



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

LILIAM DA SILVA RODRIGUES

**PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA CONTRA RAIVA EM POPULAÇÃO RURAL
EXPOSTA À EPIDEMIA EM 2005**

BELEM
2007

LILIAM DA SILVA RODRIGUES

**PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA CONTRA RAIVA EM POPULAÇÃO RURAL
EXPOSTA À EPIDEMIA EM 2005**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Clínica das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Clínica das Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa

Co-Orientadora: Dra. Luzia Maria Martorelli

BELÉM

2007

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Rodrigues, Liliam da Silva.

Proteção imunológica contra raiva em população rural exposta à epidemia em 2005 / Liliam da Silva Rodrigues; orientadora, Rita Catarina Medeiros Sousa; co-orientadora, Luzia Maria Martorelli. – 2007

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2007.

1. Virus da hidrofobia. 2. Anticorpos antivirais. 3. Vacinação. I. Sousa, Rita Catarina Medeiros, orient. II. Martorelli, Luzia Maria, co-orient. III. Título.

CDD: 22. ed. 614.563



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

LILIAM DA SILVA RODRIGUES

**PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA CONTRA RAIVA EM POPULAÇÃO RURAL
EXPOSTA À EPIDEMIA EM 2005**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovada em:

Conceito:

Banca examinadora:

Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa
Orientadora – NMT/UFPA

Dra. Luzia Fatima Alves Martorelli
Co-Orientadora – Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura Municipal da Cidade
de São Paulo

Prof^a Dr^a Marília Brasil Xavier
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr Juarez Antônio Simões Quaresma
Universidade Federal do Pará

Prof. Dra. Rosana Maria Feio Libonati
Universidade Federal do Pará

Ao meu Deus, à minha família,
aos meus amigos e ao meu
querido...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao meu anjo da guarda que sempre iluminam o meu caminho.

Aos meus pais Joaquim e Elizabete pelo exemplo de vida, pelo apoio e por saber que estiveram sempre torcendo por mim.

Aos meus filhos Gabriela e Felipe por me amarem.

Ao André, meu companheiro e grande amigo, que não me deixou desanimar diante dos desafios e que me deu carinho e conforto para continuar.

À Dra. Rita, minha orientadora e acima de tudo grande amiga, com quem pude contar em momentos muito difíceis de meu trabalho e de minha vida pessoal.

Ao grupo do morcego Reynaldo, Rhomero, Luzia, Rita, Elizabete e Júlio com o qual dividi aventuras, angústias e a felicidade do objetivo alcançado.

Aos agentes comunitários de saúde (ACS) e aos pacientes que nos receberam com tanto carinho aceitando participar do estudo.

Aos meus colegas de turma: Synthia, Rogério, Liliane, Clívia, Débora, Ernesto, Heliana e outros. Com eles compartilhei momentos memoráveis.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o planejamento, execução e conclusão dessa dissertação.

“Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E, por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.”

Dalai Lama

RESUMO

No mês de maio de 2005, no município de Augusto Correa, nordeste do Estado do Pará, foi diagnosticado um surto de raiva paralítica transmitida por morcegos hematófagos que resultou em 15 casos confirmados da doença. A população exposta recebeu vacinação anti-rábica em regime de pré e pós-exposição, sendo atendidas aproximadamente 3500 pessoas. O presente estudo verificou a persistência de anticorpos neutralizantes antivírus rábico, em amostra da população de Augusto Correa, vacinada com vacina de cultivo celular (Verorab®) por ocasião do surto. Foram coletadas e analisadas 505 amostras de moradores de quatro comunidades de Augusto Correa (Arai, Porto do Campo, Cachoeira e Nova Olinda) em junho de 2007. Os níveis de anticorpos neutralizantes foram dosados através da técnica de Favoretto e relacionados com dados demográficos, com história prévia de malária, novas agressões por animais e com o esquema vacinal recebido. Após dois anos da campanha vacinal, os resultados revelaram a persistência de anticorpos neutralizantes em níveis adequados em 90.5% da população vacinada, em esquemas de pré e pós-exposição, mesmo naqueles que receberam tratamento incompleto. Os níveis de anticorpos neutralizantes não foram reduzidos em função das variáveis analisadas.

Palavras-chave: Vacinação. Anticorpos neutralizantes. Raiva humana

ABSTRACT

On may of 2005, in the city of Augusto Correa, northeast of the State of Para, an outbreak of human rabies transmitted by vampire bats bites was diagnosed, resulting in 15 confirmed cases. Immediately a wide campaign of rabies vaccination of the population was initiated, pre and post treatment was given to about 3500 people. The objective of this work was to verify the persistence of neutralizing antibodies in samples of the population of Augusto Correa that was vaccinated with vaccine of cellular culture (Verorab) during this rabies outbreak. In the month of June of 2007, were collected 505 samples of inhabitants of four communities of Augusto Correa (Araí, Porto do Campo, Cachoeira e Nova Olinda). The levels of neutralizing antibodies were dosed through the Favoretto's technique and compared with demographic data, previous history of malaria, new animals aggressions and the treatment received. After two years of the vaccine campaign, the results disclosed the persistence of neutralizing antibodies in adjusted levels on 90.5% of the vaccinated population, that received pre or post-exposure vaccination, even on that who had received incomplete treatment. The levels of neutralizing antibodies had not been reduced in function of variables analyzed.

Key Words: Vaccination. Neutralizing antibodies. Human Rabies

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius
ADH: Hormônio antidiurético
ALT: Alanina Aminotransferase
AST: Aspartato Aminotransferase
CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CMV: Citomegalovírus
EBLV: Lissavirus do morcego europeu (European Bat Lyssavirus)
EUA: Estados Unidos das Américas
GGT: Gama glutamil transferase
HUJBB: Hospital Universitário João de Barros Barreto
IFD: Imunofluorescência direta
IFI: Imunofluorescência indireta
LCR: Líquido cefalorraquidiano
MA: Maranhão
MMII: Membros inferiores
MS: Ministério da Saúde
nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina
NUEPI: Núcleo de epidemiologia
OMS: Organização Mundial de Saúde
RNA: Ácido Ribonucléico
SESPA: Secretaria de Saúde do estado do Pará
SGB: Síndrome de Guillain Barre
SNC: Sistema nervoso Central
SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde
RABV: vírus rábico
LBV:
MOKV: vírus Mokola
DUVV: vírus Duven
ABLV: Lissavirus do Morcego Australiano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 JUSTIFICATIVA	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 HISTÓRICO	14
3.2 ETIOPATOGENIA	14
3.3 ECOEPIDEMIOLOGIA	16
3.4 QUADRO CLÍNICO	19
3.5 DIAGNÓSTICO	21
a) Diagnóstico Clínico	21
b) Diagnóstico Laboratorial	21
c) Diagnóstico Intravital	21
d) Diagnóstico Postmortem	22
e) Diagnóstico Radiológico	23
f) Diagnóstico Diferencial	23
3.6 TRATAMENTO	24
4 OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GERAL	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 TIPO DE ESTUDO	31
5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA	31
5.3 PROCESSO DE RECRUTAMENTO DA POPULAÇÃO	32
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	33
5.5 PROCEDIMENTOS	33
5.6 COLHEITA DOS ESPÉCIMENS CLÍNICOS E TESTES LABORATORIAIS	34
5.6.1 Coleta E Processamento Do Sangue	34
5.6.2 Técnica De Microteste De Inibição De Fluorescência Simplificado	34
5.7 MÉTODOS ESTATÍSTICOS	35
5.8 ASPECTOS ÉTICOS	35

6 RESULTADOS.....	37
7 DISCUSSÃO	43
8 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICES.....	53
ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose caracterizada como uma encefalite viral aguda, progressiva e potencialmente fatal, que se propaga pelo sistema nervoso central e passa para as glândulas salivares, onde também se replica, sendo eliminada para outros animais. Mata cerca de 55000 de pessoas anualmente e está presente não somente em animais domésticos e rurais, mas também em animais silvestres, os quais representam o reservatório do vírus. Mamíferos, e especialmente carnívoros, são os mais suscetíveis (WARRELL, M.; WARRELL, D., 2004).

A raiva canina, ou “raiva de rua”, permanece um sério problema de saúde pública na Ásia e África, tendo sido consideravelmente reduzida na América Latina nos últimos anos. A raiva silvestre, no entanto, está presente em todo o continente Americano, parte do continente europeu, Ásia e no resto do mundo, exceto na Antártida. A raiva que acomete morcegos parece estar presente em todos os continentes, inclusive em áreas onde a raiva canina e de outros animais silvestres já foi erradicada, como a Inglaterra e Austrália (BAER, 1991; KNOBEL et al., 2005; WHO, 2005).

Os morcegos insetívoros constituem o principal reservatório do *Vírus da Raiva* em todo o mundo. Morcegos frutívoros também são reservatórios importantes, porém só estão presentes em áreas tropicais. Os morcegos hematófagos só são encontrados na América Latina, do norte do México ao sul do Chile e do Uruguai (BAER, 1991).

Os morcegos hematófagos pertencem a Ordem Chiroptera, subordem Microchiroptera. Somente três espécies de morcegos são hematófagas (foto 1). Elas pertencem à família *Phyllostomidae*, subfamília *Desmodinae*, a qual é dividida em três gêneros (*Desmodus*, *Diphylla* e *Diaemus*), com apenas uma espécie cada. *Desmodus rotundus*, com as subespécies *Desmodus rotundus murinus* e *Desmodus rotundus rotundus* são as únicas que agridem mamíferos, incluindo o homem (ibid.).

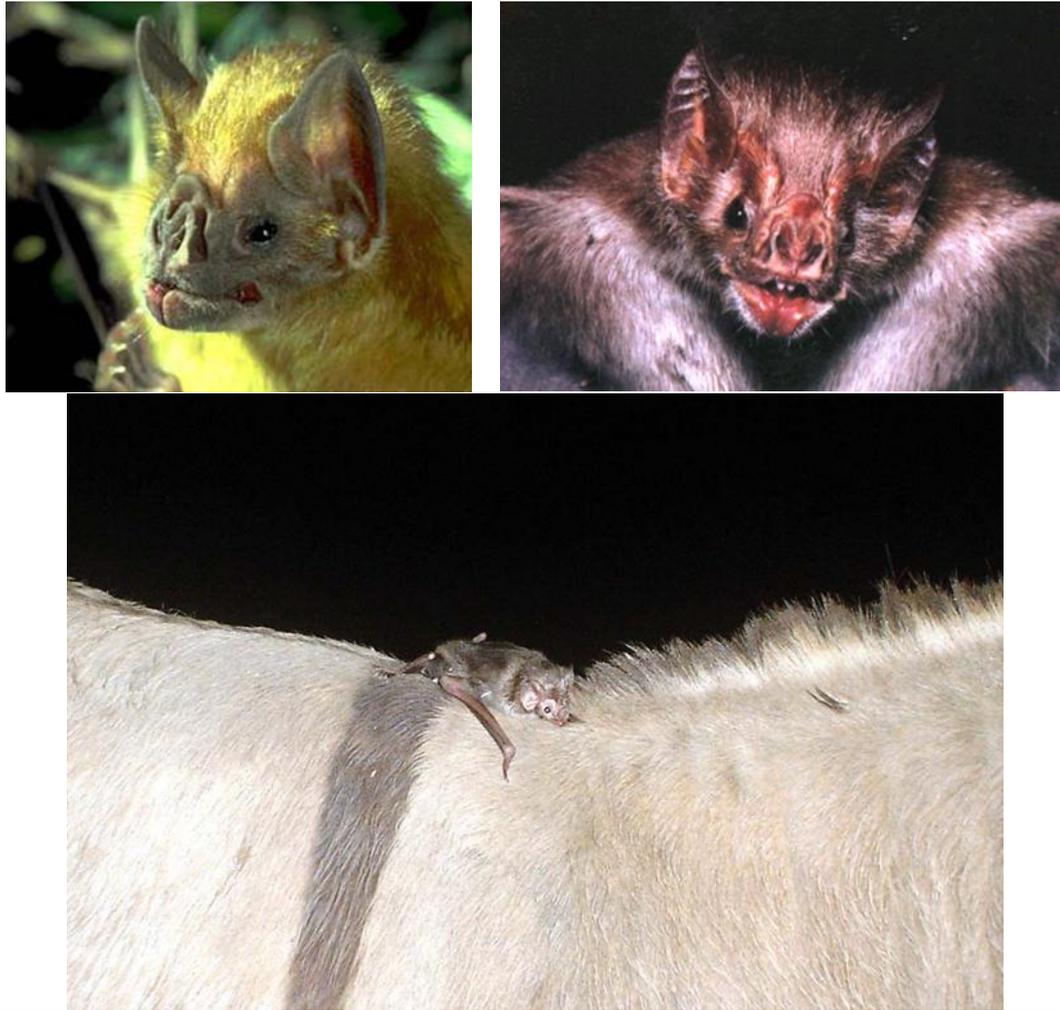


Foto 1 – Morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus*
Fonte: Imagens cedidas por W. Uieda.

Embora muitas agressões por morcego tenham sido relatadas no norte do Brasil, poucos estudos epidemiológicos têm sido realizados. Em 2004, dois surtos de raiva transmitida por morcegos foram notificados no Brasil. Um total de 21 pessoas morreram em duas cidades no nordeste do Pará (15 casos em Portel e 06 em Viseu). Em maio de 2005, 15 novos casos de raiva foram registrados no município de Augusto Corrêa, próximo a Viseu no estado do Pará, e outros 24, nos municípios de Turiaçu, Godofredo Viana, Carutapera e Cândido Mendes, no Estado do Maranhão, próximos aos municípios do nordeste paraense citados anteriormente (figura 1). A ocorrência de tantos casos de raiva humana transmitidos por morcegos em populações rurais representa um sério problema de saúde pública atualmente no Brasil (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005a).

2 JUSTIFICATIVA

Os surtos de raiva humana em 2004 e 2005 no Pará e Maranhão alertaram para o sério problema de saúde pública da doença na região. Ressalta-se que a população dessa região é vulnerável a reexposição e, como a vacinação não é duradoura, a necessidade de revacinação é evidente. Isso não somente onera o estado, como também, a população vacinada poderia ter a falsa idéia de proteção, não tendo consciência da necessidade de revacinação em caso de reexposição.

