku Shoin Ltd., 1971, pp. 96-102.
5. KITAOKA, M. — Japanese encephalitis vaccine. *Japan J. Med. Sci. Biol.* 20 (Suppl.): 41-56, 1966.
6. LOPES, O. S.; COIMBRA, T. L. M.; SACCHETTA, L. A. & CALISHER, C. — Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I — Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. *Am. J. Epidemiol.* 107: 444-449, 1978.
7. LOPES, O. S.; SACCHETTA, L. A.; COIMBRA, T. L. M.; PINTO, G. H. & GLASSER, C. M. — Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. II — Epidemiologic studies on 1975 epidemic. *Am. J. Epidemiol.* 108: 394-401, 1978.
8. LOPES, O. S.; SACCHETTA, L. A.; COIMBRA, T. L. M. & PEREIRA, L. E. — Isolation of St. Louis encephalitis virus in South Brazil. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 28: 583-585, 1979.
9. MONATH, T. P.; WILSON, D. C. & CASALS, J. — The 1970 Yellow Fever epidemic in Okwoga district, Benue Plateau State, Nigeria. *Bul. Wld. Hlth. Org.* 49: 235-244, 1973.
10. THEILER, M. & CASALS, J. — The serological reactions in Yellow Fever. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 7: 585-594, 1958.
11. THEILER, M. & DOWNS, W. G. — Neutralization test studies. In: *The Arthropod-borne Viruses of Vertebrates*. New Haven, Yale University Press, 1973, pp. 3-36.

Recebido para publicação em 29/11/1979.