



ESTUDO EXPERIMENTAL EM HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*) USANDO AS AMOTRAS Goi4191 e a VACINA 17DD.

Introdução:

Face à ocorrência de duas mortes associadas temporalmente ao uso da vacina 17DD e a conclusão do grupo de peritos do Ministério da Saúde de que tais mortes se deveram a reações individuais raras causadas pela vacina da febre amarela, estabeleceu-se a necessidade de serem desenvolvidos estudos experimentais sobre a patogenicidade das amostras vacinal e dos casos de doença, em hamsters jovens. O Instituto Evandro Chagas ficou responsável pelo experimento envolvendo o lote vacinal que deu origem ao caso e a um dos isolamentos (caso de Goiânia). A seguir, são reportados os principais resultados decorrentes desses estudos.

Equipe: Participaram dos experimentos:

Seção de Arbovírus: Dr. Pedro F. C. Vasconcelos, Dra. Sueli G. Rodrigues, Sr. Basílio S. Buna;

Seção de Patologia: Dra. Vera L. R. S. Barros e Sr. Valter M. Campos.

Objetivos

Objetivo geral: Estudar o viscerotropismo da amostra Goi4191 (Be H 619301) originária do coração, passagem Vero #1, em hamsters jovens por diferentes vias de inoculação, tendo como referência a vacina 17DD (lote 98UFB088Z).

Objetivos específicos: 1. Determinar a viremia em camundongos recém nascidos e em cultivos celulares (Vero) de soro de hamsters inoculados por diferentes vias com as duas amostras experimentadas; 2. determinar os títulos virais nos diferentes órgãos dos animais inoculados; 3. determinar a resposta imune dos animais em testes de inibição da hemaglutinação (HI) e fixação do complemento (FC); 4. avaliar a extensão e os sítios de lesão provocada pelas amostras em estudo por histopatologia e imunohistoquímica.

Metodologia

Amostras usadas:

- Vacina 17DD (lote 98UFB088Z)
- Goi4191 (Be H 619301) originária do coração, passagem Vero #1

Sexo e Idade dos animais: Todos animais pertenciam ao sexo masculino e contavam à época do experimento com quatro semanas de vida

Cuidados gerais e alimentação dos animais: Todos os animais experimentados e os controles foram mantidos em gaiolas contendo quatro animais. Todos animais foram alimentados diariamente com ração para roedores, cenoura, abóbora e água “ad libitum”. Os animais foram observados duas vezes ao dia (manhã e tarde) e qualquer alteração nos mesmos era anotada em fichas de acordo a amostra inoculada e via utilizada.



Vias de inoculação: Foram usadas três vias de inoculação a saber: intracerebra (IC), intrahepática (IH) e subcutânea (SC).

Inóculo: O inóculo usado foi de 0,1ml nas vias IC, IH e SC sob experimentação. Os animais usados como controles não foram inoculados.

Dose infectante: 1000 DL₅₀/0,1ml.

Colheita de materiais: Os materiais a serem examinados foram colhidos com intervalos de 24 h até o 10º dia pós inoculação (p.i.) e também no 21º dia p.i., quando o experimento foi encerrado. Diariamente foram sacrificados dois animais de cada uma das vias por amostra inoculada e mais um controle. Assim, 14 animais foram sacrificados diariamente. Os animais foram sacrificados aleatoriamente, salvo na ocorrência de doença manifesta em que os animais doentes foram sacrificados.

Sangria dos animais: Os animais inoculados e controles foram anestesiados e punção feita por via intracardíaca, sendo colhido o máximo de sangue possível. Após a morte, todos os animais (inoculados e controles) foram necropsiados.

Colheita dos espécimes: Foram colhidos e armazenados em frascos plásticos devidamente rotulados (um para cada animal) os seguintes órgãos: encéfalo, fígado, pulmão, coração, rim e baço.

Destino dos espécimes: Os órgãos foram colhidos em duplicata, sendo uma alíquota para exames histopatológicos (neste caso os órgãos foram preservados em solução de formalina tamponada a 10%) e para estudos virológicos (quando então os órgãos eram preservados em freezer a -70°C sem conservantes)

Sangue: O sangue obtido dos animais inoculados e controles foi centrifugado a 3.000 rpm sob refrigeração (4° C) para obter o soro. Os soros foram então alíquotados e congelados a -70° C até o uso.

Uso dos soros: Os soros dos animais inoculados e controles foram usados para testes sorológicos (HI e FC), estabelecimento da viremia e para dosagem das transaminases.