O resultado obtido a partir deste estudo revelou o grau de proteção imunológica da população de Augusto Corrêa, vacinada em situação de pré e pós-exposição, subsidiando políticas públicas para o manejo, vigilância e controle da doença em nossa região.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HISTÓRICO

A raiva é uma das mais antigas doenças infecciosas descritas. Sugestões de que a doença estava relacionada à mordedura de cães doentes foram encontradas em escrituras da Mesopotâmia e Egito há milhares de anos. Textos da medicina chinesa e indiana descrevem o que parece ser hidrofobia. Durante os séculos XV e XVI, os europeus através das grandes descobertas marítimas, importaram para terras distantes animais em período de incubação (RUPPRECHT et al., 2002).

Colonizadores das Américas relataram casos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos, assim como agressões destes, a homens e outros animais no século XVI, na Península de Yucatán, México. No Brasil, a primeira notificação da doença em animais ocorreu em 1906, em Santa Catarina quando acreditava tratar se de uma nova doença, ainda não descrita. Apenas em 1911, Carini demonstrou que a epizootia era causada pelo vírus da raiva (MARCOVISTZ et al., 2005; SCHNEIDER et al., 1995).

No século XIX, uma série de eventos culminou com a produção da vacina anti-rábica. Em, 1804, Zinke comprovou a transmissão da raiva entre animais, e em 1879, Galtier utilizava coelhos em laboratório para estudo da raiva. Louis Pasteur modificou a patogenicidade do vírus (1881 e 1882), através de passagens em animais de laboratório, resultando em redução da virulência, produção da vacina anti-rábica utilizada com sucesso em cães e, posteriormente, em humanos (MARCOVISTZ et al., 2005).

3.2 ETIOPATOGENIA

O vírus da raiva pertence a ordem Mononegavirales, onde estão localizados os vírus de fita simples de RNA não segmentado e de polaridade negativa. Atualmente esta ordem é constituída de 4 famílias *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bornaviridae* e *Rhabdoviridae*. Esta última é constituída por alguns vírus não

classificados (isolados de plantas, invertebrados e vertebrados) e outros classificados em quatro gêneros *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, e *Lyssavirus*. O gênero *Lyssavirus* engloba os vírus com genoma negativa que codifica 5 proteínas virais: nucleoproteína N, fosfoproteína P, proteína da matrix M, glicoproteína G e polimerase L. A partícula viral possui formato de bala de revólver, com 100 a 300 nm de comprimento e 75 nm de diâmetro e adaptados a replicação no sistema nervoso central de mamíferos (HEMACHUDHA et al., 2002).

O gênero *Lyssavirus* foi inicialmente dividido em 4 sorotipos, devido reações cruzadas com o soro e anticorpos monoclonais os quais correspondiam aos sorotipos 1, vírus da raiva (RABV); 2, vírus de morcego de Lagos (LBV); 3, vírus Mokola (MOKV); e 4, vírus Duvenhage (DUVV). Isolados posteriores de lissavírus de morcegos na Austrália e Europa, assim como avanços na caracterização de diversos genes, permitiram a classificação em sete genótipos: 1, RABV; 2, LBV; 3, MOKV; 4, DUVV; 5, Lissavírus do Morcego Europeu (EBLV-1); 6, lissavirus do Morcego Europeu (EBLV- 2) e 7, lissavírus do Morcego Australiano (ABLV). Os lissavírus podem ainda ser classificados através da análise filogenética em: filogrupo I (genótipos 1,4 5,6 e 7) e filogrupo II (genótipos 2 e 3). Quatro recentes lissavírus isolados de morcegos na Ásia Central, leste da Sibéria e região Caucasiana (Vírus Aravan, vírus Khujand e vírus Irkut) precisam ser caracterizados como novos genótipos (WHO, 2005).

A penetração do vírus da raiva resulta de ferimentos ou contato direto com superfície mucosa e a eficácia da transmissão depende da carga viral na saliva do animal e da profundidade da lesão capaz de atingir áreas de tecido muscular com alta densidade de receptores nicotínicos da acetilcolina, onde se liga a glicoproteína do vírus da raiva canino (RUPPRECHT et al., 2002; WHO, 2005). Entretanto a severidade da lesão pode não ser tão importante na raiva transmitida por morcego e na raiva criptogênica, pois o vírus provavelmente se liga a receptores na derme ou epiderme (FOOKS et al., 2003; RUPPRECHT et al., 2002). A transmissão do vírus da raiva através de transplantes e aerossóis também já foi descrita (SRINIVASANI et al., 2005).

O vírus então se replica em tecidos não nervosos ou penetra em nervos periféricos e migra em fluxo axoplásmico retrógrado com velocidade migratória de 15 a 100 mm por dia e o tempo até o sistema nervoso central depende da distância do

local de inoculação (RUPPRECHT et al., 2002; WHO, 2005). O vírus então replica e infecta o gânglio da raiz dorsal e as células do corno anterior. No gânglio da raiz dorsal, a replicação viral pode ser reconhecida e atacada pelos efetores imunológicos resultando em ganglioneurite, tendo como manifestação clínica dor no local da mordedura. Uma vez na célula neuronal o vírus replica rapidamente e dissemina via brotamento da membrana plasmática e transmissão direta de célula para célula ou por propagação trans sináptica (RUPPRECHT et al., 2002).

Subsequente transporte viral para tecidos periféricos ocorre de forma centrífuga através dos axônios de fibras nervosas periféricas, por um mecanismo de fluxo axoplásmico anterógrado que utiliza nervos do sistema simpático ou parassimpático, sensitivos ou motores, mielinizados ou desmielinizados, e de vários calibres (TORDO et al., 1998).

3.3 ECOEPIDEMIOLOGIA

A raiva é encontrada em todos os continentes, exceto na Antártica (HEMACHUDHA et al., 2002). A mortalidade humana na África e na Ásia por raiva canina endêmica foi estimada em 55.000 mortes por ano (56% na Ásia e 44% na África), a maioria em áreas rurais e em crianças (WHO, 2005). Em 1995, na Tailândia foram registrados 74 óbitos por raiva humana, com aproximadamente 50% dos casos em crianças e 22% na faixa etária de 5 a 9 anos (SABCHAREON et al., 1999).

Na natureza o vírus da raiva é lábil e inativado pela luz do sol, calor dessecação e outros fatores ambientais, não sendo viável fora do hospedeiro. Todos os mamíferos são susceptíveis e podem transmitir o vírus da raiva, mas os reservatórios verdadeiros, que são responsáveis pela manutenção da doença a longo prazo, são da ordem Carnívora e Chiroptera (RUPPRECHT et al., 2002; 2004).

Na cadeia epidemiológica de transmissão do vírus da raiva se verifica um ciclo silvestre que eventualmente extrapola para o ambiente doméstico, geralmente rural e um ciclo urbano. Estes ciclos podem se entrelaçar afetando as várias espécies de mamíferos (MARCOVISTZ et al., 2005).

O cão é o principal reservatório e vetor da raiva urbana para o homem nos países em desenvolvimento, em continentes como a Ásia e a África, sendo responsáveis pela maior parte dos óbitos no mundo. Os gatos são vetores eficazes, mas não servem como reservatórios (RUPPRECHT et al., 2002). Para estes animais, imunização e programas de controle populacional podem ser efetivos no controle da raiva, tendo sido considerável a redução do número de casos na América Latina nos últimos anos (HEMACHUDHA et al., 2002).

A raiva silvestre, no entanto está presente em todo o continente Americano, parte do continente europeu, Ásia e no resto do mundo, exceto em poucas ilhas. Canídeos silvestres são importantes reservatórios em diversas regiões do mundo. A raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) é o principal hospedeiro na região subártica e nordeste da América do Norte, em todo leste e centro europeu e na região subártica e zona temperada da Ásia. Em regiões árticas da América do Norte e Ásia, a raposa ártica (*Alopex lagopus*) é o principal hospedeiro. Da mesma forma o chacal (*Canis sp*), no sudeste da África, e provavelmente, áreas mais amplas da Ásia e África. No Canadá e nos EUA, o gambá (*Mephitis mephitis*) é a espécie mais frequentemente diagnosticada com raiva. Outras espécies como *Procyon lotor*, *Herpestes auropunctatus*, *Urocyon cinereoargenteus* mantém o ciclo silvestre principalmente na América do Norte e Ilhas do Caribe (TORDO et al., 1998). Roedores e lagomorfos não são importantes na epidemiologia da doença. A raiva que acomete morcegos parece estar presente em todos os continentes, inclusive em áreas onde a raiva canina e de outros animais silvestres já foi erradicada, como a Inglaterra e Austrália (RUPPRECHT et al., 2002).

Com o controle da raiva canina em diversos países latino-americanos, o número de casos de raiva transmitida por morcegos hematófagos tem aumentado, sendo registrados 177 casos, nas décadas de 80 e 90, principalmente no Peru (78 casos) e no Brasil (43 casos) (SCHNEIDER et al., 2001).

Os morcegos hematófagos pertencem a Ordem Chiropterae, subordem Microchiropterae, família Phyllostomidae, subfamília Desmodinae, a qual é dividida em três gêneros (Desmodus, Diphylla e Diaemus). São apenas três as espécies de morcegos hematófagos (*Diphylla ecaudata*, *Diaemus youngi* e *Desmodus rotundus*) e habitam exclusivamente a região da América Latina, desde o norte do México até o norte da Argentina (SCHNEIDER et al., 1995). A espécie *Desmodus rotundus*, com

as subespécies *Desmodus rotundus murinus* e *Desmodus rotundus rotundus* são as únicas que agridem humanos. A família dos morcegos é a segunda maior família de mamíferos do mundo, com um total de 950 espécies e a primeira quanto à amplitude de distribuição. A ordem Chiroptera hospeda seis dos sete genótipos dos lissavírus descritos atualmente (BAER, 1991).

Morcegos hematófagos se alimentam de sangue de vertebrados, principalmente herbívoros, sendo os bovinos a principal fonte de alimento para esses animais. Quando bovinos não são abundantes em determinada área, os morcegos se alimentam de sangue de outros animais como eqüinos, caprinos, suínos, cães, e humanos. Somente vírus da raiva do genótipo 1 é transmitido pelos morcegos hematófagos. Raiva paralítica bovina é freqüentemente descrita em toda América Latina. Sabe-se que os morcegos não hematófagos também podem ser portadores e transmitir raiva ao homem, porém de forma acidental e em menor proporção. Os morcegos insetívoros constituem o principal reservatório do vírus da raiva em todo o mundo, em quanto que os frutívoros também são reservatórios importantes, porém só estão presentes em áreas tropicais (BAER, 1991).

Embora a raiva relacionada à mordedura de morcegos hematófagos já tenha sido descrita desde o século XVII, o primeiro surto de raiva transmitida por morcegos hematófagos ocorreu em Trinidad na década de 30 com 55 óbitos. Desde então foram registrados surtos no México em 1951 (5 óbitos), na Guiana Francesa em 1959 (9 óbitos), no Brasil, estado do Pará em 1975 (6 óbitos), na Venezuela tribo Yanomami em 1979, no Brasil, tribo Caiapó em 1991, entre outros (SCHNEIDER, 1995 ; 2001). Analisando oito surtos ocorridos no Brasil e Peru, Scheneider et al (1995) observaram que a maioria deles ocorreu em pequenas localidades da zona rural amazônica, com difícil acesso ao serviço de saúde, moradias vulneráveis, com pouco ou nenhum gado presente e com mudança do processo de produção local. No Brasil o morcego é o principal responsável pela manutenção da cadeia silvestre da raiva e agressões são comuns no norte do Brasil, porém poucos estudos epidemiológicos têm sido realizados (MARCOVISTZ et al., 2005; SCHNEIDER et al., 1996).

Em março e abril de 2004, um surto de raiva transmitida por morcegos foi notificado no Pará, município de Portel. Poucos meses depois, em maio deste mesmo ano, outro surto foi notificado em Viseu, município do nordeste do estado.

Um total de 21 pessoas morreu nestas duas cidades (15 casos em Portel e 06 em Viseu). É importante salientar que a taxa de agressão por morcego na região é alta e que 100% dos casos, ao serem agredidos, não tinham conhecimento da necessidade de tratamento profilático anti-rábico (BRASIL, 2004).

Em maio de 2005, 15 novos casos de raiva foram registrados no município de Augusto Correa, próximo a Viseu no estado do Pará, e outros 24 casos, nos municípios de Turiaçu, Godofredo Viana, Carutapera e Cândido Mendes, no Estado do Maranhão, próximos aos municípios do nordeste paraense citados anteriormente. A ocorrência de tantos casos de raiva humana transmitidos por morcegos em populações rurais representa um sério problema de saúde pública atualmente no Brasil (BRASIL, 2004; 2005).

Estes episódios mobilizaram as autoridades de saúde com adoção de diversas medidas para controlar o surto na região, incluindo ampla vacinação em regime de pré e pós-exposição. Em em Augusto Correa, mais de 3.500 habitantes do município receberam vacinação anti-rábica (Verorab®), tanto em esquema de pós como em pré-exposição (SESPA). Alguns receberam doses de reforço, devido possível re-exposição ao vírus da raiva, após nova agressão por morcegos hematófagos (BRASIL, 2004; 2005).

3.4 QUADRO CLÍNICO

O vírus da raiva é neurotrópico e provoca uma encefalite aguda, com sintomas compatíveis com a forma encefálica (raiva furiosa, 70% dos casos), ou a forma paralítica (raiva paralítica, 30% dos casos notificados). Sem tratamento profilático específico, a mortalidade da raiva após mordedura por cão raivoso varia de 38% a 57%, dependendo da severidade e localização do ferimento e da concentração viral na saliva do animal agressor. Após instalada, a raiva é uma doença fatal levando a óbito em 7 dias (média de 5 dias) após início dos sintomas na forma encefálica e, em 2 semanas nas formas paralíticas (HEMACHUDHA et al., 2002; JACKSON e WUNNER, 2002).

A evolução clínica da raiva pode ser dividida em cinco estágios: período de incubação, período prodrômico, fase neurológica aguda, coma e morte. O período de incubação mais comum é de 1 a 2 meses, mas pode variar de 7 dias a 6 anos. Períodos muito curtos foram registrados após inoculação direta do vírus no sistema nervoso. Longos períodos foram associados à infecção por lissavírus de morcego australiano e, a imigrantes do sudeste da Ásia (HEMACHUDHA et al., 2002). O período prodrômico está relacionado a alterações disestésicas no local da lesão como dor, formigamento e prurido, acompanhados de insônia e seguida de febre, anorexia, cefaléia, agitação que se instalam em 2 a 5 dias (HEMACHUDHA et al., 2002; MARCOVISTZ et al., 2005).

