

AVALIAÇÃO "IN VIVO" DA VACINA BIVALENTE CONTRA A GRIPE, PRODUZIDA NO INSTITUTO BUTANTAN.

Dalva A. Portari MANCINI *
Cirlene A. VILELA **
Mariangela M. MOREIRA **

RESUMO: Verificou-se o poder de proteção da vacina bivalente contra a gripe (IB) em camundongos previamente imunizados e posteriormente infectados com suspensão de vírus influenza adaptado em pulmão de camundongo. Foram usados dois grupos de camundongos, correspondentes às imunizações com vacina pura e diluída a 10^{-1} e infectados com duas cepas do vírus influenza A/SP/1/81 (H₁N₁) e A/SP/1/80 (H₃N₂). A imunidade foi considerada satisfatória, pois resultou sobrevivência além de 60% (Reed-Muench) para os dois grupos de animais.

PALAVRAS-CHAVE: Vacina contra a gripe, teste de proteção.

INTRODUÇÃO

O problema da gripe é de grande interesse mundial devido a alta infeciosidade da doença e sua incapacidade de produzir imunidade permanente. Pelo fato de que, de uma determinada epidemia de gripe, ou ainda por sua principal complicação, a pneumonia, decorram elevados coeficientes de morbidade e mortalidade, é que a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem desenvolvendo um programa de colaboração internacional para o controle da infecção. Assim, coleta informações epidemiológicas de toda a parte do mundo, para divulgá-las rapidamente; ainda promove e coordena pesquisas de laboratório, a fim de descobrir novas variantes de vírus potencialmente infectantes, fornecendo-as aos laboratórios produtores de vacinas.

A prevenção e o controle da gripe têm sido sustentados, principalmen-

* PqC III — Chefe da Seção de Riquetsias. Serviço de Virologia. Instituto Butantan.

** Estagiárias da Seção de Riquetsias.

te, por vacinas de diferentes tipos de preparo, com nível de proteção de até 80%, quando utilizadas em casos de epidemias⁹.

A verificação da potência da vacina contra a gripe, geralmente se faz através de testes "in vitro", porém é importante a avaliação "in vivo" da proteção e para este teste são utilizados camundongos, hamsters e furões^{4,11,12,13}. A padronização da vacina contra a gripe, através de testes comparativos "in vitro" e "in vivo", é referida nas investigações de Mc Laren e colaboradores⁵.

Estudos da adaptação do vírus influenza em pulmão ou cérebro de camundongos adultos ou recém-nascidos, tem colaborado não somente no controle de vacinas, como também para esclarecimentos da infecciosidade e da neurovirulência de algumas cepas variantes do vírus^{1,6,10}.

O presente trabalho procura avaliar "in vivo" o poder imunizante da vacina bivalente contra a gripe, composta das cepas A/SP/1/80 (H₃N₂) e A/SP/1/81 (H₁N₁) inativadas, produzida no Instituto Butantan e que normalmente tem sua potência avaliada pela prova de hemaglutinação.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus

Foram empregados na pesquisa, as cepas do vírus influenza, A/SP/1/80 (H₃N₂) e A/SP/1/81 (H₁N₁), que são mantidas rotineiramente em passagens sucessivas na cavidade alantóide de ovos embrionados de galinha, com dez dias de idade. Com o líquido alantóide colhido após 40 horas da inoculação, foi preparado o inóculo².

Vacina

A purificação e a concentração do vírus foi realizada em supercentrífuga Sharples, com 50.000 r.p.m., fluxo contínuo, à baixa temperatura (+ 2 a 5°C)⁸. O vírus purificado foi inativado pelo formol na proporção de 1:4000 e ressuspenso em solução tampão fosfato (PBS), de acordo com título hemaglutinante, de onde resultou a vacina.

Adaptação do vírus em pulmão de camundongo

Para adaptação do vírus foram utilizados dois grupos de 10 camundongos com peso de 17 a 20 g, para inoculação das cepas variantes A/SP/1/80 (H₃N₂) e A/SP/1/81 (H₁N₁) com título hemaglutinante de 128 unidades cada^{1,10}. Recebeu cada animal, 0,2ml de inóculo, por via nasal sob leve anestesia com éter. Após cinco dias os camundongos foram reinfectados obedecendo a mesma técnica utilizada anteriormente.

Decorrido o prazo de 10 dias, desde o início da primeira infecção, os pulmões dos animais inoculados foram retirados, triturados em gral e ressuspenso em solução tampão fosfato (PBS), usando-se 1ml para cada pulmão. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000 r.p.m. por 30 min. e o sobrenadante foi testado quanto à infecciosidade, em um total de 20 camundongos para cada cepa do vírus, nas diluições 10⁻¹ a 10⁻⁴, com determinação do título infeccioso (DL₅₀), calculado pelo método Reed-Muench⁶, no final do 10.º dia de inoculação. As cepas virais assim adaptadas foram utilizadas na prova de proteção da vacina.

