

Resposta imune humoral em macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, após a revacinação com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios modificada de uso veterinário

CORRESPONDÊNCIA PARA:
ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS
Instituto Pasteur
Av. Paulista, 393 - Cerqueira Cesar
01311-000 - São Paulo - SP
e-mail: ecpassos@bol.com.br

1- Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo - SP
2- Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo, São Paulo - SP
3- Fundação Parque Zoológico de São
Paulo, São Paulo - SP
4- Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo - SP
5- Bióloga - SP

Humoral immune response in capuchin monkeys (*Cebus apella*) kept in captivity after a booster dose with a veterinary use suckling mouse brain rabies vaccine

Estevão de Camargo PASSOS¹, Pedro Manuel Leal GERMANO²,
José Daniel Luzes FEDULLO³, Cleide Aschenbrenner CONSALES¹,
Maria Luiza CARRIERI¹, Ricardo CARDOSO⁴, Margareth de Andrade GONÇALVES⁵

RESUMO

Foram imunizados 26 macacos-pregos (*Cebus apella*) adultos, através da via intramuscular, com uma dose de 1,0 ml da vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida a partir de cérebros de camundongos lactentes, de uso veterinário, empregada nas campanhas de prevenção da raiva animal de cães e gatos. Os animais pertenciam a três grupos experimentais, previamente imunizados com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios submetidos a diferentes esquemas de vacinação, e permaneceram em cativeiro durante o período de junho de 1996 a junho de 1997. A revacinação foi realizada em todos os animais. As amostras de soros foram obtidas aos 0, 30, 180 e 365 dias, e armazenadas à temperatura de -20°C, e a dosagem dos anticorpos realizada através do teste simplificado da inibição da fluorescência. Verificou-se após a revacinação 17/25 (68%) dos animais pertencentes aos grupos I, II e III, que se apresentavam com títulos inferiores ao limite indicativo de soroconversão (<0,5 UI/mL) responderam com produção de anticorpos neutralizantes, e, os outros cinco que se apresentavam com títulos acima desse limite, mantiveram-se nesse patamar. Em relação ao período da resposta imune humoral, não ocorreram diferenças significantes entre os Grupos I, II e III (p>0,05). A vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios induziu a resposta imune nos macacos-pregos, após revacinação com produção de anticorpos neutralizantes, iguais ou superiores a 0,5 UI/ml, porém, de curta duração; não constituindo assim, imunógeno apropriado para ser utilizado na rotina de imunização destes animais de difícil lide, mantidos em cativeiro.

PALAVRAS-CHAVE: Macacos-pregos. *Cebus apella*. Raiva. Vacina Fuenzalida & Palacios. Anticorpos neutralizantes.

INTRODUÇÃO

A imunização dos animais suscetíveis se impõe como principal medida para o controle da raiva animal³⁰, podendo ser realizada mediante o emprego de diferentes tipos de vacinas anti-rábicas com vírus inativado ou vírus vivo modificado, produzidas em tecido nervoso ou em cultura celular. A utilização de vacinas anti-rábicas com vírus vivo modificado na imunização de primatas não humanos nunca deve ser adotada, pois há o risco de provocar a raiva vacinal, tal como observado em macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*)²², sauim (*Saguinus nigricollis*)¹ e babuínos adultos (*Papio ursinus*)⁵.

É importante destacar que, embora os primatas sejam mantidos nos zoológicos em recintos apropriados, outras espécies animais podem adentrar suas instalações,

notadamente morcegos. Como estes podem transmitir a raiva, a imunização preventiva dos primatas faz-se necessária, uma vez que o vírus rábico já foi isolado em morcegos recolhidos mortos dentro desses recintos²⁷, como também em morcegos capturados vivos, nos gramados dos parques zoológicos, devido a comportamento anômalo²⁵. Em áreas onde a raiva ocorre de forma endêmica, a vacinação anti-rábica dos animais pertencentes aos zoológicos deve ser considerada, sobretudo, quando as colônias têm alto risco de exposição ao vírus rábico^{11,13,19}.

Os primatas, embora possam acostumar-se com as pessoas que os alimentam, são extremamente agressivos, sobretudo após a maturidade sexual, com reações de defesa caracterizadas, principalmente, pelas mordeduras em veterinários, tratadores, proprietários e outras pessoas que tenham contato com esses animais, e, seus grandes dentes

caninos podem provocar profundas e extensas dilacerações teciduais, passíveis de cuidados cirúrgicos, obrigando que as pessoas agredidas sejam submetidas ao tratamento anti-rábico pós-exposição^{2, 7, 12, 14, 18, 22, 24}.

No Brasil é utilizado oficialmente nas campanhas de vacinação em massa, para a prevenção da raiva canina e felina, a vacina anti-rábica inativada, produzida em camundongos lactentes¹⁰. Esta vacina contém suficiente quantidade de massa antigênica, que lhe confere poder imunogênico, apresenta alto grau de inocuidade e confere níveis de imunidade satisfatórios, que são de máxima importância quando a vacinação é utilizada em campanhas de prevenção no âmbito populacional^{10, 30}.