A fase neurológica aguda da raiva clássica é caracterizada por disfunção mental. Em sua forma furiosa, a hiper excitabilidade é agravada pela sede, medo, luz, barulho e outros estímulos. A febre se mantém e em 24 horas flutua no nível de consciência, espasmos inspiratórios ou fóbicos, e sinais de estimulação autonômica se instalam. O estado mental alterna entre períodos de normalidade, agitação severa e depressão. Aerofobia e hidrofobia podem aparecer isoladamente. Durante os espasmos induzidos o paciente apresenta fácies de medo e salivação intensa. Miose ou midríase, pilo ereção localizada ou generalizada, edema pulmonar neurogênico, sudorese profusa, priapismo e ejaculações espontâneas podem estar presente. Na forma paralítica o diagnóstico de raiva é extremamente difícil. Os sinais cardinais aparecem tardiamente e não são proeminentes, espasmos ocorrem em cerca de 50% dos pacientes. Espasmos geralmente iniciam no membro agredido e progride para os outros membros e músculos respiratórios. Outros achados são diparesia facial, febre persistente, disfunção vesical e presença de edema à percussão de certos grupos musculares (HEMACHUDHA et al., 2002).

Após instalado o coma, o paciente apresenta espasmos inspiratórios, difíceis de detectar na raiva paralítica, taquicardia sinusal desproporcional a febre, arritmia ventricular ou supraventricular por provável mecanismo de lesão viral do sinus ou nó atrioventricular e miocardite. O coma precede a hematêmese, registrada em 30 a 60% dos casos, e a insuficiência circulatória que precede o óbito na maioria dos casos (HEMACHUDHA et al., 2002).

3.5 DIAGNÓSTICO

a) Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da raiva humana é difícil, exceto quando sinais de hidrofobia ou aerofobia estão presentes. Todavia, alguns pacientes apresentam sintomas atípicos ou formas paralíticas semelhantes à Síndrome de Guillain-Barre (WHO, 2005).

b) Diagnóstico Laboratorial

O laboratório de rotina não é diagnóstico. Hiponatremia é encontrada na maioria dos casos devido ingestão inapropriada, ou síndrome da secreção inapropriada de hormônio anti-diurético. Porém a hipernatremia também pode estar presente. O Líquido cefalorraquidiano pode estar normal ou apresentar pleiocitose (HEMACHUDHA et al., 2002).

O diagnóstico definitivo da raiva só pode ser obtido pela investigação laboratorial (WHO, 2005).

b.1) Diagnóstico *intravitam*

Secreções e fluidos biológicos (saliva, lágrima e LCR, etc.) e tecidos podem ser utilizados para diagnóstico da raiva durante a vida. A sensibilidade das técnicas diagnósticas varia de acordo com o estágio da doença, níveis de anticorpos, eliminação viral intermitente e treinamento técnico do examinador. Um resultado positivo confirma o diagnóstico de raiva, porém um negativo não o exclui (WHO, 2005).

A técnica Imunofluorescência direta (IFD), considerada método diagnóstico de escolha desde a década de 60, é atualmente padrão ouro no diagnóstico da raiva, por sua simplicidade, rapidez e taxa de falso negativos de 0.1%. A IFD pode ser realizada em biópsia de pele da região da nuca com folículos capilares contendo nervos periféricos para pesquisa de antígeno viral. Recomenda-se o exame de pelo

menos 20 cortes para detecção de inclusões de nucleocapsídeo viral ao redor da base dos folículos capilares. Atualmente, IFD em impressões de córnea não são mais recomendadas (MARCOVISTZ et al., 2005; TORDO et al., 2004; WHO, 2005).

O isolamento viral pode ser realizado em cultura celular utilizando células de neuroblastoma ou inoculação intracraniana em camundongos. Utilizam-se preferencialmente amostras de saliva, lágrimas ou LCR (WHO, 2005).

Em pacientes não vacinados, anticorpos neutralizantes aparecem após o oitavo dia do início dos sintomas. A dosagem destes anticorpos no soro ou no LCR pode ser realizada através das técnicas de RFFIT (*Rapid Fluorescent Inhibition Test*) ou FANV (*Fluorescent Antibody Virus Neutralization*). A técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando proteína rábica purificada, é realizada quando o RFFIT não está disponível, e determina os níveis de anticorpos anti-glicoproteína (WHO, 2005).

O RNA do vírus da raiva pode ser detectado através das técnicas de PCR em diversos fluidos e amostras biológicas. Devem ser realizadas em combinação com técnicas convencionais, pois podem produzir resultados falso positivos ou falso negativos (WHO, 2005).

b.2) Diagnóstico *postmortem*

O tecido cerebral é o *specimen* preferido para diagnóstico *postmortem* em humanos e animais. Em estudos de campo, quando a necrópsia não é realizada, coleta de amostra de tecido cerebral via trans-orbital ou trans-*foramen magnum* pode ser utilizada. No século passado, até a década de 50, análise histopatológica do cérebro para pesquisa de Corpúsculos de Negri era o principal teste laboratorial para diagnóstico da raiva. Apesar de rápido, o teste apresenta baixa sensibilidade, necessita de técnicos muito bem treinados, sendo substituído pela IFD (MARCOVISTZ et al., 2005; TORDO et al., 1998).

Da mesma forma que *intravital*, o diagnóstico *postmortem* pode ser realizado através da técnica de IFD. Neste caso utiliza-se impressões ou esfregaços de tecido cerebral, preferencialmente do tronco cerebral, tálamo, cerebelo ou Corno de

Ammon no hipocampo (MARCOVISTZ et al. , 2005; TORDO et al., 1998; WHO, 2005).

O isolamento viral é realizado utilizando cultura em células de neuroblastoma murino (NA Cl300) e inoculação intracraniana em camundongos (MARCOVISTZ et al., 2005; TORDO et al., 1998; WHO, 2005).

As técnicas de biologia molecular não são recomendadas para o diagnóstico de rotina postmortem (WHO, 2005).

c) Diagnóstico Radiológico

A Ressonância Nuclear Magnética de Crânio pode ser útil no diagnóstico nas formas encefálicas e paralíticas. Distribuição similar das imagens de discreto hipersinal T2 anormal definidora de doença envolvendo o tronco cerebral, hipocampo, hipotálamo, substância branca profunda e subcortical, substância cinzenta profunda e cortical com vários graus de severidade dependendo do estágio da doença. Realce de contraste aparece claramente apenas nos estágios terminais da doença (HEMACHUDHA et al., 2002; WHO, 2005).

d) Diagnóstico Diferencial

A OMS recomenda investigação diagnóstica da raiva em todos os casos de encefalite (WHO, 2005). Encefalite pelo vírus do Oeste do Nilo pode apresentar paralisia flácida difusa em 10% dos casos, porém sem padrão de progressão ascendente. O quadro clínico da encefalite Japonesa inclui fraqueza muscular puramente motora e, assimétrica, semelhante à poliomielite. Sinais de comprometimento do tronco cerebral foram descritos em encefalites pelo enterovírus-71 e vírus Nipah. Doenças como porfiria hepática aguda (distúrbios neuropsiquiátricos), tétano (espasmos musculares) e situações como uso de drogas de abuso, ingestão alcoólica e *delirium tremens*, também fazem parte do diagnóstico diferencial da raiva (HEMACHUDHA et al., 2002).

O principal diagnóstico diferencial da raiva parálitica é com a forma axonal da Síndrome de Guillain Barre (GBS). A GBS apresenta como sintoma principal paralisia ascendente evoluindo com acometimento da musculatura respiratória. Distúrbios metabólicos podem estar presentes em ambos diagnósticos (HEMACHUDHA et al., 2002).

3.6 TRATAMENTO

a) Tratamento Clínico

Por ser uma doença frequentemente fatal, o tratamento clínico da doença instalada é puramente sintomático com intuito de reduzir o grau de agitação e dar conforto ao paciente e aos seus familiares. Existem seis casos bem documentados de sobreviventes de raiva. Cinco haviam recebido vacinação pré-exposição e apenas um sobreviveu sem tratamento profilático. Todos apresentaram seqüelas neurológicas importantes (WARRELL e WARRELL, 2004; WILLOUGHBY et al., 2005). Tratamentos utilizando drogas antivirais como ribavirina, vidarabina, aciclovir, altas doses de imunoglobulina, corticóides foram testados, porém não obtiveram sucesso (HEMACHUDHA et al., 2002; JACKSON et al., 2003).

Em dezembro de 2004, na cidade de Milwaukee, uma paciente sobreviveu após ter sido infectada pelo *Vírus da Raiva* transmitida por morcego. O tratamento instituído baseou-se essencialmente no controle da disautonomia e do edema cerebral apresentados durante a fase final da doença; o sistema imunológico encarregaria-se do *clearance* viral (WILLOUGHBY et al., 2005). Este acontecimento e o protocolo criado (Protocolo de Milwaukee) abre uma nova perspectiva para o futuro do tratamento da raiva humana.

b) Tratamento Profilático (ANEXO A)

A forma de tratamento mais bem sucedido após possível exposição ao vírus da raiva é a imunoprofilaxia. O custo mundial do tratamento preventivo é estimado em U\$ 1 bilhão anualmente. Continentes como a Ásia e a África gastam U\$ 583,50 milhões por ano, enquanto que os EUA e a Europa U\$ 300 milhões. Na América Latina, os programas nacionais para o controle da raiva utilizaram U\$ 10.980.892 no ano 2000 e U\$ 22.215.289 em 2001. Em 2004, o Brasil investiu U\$ 24 milhões em prevenção da raiva, incluindo custos em vacinas animais e humanas, imunoglobulinas, diagnóstico laboratorial, pessoal médico e veterinário, e treinamento para as campanhas vacinais em animais. O tipo de vacina, o número de doses, via de administração e o tipo de imunoglobulina utilizada, influenciam no custo do tratamento (WHO, 2005).

Nas duas últimas décadas houve um considerável progresso na produção de vacina antirábica. Atualmente somente vacinas produzidas em culturas de células ou em ovos embrionados purificados são recomendadas pela OMS. Estas têm sido amplamente estudadas nos últimos anos e apresentam comprovada eficácia, imunogenicidade e segurança, podendo ser administradas em regime de pré ou pós-exposição, em imunodeprimidos e em grávidas (BRIGGS et al., 2001; KULKARNI et al., 2007; SABCHAREON et al., 1999; SUDARSHAN et al., 2007; WHO, 2005). Entretanto, pelo baixo custo, vacinas de tecido cerebral ainda são amplamente utilizadas em alguns países em desenvolvimento, porém com menor eficácia e responsáveis por efeitos colaterais severos e prolongados estimados em 0.3 a 0.8 por mil vacinados (WHO, 2005). Vacinas antirábicas induzem uma resposta imune ativa que inclui a produção de anticorpos neutralizantes que se desenvolvem em 7 a 10 dias e persiste por 2 anos ou mais (MMWR, 1999).

As vacinas mais recentes são produzidas em cultura de células (diplóides humanas, células Vero, células de embrião de galinha etc.) com amostras de vírus P.V. ou PITTMAN - MOORE (P.M.) inativados pela betapropiolactona. São apresentadas sob a forma liofilizada, acompanhadas de diluente; devem ser conservadas em geladeira, fora do congelador, na temperatura entre + 2°C a + 8°C, até o momento de sua aplicação, observando o prazo de validade do fabricante. A potência mínima destas vacinas é 2,5 UI/dose. No Brasil, são utilizadas há

aproximadamente cinco anos. A *Purified vero cell rabies vaccine*, Verorab®, Sanofi Pasteur (PVRV), é uma das vacinas mais potentes e seguras que a Fuenzalida & Palácios modificada, além de ser isenta de risco. (BRASIL, 2002; BRASIL, 2005b; TOOVEY, 2007).

A PVRV (Purified vero cell rabies vaccine, Verorab®, Sanofi Pasteur), vacina liofilizada e inativada produzida com a cepa Flury LEP, é utilizada no Brasil há aproximadamente 5 anos (BRASIL, 2002; TOOVEY, 2007).

As imunoglobulinas anti-rábicas promovem uma imunidade rápida e passiva que persiste por apenas um curto período de tempo (meia vida de aproximadamente 21 dias). Existem 3 tipos de imunoglobulinas atualmente disponíveis: Imunoglobulina humana hiperimune anti-rábica (soro homólogo), imunoglobulina anti-rábica eqüina (soro heterólogo), e produtos F(ab')₂ altamente purificados produzidos a partir do soro heterólogo (BRASIL, 2002; WHO, 2005).

b.1) Tratamento Pré-Exposição

A profilaxia pré-exposição não tem o intuito de prover imunidade a longo prazo, mas sim induzir memória imunológica que possa ser reforçada após exposição a um animal potencialmente rábico (RANNEY et al., 2006). É recomendada em situações de alto risco de exposição ao vírus, como em profissionais que trabalham com diagnóstico da raiva, pesquisadores em laboratórios, veterinários, manipuladores de animais, reabilitadores de animais, oficiais que trabalham com vida selvagem (MMWR, 1999; TORDO et al., 2004; WHO, 2005). Viajantes internacionais podem ser candidatos ao esquema pré-exposição se permanecerão por certo período em contato com animais em área onde a raiva canina é enzoótica e o acesso imediato ao tratamento profilático é limitado (MMWR, 1999).

No Brasil, atualmente, a profilaxia pré-exposição é composta de três doses da vacina de cultivo celular nos dias 0, 7 e 28, por via intramuscular. Profissionais que permanecem em situações de alto risco de exposição devem ter seus títulos de anticorpos testados a cada 6 meses e devem receber reforço vacinal quando os

níveis estiverem abaixo de 0.5 UI/mL (BRASIL, 2002; WHO, 2005). A vacinação pré-exposição não elimina a necessidade de vacinação após exposição, porém reduz o número de doses de vacina (apenas duas doses de reforço, administradas em três dias de intervalo) e dispensa a imunoglobulina, desta forma tornando a terapia mais simples e de menor custo (MMWR, 1999; WHO, 2005).

Não há registro de óbito por raiva em pacientes que receberam tratamento pré-exposição com doses adequadas seguido de dose de reforço pós-exposição (WARRELL e WARRELL, 2004).