Transaminases: Foram dosadas usando kits comerciais, e que se encontravam disponíveis na Seção de Patologia. Os procedimentos dos testes foram realizados de acordo com as instruções da bula do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro.

Sorologia: Os soros dos animais inoculados e controles foram testados por HI (Shope, 1963) e FC (Fulton & Dumbell, 1949).

Viremia em camundongos: Os soros dos animais inoculados e controles foram inoculados em camundongos albinos suíços recém nascidos para verificar a viremia, usando o método de diluição seriada de 10X (Beaty et al., 1989).

Resultados

Letalidade: Nenhum hamster inoculado morreu após a inoculação das amostras 17DD e Goi4191 pelas vias IC, IH e SC.

Transaminases: Não houve alteração nas taxas de transaminases. A comparação das taxas nos animais inoculados com os controles não apresentou diferença estatística significativa.

Viremia em soro: Não se detectou viremia nos soros obtidos com intervalos de 24h nas duas amostras estudadas (vacina 17DD e Goi4191). Isto é, todos os animais inoculados com os soros colhidos nos dias 1-10 e 21 p.i. não adoeceram, tendo sido o experimento encerrado sem mortes dos animais.

Viremia nos órgãos: Tanto a amostra 17DD quanto a Goi4191 mostraram títulos em camundongos recém nascidos somente no cérebro das vias IC (Figura 1). Nas demais vias e outros órgãos inoculados, não houve título, tendo sido encerrado o experimento sem mortes desses animais. Todos os soros dos animais controles foram negativos.

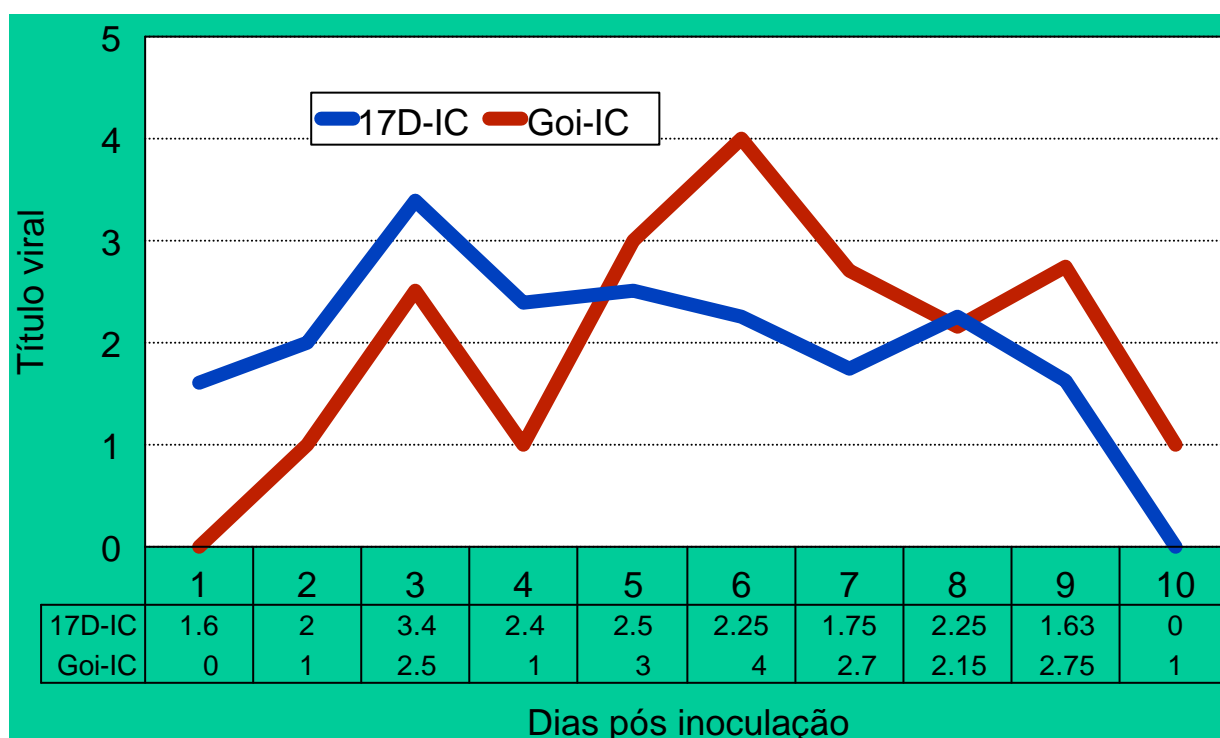


Figura 1. Resultados dos experimentos de viremia em camundongos usando cérebros de hamsters inoculados com as amostras 17DD e Goi4191, pela via IC.