Embora não recomendado pelas autoridades sanitárias do país, os primatas neotropicais criados em domicílios têm sido, usualmente, vacinados contra a raiva nas campanhas preventivas, organizadas pelos Municípios, com a finalidade de controlar no meio urbano, a raiva canina e felina. Contudo, na literatura são escassos os dados disponíveis sobre a eficácia da vacina anti-rábica, inativada, produzida em camundongos lactentes, indicada para cães, na imunização de macacos-pregos.

Cabrera et al.⁸ estudaram a resposta imune em macacos-pregos (*Cebus apella*) e sagüis (*Callithrix* sp.), após a imunização com uma dose da vacina anti-rábica inativada preparada a partir de cérebros de camundongos lactentes indicada para cães, administrada por via subcutânea ou intramuscular, e observaram que os macacos-pregos não responderam ao imunógeno, enquanto que os sagüis apresentaram anticorpos detectáveis, a partir do 14º dia persistindo até o 60º dia; os anticorpos anti-rálicos foram determinados através da técnica de contraímunoelctroforese.

Passos et al.^{20, 21} imunizaram três grupos de macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, indicada para cães e gatos, com esquemas vacinais diferentes. Os animais apresentaram resposta imunológica com produção de anticorpos neutralizantes e com títulos superiores a 0,5 UI/mL, com exceção de três animais pertencentes aos Grupos II e III que não responderam aos estímulos antigênicos. Os três grupos apresentaram período curto da resposta imune humoral.

Em vista das informações e dado a carência de resultados, o objetivo do presente trabalho foi submeter três grupos de macacos-pregos, previamente imunizados contra a raiva, ao reforço anual com a vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, indicada para cães e gatos, e acompanhar a resposta imune humoral durante o período de 365 dias.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados três grupos experimentais de

macacos-pregos (*Cebus apella*) adultos, previamente vacinados há um ano contra a raiva. Todos os animais dos três grupos foram imunizados, pela via intramuscular, no músculo *semitendinosus*, com uma única dose de 1,0 ml da vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, de uso veterinário, suspensão a 2% de tecido cerebral, empregada nas campanhas de prevenção da raiva animal de cães e gatos, produzida no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), lote 096/96 produzido em maio de 1996 com título protetor de 10^{6,2} DP₅₀/0,03ml, e validade por 12 meses após a data de fabricação.

Os animais identificados através de número tatuado na região interna dos membros pélvicos, foram mantidos na colônia da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, em recintos com área externa de 20 a 30 m², incluindo o solário, e alimentados duas vezes ao dia, segundo o Setor de Nutrição com banana nanica, mamão, fruta da época, repolho, laranja, batata doce cozida, pescoço de frango moído, amendoim com casca e ovo cozido e, a água administrada *ad libitum*. O Grupo I era constituído por 1 fêmea e 7 machos, o grupo II por 3 fêmeas e 5 machos e o grupo III por 2 fêmeas e 8 machos. Os animais permaneceram nos recintos durante 12 meses, com início em junho de 1996 e término em junho de 1997.

Cada animal foi anestesiado com zolazepan associado com tiletamina (Zoletil 50 da Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda), na dosagem de 4,4 mg/kg de peso, por via intramuscular, utilizando seringas de insulina esterilizadas e descartáveis, com volume de 1,0 ml, e agulhas esterilizadas e descartáveis, de tamanho 20 x 5,5 mm. A anestesia foi aplicada nos animais para permitir tuberculização, colheita de sangue, vacinação e cuidados veterinários.

Os animais foram sangrados nos meses de junho, julho e dezembro de 1996 e junho de 1997. A colheita deu-se mediante punção da veia femoral, utilizando seringas esterilizadas descartáveis, com 10 ml de volume, e agulhas esterilizadas e descartáveis, 30 x 8 mm. O sangue colhido foi acondicionado em tubos de ensaio esterilizados de vidro, tamanho 12 x 150 mm, colocados em estufa à temperatura de 37°C durante 30 minutos, em seguida eram deixados em geladeira à temperatura de 4-8°C, durante 30 minutos, para formação e retração do coágulo e liberação de soro. As amostras foram centrifugadas sob refrigeração a 2.000 rpm, durante 15 minutos, distribuídas em tubos "Eppendorf" e armazenadas em freezer à temperatura de -20°C até o processamento no laboratório, para dosagem de anticorpos.

Todos os procedimentos realizados para a manutenção das culturas celulares, produção de vírus rábico de trabalho e reação de soroneutralização foram efetuados na capela de fluxo laminar, utilizando materiais esterilizados.