Em estudo controlado e randomizado, envolvendo estudantes de medicina veterinária vacinados com 3 doses da vacina anti-rábica de célula diplóide humana por via intradérmica, concomitante com profilaxia para malária com cloroquina, encontrou-se redução na produção primária de anticorpos (PAPPAIOANOU, 1986). A OMS recomenda que pessoas que estejam recebendo profilaxia para malária ou que sejam incapazes de completar as 3 doses da vacinação anti-rábica pré-exposição antes da quimioprofilaxia para malária, recebam a pré-exposição por via intramuscular (WHO, 2005).

b.2) Tratamento Pós-Exposição

O tratamento pós-exposição tem sido realizado desde o final do século XIX e é considerado uma urgência médica (MMWR, 1999). O esquema utilizado deve levar em consideração as características do ferimento e as condições do animal agressor. Nos acidentes classificados na Categoria III da OMS (acidentes graves), o tratamento pós-exposição completo consiste em: limpeza do ferimento, vacinação e infiltração da imunoglobulina. O ferimento deve ser lavado imediatamente com água, sabão e/ou um antisséptico viruscida. A imunoglobulina (Ig) humana ou equina deve ser administrada apenas uma vez, para pacientes não vacinados previamente, juntamente com a primeira dose da vacina ou até o 7º dia, enquanto a produção de anticorpos em resposta a vacina se desenvolve. A Ig deve ser infiltrada no local da lesão e, o volume restante, em local distante da vacina. Cinco doses da vacina são recomendadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 28. A observação do animal agressor por dez

dias é válida somente para cães e gatos (MMWR, 1999; BRASIL, 2002; WHO, 2005).

Em certos países, 50% das vítimas de raiva são crianças (WHO, 2005). Certos autores questionam o fato de que visitantes destes países recebem profilaxia pré-exposição, enquanto que a população mais vulnerável de crianças vivendo na área de alto risco é deixada desprotegida. Estudos de fármaco-economia têm demonstrado a vantagem em se estabelecer um programa de vacinação pré-exposição em escolares nestas regiões, porém os dados ainda são insuficientes para expandir esta estratégia para outros países onde a raiva é endêmica. A resposta primária e após reforço em crianças, após administração de vacinas celulares, em pré e pós-exposição e por diversas vias, é adequada (SABCHAREON et al., 1999). Diversos trabalhos para avaliar a resposta vacinal e ao reforço da vacina têm sido realizados com população de adultos saudáveis com excelente resposta na produção de anticorpos em ambas situações (BRIGGS et al., 2001; KULKARNI et al., 2007; MALERCZYK et al., 2007; RANNEY et al., 2006). Porém, alguns estudos realizados em grupos de indivíduos com faixa etária acima de 50 anos, apresentam resultados conflitantes quando comparam a resposta imune primária e o nível de produção de anticorpos neutralizantes, mas sempre com excelente resposta anamnésica após reforço (MASTROENI et al., 2004; STRADY et al., 2000).

Evidências indicam que existe dimorfismo sexual na resposta imune e nos aspectos imunológicos e neuroendócrinos nas fases agudas de processos inflamatórios (SPITZER, 1999). Briggs et al (2001), estudando doses de reforço em estudantes de medicina veterinária, encontrou concentração de anticorpos antivírus da raiva três vezes mais elevada em pacientes do sexo feminino. Por outro lado, Strady et al (2000) não ratificaram esta observação.

Vacinas anti-rábicas têm sido utilizadas por décadas, mas há limitada informação publicada sobre quanto tempo após ter recebido a primeira dose da vacina, o indivíduo continuará desenvolvendo uma resposta anamnésica após uma dose de reforço vacinal ter sido administrado (MALERCZYK et al., 2007). Atualmente a OMS recomenda duas doses de reforço da vacina (dias 0 e 3) em caso de suspeita de reinfecção (WHO, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que, em determinadas populações, apenas uma dose de reforço da vacina anti-rábica seria suficiente para garantir a proteção desejada (BRIGGS et al., 2001; LEMOS et

al., 1992; VODOPIJA et al., 1997). Além disso, estudos sorológicos têm mostrado títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 0.5 UI/mL podendo permanecer nesse nível vários anos após vacinação completa (STRADY, 1998; 2000). Um estudo mostra que em regime de pós-exposição, quatro injeções intradérmicas com vacina de células embrionárias purificadas de galinha ou vacina purificada de células vero, ocorre a manutenção de títulos aceitáveis de soroproteção a partir do 14º dia da primeira dose da vacina, mantendo-se por pelo menos 104 dias (AMBROZAITIS et al., 2006). Outros autores encontraram níveis de anticorpos neutralizantes detectáveis e uma boa resposta anamnésica após um ano, mesmo em pacientes que receberam apenas uma dose de vacina (KHAWPLOD et al., 2007).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o impacto da vacinação contra raiva no estado imunológico de indivíduos vacinados em situação de pré e pós-exposição.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de anticorpos antivírus da raiva na população vacinada de Augusto Corrêa nos anos de 2004, 2005 e 2006.

- Descrever dados demográficos e epidemiológicos da população e das eventuais novas agressões por morcegos.

- Correlacionar a prevalência de anticorpos com as doses de vacina realizadas em pré e pós exposição.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo faz parte do projeto “**Persistência de anticorpos neutralizantes contra o vírus rábico após vacinação pré e pós-exposição e doses de reforço, em população de área rural exposta a agressão por morcegos hematófagos no Brasil**”, financiado pela Sanofi Pasteur®, em parceria com o Instituto Pasteur (Paris – França), Centro de Controle de Zoonoses (São Paulo – SP) e Instituto Evandro Chagas (Belém – PA), aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa com parecer nº 402/2007 (ANEXO B)

5.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo monocêntrico, descritivo, analítico, prospectivo, para avaliar a presença e manutenção de anticorpos neutralizantes antivírus da Raiva, em indivíduos expostos ao vírus transmitido por morcegos e previamente vacinados, em esquemas de pré ou pós-exposição no ano de 2005, no município de Augusto Corrêa.

5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA

O estudo foi realizado na Unidade Básica de Saúde de Araí, uma das nove Unidades de Saúde de Augusto Corrêa-Pará (figura 1). O município de Augusto Corrêa possui cerca de 27.000 habitantes, a maioria desenvolvendo atividade de pesca e agricultura e foi um dos municípios onde ocorreram os surtos de raiva transmitida por morcegos nos anos de 2004 e 2005. Após o último surto em 2005, cerca de 3.500 pessoas receberam vacina antirrábica, em esquemas de pós-exposição com 5 doses (vacina nos dias 0, 3, 7, 14 e 28), ou pré-exposição com 3 doses (dias 0, 7 e 21 ou 28). Cerca de 3500 habitantes de Araí, comunidade rural do município de Augusto Corrêa, foram vacinados. A vacina utilizada foi a Verorab® preparada a partir da cepa WISTAR PM/WI 38-1503-3M, cultivados sobre células VERO (uma linhagem contínua de células de rim de macaco verde africano), as quais foram adaptadas para cultivo em grande escala sobre microcarreadores (VACINA, 2009). Como não foi atingido o número desejado de amostras entre os indivíduos habitantes de Araí, outros

vilarejos próximos onde a população também foi vacinada contra a raiva em 2005, e que também fazem parte do município de Augusto Corrêa, foram incluídos no estudo: Nova Olinda, Cachoeira e Porto do Campo.

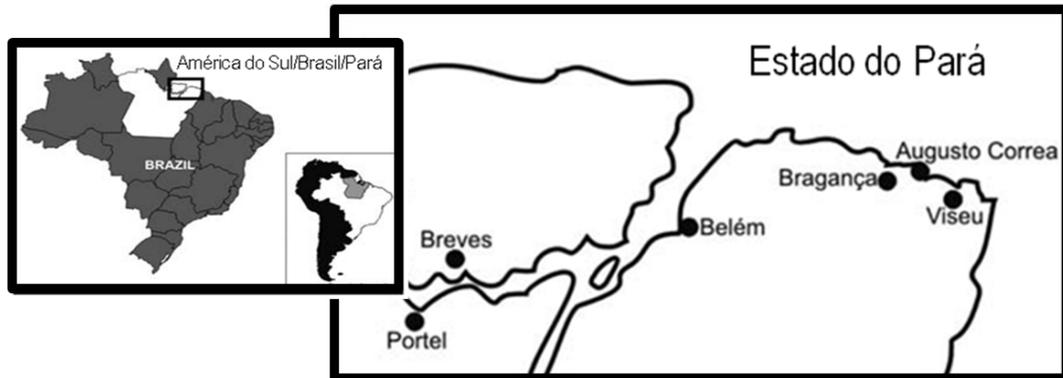


Figura 2 – Local do estudo.

Fonte: adaptado de Da Rosa et al., 2006.

O tamanho da amostra foi baseado na precisão de soroproteção esperada (intervalo de confiança de 95% - IC 95%). Considerando que a taxa de soroproteção esperada era de 90% após 3 anos da primovacinação, 140 indivíduos seriam suficientes para garantir IC de 5%. Porém, levando em conta uma perda de 30% dos indivíduos após 3 anos da primovacinação, 200 indivíduos deveriam ser incluídos. Entretanto, para compensar as perdas de amostras, quantidade de soro insuficiente, análises de subgrupos, o tamanho da amostra foi de 509 indivíduos.

5.3 PROCESSO DE RECRUTAMENTO DA POPULAÇÃO:

O registro de vacinação com os nomes dos habitantes de Augusto Corrêa, que foram vacinados em pré ou pós-exposição estava disponível na secretaria municipal de saúde de Augusto Corrêa. Após aprovação pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa, parecer nº 202/2007, uma equipe do estudo se encarregou de divulgar a pesquisa através de cartazes, nos quais constaram informações sobre a raiva humana transmitida por morcegos, a natureza do estudo e como este seria realizado. Os agentes comunitários de saúde do local foram envolvidos para recrutar a população.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Indivíduos incluídos na lista de registro de vacina da secretaria de saúde de Augusto Corrêa, como imunizados contra a raiva em 2005 ; e
- Habitantes de Augusto Corrêa e que não pretendiam mudar de município nos próximos 12 meses após início do estudo ; e
- Indivíduos que estivessem disponível para as visitas todos os anos (total de 3 anos) e que aceitassem em participar de todas as etapas do estudo ; e
- Indivíduos que lessem e assinassem o termo de consentimento livre e esclarecido, quando > 18 anos de idade, ou responsável se menor de idade (APÊNDICE A).

Foram excluídos da pesquisa todos os pacientes que não preencheram os critérios acima relacionados.

5.5 PROCEDIMENTOS

Durante todo o período de estudo, os indivíduos que concordaram em participar foram submetidos a questionário para a colheita das seguintes informações (APÊNDICE B):

1. Dados demográficos
2. História médica relevante desde o período de vacinação até a data da investigação
3. Medicamentos utilizados desde o período de vacinação até a data da investigação
4. História de imunização antirrábica
5. História de exposição a morcego hematófago ou outros animais vetores do vírus da Raiva.

Foram colhidos 5 mL de sangue para dosagem de anticorpos antivírus da Raiva utilizando o teste SFIMT. Indivíduos com anticorpos neutralizantes ≤ 0.5 IU/mL foram contatados para receber uma dose de reforço.

5.6 COLHEITA DOS ESPÉCIMENS CLÍNICOS E TESTES LABORATORIAIS

5.6.1 Colheita e processamento do sangue

Foram colhidos 5 mL de sangue venoso de cada participante do estudo. Os tubos contendo o sangue dos pacientes foram armazenados a 4°C por não mais de 2h antes da centrifugação. Após centrifugação, o soro foi distribuído em 4 alíquotas de 0,5 mL, as quais foram mantidas resfriadas a 4°C, por no máximo 4-5 dias, e posteriormente congeladas a -20°C. Uma das alíquotas foi enviada ao Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses (LabZoo/CCZ) da cidade de São Paulo, para testes laboratoriais. Outras duas alíquotas foram enviadas ao Instituto Pasteur, Paris (França) para testes laboratoriais complementares. A quarta alíquota foi armazenada em freezer -70°C, no Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará.

Todas as amostras foram testadas em laboratórios de segurança 2 e 3 (NB2 e NB3), obedecendo normas de biossegurança, por considerar que as mesmas poderiam estar contaminadas com outros patógenos como arbovirus, HIV, HBV, HCV, Plasmódio, entre outros.

5.6.2 Técnica De Microteste De Inibição De Fluorescência Simplificado

Os soros colhidos foram enviados para o Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo e testados pela técnica de Microteste de Inibição de Fluorescência Simplificado que consiste na soroneutralização em cultura celular para determinação de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva (SFIMT Favoretto *et al*, 1993), a

fim de determinar a presença de anticorpos neutralizantes específicos contra o vírus da raiva (Anexo C)

O Microteste de Inibição de Fluorescência Simplificado é considerado positivo quando anticorpos neutralizantes antivírus da raiva ≥ 0.5 IU/mL no soro da amostra testada (Favoretto *et al*, 1993). Os resultados obtidos com anticorpos neutralizantes < 0.5 IU/mL receberam doses de reforço.

5.7 MÉTODO ESTATÍSTICO

A avaliação da imunogenicidade foi realizada em vários níveis de comparação. Inicialmente a amostra foi avaliada conforme a Pré-exposição ou a Pós-exposição, em seguida avaliou-se a influência do histórico de malária, e posteriormente a avaliação do resultado entre as comunidades. Para atingir os objetivos deste estudo foram aplicados métodos estatísticos descritivos e inferenciais, conforme a distribuição da cada variável, de acordo com a metodologia relatada em Ayres *et. al.* (2004). Para avaliar se as variáveis quantitativas apresentavam características gaussianas foi utilizado o teste de normalidade de D'Agostino-Pearson. As variáveis antropométricas e as variáveis de resposta imunológicas não apresentaram normalidade, portanto a ANOVA de Kruskal-Wallis foi aplicada para comparar a distribuição das variáveis quantitativas, quando a ANOVA obteve p-valor foi realizado o pós-teste de Student-Newman-Keuls. A distribuição das variáveis qualitativas foi avaliada pelo teste do Qui-Quadrado de aderência (Goodness of fit) onde as ocorrências foram comparadas com a distribuição proporcional ao tamanho de cada amostra.

5.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho está inserido no projeto de pesquisa intitulado "Persistência de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva após vacinação pré e pós-

exposição e doses de reforço, em população de área rural exposta a agressão por morcegos hematófagos no Brasil” e foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa com parecer nº 402/2007.

Todos os participantes da pesquisa foram informados previamente sobre a importância do estudo e depois solicitado sua permissão, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme rege a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, sobre os aspectos éticos envolvendo a pesquisa com seres humanos (Apêndice A).