Anticorpos HI: Os soros dos animais inoculados e controles submetidos aos testes HI, mostraram presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação. Estes foram detectados nos soros dos animais inoculados a partir do 5º dia p.i. na vacina 17DD via IC e 6º dia nas

vias IH e SC. Para a amostra Goi4191 se detectou anticorpos no 6º dia p.i. na via IH e 7º dia para as vias IC e SC. Os títulos persistiram até o fim do experimento (21 dias) e foram mais elevados para a amostra Goi4191 (Figura 2). Todos os soros dos controles foram negativos.

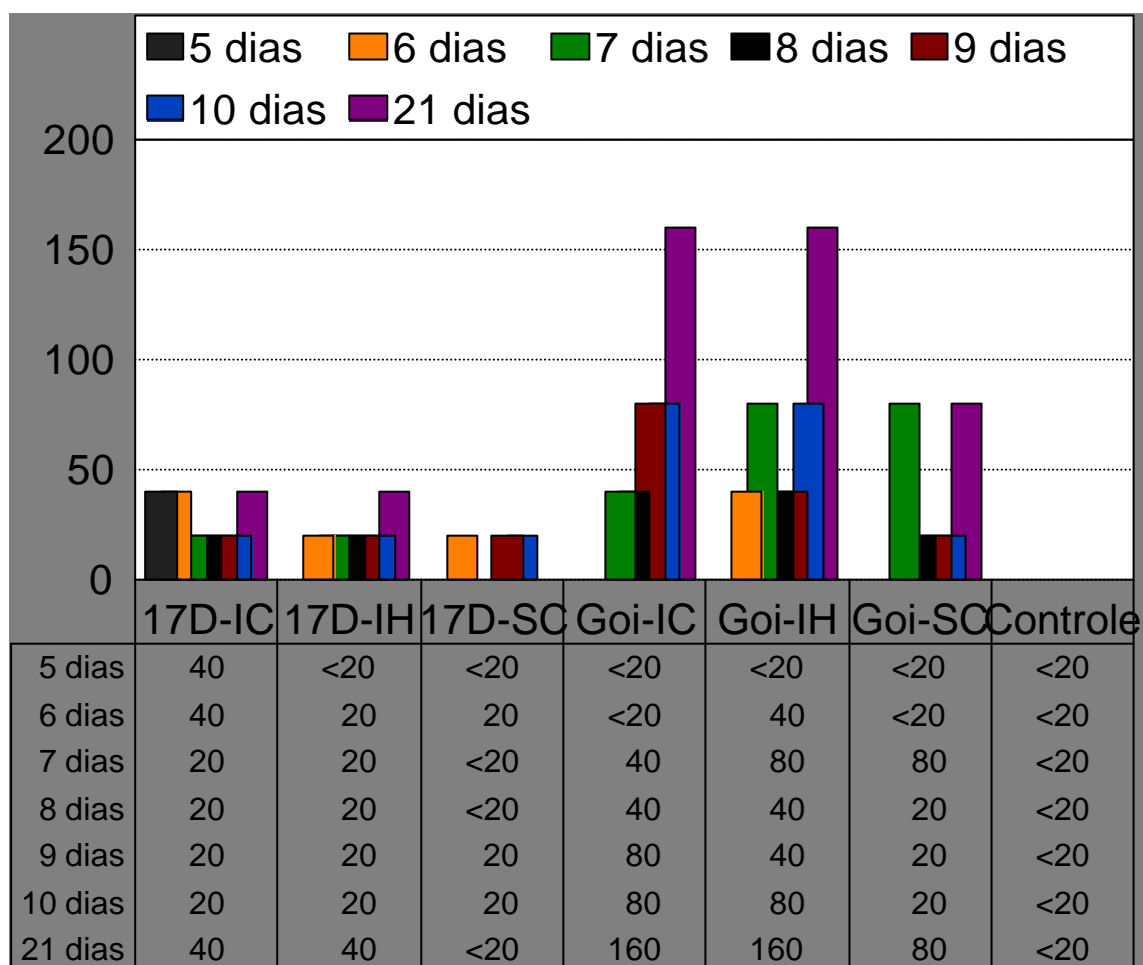


Figura 2. Resultados dos testes de inibição da hemaglutinação em hamsters inoculados com amostras do vírus da febre amarela (vacina 17DD e Goi4191) pelas vias IC, IH e SC, de acordo com o tempo de sangria.