A pesquisa de anticorpos anti-rálicos nos soros dos animais foi realizada através do teste simplificado da inibição da fluorescência (TSIF)⁹, em microplacas esterilizadas, de fundo chato, com tampa e 96 orifícios, as células utilizadas

foram da linhagem BHK₂₁ Clone₁₃ (Baby Hamster Kidney) e o meio de cultura Eagle-MEM (Minimum Essential Medium) com sais de Earle e L-glutamina, sem bicarbonato. Os soros foram inativados em banho-maria à temperatura de 56°C, durante 30 minutos, e testados na razão 2 até a diluição final de 1:640, em seguida foram adicionados em todos os orifícios 50 microlitros de uma suspensão do vírus rábico fixo, cepa PV (Pasteur Virus) na diluição ótima de trabalho (1:8), suficiente para provocar 100% de infecção nas células. Após uma hora de incubação a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, foram adicionados 50 microlitros de uma suspensão de células BHK₂₁C₁₃ (10⁶ células/ml), incubando-se nas mesmas as condições anteriores por 24 horas. As células foram coradas mediante a adição de 50 microlitros do conjugado fluorescente anti-nucleocapsídeo rábico, marca Diagnostics Pasteur, França, diluído a 1:20 em solução tampão fosfatos, pH 7,2 e adicionado de azul de Evans na diluição final de 1:2.000.

Os resultados foram expressos na diluição onde ocorreu decréscimo de 50% de infecção. A comparação dos resultados dos soros dos animais com o soro padrão utilizado serviu como base para obter os títulos em UI/ml. Através de regra de três, comparou-se os resultados obtidos com o soro padrão e o soro problema.

Foi adotado para os primatas não humanos, o mesmo critério utilizado para as pessoas submetidas a vacinação anti-rábica e que são consideradas imunizadas, ou seja, demonstram soroconversão com títulos maiores ou iguais a 0,5UI/ml segundo World Health Organization³⁰.

Para a determinação do valor estimado pela curva do título de anticorpos anti-rábicos, nos meses em que os animais não foram manuseados, utilizou-se a fórmula da equação da reta com a união de dois pontos¹⁷, tendo sido empregada para os seguintes meses: agosto, setembro, outubro e novembro de 1996; e, janeiro, fevereiro, março, abril e maio de 1997. Este método permitiu estimar, mês a mês, o título de anticorpos anti-rábicos de cada animal do experimento.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da distribuição t de Student, teste de duas médias independentes e análise de variância, para comparar os resultados dos diferentes grupos experimentais em relação à duração da imunidade após a revacinação; utilizando um nível de significância de 0,05⁴.

RESULTADOS

A Tab.1 apresenta os títulos de anticorpos neutralizantes, obtidos na reação do TSIF, em macacos-pregos do grupo I, revacinados com 1 dose da vacina anti-rábica em junho de 1996, nesta data, 100% (8/8) dos animais apresentavam títulos inferiores a 0,5 UI/ml. Os títulos obtidos 30 dias após revacinação (julho 1996), foram superiores ao limite mínimo indicativo de soroconversão, em 100% do grupo (7/7). O animal de número 54 veio a óbito antes de completar

30 dias pós revacinação. Aos 180 dias do início do experimento, ou seja, seis meses após a dose de revacinação anual, 42,8% (3/7) dos animais (n^{os} 25, 100 e 101) apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml. Ao término do experimento, portanto, aos 365 dias da revacinação (junho 1997), apenas o animal de número 25 (14,3%) apresentou título maior que o mínimo preconizado, enquanto que os restantes 85,7% (6/7), mostraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml.

Na Tab. 2 são apresentados os títulos de anticorpos neutralizantes, obtidos na reação do TSIF, em macacos-pregos do grupo II, revacinados com 1 dose da vacina anti-rábica em junho de 1996, nesta data, 25% (2/8) dos animais (n^{os} 1 e 10) apresentavam títulos maiores que o mínimo preconizado, 75% (6/8) registraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml. Aos 30 dias pós revacinação anual, 87,5% (7/8) dos animais (n^{os} 1, 10, 11, 15, 26, 43 e 98) apresentavam títulos maiores que o mínimo preconizado e apenas o animal número 30 (12,5%) registrou título inferior a 0,5 UI/ml. Deve-se salientar que, neste animal não se detectou resposta imune humoral após a vacinação, permanecendo com títulos de anticorpos neutralizantes inferiores a 0,5 UI/ml. Aos 180 dias do experimento, ou seja, seis meses após a dose de revacinação anual, apenas dois animais (28,5%) (n^{os} 1 e 43) mantiveram títulos superiores a 0,5 UI/ml. O número 11 veio a óbito antes de completar 180 dias pós revacinação. Ao término do experimento, aos 365 dias da revacinação (junho 1997), 100% (6/6) dos animais apresentaram títulos inferiores a 0,5 UI/ml. O animal número 1 veio a óbito antes de completar 365 dias.