Após a visita, indivíduos que apresentaram títulos de anticorpos < 0.5 IU/mL, receberam doses de reforço da vacina anti-rábica, 3-6 meses depois.

6 RESULTADOS

No período de 2 a 7 de junho de 2007, foram entrevistados 509 indivíduos residentes em 4 comunidades do Município de Augusto Corrêa e coletadas as amostras de sangue, as quais foram processadas conforme metodologia descrita. Quatro amostras foram retiradas do estudo devido hemólise (1) e formulários com dados incompletos (3). As comunidades de Arai (137), Porto do Campo (73), Cachoeira (110) e Nova Olinda (185) foram incluídas no estudo. Nenhum indivíduo relatou antecedente de hanseníase ou ter recebido soro devido acidente por animal peçonhento. Todos os participantes que receberam vacina em esquema de pré-exposição completaram as 3 doses e não receberam reforço, uma vez que ninguém relatou nova agressão por animal. Todos os casos de malária registrados, no período entre a vacinação e a coleta da amostra, foram tratados com cloroquina e primaquina conforme recomendação do ministério da saúde (MS/FNS, 2001).

Os pacientes foram agrupados segundo esquema vacinal recebido em:

- Grupo A: Pacientes que receberam profilaxia pós-exposição incompleta (2, 3 ou 4 doses)
- Grupo B: Pacientes que receberam profilaxia pós-exposição completa.
- Grupo C: Pacientes que receberam profilaxia pós-exposição e reforço.
- Grupo D: Pacientes que receberam profilaxia pré-exposição completa.

A amostra é constituída de 218 (43.2%) indivíduos do sexo masculino e 287 (56.8%) do sexo feminino. A proporção da variável sexo (M/F) nos diversos grupos apresenta a seguinte distribuição: Grupo A 6(66.7%)/ 3(33.3%); Grupo B 244(56.9%)/185(43.1%); Grupo C 7(77.8%)/2 (22.2%); e Grupo D 30(51.7%)/28(48.3%). Para avaliar a distribuição da variável Sexo nos diversos grupos, foi aplicado o teste do Qui-Quadrado de Aderência o qual obteve p-valor = 0.1198, não significativa, portanto não há diferenças significante entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição da variável Sexo nos diversos grupos e na amostra completa.

	Grupo A (n=9)	Grupo B (n=429)	Grupo C (n=9)	Grupo D (n=58)	Geral (n=505)
Feminino	3 33.3%	185 43.1%	2 22.2%	28 48.3%	218 43.2%
Masculino	6 66.7%	244 56.9%	7 77.8%	30 51.7%	287 56.8%

p-valor = 0.1198 ($\chi^2=5.838$, GL=3)

Quando avaliamos os níveis de anticorpos neutralizantes em função do sexo do paciente através do Teste U de Mann-Whitney encontramos p-valor = 0.0151, o qual indica que há evidências suficientes para atestar que o sexo feminino apresenta níveis mais elevados de anticorpos (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição da imunogenicidade em função do sexo do paciente.

	Feminino (n=218)	Masculino (n=287)
Mínimo	0.05	0.05
Máximo	4.5	4.5
Mediana	1.5	1
Média Aritmética	1.7603	1.5243

p-valor = 0.0151* (Teste U de Mann-Whitney)

A idade média da amostra foi de 16 anos (variando de 2 a 83 anos). Trinta e oito pessoas (7.52 %) tinham idade inferior a 5 anos, 21.38% (108) tinham entre 5 e 10 anos, entre 10 e 20 anos tinham 28.51% (144), entre 20 a 30 anos 17.62%(89), entre 30 e 40 anos 9.3% (47), entre 40 e 50 anos 67.32% (34), entre 50 e 60 anos 57.42%(29) e igual ou maior que 60 anos 31.68%(16). As diversas faixas etárias estão distribuídas nos diversos grupos conforme tabela 4. A ANOVA de Kruskal-Wallis foi aplicada para comparar a distribuição da idade entre os grupos, o p-valor = 0.0144 é significativo indicando que a idade é um fator de distinção entre os grupos. Quando foi aplicado o pós-teste de Student-Newman-Keuls a comparação entre os Grupos B e D obteve p-valor = 0.0022, altamente significativo, indicando que estes

grupos são constituídos por indivíduos com faixas etárias diferenciadas. O grupo B (pós-exposição completa) é constituído de indivíduos mais jovens (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 – Descrição da variável Idade nos grupos

	Grupo A (n=9)	Grupo B (n=429)	Grupo C (n=9)	Grupo D (n=58)
Mínimo	6	2	7	2
Máximo	55	82	49	83
Mediana	21	15	16	25

p-valor = 0.0144 (ANOVA de Kruskal-Wallis)

Tabela 4 – Descrição da variável Idade nos grupos e na amostra completa conforme faixa etária.

a. Faixa Etária	Grupo A (n=9)	Grupo B (n=429)	Grupo C (n=9)	Grupo D (n=58)	Geral (n=505)
< 5 anos	0	35	0	3	38
5 — 10	2	98	1	7	108
10 — 20	2	126	4	12	144
20 — 30	1	75	2	11	89
30 — 40	2	33	1	11	47
40 — 50	1	25	1	7	34
50 — 60	0	24	0	5	29
≥ 60	0	14	0	2	16

P-valor < 0.0001

A análise dos níveis de anticorpos neutralizantes em função da variável idade, revela que o p-valor (< 0.0001) é altamente significativo, o que nos permite concluir que há uma diferença nos níveis de anticorpos neutralizantes entre os dois grupos (abaixo e acima de 22 anos). O nível de anticorpos em UI/mL variou de 0.16 a 4.5, com mediana de 1.5 e média aritmética de 1.78, nos indivíduos com 22 anos ou menos. Nos indivíduos acima de 22 anos, a variação foi de 0.05 a 4.5, com mediana de 1.0 e média aritmética de 1.34. Esta diferença torna-se evidente principalmente quando se observa a mediana, onde o grupo com idade \leq 22 anos supera o indivíduos acima de 22 anos em 0.5 UI/ml.

Na análise das amostras pelo teste de Favoretto, 90.5% dos indivíduos apresentaram títulos de anticorpos acima de 0,5 UI/mL. No grupo A (pos-exposição incompleta), todos os indivíduos apresentaram positividade no teste. Já no grupo B (pós-exposição completa), 90% (386) foram positivos. A positividade ao teste nos grupos C (pós-exposição com reforço) e D (pré-exposição) foram de 88.9% (8) e 93.1% (54), respectivamente. Para avaliar a distribuição da variável resposta imunológica à vacina, foi aplicado o teste do Qui-Quadrado de Aderência o qual obteve p-valor = 0.9843, não significativa, portanto não há diferença significativa entre a resposta imunológica a vacina nos diferentes grupos (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição da resposta imunológica à vacina, ponto de corte onde o teste Favoretto \geq 0,5 UI/mL é considerado positivo.

	Grupo A (n=9)	Grupo B (n=429)	Grupo C (n=9)	Grupo D (n=58)	Geral (n=505)
Positivo	9 100.0%	386 90.0%	8 88.9%	54 93.1%	457 90.5%
Negativo	0 0.0%	43 10.0%	1 11.1%	4 6.9%	48 9.5%

p-valor = 0.9843 ($\chi^2=0.151$, GL=3)

O histórico de malária após vacinação esteve presente em 10.9% da amostra (55 casos). Os grupos A e C não apresentaram registro de tratamento prévio para malária. No grupo B (pós-expostos), 12.1% (52) dos pacientes tinham histórico de tratamento para malária. Os 3 casos restantes (5.2%) pertenciam ao grupo D (pré-expostos).

Tabela 6 – Distribuição da história de malária nos grupos e na amostra geral.

Hist. Malária	Grupo A (n=9)	Grupo B (n=429)	Grupo C (n=9)	Grupo D (n=58)	Geral (n=505)
Presente	0 0%	52 12.1%	0 0%	3 5.2%	55 10.9%
Ausente	9 100%	377 87.9%	9 100%	55 94.8%	450 89.1%

p-valor = 0.9133, $\chi^2=0.525$, GL=3.

A distribuição do histórico de malária foi avaliada pelo teste do Qui-Quadrado, onde as ocorrências foram comparadas com a distribuição proporcional ao tamanho

de cada amostra, portanto caracterizando um teste não-paramétrico de aderência, o qual obteve p-valor = 0.9133, não significativo, portanto, podemos concluir os casos de malária estão proporcionalmente distribuídos entre os grupos (Tabela 6).

Quando analisamos a positividade do teste Favoretto em relação ao histórico de malária pelo teste do Qui-Quadrado, o valor de obtido não foi significativo (p-valor= 0.9993), indicando que resultado do teste Favoretto não sofreu influência pelo histórico de malária (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição da resposta imunológica, com base no ponto de corte $x \geq 0.5$ UI/ml, conforme a história de malária nos grupos e na amostra geral.

	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D		Geral	
	Ausente (n=9)	Malária (n=52)	Ausente (n=377)	Malária	Ausente (n=9)	Malária (n=3)	Ausente (n=55)	Malária (n=55)	Ausente (n=450)	Malária
Positivos	9	47	339		8	3	51	50	407	
	100.0%	90.4%	89.9%		88.9%	100.0%	92.7%	90.9%	90.4%	
Negativos	0	5	38		1	0	4	5	43	
	0.0%	9.6%	10.1%		11.1%	0.0%	7.3%	9.1%	9.6%	

p-valor = 0.9993 ($\chi^2 = 0.178$, GL = 5)

A resposta imunológica (teste positivo ≥ 0.5) conforme as comunidades foi avaliada pelo teste do Qui-Quadrado, onde as ocorrências foram comparadas com a distribuição proporcional ao tamanho de cada comunidade, portanto caracterizando um teste não-paramétrico de aderência, o qual obteve p-valor = 0.8977, não significativo, logo, podemos concluir que a boa resposta imunológica, com manutenção de títulos acima de 0,5 UI/mL está proporcionalmente distribuída entre as comunidades (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição da resposta imunológica, com base no ponto de corte = 0.5 UI/mL:, conforme a comunidade.

	Negativos		Positivos		Total
	$x < 0.5$ UI/mL		$x \geq 0.5$ UI/mL		
Comunidade Araí	8	5.8%	129	94.2%	137
Comunidade Porto do campo	12	16.4%	61	83.6%	73
Comunidade Cachoeira	10	9.1%	100	90.9%	110
Comunidade Nova Olinda	18	9.7%	167	90.3%	185
Total	48	9.5%	457	90.5%	505

p-valor = 0.8977 ($\chi^2=0.594$, GL=3)

Vinte e seis novas agressões por animais (5.15% da amostra) foram registradas após a vacinação inicial. Os animais envolvidos nas novas agressões foram o cão 57.7% (15), o morcego 26.9%(7) e o macaco 15.4 % (4).

7 DISCUSSÃO

Diversos estudos comprovam a eficácia e imunogenicidade das modernas vacinas de cultura celular utilizadas mundialmente, seja em regime de pré ou pós-exposição, por via subcutânea, intradérmica ou intramuscular e nas diversas faixas etárias (BRIGGS et al., 2001; KULKARNI et al., 2007; MALERCZYK et al., 2007; RANNEY et al., 2006; SABCHAREON et al., 1999). Em nossa casuística, todos os pacientes receberam a vacina PVRV (Purified vero cell rabies vaccine, Verorab®, Sanofi Pasteur), vacina liofilizada e inativada, para tratamento pré ou pós-exposição (TOOVEY, 2007; BRASIL, 2002). Duzentos e dezenove pacientes (43.4%) expostos apresentam atualmente menos de 15 anos (13 anos por ocasião do surto), deixando evidente a vulnerabilidade da faixa etária pediátrica. Estes resultados revelam que, em nossa amostra, as faixas etárias mais jovens foram as mais expostas por morcegos hematófagos por ocasião do surto.

Estudo realizado por Mastroeni et al (1994) observou que grupos de indivíduos com faixa etária acima de 50 anos, apresentam menor produção de anticorpos quando comparados grupos mais jovens. Por outro lado, Strady et al (2000) estudando fatores preditivos da resposta imune na produção de anticorpos neutralizantes, não encontrou influência da idade. Em nosso trabalho, encontramos uma relação evidente com os níveis de anticorpos e faixa etária mais jovem, inclusive com redução significativa destes após 22 anos de idade. Sabe-se que mesmo após esta idade, os níveis de anticorpos continuaram adequados e que não estão necessariamente relacionados a uma pior resposta anamnésica no caso de revacinação.

Diferenças na resposta imune nos sexos feminino e masculino, assim como nos aspectos neuroendócrinos, podem justificar os níveis mais elevados na produção de anticorpos no sexo feminino encontrado em alguns trabalhos (BRIGGS et al., 2001; SPITZER, 1999). Os resultados apresentados em nosso trabalho vêm reforçar este fato já que, apesar de ambos os sexos apresentarem adequada resposta na produção de anticorpos neutralizantes anti vírus da raiva, em nossa casuística o sexo feminino apresentou maiores níveis de anticorpos quando comparados ao sexo masculino.

Pappaioanou et al (1986) observou redução significativa na produção de anticorpos neutralizantes em grupo de estudantes que receberam esquema de pré-exposição por via intradérmica, juntamente com profilaxia para malária utilizando cloroquina. O estado do Pará é área endêmica para malária, resultando na possibilidade de concomitância da vacinação anti-rábica com o uso de cloroquina, porém em doses terapêuticas (mais elevadas por menor período). Em nossa casuística 55 (10,9%) dos pacientes receberam tratamento para malária com cloroquina e primaquina nas doses recomendadas pelo MS, por período de 7 dias em período compreendido entre a vacinação e coleta da amostra. O histórico de malária, avaliado pelo teste do Qui-Quadrado, apresenta-se proporcionalmente distribuídos entre os grupos A, B, C, e D (p-valor = 0.9133). Neste estudo não encontramos relação entre os níveis de anticorpos neutralizantes e o histórico de malária pelo teste de Kruskal-Wallis (p-valor = 0.2565), nem predomínio de resultados positivos ou negativo pelo teste do Qui-Quadrado (p-valor= 0.9993), nos diversos grupos (A, B, C ou D). Desta forma, em nossa casuística o uso da cloroquina em doses mais elevadas e não simultâneas com o esquema vacinal, não interferiu na produção de anticorpos neutralizantes.