Prova de Proteção "in vivo"

A prova de proteção da vacina, foi realizada em camundongos com peso de 17 a 20 gramas, inoculando-se por via intradérmica, 0,1ml da vacina bivalente contra a gripe, de título hemaglutinante de 400 unidades, composta das duas cepas virais em questão. Utilizou-se vinte camundongos para cada grupo, isto é, vacina pura e diluída 10^{-1} . Após sete dias, inoculou-se a segunda dose. Decorridos 15 dias após a primeira vacinação, os camundongos foram infectados com as cepas virais adaptadas, sendo que dez camundongos imunizados com a vacina pura foram infectados com 100 DL_{50} da cepa A/SP/1/80 (H_3N_2) e os outros dez, com 100 DL_{50} da cepa A/SP/1/81 (H_1N_1). Os animais imunizados com a vacina diluída a 10^{-1} , foram igualmente infectados e todos permaneceram em observação durante 25 dias. Um controle de 20 camundongos não-imunizados, porém infectados, foi incluído ^{5,13}.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão resumidos na tabela.

Verificou-se, através do método de Reed-Muench, a sobrevivência acima de 50% para os dois grupos de camundongos e que coincidentemente apresentaram os mesmos resultados, tanto para vacina pura, como diluída (10^{-1}). Sendo 75% de proteção conferida pela vacina pura, contra 100 DL_{50} da cepa A/SP/1/80 (H_3N_2) e a mesma porcentagem de proteção, contra 100 DL_{50} da cepa A/SP/1/81 (H_1N_1). A vacina diluída a 10^{-1} , conferiu proteção de 60%, contra as mesmas DL_{50} das referidas cepas do vírus. No grupo controle dos camundongos infectados, mas não imunizados, os níveis de letalidade foram de 75% para a cepa A/SP/1/81 (H_1N_1) e de 65% para a cepa A/SP/1/80 (H_3N_2), o que foi considerado alta infectividade dos vírus empregados na prova de proteção.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, parece-nos lícito concluir que a imunização dos camundongos, com vacina bivalente contra a gripe, foi satisfatória para o primeiro grupo de camundongos que recebeu vacina pura, contra 100 DL_{50} da cepa do vírus influenza A/SP/1/80 (H_3N_2) e 100 DL_{50} da cepa A/SP/1/81 (H_1N_1), pois apresentou sobrevivência acima de 50%. A imunização foi considerada satisfatória, quando este mesmo resultado foi obtido com o segundo grupo, imunizado com vacina diluída (10^{-1}) e contra as mesmas DL_{50} dos vírus influenza.

Podemos concluir ainda, que o teste de proteção "in vivo" é muito sensível, e importante no processo de avaliação da vacina contra a gripe, além dos testes "in vitro", tendo em vista que estes nem sempre estão associados ao poder imunizante, como observou Lacorte ².

TABELA

Teste de proteção "in vivo" da vacina bivalente contra gripe

após infecção com vírus influenza

camundongos	N.º	% de Sobrevivência	
		A (H ₁ N ₁)	A (H ₃ N ₂)
Vacinados	Vac. pura 20	75	75
	Vac. 10 ⁻¹ 20	60	60
Não Vacina- dos (controle)	20	% de Letalidade	
		A (H ₁ N ₁)	A (H ₃ N ₂)
		75	65

ABSTRACT: The protection of Influenza vaccine was verified in mice which had first been immunised and lateron infected with influenza virus adapted in mice's lungs. Two groups of mice were used corresponding immunizations with pure and diluted at 10⁻¹ vaccine and two strains of influenza virus A/SP/1/81 (H₁N₁) and A/SP/1/80 (H₃N₂). The immunization was considered satisfactory, because of a survival of above 60% (Reed Muench) for the two groups of animals.

KEYWORDS: Vaccine against influenza, protection test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COLLIE, M.H. et al. infection of neonatal and adult mice with non, passage influenza viruses (Brief report.) *Arch. Virol.*, 65: 77-81, 1980.
2. KNIGHT, C.A., et al. The effect of some chemicals on purified influenza virus. *J. exp. Med.*, 79: 291-300, 1944.
3. LACORTE, J.G. et al. Dissociação entre as propriedades imunizante e hemaglutinante do vírus da gripe. *Rev. bras. Med.*, 18(6): 377-84, 1961.
4. JENNINGS, R. et al. The hamster a model for the study of immunity to influenza virus infection. *Infect. Immun. (session III)*: 2072-73, 1977.
5. MC LAREN, C. et al. Comparative antigenicity and immunity of A/USSR/77 influenza vaccines in normal and primed mice. *Infect. Immun.*, 28(1): 171-77, 1980.
6. NAKAJIMA, A.S. et al. Neurovirulence of influenza virus in mice. II – Mechanisms of virulence as studied in a neuroblastoma cell line. *Virology*, 101: 450-57, 1980.
7. REED, J. et al. A simple method of stimating fifty percent end points. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-97, 1938.
8. STANLEY, W.M. An evaluation of methods for the concentration and purification of influenza virus. *J. exp. Med.*, 79: 255-66, 1944.
9. STUART, H.C. The epidemiology and prevention of Influenza. *Amer. Scient.*, 69: 166-72, 1981.
10. SULLIVAN, J. et al. Influenza virus infection in nude mice. *J. Infect. Dis.*, 133(1): 91-4, 1976.
11. SWEET, C. et al. Differential distribution of virus and histological damage in the lower respiratory tract of ferrets infected with influenza viruses of differing virulence. *J. gen. Virol.*, 54: 103-14, 1981.
12. TANNOCK, G.A. et al. A clearence test in mice using non adapted viruses to determine the immunogenicity of influenza strains. *Arch. Virol.*, 70: 91-101, 1981.
13. WELLS, M.A. et al. Cytotoxic T-cell and antibody responses to influenza infection of mice. *J. gen. Virol.*, 43: 685-90, 1979.

Recebido para publicação em 3/7/1986 e aceito em 8/12/1986.