Na Tab. 3 constam os títulos de anticorpos neutralizantes, obtidos na reação do TSIF, em macacos-pregos do grupo III, revacinados com 1 dose da vacina anti-rábica em junho de 1996, nesta data 30% (3/10) (n^{os} 7, 22 e 97) apresentaram títulos mínimo indicativo de soroconversão; e, os outros 70% (7/10) registraram títulos inferiores a 0,5 UI/ml. Aos 30 dias após a revacinação (julho 1996), 80% (8/10) dos animais (n^{os} 7, 16, 22, 38, 59, 71, 73 e 97) apresentaram títulos maiores que o mínimo desejado e, 20% (2/10) títulos inferiores a 0,5 UI/ml, observados nos animais n^{os} 48 e 70 que desde o início do experimento nunca apresentaram títulos de anticorpos detectáveis. Aos 180 dias do início do experimento, ou seja, seis meses após a dose de revacinação anual, 33,3% (3/9) dos animais (n^{os} 22, 59 e 97) apresentaram títulos satisfatórios; títulos inferiores a 0,5 UI/ml, foram encontrados em 66,6% (6/9). O animal de número 7 veio a óbito, no decorrer deste período. Ao término do experimento, aos 365 dias da revacinação (junho 1997), 33,3% (3/9) dos animais (n^{os} 22, 59 e 97) apresentaram títulos superiores a 0,5 UI/ml e títulos inferiores abaixo do limite mínimo desejado constataram-se em 66,6% (6/9). Os animais n^{os} 48 e 70 apresentaram um comportamento anérgico durante o período experimental.

A Tab. 4, do mesmo modo apresenta o período da soroconversão em dias após a revacinação dos Grupos I, II

PASSOS, E.C.; GERMANO, P.M.L.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; FEDULLO, J.D.L.; CORRÊA, S.H.R.; CONSALES, C.A.; CARRIERI, M.L.; CARDOSO, R.; GONÇALVES, M.A. Resposta imune humoral em macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, após a revacinação com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios modificada de uso veterinário. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.4, p.181-188, 2002.

Tabela 1

Títulos de anticorpos neutralizantes (UI/ml) obtidos em macacos-pregos (*Cebus apella*) previamente imunizados contra a raiva, pertencentes ao Grupo I, submetidos a uma dose de reforço anual com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, de uso veterinário. São Paulo, 1998.

Animal	Junho 1996 (1)	Julho 1996	Dezembro 1996	Junho 1997
18	0,26	1,41*	0,26**	0,18***
19	0,18	0,71	0,18	0,18
25	0,26	2,12	2,12	0,71
34	0,18	1,06	0,35	0,18
54	0,35	Morreu		
61	0,18	0,53	0,35	0,18
100	0,18	4,23	0,71	0,35
101	0,26	2,12	0,71	0,26

(1) Aplicação da dose de reforço anual com a vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios

* Título de anticorpos em UI/ml, 30 dias após a revacinação; ** Título de anticorpos em UI/ml, 180 dias após a revacinação

*** Título de anticorpos em UI/ml, 365 dias após a revacinação

Tabela 2

Títulos de anticorpos neutralizantes (UI/ml) obtidos em macacos-pregos (*Cebus apella*) previamente imunizados contra a raiva, pertencentes ao Grupo II, submetidos a uma dose de reforço anual com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, de uso veterinário. São Paulo, 1998.

Animal	Junho 1996 (1)	Julho 1996	Dezembro 1996	Junho 1997
1	1,41	1,06*	0,71**	Morreu
10	0,53	0,53	0,26	0,26***
11	0,18	1,06	Morreu	
15	0,35	0,71	0,26	0,18
26	0,18	0,53	0,26	0,26
30	0,18	0,26	0,18	0,18
43	0,26	0,53	0,53	0,26
98	0,18	1,41*	0,35	0,26

(1) Aplicação da dose de reforço anual com a vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios

* Título de anticorpos em UI/ml, 30 dias após a revacinação; ** Título de anticorpos em UI/ml, 180 dias após a revacinação

*** Título de anticorpos em UI/ml, 365 dias após a revacinação

Tabela 3

Títulos de anticorpos neutralizantes (UI/ml) obtidos em macacos-pregos (*Cebus apella*) previamente imunizados contra a raiva, pertencentes ao Grupo III, submetidos a uma dose de reforço anual com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, de uso veterinário. São Paulo, 1998.

Animal	Junho 1996 (1)	Julho 1996	Dezembro 1996	Junho 1997
7	1,06	1,06*	Morreu	
16	0,18	1,06	0,18**	0,18***
22	1,06	2,12	1,41	1,41
38	0,18	1,41	0,35	0,18
48	0,18	0,26	0,18	0,18
59	0,18	1,06	1,06	0,53
70	0,18	0,18	0,18	0,18
71	0,18	0,53	0,26	0,18
73	0,18	2,12	0,35	0,18
97	0,53	1,06	0,71	0,53

(1) Aplicação da dose de reforço anual com a vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios

* Título de anticorpos em UI/ml, 30 dias após a revacinação; ** Título de anticorpos em UI/ml, 180 dias após a revacinação

*** Título de anticorpos em UI/ml, 365 dias após a revacinação

PASSOS, E.C.; GERMANO, P.M.L.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; FEDULLO, J.D.L.; CORRÊA, S.H.R.; CONSALES, C.A.; CARRIERI, M.L.; CARDOSO, R.; GONÇALVES, M.A. Resposta imune humoral em macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, após a revacinação com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios modificada de uso veterinário. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.4, p.181-188, 2002.