No Brasil, no período de 1997 a 2001 mais de 400.000 pessoas ao ano procuraram atendimento médico, por terem sido expostas ou por se julgarem expostas ao vírus da raiva. Destas, 60% receberam algum tipo de indicação de tratamento profilático, sendo que 13% abandonaram o tratamento (BRASIL, 2002). Garcia et al (1999) encontraram 11,7% de abandono no tratamento pós-exposição na grande São Paulo. Em nossa amostra, não houve abandono no grupo que recebeu profilaxia pré-exposição e o percentual de tratamentos incompletos no grupo pós-exposição foi de 2,01% (9 /447). A campanha vacinal iniciada por ocasião do surto de raiva em Augusto Correa encontrou uma população assustada e preocupada com o risco de adoecimento. Fato este que, juntamente com a mobilização das autoridades de saúde locais, influenciou a maior adesão ao tratamento.

Ao analisarmos os exames positivos (Favoretto ≥ 0.5 UI/mL) nos diversos grupos, inclusive naquele constituído de indivíduos que não receberam tratamento completo (Grupo A), não houve diferença significativa entre os grupos (Qui-Quadrado de Aderência p-valor = 0.9843). Também não foi encontrada significância

estatística quando avaliado o nível da resposta imunológica nos diversos grupos (ANOVA de Kruskal-Wallis p-valor = 0.0758). Após 2 anos de vacinação anti-rábica, 90,5% dos indivíduos de nossa amostra mantêm níveis de anticorpos neutralizantes adequados. Estes resultados vêm reforçar os trabalhos de Strady et al (2000) nos quais, títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 0.5 UI/mL foram encontrados após anos de vacinação completa.

Khaplod et al (2007), avaliando indivíduos (voluntário sadios) que receberam pré-exposição incompleta, encontrou anticorpos neutralizantes detectáveis e boa resposta anamnésica após 1 ano, mesmo naqueles que receberam apenas uma dose da vacina. Vodopija et al (1997), Briggs et al (2001) e Lemos et al (1992) têm encontrado boa resposta anamnésica, em determinadas populações, com apenas uma dose de reforço da vacina anti-rábica. De 48 participantes deste estudo (9.5%) que apresentaram sorologia ≤ 0.5 UI/mL, 36 (75%) apresentaram Favoretto ≥ 0.33 UI/ml e provavelmente apresentarão boa resposta anamnésica após duas doses de reforço da vacina, considerando os resultados dos estudos citados anteriormente. A resposta vacinal ao reforço deste indivíduos, só poderá ser avaliada futuramente com o seguimento deste estudo.

Nossas análises são limitadas por não dispormos de informações como doenças imunossupressoras, dosagem de anticorpos neutralizantes previamente a vacinação, uma vez que agressões por animais silvestres poderiam inocular baixa dose viral, o que não seria suficiente para causar doença, mas sim para a produção de anticorpos.

8 CONCLUSÃO

Concluimos que a maioria da população estudada (90.5%) mantém níveis de anticorpos neutralizantes adequados, quando dosados pela técnica de Favoretto, mesmo após 2 anos da vacinação antirábica;

A resposta imune à vacina verificada através da doagem de anticorpos neutralizantes, foi adequada nas diversas faixas etárias, independente do esquema vacinal recebido;

Indivíduos com idade acima de 22 anos apresentam de forma significativa menores níveis de anticorpos neutralizantes, independente do esquema vacinal recebido.

Ao analisarmos a positividade ao teste de Favoretto (≥ 0.5 UI/mL) em função da variável sexo, não encontramos tendência a redução dos níveis de anticorpos neutralizantes.

Mesmo que a resposta à vacina seja adequada em ambos os sexos, o sexo feminino apresentou níveis de anticorpos neutralizantes pela técnica de Favoretto significativamente mais elevados que o sexo masculino.

A taxa de abandono do tratamento foi muito baixa (2.01%) quando comparada com as taxas de abandono relatadas em outros trabalhos (13% e 11.7%).

Não há relação entre os níveis de anticorpos e a história prévia de tratamento para malária com cloroquina.

REFERÊNCIAS

AMBROZAITIS, A.; LAISKONIS, A.; BALCIUNIENE, L.; BANZHOFF, A.; MALERCZYK, C. Rabies post-exposure prophylaxis vaccination with purified chick embryo cell vaccine (PCECV) and purified vero cell rabies vaccine (PVRV) in a four-site intradermal schedule (4-0-2-0-1-1): An immunogenic, cost-effective and practical regimen. **Vaccine**, v. 24, n. 19, p. 4116–4121, maio. 2006.

ARYA, S. C. Immunogenicity of newly introduced Vero cell rabies Vaccine. **Vaccine**, v.24, n.7, p. 847–848, fev. 2006.

AYRES M, AYRES JR M, AYRES DL, SANTOS AAS. **BioEstat 4**. Sociedade Civil Mamirauá. MCT – CNPq, Belém, Pará, Brasil. 2004

BADILLA, X.; PEREZ-HERRA, V.; QUIROS, L.; MORICE, A.; JIMENEZ, E.; SAENZ, E.; SALAZAR, F.; FERNANDEZ, R.; ORCIARI, L.; YAGER, P.; WHITFIELD, S.; RUPPRECHT, C. E. Human rabies: a reemerging disease in Costa Rica? **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 6, p. 721-723, jun. 2003.

BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**. 2th ed. Boca Raton: CRC Press. Florida, p. 620, 1991.

BAHLOUL, C.; TAIEB, D.; KAABI, B; DIOUANI, M.F.; HADJAHMED, S.B.; CHTOUROU, Y.; B'CHIR, B.I.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of specific ELISA and RFFIT antibody assays in the assessment of dog immunity against rabies. **Epidemiology and infection**, v.133, n.4, p.749–757, agosto. 2005.

BERNARD, K. W.; FISHBEIN, D. B.; MILLER, K. D.; PARKER, R. A.; WATERMAN, S.; SUMNER, J. W.; REID, F. L.; JOHNSON, B. K.; ROLLINS, A. J.; OSTER, C. N.; SCHONBERGER, L.B.; BAER, G.M.; WINKLER, W. G. Pre-exposure rabies immunization with human diploid cell vaccine: decreased antibody responses in persons immunized in developing countries. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 3, p. 633–47, maio, 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: MS, 2005. p. 603-632.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva Humana Transmitida por Morcegos em Viseu, Pará**. Nota técnica. Brasília: MS, 2004. p. 1. Disponível em :< http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21275 >. Acesso em: 15 dez. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva humana transmitida por morcegos no município de Augusto Corrêa – Estado do Pará**. Brasília: MS, 2005. p. 1-3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva humana transmitida por morcegos no Estado do Maranhão**. Brasília: MS, 2005. p. 1-4.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surto de Raiva humana transmitida por morcegos no município de Portel – Estado do Pará, Março / Abril de 2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília: MS, 2004. p. 1-5. Disponível em:< http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_06_ano04.pdf >. Acesso em: 15 dez. 2004.

BRIGGS, D. J.; DREESEN, D. W.; NICOLAY, U.; CHIN, J. E.; DAVIS, R.; GORDON, C.; BANZHOFF, A. Purified chick embryo cell culture rabies vaccine: interchangeability with human diploid cell culture rabies vaccine and comparison of one versus two-dose post-exposure booster regimen for previously immunized persons. **Vaccine**, v. 19, n. 9-10, p. 1055-1060, 2001.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. **The fluorescent antibody test**. In: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M. and Koprowski, H. Laboratory techniques in rabies, World Health Organization, 4^a ed. Genebra, p. 75-87, 1996.

DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Rabies transmission from organ transplants in the USA. **The Lancet**, v. 364, p. 648-649, agosto, 2004.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; TINO, M. S.; ZANETTI, C. R.; PEREIRA, O. A. Simplified fluorescent Inhibition Microtest for the Titration of Rabies Neutralizing Antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, n. 2, p. 171-175, abril, 1993.

FOOKS, A. R.; BROOKES, S. M.; JOHNSON, N.; McELHINNEY, L. M.; HUTSON, A. M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiology and infection**, v. 131, p. 1029-1039, dez. 2003.

GARCIA, R. C. M.; VASCONCELLOS, S. A.; SAKAMOTO, S. M.; LOPEZ, A. C. Análise de tratamento anti-rábico humano pós-exposição em região da Grande São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 3, p. 295-301, jun. 1999.

GONÇALVES, M. A. S.; SA-NETO, R. J.; BRAZIL, T. K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 461-4, sep-oct 2002.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J; RUPPRECHT, C. E. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **The Lancet**, v. 1, p. 101-109, jun. 2002.

U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Center for Disease Control and Prevention. Human Rabies Prevention – United States, 1999. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 48, p. 1 – 41, jan. 1999.

JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. Academic Press, London, pp. 491, 2002.

JACKSON, A. C.; WARRELL, M. J.; RUPPRECHT, C. E.; ERTL, H. C. J.; DIETZSCHOLD, B.; O'REILLY, M.; LEACH, R. P.; FU, Z. F.; WUNNER, W. H.; BLECK, T. P.; WILDE, H. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 60-63, jan. 2003.

KHAWPLOD, P.; WILDE, H.; BENJAVONGKULCHAI, M.; SRIAROON, C.; CHOMCHEY, P. Immunogenicity study of abbreviated rabies preexposure vaccination schedules. **Journal of Travel Medicine**, v. 14, n. 3, p. 173-6, may-jun. 2007.

KNOBEL, D. L.; CLEVELAND, S.; COLEMAN, P. G.; FÈVRE, E. M.; MELTZER, M. I.; MIRANDA, M. E.; SHAW, A.; ZINSSTAG, J.; MESLIN, FX. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. **Bull WHO**, v. 83, n. 5, p. 360-368, may 2005.

KULKARNI, P. S.; RAUT, S. K.; JADHAV, S. S.; KAPRE, S. V.; DEUSKAR, N. Immunogenicity of Two Modern Tissue Culture Rabies Vaccines in Pre-Exposure Prophylaxis. **Human Vaccines**, v. 3, n. 5, p. 183-186, September/October 2007.

LEMOS H. N.; SOUZA, M. M.; CAMPOS, H. H. V.; ABREU, V. L. V.; SOARES, I. C. G.; REIS, W. Effect of one booster dose in antirabies vaccination. **Biologicals**, v. 20, n. 3, p. 171-175; Sep1992.

LONG, S. S. Evidence favors use of rabies vaccine in rabies-endemic areas. **The Journal of Pediatrics**, v. 151, n. 2, p. 173, aug. 2007.

LOPEZ, A. R.; MIRANDA, P. P.; TEJADA, E. V.; FISHBEIN, D. B. Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle. **Lancet**, v. 339, p. 408-411, 1992.

BRASIL: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. Brasília: MS, 2001. p. 104.

MALERCZYK, C.; BRIGGS, D. J.; DREESEN, D. W.; BANZHOFF, A. Duration of Immunity: An Anamnestic Response 14 Years After Rabies Vaccination With Purified Chick Embryo Cell Rabies Vaccine. **Journal of Travel Medicine**, v. 14, n. 1, p. 63-64, 2007.

MARCOVISTZ, R.; ROMIJN, P. C.; ZANETTI, C. R. **Raiva**. In: COURA, J. R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005. Cap. 152, p. 1783-1793.

MASTROENI, I.; VESCIA, N.; POMPA, M. G.; CATTARUZZA, M. S.; MARINI, G. P.; FARA, G. M. Immune response of the elderly to rabies vaccines. **Vaccine**, v. 12, n. 6, p. 518-520; mai, 1994.

MATHA, I. S.; SALUNKE, S. R. Immunogenicity of Purified Vero Cell Rabies Vaccine Used in the Treatment of Fox-Bite Victims in India. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 4, p. 611–3, fev. 2005.

MESSENGER, S. L.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E. Emerging Epidemiology of Bat-Associated Cryptic Cases of rabies in Humans in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 738-747, set. 2002.

PAPPAIOANOU, M.; FISHBEIN, D. B.; DREESEN, D. W. ; SCHWARTZ, I. K.; CAMPBELL, G. H.; SUMNER, J. W.; PATCHEN, L. C.; BROWN, W. J. Antibody response to preexposure human diploid-cell rabies vaccine given concurrently with chloroquine. **New England Journal of Medicine**, v. 314, p. 280–284, jan. 1986.

RANNEY, M.; PARTRIDGE, R.; JAY, G. D.; ROZZOLI, D. E.; PANDEY, P. Rabies Antibody Seroprotection Rates Among Travelers in Nepal: “ Rabies Seroprotection in Travelers ”. **Journal of Travel Medicine**, v. 13, n. 6, p. 329–333, 2006.

ROMIJN, P. C.; VAN DER HEIDE, R.; CATTANEO, C. A. M.; SILVA, R. C. F.; VAN DER POEL, W. H. M. Study of Lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio Janeiro, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 69, n. 1, p. 81-86, 2003.

ROSA, E. S. T.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J. S.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUSA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. C. Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1197-1202, agosto 2006.

WILLOUGHBY, R. E.; TIEVES, K. S.; HOFFMAN, G. M.; GHANAYEM, N. S.; AMLIE-LEFOND, C. M.; SCHWABE, M. J.; CHUSID, M. J.; RUPPRECHT, C. E. Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 2508-2514, jun. 2005.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet**, v. 2, p. 327-343, jun. 2002.

SABCHAREON, A.; LANG, J.; ATTANATH, P.; SIRIVICHAYAKUL, C.; PENGSA, K.; LE MENER, V.; CHANTAVANICH, P.; PRARINYANUPHAB, V.; POJJAROENANANT, C.; NIMNUAL, S.; WOOD, S. C.; RIFFARD, P. A New Vero Cell Rabies Vaccine: Results of a Comparative Trial with Human Diploid Cell Rabies Vaccine in Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29. p. 141–9, 1999.

SCHNEIDER, M. C.; BELOTTO, A.; ADE, M. P.; LEANES, L. F.; CORREA, E.; TAMAYO, H.; MEDINA, G.; RODRIGUES, M. J. OPS Consultores, 2005. **Epidemiological Bull/PAHO**, v. 26, n. 1, p. 2-4.

SCHNEIDER, M. C.; SANTOS-BURGOA, C.; ARON, J.; MUNOZ, B.; RUIZ-VELAZCO, S.; UIEDA, W. Potential force of infection of human rabies transmitted by vampire bats in the Amazonian region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 6, p. 680-684, 1996.