Anticorpos FC: Os soros dos animais inoculados e controles testados por FC mostraram anticorpos FC (fixadores de complemento) nos soros dos animais inoculados detectáveis a

partir do 6º dia p.i. na vacina 17DD nas vias IC, IH e SC. Para a amostra Goi4191 se detectou no 6º dia p.i. na via IC e 7º dia para as vias IH e SC. Os títulos persistiram até o fim do experimento e foram mais elevados na via IC (21 dias: 1:256) da amostra Goi4191 (Figura 3). Os soros dos animais controles foram negativos.

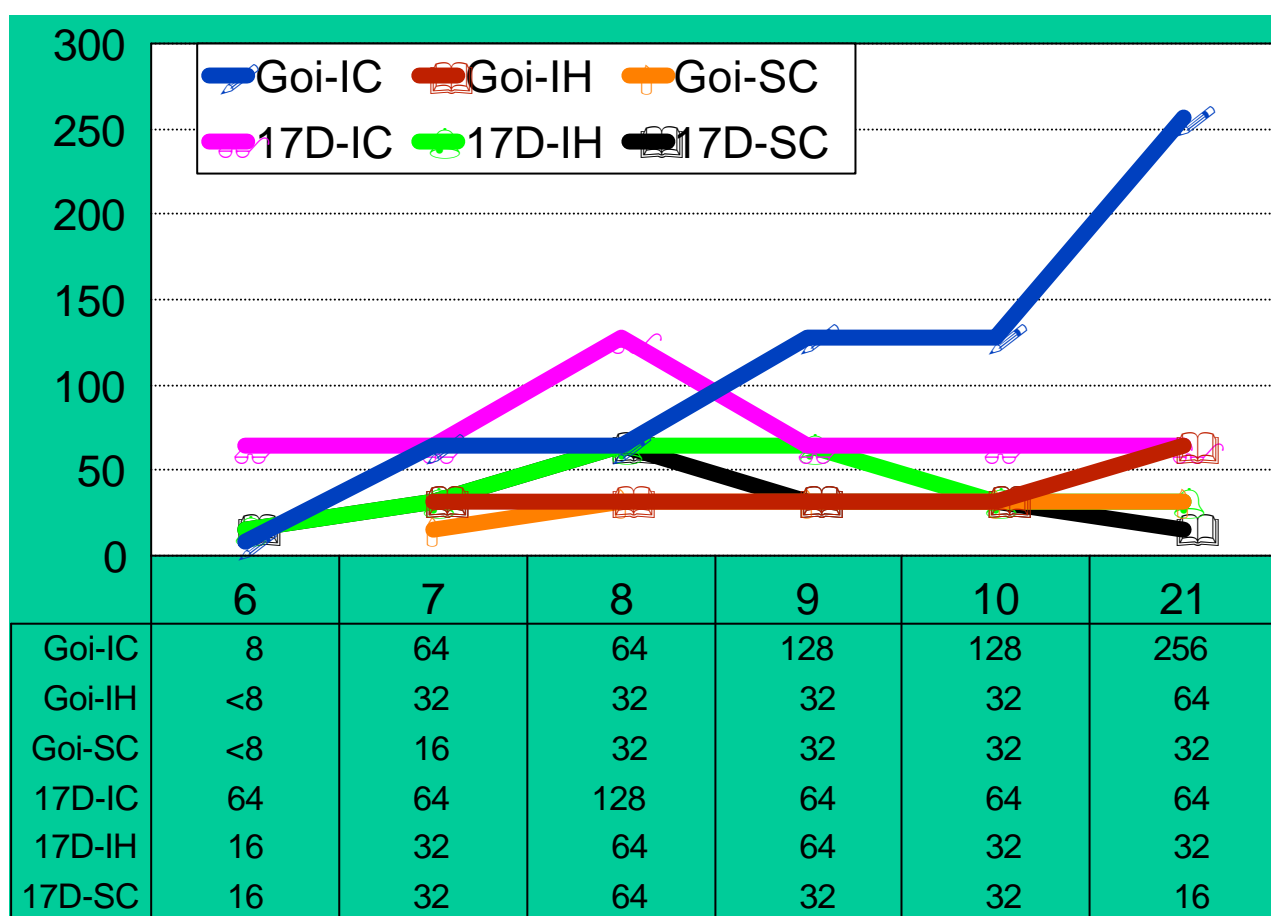


Figura 3. Resultados dos testes de fixação do complemento (FC) com soros de hamster inoculados amostras do vírus da febre amarela (vacina 17 DD e Goi4191).