Tabela 4

Período da soroconversão em dias, observados em macacos-pregos (*Cebus apella*) previamente imunizados contra a raiva, pertencentes aos Grupos I, II e III, submetidos a uma dose de reforço anual com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, de uso veterinário. São Paulo, 1998.

Grupo I		Grupo II		Grupo III	
Animal	Período de soroconversão em dias	Animal	Período de soroconversão em dias	Animal	Período de soroconversão em dias
18	146	1	Morreu *	7	Morreu *
19	71	10	45	16	115
25	360	11	Morreu *	22	360
34	137	15	88	38	115
54	Morreu *	26	19	48	0
61	28	30	0	59	349
100	283	43	173	70	0
101	260	98	151	71	19
			73	162	
			97	360	
Média Aritmética	183,6		79,3		164,4
Desvio Padrão	120,6		70,8		154,4
Variância	14551,6		5019,5		23834,8

* Os animais que morreram, do Grupo I nº 54, do Grupo II nº 1 e 11, do Grupo III nº 7, não foram considerados para os efeitos dos cálculos estatísticos.

e III. Em relação à duração da imunidade dos diferentes grupos experimentais, a análise estatística dos resultados constatou que os animais dos Grupos I, II e III não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

A vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, indicada para cães e gatos, quando administrada em macacos-pregos (*Cebus apella*) previamente imunizados, apresentou ao longo do período experimental, um comportamento irregular na resposta imunológica destes animais. A ocorrência de reações alérgicas à vacina não foram detectadas em animais vacinados, e, as mortes decorrentes dos ferimentos provocados pelas mordeduras ocorridas nos conflitos de hierarquia dos grupos.

No Grupo I (Tab. 1), os animais que haviam sido imunizados há um ano atrás com três doses de vacina ²¹, verificou-se na ocasião da revacinação que em 100% (8/8) dos animais apresentavam títulos de anticorpos neutralizantes abaixo do limite de 0,5 UI/ml. Após 30 dias da revacinação, ocorreu a indução da resposta imunológica humoral secundária com elevação nos títulos, acima do limite indicativo de soroconversão e com duração média de 183,6±120,6 dias, em 100% (7/7) dos animais, sendo que dentre estes, três animais apresentaram duração dos níveis de anticorpos acima dos 260 dias.

O comportamento do Grupo II (Tab. 2), refere-se aos animais que haviam sido imunizados há um ano com duas

doses de vacina e uma dose de reforço há seis meses atrás ²⁰, verificou-se na ocasião da revacinação dois animais (nºs 1 e 10) apresentavam títulos superiores a 0,5 UI/ml, a revacinação manteve esses dois exemplares com títulos de anticorpos superiores e estimulou a resposta imune nos outros 62,5% (5/8), atingindo níveis superiores ao limite mínimo desejado de 0,5 UI/ml.

O Grupo III (Tab. 3) os animais que haviam sido imunizados há um ano com uma dose de vacina e uma dose de reforço há seis meses atrás ²⁰, verificou-se na ocasião da revacinação três animais (nºs 7, 22 e 97) apresentavam com títulos superiores a 0,5 UI/ml, a revacinação também manteve esses três exemplares com títulos de anticorpos superiores e estimulou a resposta anamnésica em outros 50% (5/10) dos animais.

Em relação a duração da imunidade dos diferentes grupos experimentais (Tab. 4), os valores da média e desvio padrão obtidos para os Grupos I, II e III foram respectivamente 183,6±120,6 dias, 79,3±70,8 dias e 164,4±154,4 dias. Embora as médias entre os Grupos I e III tenham ficado próximas, e distantes da média do Grupo II, a análise estatística dos resultados demonstraram que os animais dos Grupos I, II e III não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados dois a dois, G-I x G-II, G-I x G-III, e G-II x G-III.

A necessidade da aplicação de doses de reforço vacinal para estimular a resposta imune humoral em primatas não humanos, foi observada por Andrade et al.³ em sagüiis (*Callithrix* sp.) imunizados com quatro doses de vacina anti-rábica produzida em camundongos lactentes, que apresentaram

100% de proteção após serem desafiados com uma suspensão de vírus rábico aos 37 dias. Kessler et al.¹³ observou em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) que uma dose de reforço de vacina anti-rábica produzida em camundongos lactentes, aplicada 30 dias após a primeira vacinação, estimulou a resposta imune humoral em 100% dos exemplares, com títulos de anticorpos iguais a 0,5 UI/ml ou superiores. Nota-se que a resposta imune humoral destes animais pode ser induzida com vacina de tecido cerebral quando se adotam esquemas com reforços periódicos ou revacinação anual. Passos et al.^{20,21} também observaram em macacos-pregos (*Cebus apella*) que as doses de reforço da vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios estimularam a produção de anticorpos neutralizantes com títulos superiores a 0,5 UI/ml, com exceção de três animais que não responderam aos estímulos antigênicos.