SCHNEIDER, M. C.; SANTOS- BURGOA, C. Algunas Consideraciones sobre la rabia humana transmitida por murciélago. **Salud Pública México**, v. 37, p. 354-362, 1995.

SCHNEIDER, M. C.; ARON, J.; SANTOS- BURGOA, C.; UIEDA, W.; RUIZ-VELAZCO, S. Common vampire bat attacks on humans in a village of the Amazon region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, escola Nacional de Saúde Pública**, v. 17, p. 1531-1536, dez. 2001.

SMITH, J.; YAGER, P.; BAER, G. M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibodies. **Bull W. H. O.** , v. 48, p. 535-541, 1973.

SPITZER, J. A. Gender differences in some host defense mechanisms. **Lupus**, v. 8, p. 380-383, 1999.

SRINIVASAN, A.; BURTON, E. C.; KUEHNERT, M. J.; RUPPRECHT, C.; SUTKER, W. L.; KSIAZEK, T. G.; PADDOCK, C. D.; GUARNER, J.; SHIEH, W. J.; GOLDSMITH, C.; HANLON, C. A.; ZORETIC, J.; FISCHBACH, B.; NIEZQODA, M.; EL-FEKY, W. H.; ORCIARI, L.; SANCHEZ, E. Q.; LIKOS, A.; KLINTMALM, G. B.; CARDO, D.; LEDUC, J.; CHAMBERLAND, M. E.; JERNIGAN, D. B.; ZAKI, S. R. Transmission of Rabies Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1103-1111, mar. 2005.

STRADY, A.; LANG, J.; LIENARD, M.; BLONDEAU, C.; JAUSSAUD, R.; PLOTKIN, S. A. Antibody Persistence Following Preexposure Regimens of Cell-Culture Rabies Vaccines: 10-Year Follow-Up and Proposal for a New Booster Policy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1290–5, 1998.

STRADY, A.; JAUSSAUD R.; BÉGUINOT, M.; LIENARD, M.; STRADY, A. Predictive factors for

the neutralizing antibody response following pre-exposure rabies immunization: validation of a new booster dose strategy. **Vaccine**, v. 18, p. 2661-2667, 2000.

SUDARSHAN, M. K.; GIRI, M. S. A.; MAHENDRA, B. J.; VENKATESH, G. M.; SANJAY, T. V.; NARAYANA, D. H. A.; RAVISH, H. S. Assessing the Safety of Post-exposure Rabies Immunization in Pregnancy. **Human Vaccines**, v. 3, n. 3, p. 61-63, May/June 2007.

TOOVEY, S. Preventing rabies with the Verorab[®] vaccine: 1985–2005 Twenty years of clinical experience. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 6, p. 327-348, nov. 2007.

TORDO, N.; CHARLTON, K.; WANDELER, A. Rhabdoviruses: rabies. In: TOPLEY, W. W. C.; WILSON, G. S. **Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity**. 9. ed. Londres: Arnold, 1998, p. 665-692.

VODOPIJA, R.; LAFONT, M.; BAKLAIC, Z.; LJUBICIC, M.; SVJETLIEIC, M.; VODOPIJA, I. Persistence of humoral immunity to rabies 1100 days after immunization and effect of a single booster dose of rabies vaccine. **Vaccine**, v. 15, n. 5, p. 571-574, 1997.

WARRELL, M. J.; WARRELL D. A. Rabies and Other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v. 363, p. 959-969, mar. 2004.

WARRILOW, D. Australian Bat Lyssavirus: A Recently Discovered New Rhabdovirus. In: FU, Z. F. **The World of Rhabdoviruses**. 1. ed. New York: Springer, 2005. p. 25-44.

WHO, 2005. Who expert consultation on rabies. Technical report series 931; First Report; Geneva. <http://www.who.int/rabies/931/en/index.html>;

WINER, J. B. Guillain Barré Syndrome. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 54, p. 381-385, dez. 2001

APÊNDICES

APÊNDICE A : TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Persistência de anticorpos neutralizantes contra o vírus rábico após vacinação pré e pós-exposição e doses de reforço, em população de área rural exposta a agressão por morcegos hematófagos no Brasil.

Instituições Envolvidas: Universidade Federal do Pará, Secretaria de Saúde do Estado do Pará, Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, Instituto Pasteur de Paris, sanofi pasteur.

Esclarecimento da Pesquisa

A raiva é uma doença que tem evolução fatal. A doença é transmitida ao homem através de arranhadura, lambadura ou mordedura de um animal infectado. Nos anos de 2004 e 2005, o Pará registrou 36 casos de raiva humana transmitida por morcegos, dos quais 15 ocorreram no município de Augusto Correa. Para prevenir novos casos da doença, cerca de 3.500 pessoas foram vacinadas contra a raiva no município. O objetivo deste estudo é dosar o nível de anticorpos contra o vírus rábico presente no sangue, e foi aceito no comitê de ética do Hospital Universitário João de Barros Barreto. Tais anticorpos protegem o organismo da doença fatal, mas com o passar dos meses e anos, os mesmos diminuem no organismo. É por esta razão que devemos nos vacinar em caso de nova agressão por animal suspeito. Se você foi vacinado contra a raiva em 2005 ou 2006, poderá participar deste estudo. Para isso, precisaremos fazer algumas perguntas sobre dados pessoais como data de nascimento, sexo, peso, altura, antecedentes de doenças e medicamentos tomados durante e após a vacinação contra a raiva, assim como história de agressão por animais domésticos ou selvagens. Para a dosagem dos anticorpos, necessitaremos de 5 mililitros de seu sangue, o qual será colhido com material estéril e descartável, não apresentando risco para sua saúde, a não ser pequena dor local e/ou hematoma relacionados a técnica de colheita. O resultado do exame será fornecido por escrito 3 a 6 meses após a colheita do sangue, e caso você apresente uma taxa de anticorpos inferior a 0.5 UI/mL, uma nova dose de reforço da vacina será proposta. Estes procedimentos deverão ser realizados uma vez por ano, durante 5 anos (de 2007 a 2011), por isso solicitamos que somente as pessoas que não pretendem se mudarem nos próximos 12 meses participem do estudo. Quanto ao segredo da sua participação na pesquisa e de toda informação fornecida, esta equipe de pesquisadores garantirá total sigilo (segredo). Os dados que interessam da pesquisa serão publicados em conjunto, sem identificação de qualquer pessoa. Somente os médicos deste estudo, da sanofi pasteur e as autoridades de saúde poderão ter acesso as informações confidenciais. Deixa-se claro que sua participação é de seu livre-arbítrio, não havendo pagamento pela mesma, podendo, em qualquer momento do estudo, recusar-se a responder quaisquer perguntas, permitir análise e divulgação dos dados contidos em seu questionário. O médico responsável pelo estudo está à sua disposição para esclarecer qualquer dúvida antes que você assine o termo de consentimento, durante a após o término do mesmo. É preciso esclarecer que caso você desista de continuar nesta pesquisa, não haverá nenhum prejuízo no seu acompanhamento médico.

ii) CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre o projeto de pesquisa “**Persistência de anticorpos neutralizantes contra o vírus rábico após vacinação pré e pós-exposição e doses de reforço, em população de área rural exposta a agressão por morcegos hematófagos no Brasil**”, e que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo do mesmo, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame, além de fornecer informações sobre minha pessoa que constarão em uma ficha clínico-epidemiológica, as quais só poderão ser utilizadas em relatórios e publicações científicas.

Augusto Correa, / / 2007

Nome do Sujeito: _____ Assinatura: _____

Nome do Pai/Mãe/Tutor Legal: _____ Assinatura: _____

Pesquisador Responsável: Rita Catarina Medeiros Sousa Assinatura: _____

Endereço: Hospital Universitário João de Barros Barreto. Av. Mundurucus, Belém

Fones: 091. 3201.6652/3214.2012. Registro no CRM-PA: 5303

APÊNDICE B : FICHA INDIVIDUAL DE INCLUSÃO – 2007

PERSISTÊNCIA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O VIRUS RÁBICO
APÓS VACINAÇÃO PRÉ OU PÓS-EXPOSIÇÃO E DOSES DE REFORÇO, EM
POPULAÇÃO DE ÁREA RURAL EXPOSTA A AGRESSÃO POR MORCEGOS
HEMATÓFAGOS NO BRASIL

Protocolo RAB33

Nome do Centro de estudo:

Número do Centro de estudo: |_|_|

Número do Sujeito: |_|_| |_|_|_|_|

<p>PATROCINADOR Sanofi Pasteur S.A 2 avenue Pont Pasteur 69367 Lyon Cedex 07, France ☐: 33 4 37 37 74 75 Fax: 33 4 37 37 70 59</p> <p>PESQUISADOR COORDENADOR Rita Catarina Medeiros Souza, MD, PhD. Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia. Rodovia BR 316 – KM 07, Levilândia, Ananindeua – Pará, Brasil ☐ : +55 (91) 3214.2012 Fax: +55 (91) 3201.6662</p> <p>CHEFE DO CORPO MEDICO Guy Houillon, MD Sanofi Pasteur ☐ : 33 4 37 37 73 13 e-mail: guy.houillon@sanofipasteur.com</p> <p>COORDENADOR DO ESTUDO CLINICO Viviane Jusot, M.Sc., PG. PharMed. Sanofi Pasteur ☐: 33 4 37 37 74 75 Fax: 33 4 37 37 70 59</p>	<p>LABORATÓRIOS COLABORADORES</p> <p>Pasteur Institute Yolande Rotivel, MD Noël Tordo, PhD 28 rue du Dr Roux, 75724, Paris Cedex 15, France. ☐: 33 (0) 1 45 68 87 55 Fax : 33 (0) 1 40 61 30 15 e-mail: yrotivel@pasteur.fr ntordo@pasteur.fr</p> <p>Centro de Controle de Zoonoses Rua Santa Eulália 86, Santana - São Paulo/SP 02031 020 - Brasil ☐: 55(021)11 6224 5517 Fax: 55(021)11 62512666 Luzia Fátima Alves Martorelli, PhD Marilene Fernandes de Almeida, M.Sc., PhD e-mail: lmartorelli@prefeitura.sp.gov.br marilene@prefeitura.sp.gov.br</p>
---	--

RAB33	Artigo II.	Ficha Individual	
Número do sujeito			
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		<i>i. inclusão</i>	
SEÇÃO 2.02 DATA DA ENTREVISTA			
Data <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> <input type="text"/> 0 <input type="text"/> <input type="text"/> 7 <input type="text"/> <small>dd mm aaaa</small>		Nome do entrevistador	
INCLUSION CRITERIA			
	SIM	NÃO	
1. Nome do sujeito consta no registro de vacinação como tendo sido vacinado contra a raiva	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
2. Residente de Augusto Correa e sem planos de mudança de município pelo menos 1 ano após ter sido incluído no estudo	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
3. Concorde com colheita de amostra de sangue	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
4. Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo sujeito (se >18 anos) ou por responsável legal	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
5. Consentimento por escrito, se sujeito com 10 – 17 anos de idade	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<i>Se alguma resposta for NÃO, parar processo de inclusão</i>			
DADOS DEMOGRÁFICOS			
Sexo <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino	Peso <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> kg		
Data de nascimento <input type="text"/> <input type="text"/> <small>dd mm aaaa</small>	Altura <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> cm		
ANTECEDENTES MÓRBIDOS PESSOAIS RELEVANTES			
Seção 2.03 O sujeito apresentou alguma das condições clínicas abaixo desde a vacinação em 2005?			
	Seção 2.03 Sim	Não	Não sabe
1. Malária	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Tuberculose.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Hanseníase	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEDICAÇÕES UTILIZADAS			
Seção 2.05 O sujeito tomou alguma das medicações abaixo desde a vacinação em 2005?			
	Seção 2.05 Sim	Não	Não sabe
1. Anti-Malárico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Se Sim, especificar:</i> Cloroquina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. Soro contra animal peçonhento

RAB33	Artigo III.	Ficha Individual
Número do Sujeito		
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<i>i. Inclusão</i>	

HISTÓRIA DE VACINAÇÃO ANTIRRÁBICA EM 2005

Informação detalhada sobre a vacinação antirrábica administrada no sujeito em 2005.

Número de injeções	Sim	Não	Se Sim, Data
1 ^a Injeção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> dd mm aaaa
2 ^a Injeção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> dd mm aaaa
3 ^a Injeção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> dd mm aaaa
4 ^a Injeção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> dd mm aaaa
5 ^a Injeção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> dd mm aaaa

Tipo de vacinação: Pré-exposição Exposição Re-exposição

HISTÓRIA DE RE-VACINAÇÃO ANTIRRÁBICA (BOOSTER)

O sujeito recebeu alguma vacina antirrábica adicional após a vacinação em 2005? Sim Não Não sabe

Se Sim, especificar o número de injeções	Sim	Não	Seção 3.02 Data
1 ^a Injeção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> dd mm aaaa
2 ^a Injeção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> dd mm aaaa

Dados obtidos por: Relato oral

Documento escrito (ex: carteira de vacinação, registro de unidade de saúde)

HISTÓRIA DE EXPOSIÇÃO AO VIRUS RABICO

O sujeito foi mordido por algum animal desde a vacinação em 2005? Sim Não Não sabe

Se Sim, por qual animal?

Cão Morcego Macaco Outro..... Não sabe

Se Sim, quantas vezes? 1 vez 2 – 5 vezes >5 vezes

SEÇÃO 3.03 COLHEITA DAS AMOSTRAS E DIAGNÓSTICO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ANTI-RABICO

Amostra coletada? Sim Não Se não, por quê?

Se Sim, data da colheita

dd mm aaaa

Teste realizado

Resultados

Data do resultado obtido

RFFIT

IU/ml Não realizado

dd mm aaaa

ELISA (Platelia)

IU/ml Não realizado

dd mm aaaa

FAVN

IU/ml Não realizado

dd mm aaaa

ANEXOS

ANEXO A : ESQUEMA PARA TRATAMENTO PROFILÁTICO ANTI-RÁBICO HUMANO COM A VACINA DE CULTIVO CELULAR.