Histopatologia: Os órgãos tanto dos animais inoculados quanto dos controles foram processados e corados pelo método HE (Hematoxilina-Eosina). Os espécimes obtidos após necropsia dos animais mostraram os seguintes resultados:

Goi4191-IC: presença de reação inflamatória do tipo monuclear em áreas portais nos dois primeiros dias. Os animais no 3º e 4º dias p.i. também apresentaram reação inflamatória no



parênquima em torno de focos de necrose. No 7º dia p.i. verificou-se encefalite viral. Na via IH observou-se lesões focais no parênquima constituídas de necrose limitada por reação inflamatória mononuclear nos dias 1 e 2 p.i. Nos demais dias não foram observadas alterações histopatológicas. Na via SC não se observou alterações histopatológicas nos animais inoculados. Todos os animais controles não mostraram alterações histopatológicas. Vacina 17DD-IC: Dia 1 p.i. sem alterações. Dias 2 a 10 p.i. observou-se encefalite viral. A partir do dia 8 ao dia 10 p.i. no fígado, também se observou infiltrado inflamatório do tipo mononuclear focal intralobular em torno de células necróticas e em áreas portais. As vias IH e SC não mostraram alterações histopatológicas. Todos os animais controles não apresentaram alterações histopatológicas.

Imunohistoquímica: Ainda se encontra em processamento na Seção de Patologia (Dra. Vera Barros).

Discussão e Conclusões:

Os experimentos em hamsters estão de acordo com o esperado, isto é, ocorrência de encefalite sem manifestação de hepatotropismo. Os experimentos nesses animais nos permitem concluir o seguinte: 1. Após passagem em hamsters, as amostras estudadas não desenvolveram viremia detectável em camundongos recém nascidos, exceto no cérebro dos animais inoculados pela via IC; 2. A amostra Goi4191 apresentou maior imunogenicidade quando comparada com a vacina 17DD. Isto ficou bem claro nos resultados dos testes HI e FC, principalmente na via IC; 3. Não houve alteração nos níveis de transaminases dos animais inoculados. A comparação das médias obtidas nas três vias de inoculação e nos animais controles não apresentou diferença estatística significativa, o que reforça a ausência de hepatotropismo; 4. A dose infectante usada (1000 LD50) pode ter sido insuficiente para causar viremia nos hamsters. Vale ressaltar que, esta dose foi usada por ser a dose mínima usada para vacinar seres humanos; 5. Os resultados da imunohistoquímica (Dra. Vera Barros, Seção de Patologia do IEC) podem trazer informações interessantes, pois pode comprovar a presença ou não do vírus da febre amarela (vacina 17DD e Goi4191) no fígado e demais órgãos selecionados no experimento e nas diferentes vias utilizadas; 6. Seria interessante a realização de experimento semelhante com amostras silvestres do vírus da febre amarela para comparar com os dados obtidos neste experimento. É importante ressaltar que experimento realizado pelo IEC em colaboração com a University of Texas Medical Branch (UTMB) em Galveston, EUA, mostrou que amostra silvestre do vírus da febre amarela inoculado pela via intraperitoneal mostrou hepatotropismo. Este trabalho, foi recentemente publicado no conceituado periódico *Journal of Infectious Diseases* (TESH et al, 2001), e mostra a importância desses animais para os estudos experimentais com o vírus da febre amarela face à expressão viscerotrópica do vírus nos hamsters, o que os tornam modelos para estudos experimentais com um baixo custo, ao contrário dos macacos que são extremamente caros e impõem restrições éticas.

Belém, 21 de maio de 2001

Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos



Ministério da Saúde
Fundação Nacional de Saúde

Chefe da Seção de Arbovírus do IEC

Referências:

BEATY, B.; CALISHER, C.H. & SHOPE, R.E. - Arboviruses. In: . SCHMIDT, N.J. & EMMONS, E., ed. *Diagnostic procedures for viral, chlamydial and rickettsial infections*. 6 ed. Washington, American Public Health Association, 1989. p.797-855.

FULTON F & DUMBELL KR. The serological comparison of strains of influenza virus. *J. Gen. Microbiol*, 3:97-111, 1949.

SHOPE RE. The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. *An. Microbiol. (Rio de J.)*, 11 (Parte A):167-171, 1963.

TESH RB, GUZMAN H, TRAVASSOS DA ROSA APA, VASCONCELOS PFC, DIAS LB, BUNNELL JE, ZHANG H, XIAO SY. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, Biochemical and Immunologic studies. *J Infect Dis*. 183:1431-1436, 2001.