As vacinas anti-rábicas de cultura de tecido e recombinantes também estimulam a resposta imune humoral secundária, fato este observado por Lavender¹⁵ em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) imunizados com diferentes tipos de vacinas anti-rábicas de cultura de tecido constatou que 100% dos animais apresentavam aumento no título de anticorpos decorridos 30 dias do reforço vacinal. O mesmo resultado foi obtido por Taylor et al.²⁸ em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) e chimpanzés (*Pan troglodytes*), quando do reforço da vacina recombinante de vírus aviário (canarypox), contendo glicoproteína rábica ALVAC-RG, responsável pelo aumento significativo dos níveis de anticorpos e, também por Smith et al.²⁷ quando imunizaram quatro gibões (*Hylobates lar*) com vacinas anti-rábicas de cultura de tecido após terem manuseados um morcego raivoso dentro do recinto no zoológico.

Pode-se considerar alguns aspectos importantes relacionados ao trabalho experimental, durante os 12 meses de observação após a revacinação, ao analisar o conjunto de 25 macacos-pregos, o sistema imune destes animais, quando estimulado com a vacina anti-rábica produzida em camundongos lactentes, respondeu 30 dias após a vacinação com a produção de anticorpos neutralizantes em 17/25 (68%) dos animais pertencentes aos grupos I, II e III, que se apresentavam com títulos inferiores ao limite indicativo de soroconversão, e, os outros 5 exemplares (Grupo II animais n^{os} 1 e 10; Grupo III animais n^{os} 7, 22, 97) que se apresentavam com títulos de anticorpos acima do limite indicativo de soroconversão, mantiveram os níveis de anticorpos acima do limite de soroconversão adotado após a revacinação.

A presença de animais não respondedores, ou por falta de estímulo antigênico ou por serem anérgicos, foi constatada durante o período experimental, depois do reforço em apenas 3 exemplares que pertenciam aos grupos II (animal n^o 30) e III (animais n^{os} 48, 70). Saliente-se que os animais desses grupos haviam sido imunizados previamente, respectivamente com três doses e duas doses de vacina anti-rábica produzida em camundongos lactentes²⁰.

A ausência de resposta imunológica humoral após a vacinação anti-rábica utilizando diferentes tipos de vacinas, em primatas não humanos, também foi observada por Sikes et al.²⁶ em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) imunizados com vacina anti-rábica de cérebros de camundongos lactentes; Lawson et al.¹⁶ com macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) com uma vacina anti-rábica de vírus vivo modificado, cepa ERA, administrada pela via oral; Blancou et al.⁶ em primatas não humanos imunizados com vacina anti-rábica de cultura celular, inativada, adicionada de adjuvante (hidróxido de alumínio), administrada por via subcutânea; Rupprecht et al.²³ em chimpanzés (*Pan troglodytes*) imunizados oralmente com vacina recombinante de glicoproteína do vírus rábico e vaccinia; Cabrera et al.⁸ e Passos et al.²⁰ em macacos-pregos (*Cebus apella*) imunizados com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios; e, Andrade et al.³ em sagüis (*Callithrix* sp.) imunizados com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, por via subcutânea.

De acordo com estes aspectos, evidencia-se que os primatas não humanos, frente a vacinas anti-rábicas, apresentam resposta imune humoral variáveis; na dependência de fatores como: delineamento experimental, tipo de imunógeno, esquemas de imunização e, fundamentalmente, espécies de primatas consideradas nos experimentos e, por esta razão, as análises comparativas tornam-se dificultadas. Nos experimentos com vacinas anti-rábicas de uso veterinário ou humano, utilizam-se espécies de primatas originárias do Velho Mundo como babuínos (*Papio ursinus*)⁵; chimpanzés (*Pan troglodytes*)^{23, 28}; cynomolgos (*Macaca fascicularis*)²⁹; gibões (*Hylobates lar*)²⁷; macacos Rhesus (*Macaca mulatta*)^{13, 15, 16, 26, 28}; *Macaca nemestrina*¹⁹; e as originárias do Novo Mundo como macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp.)^{11, 23, 28}; macacos-pregos (*Cebus apella*)^{8, 20, 21}; sagüis (*Callithrix* sp.)^{3, 8}.

Com base nos trabalhos mencionados constata-se que os primatas não humanos, de modo geral, podem ser considerados bons respondedores aos imunógenos rábicos. As dificuldades maiores de resposta, contudo, permanecem quando os animais são vacinados com imunógenos preparados a partir do tecido nervoso de camundongo com vírus inativado. Mesmo adicionadas com adjuvantes, nem sempre os resultados são satisfatórios. Em relação às vacinas modernas, preparadas a partir de frações proteicas virais, os resultados são promissores, embora alguns deles, insatisfatórios, possam ter sido determinados pelo tipo de via de administração adotado^{23, 28, 29}.