Condições do animal agressor ¹	Cão ou gato sem suspeita de raiva no momento da agressão	Cão ou gato clinicamente suspeito de raiva no momento da agressão	Cão ou gato raivoso, desaparecido ou morto; Animais silvestres (inclusive os domiciliados) ² Animais domésticos de interesse econômico ou de produção
Tipo de exposição			
Contato indireto	Lavar com água e sabão Não tratar	Lavar com água e sabão Não tratar	Lavar com água e sabão Não tratar
Acidentes leves Ferimentos superficiais, pouco extensos, geralmente únicos, em tronco e membros (exceto mãos, polpas digitais e planta dos pés); Podem acontecer em decorrência de mordeduras ou arranhaduras causadas por unha ou dente; Lambedura de pele com lesões superficiais	Lavar com água e sabão Observar o animal durante 10 dias após a exposição Se o animal permanecer sadio no período de observação, encerrar o caso Se o animal morrer, desaparecer ou se tornar raivoso, administrar 5 doses de vacina (dias 0, 3, 7, 14 e 28)	Lavar com água e sabão. Iniciar tratamento com duas doses, uma no dia 0 e outra no dia 3 Observar o animal durante 10 dias após a exposição Se a suspeita de raiva for descartada após o 10º dia de observação, suspender o tratamento e encerrar o caso Se o animal morrer, desaparecer ou se tornar raivoso, completar o esquema até 5 doses. Aplicar uma dose entre o 7º e o 10º dia e uma dose nos dias 14 e 28	Lavar com água e sabão. Iniciar imediatamente o tratamento com 5 (cinco) doses de vacina administradas nos dias 0, 3, 7, 14 e 28
Acidentes graves Ferimentos na cabeça, face, pescoço, mão, polpa digital e/ou planta do pé; Ferimentos profundos, múltiplos ou extensos, em qualquer região do corpo; Lambedura de mucosas; Lambedura de pele onde já existe lesão grave; Ferimento profundo causado por unha de gato.	Lavar com água e sabão Observar o animal durante 10 dias após exposição Iniciar tratamento com duas doses: uma no dia 0 e outra no dia 3. Se o animal permanecer sadio no período de observação, encerrar o caso Se o animal morrer, desaparecer ou se tornar raivoso, dar continuidade ao tratamento, administrando o soro ³ e completando o esquema até 5 (cinco) doses. Aplicar uma dose entre o 7º e o 10º dia e uma dose nos dias 14 e 28	Lavar com água e sabão. Iniciar o tratamento com soro ³ e 5 doses de vacina nos dias 0, 3, 7, 14 e 28 Observar o animal durante 10 dias após a exposição Se a suspeita de raiva for descartada após o 10º dia de observação, suspender o tratamento e encerrar o caso	Lavar com água e sabão Iniciar imediatamente o tratamento com soro ³ e 5 doses de vacina nos dias 0, 3, 7, 14 e 28

1. É preciso sempre avaliar os hábitos e cuidados recebidos pelo cão e gato. Podem ser dispensadas do tratamento as pessoas agredidas por cão ou gato que, com certeza, não têm risco de contrair a infecção rábica. Por exemplo, animais que vivem dentro do domicílio (exclusivamente), não têm contato com outros animais desconhecidos e que somente saem às ruas acompanhados de seus donos, que não circulem em área com a presença de morcegos hematófagos.

Em caso de dúvida, iniciar o esquema de profilaxia indicado. Se o animal for procedente de área de raiva controlada, não é necessário iniciar o tratamento. Manter o animal sob observação e só indicar o tratamento (soro + vacina) se o animal morrer, desaparecer ou se tornar raivoso.

2. Nas agressões por morcegos, deve-se indicar a soro-vacinação independente da gravidade da lesão, ou indicar conduta de reexposição.

3. Aplicação do soro perifocal na(s) porta(s) de entrada. Quando não for possível infiltrar toda a dose, a quantidade restante deve ser aplicada pela via intramuscular, podendo ser utilizada a região glútea. **Sempre aplicar em local anatômico diferente do que aplicou a vacina.**

ANEXO B : PARECER DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 402/2007

Registro CONEP: 13882 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro no CEP: 0438/2007

Processo nº 25000.048631/2007-15

Projeto de Pesquisa: *"Persistência de anticorpos neutralizantes contra o vírus rábico após vacinação pré e pós-exposição e doses de reforço, em população de área rural exposta a agressão por morcegos hematófagos no Brasil".*

Pesquisador Responsável: Dr^a. Rita Catarina Medeiros Sousa

Instituição: Hospital Universitário João de Barros Barreto / UFPA

CEP de origem: HUIBB / UFPA

Área Temática Especial: Cooperação estrangeira

Patrocinador: Sanofi Pasteur S.A.

Sumário geral do protocolo:

O objetivo geral deste estudo é verificar a persistência dos anticorpos neutralizantes antivírus rábico em indivíduos previamente vacinados contra o vírus rábico em situações de pré e pós-exposição, durante cinco anos, por meio de testes sorológicos em 500 sujeitos de pesquisa. Em 2005, mais de 3.500 habitantes do município de Augusto Correa receberam vacinação anti-rábica (Verolab), tanto em pós como em pré-exposição. O estudo será realizado na unidade básica de saúde de Arai, uma das nove unidades de saúde de Augusto Correa (Pará). Alguns receberam doses de reforço, devido a possível re-exposição ao vírus rábico após nova agressão por morcegos hematófagos. Os resultados obtidos a partir deste estudo fornecerão informações importantes sobre o impacto da vacinação pré e pós-exposição em ambiente rural, para melhor conduta diante de novos casos de raiva causados por morcegos hematófagos. Além disso, este estudo deve colher informações sobre o impacto das doses de reforço nos títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos. Cada indivíduo será acompanhado uma vez por ano, durante cinco anos. Após visita, os indivíduos que apresentarem títulos de anticorpos menor ou igual a 0.5 IU/mL receberão doses de reforço da vacina anti-rábica, de 3 a 6 meses depois.

A metodologia está adequada aos objetivos. Foi informado pelo pesquisador, que os riscos estão relacionados a técnica de coleta de sangue (dor e/ou hematoma no local da punção venosa). Os benefícios individuais estão relacionados ao conhecimento do estado imunológico de cada um diante da vacinação e reforços administrados, e para aqueles em que os títulos de anticorpos serão menor ou igual a 0.5 IU/mL será oferecido novo esquema de reforço. Como benefício coletivo, os resultados deste estudo, permitirão otimizar os programas de vacinação anti-rábica na região.

Local de realização:

O projeto não é multicêntrico. Será realizado na Universidade Federal do Pará e contará com a participação de pesquisadores da Secretaria Estadual de Saúde do Pará (SESPA), do Hospital Universitário João de Barros Barreto, do Centro de Controle de Zoonoses do Estado de SP e do Instituto Pasteur de Paris.

Cont. Parecer CONEP 402/07

Apresentação do protocolo:

O currículo do pesquisador responsável está de acordo com a proposta da pesquisa. O orçamento apresentado está adequado. Foi apresentada a brochura do investigador. O cronograma da pesquisa está adequado.

Há tratamento adequado dos dados e materiais biológicos. Serão coletados 5 ml de sangue venoso de cada participante do estudo para dosagem de anticorpos anti-rábicos por meio de testes RFFIT e Platelia® Elisa. Cada participante será identificado por um número que será colocado na ficha individual e no tubo contendo cada amostra de sangue.

Haverá envio de material biológico para o exterior. Após coleta das amostras, estas serão encaminhadas aos laboratórios de São Paulo (Centro de Controle de Zoonoses) e de Paris (Instituto Pasteur) para realização dos testes sorológicos. Duas alíquotas de cada paciente serão enviadas ao laboratório de análises clínicas do centro anti-rábico do Instituto Pasteur de Paris. Outra alíquota será enviada ao Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo e a quarta alíquota será mantida como reserva em congelador no Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. O pesquisador informa que não haverá formação de banco de materiais biológicos, sendo que todas as amostras serão destruídas após análise.

Foram apresentadas as autorizações de pesquisa do Centro de Zoonoses do município de São Paulo e do setor de endemias da Secretaria de Saúde do Estado do Pará, e Certificado de Seguro no nome da Sanofi-Aventis farmacêutica LTDA, que cobrirá reclamações por danos decorrentes da responsabilidade civil do segurado. Foi apresentada a autorização do comitê do Instituto Pasteur de Paris.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) é conciso e objetivo, está formulado na forma de convite à participação no estudo, a linguagem é adequada ao nível sócio-cultural dos participantes, permitindo a decisão consciente do sujeito de pesquisa, consta descrição suficiente dos procedimentos, identificação dos riscos e desconfortos esperados, e permite a saída do sujeito de pesquisa da experimentação, sem prejuízo de seus cuidados.

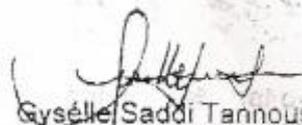
Recomendação:

1. Na folha de rosto falta preenchimento dos dados do patrocinador e da área temática especial.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 17 de maio de 2007.



Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

**ANEXO C : TÉCNICA DE MICROTESTE DE INIBIÇÃO DE FLUORESCÊNCIA
SIMPLIFICADO**



MICROTESTE DE INIBIÇÃO DE FLUORESCÊNCIA SIMPLIFICADO

Soroneutralização em cultura celular para determinação de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva (**SFIMT** Favoretto *et al*, 1993).

Responsável Técnico: Dra. Luzia Martorelli

1. Finalidade

Dosagem de anticorpos antivírus da raiva em soro humano ou animal

2. Princípio

O vírus da raiva pode ser neutralizado pela ação do anticorpo, ocorrendo à ligação Ag com fração Fc do anticorpo. Se ocorrer neutralização, o sítio de ligação do vírus estará "ocupado" e o vírus não será hábil para se ligar ao antianticorpo corado com isotiocianato de fluoresceína e a reação vista ao microscópio não produzirá a coloração verde característica, apenas o tapete celular será visto. Na ausência de anticorpo, o vírus se liga ao antianticorpo fluorescente, produzindo uma reação na qual o complexo antígeno-anticorpo se torna visível ao microscópio de fluorescência.

3. Material

Soro humano ou animal

Vírus desafio (Vírus Amostra PV - ***IB-VRS/BHK21-01/03***)

Soro controle positivo – **C +** inativado (pool de soros positivos)

Soro controle negativo – **C –** inativado (pool de soros negativos)

Soro Padrão com UI conhecida

Monocamada de células BHK21 C13 crescidas

Placas de cultura de 96 cavidades

Meio Eagle de crescimento

ATV

Salina tamponada estéril

Salina tamponada

a) Garrafas de 25 e ou 75ml

Álcool 70%

Rack com ponteiras para até 200uL, 1mL e 1 a 5mL

Micropipetas automáticas compatíveis com as ponteiras acima

Frasco vazio estéril para descarte de líquidos

Caneta retroprojeter

Canaletas

Fluxo laminar vertical

Microscópio invertido

Geladeira
 Freezer -70°C
 Câmara Úmida
 Estufa de Co_2
 Acetona 80%
 Microscópio de Imunofluorescência
 Microscópio invertido
 Luvas de procedimento estéril
 Gaze estéril em compressa
 Placa de petri
 Água destilada
 Glicerina tamponada

4. Descrição

- 1- A diluição dos soros deve ser feita direto na placa;
- 2- Todo lote de soro deve ser acompanhado de um soro padrão, um soro controle positivo e um negativo;
- 3- A suspensão de vírus PV e o conjugado devem ser titulados previamente;
- 4- Fazer protocolo dos soros que serão testados

Na capela de fluxo laminar:

- Identificar as placas com o nº e data conforme protocolo
- Fazer diluição seriada dos soros iniciando com 1:5 até 1:40

Ex: 20 μl de soro + 80 μl de meio na primeira cavidade

- Preencher as outras cavidades (2^o, 3^o e 4^o) com 50 μL de meio
- Homogeneizar o soro + meio e transferir 50 μL para a segunda cavidade
- Homogeneizar e transferir 50 μL para a terceira cavidade
- Homogeneizar e transferir 50 μL para a quarta cavidade
- Descartar 50 μL da quarta cavidade
- Adicionar 50 μl de vírus diluído conforme o título, em toda placa (o título é determinado por titulação do vírus, e este é determinado pela infecção de 80% das células)
- Incubar uma hora em estufa de CO_2 . O meio deve sofrer alteração de avermelhado para amarelo avermelhado
- Observar ao microscópio invertido o aspecto da cultura celular a ser utilizada
- Iniciar a tripizinação 10 minutos antes do término da incubação; Tripizinizar as garrafas na diluição adequada para o número de placas
- Após o descolamento das células suspende-las em 10ml de meio eagle com 2,5% de SFB. Transferir a suspensão celular para um frasco erlenmeyer siliconizado de 50mL.
- Com uma pipeta monocal, retirar uma amostra de 1,0ml e coloca-la em um frasco de vidro para contagem de células

- Após a contagem das células fazer os cálculos de diluição da suspensão celular de maneira a obter $3,7 \times 10^5$ células/mL
- Adicionar 50 μ L de células em toda placa
- Incubar 24 horas em estufa de CO₂.
- Após este tempo, retirar as placas da estufa e identifica-las placas com etiqueta com nº da placa e data com lápis (ação da acetona)
- Retirar o meio por aspiração com bomba de vácuo ou micropipeta multicanal
- Colocar 80 μ L de acetona 80% gelada, suficiente para cobrir o fundo da placa e levar ao freezer por 10 minutos
- Desprezar a acetona virando a placa na cuba de uma pia. Secar em estufa 37°C. A placa assim fixada pode ser guardada em geladeira para posterior finalização do processo
- Colocar 40 μ L do conjugado diluído em toda placa e deixar por uma hora em câmara úmida em estufa 37°C
- Desprezar o conjugado por inversão na cuba de uma pia e lavar a placa com solução salina tamponada e com água destilada por imersão na placa.
- Secar bem em estufa 37 °C
- Pingar glicerina tamponada (1 gota/cavidade). A glicerina deve ter pH básico (8,0/8,5)
- Leitura
- O ponto de corte é a diluição correspondente a 50% de decréscimo da infecção. Os resultados são obtidos pela comparação entre o ponto de corte do soro teste e um soro padrão de UI conhecida.

BIBLIOGRAFIA

SMITH, J.; YAGER, P.; e BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibodies. **Bull W.H.O.** **48**, 535-541, 1973.

FAVORETTO, S.R.; CARRIERI, M.L.; TINO, M.S.; ZANETTI, C.R.; PEREIRA, O.A. Simplified fluorescent Inhibition Microtest for the Titration of Rabies Neutralizing Antibodies. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **5** (2), 171-175, 1993.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P., 1996. **The fluorescent antibody test** in Meslin, F-X; Kaplan, M.M. and Koprowski, H. Laboratory techniques in rabies - WHO, 1996 - 4ª ed.