Nestas circunstâncias, torna-se difícil a comparabilidade de resultados entre estas pesquisas e, entre elas e os resultados obtidos neste experimento. Mesmo assim, é possível constatar que os resultados dos três grupos experimentais não se distanciam do perfil de comportamento observado nas referidas pesquisas. Evidencia-se portanto, que a vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, para produzir

PASSOS, E.C.; GERMANO, P.M.L.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; FEDULLO, J.D.L.; CORRÊA, S.H.R.; CONSALES, C.A.; CARRIERI, M.L.; CARDOSO, R.; GONÇALVES, M.A. Resposta imune humoral em macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, após a revacinação com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios modificada de uso veterinário. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.4, p.181-188, 2002.

o efeito desejado necessita de repetidas doses e a intervalos curtos de tempo, o que determina dificuldades de ordem técnica quanto à sua utilização na prática dos serviços que mantêm macacos-pregos em cativeiro.

CONCLUSÕES

1. A vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes, de uso veterinário, foi capaz de estimular em 68,0% (17/25) dos macacos-pregos, que se apresentavam com níveis de anticorpos abaixo do limite de soroconversão, a resposta

imune humoral secundária com produção de anticorpos neutralizantes com títulos iguais ou superiores a 0,5 UI/ml, 30 dias após a revacinação.

2. Em relação ao período da resposta imune humoral, não ocorreram diferenças significante entre os Grupos I, II e III ($p>0,05$) quando comparados dois a dois, G-I x G-II, G-I x G-III, e G-II x G-III.

3. A vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios, inativada, produzida em camundongos lactentes não constitui imunógeno apropriado para ser utilizado na rotina de imunização de macacos-pregos, animais de difícil lide, mantidos em cativeiro.

SUMMARY

Twenty-six capuchin monkeys (*Cebus apella*) were intramuscularly immunized with 1.0 ml dose of a veterinary inactivated suckling mouse brain rabies vaccine (SMBV) employed in campaigns for rabies prevention in dogs and cats. The animals belonged to three experimental groups previously vaccinated with SMBV and different schemes, were kept in captivity from June, 1996 to June, 1997. All animals received a booster dose. Serum samples were obtained at the 0th, 30th, 180th and 365th days and kept stored at -20°C. The antibodies dosage was carried out through the simplified inhibition fluorescent test. After a booster dose 17/25 (68%) of animals belonged to groups I, II and III, that had neutralizing antibodies above 0.5 IU/ml produced a humoral immune response equal or higher than 0.5 IU/ml, and another five animals that had neutralizing antibodies higher than 0.5 IU/ml kept in these levels. In relationship to longer humoral immune response there is no statistical difference between all groups, G-I x G-II, G-I x G-III, G-II x G-III ($p>0,05$). The SMBV induced humoral immune response in capuchin monkeys after a booster dose, producing neutralizing antibodies equal to or higher than 0.5 IU/ml; however, they were short-lasting, being therefore not appropriate as an immunogen to be used routinely in the immunization of these animals which are difficult both to be dealt with and to be kept in captivity.

KEY-WORDS: Capuchin monkeys. *Cebus apella*. Rabies. SMBV. Neutralizing antibodies. Immunization.

REFERÊNCIAS

1. AARON, E.; KAMEI, I.; BAYER, E.V.; EMMONS, R.W.; CHIN, J. Probable vaccine-induced rabies in a pet marmoset, California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.24, n.11, p.99, 1975.

2. ALMEIDA, L.P.; FRANCIS, D.G.; LOPES, E.V. Raiva; aspectos epidemiológicos das agressões por animais e procura ao serviço anti-rábico humano em Araguari, Minas Gerais. **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, v.2, n.1, p.71-76, 1986.

3. ANDRADE, M.C.R.; OLIVEIRA, A.N.; 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.

4. BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: E.P.U., 1980.

5. BINGHAM, J.; FOGGIN, C.M.; GERBER, H.; HILL, F.W.G.; KAPPELLER, A.; KING, A.A.; PERRY, B.D.; WANDELER, A.I. Pathogenicity of SAD rabies vaccine given orally in chacma baboons (*Papio ursinus*). **The Veterinary Record**, v.131, p.55-56, 1992.

6. BLANCOU, J.; AUBERT, M.F.A.; ANDRAL, L. Immunité humorale après vaccination contre la rage. **Bulletin de L'Académie Vétérinaire de France**, v.52, p.491-497, 1979.

7. BOULGER, L.R. Natural rabies in a laboratory monkey. **The Lancet**, v.1, p. 941-943, 1966.

8. CABRERA, M.A.A.; FIGUEIREDO, M.J.; SILVA, W.C.; FERRER, D.; TEIXEIRA, R.H.; CAVALHEIRO, M.L.J.; ANDRADE, M.C.R.; FERNANDES, R.C.; MOURA, W.C. Antibody response to a inactivated rabies vaccine in some species of Brazilian monkeys. In: **WORLD VETERINARY CONGRESS**, 24th, 1991, Rio de Janeiro. **Abstracts**. Rio de Janeiro, 1991. p.322.

9. FAVORETTO, S.R.; CARRIERI, M.L.; TINO, M.S.; ZANETTI, C.R.; PEREIRA, O.A.C. Simplified fluorescent inhibition microtest for the titration of rabies neutralizing antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 35, n. 2, p.171-175, 1993.

10. GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V.; SILVA, E.V.; PRETO, A.A.; CORDEIRO, C.F. Avaliação em camundongos de vacinas anti-rábicas inativadas frente a variantes antigênicas do vírus da raiva. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, p. 551-560, 1990.

11. HAIGH, J.C.; FIELD, M.F. Rabies vaccination in a small zoo: antibody titers studies. **Journal of Zoo and Animal Medicine**, v.12, p.17-20, 1981.

12. KAPLAN, C. Rabies in non-human primates. **Laboratory Animal Handbooks**, v.4, p.117-8, 1969.

13. KESSLER, M.J.; SUMMER, J.W.; BAER, G.M. Evaluation of killed rabies vaccine for Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Journal**

PASSOS, E.C.; GERMANO, P.M.L.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; FEDULLO, J.D.L.; CORRÊA, S.H.R.; CONSALES, C.A.; CARRIERI, M.L.; CARDOSO, R.; GONÇALVES, M.A. Resposta imune humoral em macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, após a revacinação com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palacios modificada de uso veterinário. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.4, p.181-188, 2002.

of Zoo and Animal Medicine., v.13, n.2, p.74-77, 1982.

14. KLENERMAN, L.; COID, C.R.; AOKI, F.Y. Treatment of wounds from animals suspected of carrying neurotropic viruses. **British Medical Journal**, v.3, p.740-741, 1975.

15. LAVENDER, J.F. Immune response in primates vaccinated with duck embryo cell culture rabies vaccine. **Applied Microbiology**, v.25, n.3, p.327-331, 1973.

16. LAWSON, K.F.; WALCROFT, M.J.; CRAWLEY, J.F. ERA strain rabies vaccine: oral vaccination of nonhuman primates. **Canadian Veterinary Journal**, v.17, n.10, p. 255-258, 1976.

17. LEITHOLD, L. **O cálculo com geometria analítica**. 3ed. São Paulo : Harbra, 1994.

18. MIOT, M.R.; SIKES, R.K.; SILBERMAN, M.S. Rabies in a chimpanzee. **Laboratory Primate Newsletter**, v.12, n.1, p. 6, 1973.

19. NIEVES, P.; RODRIGUEZ, J.F.; KESSLER, M.J.; BERCOVITCH, F. Subcutaneous rabies vaccination of pigtail macaques. **Journal of Medical Primatology**, v.25, p.14-16, 1996.

20. PASSOS, E.C. **Avaliação da vacina anti-rábica inativada, produzida em cérebros de camundongos lactentes, na imunização de macacos-prego (*Cebus apella*, LINNAEUS, 1758) mantidos em cativeiro**. 1998. 77f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

21. PASSOS, E.C.; GERMANO, P.M.L.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; FEDULLO, J.D.L.; CORRÊA, S.H.R.; CONSALES, C.A.; CARRIERI, M.L.; GONÇALVES, M.A. Inactivated suckling mouse brain rabies vaccine provides short-term immunity in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.32, n.1, p.55-57, 2001.

22. RICHARDSON, J.H. & HUMPHREY, G.L. Rabies in imported nonhuman primates. **Laboratory Animal Science.**, v.21, n.6, p.1082-1083, 1971.

23. RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; CUMMINS, L.B.; KOPROWSKI, H. Primate responses to a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. **Vaccine**, v. 10, n. 6, p. 368-374, 1992.

24. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Profilaxia da raiva humana. Manual Técnico do Instituto Pasteur, v.4, 33p. São Paulo, 1999.

25. SEDGWICK, C.J.; ROBINSON, P.T.; LOCHNER, F.K. Zoonoses: a zoo's concern. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.167, n.9, p.828-829, 1975.

26. SIKES, R.K.; CLEARY, W.F.; KOPROWSKI, H.; WIKTOR, T.J.; KAPLAN, M.M. Effective protection of monkeys against death from street virus by post-exposure administration of tissue-culture rabies vaccine. **Bulletin of World Health Organization**, v.45, p.1-11, 1971.

27. SMITH, R.E.; PIRIE, G.J.; ENGLAND, J.J. Rabies vaccination of captive white-handed gibbons potentially exposed to wild rabies virus. **Laboratory Animal Science.**, v. 37, n. 5, p. 668-669, 1987.

28. TAYLOR, J.; MEIGNIER, B.; TARTAGLIA, J.; LANGUET, B.; VANDERHOEVEN, J.; FRANCHINI, G.; TRIMARCHI, C.; PAOLETTI, E. Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non avian species. **Vaccine**, v. 13, n. 6, p. 539-549, 1995.

29. TOLLIS, M.; DIETZSCHOLD, B.; VOLIA, C.B.; KOPROWSKI, H. Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. **Vaccine**, v. 9, p. 134-136, 1991.

30. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Committee on Rabies**. 8th report. Geneva: WHO, 1992. (WHO-Technical Report Series, 824).

Recebido para publicação: 29/01/2002
Aprovado para publicação: 19/03/2002