

TERMOESTABILIDADE DA VACINA CONTRA A RAIVA, TIPO FUENZALIDA & PALACIOS, USO HUMANO

Avelino ALBAS (1), Regina Maria MOURÃO FUCHES (1), Neuza Maria FRAZATTI GALLINA (1), Rita Maria Zucatelli MENDONÇA (1), Francisco Liauw WOE FANG (2) & Elizabeth Juliana GHIURO VALENTINI (1).

RESUMO

Dez lotes de vacina contra a Raiva, tipo Fuenzalida & Palacios, líquida, uso humano, produzidos no Instituto Butantan, foram estocados às temperaturas de 45, 37, 28 e 2-8°C. Amostras de cada lote, colhidas a intervalos de tempo que variavam com a temperatura de estocagem, tiveram sua potência (valor antigênico) determinada pelo método do N.I.H. Foram consideradas satisfatórias vacinas portadoras de um valor antigênico (VA) $\geq 0,3$. Foi verificado que apenas um dos lotes apresentou VA inferior ao mínimo requerido, após 2 h de exposição a 45°C. Todos os lotes mantiveram VA satisfatório até 3 dias de armazenamento de 37°C, enquanto que, a 28 e 2-8°C, o mesmo ocorreu com 10 e 360 dias, respectivamente. À temperatura ideal de armazenamento (2-8°C), 100% dos lotes retiveram a potência mínima por período de tempo mais longo (16 meses) do que o prazo de validade (12 meses), o que permite sugerir que a validade da vacina contra a Raiva, que nos países da América Latina e Caribe é de 6 a 12 meses, poderia ser ampliada para 16 meses, de modo a evitar o descarte de produto em condições de uso.

UNITERMOS: Vacina contra a Raiva; Termoestabilidade; Potência; Valor Antigênico.

INTRODUÇÃO

A Raiva, no Brasil, assim como na maioria dos países da América Latina e Caribe, constitui grave problema de saúde pública. Segundo informes publicados pelo CEPANZO¹¹, de 1986 a 1989 foram notificados 800 casos de raiva humana nas Américas, sendo 183 no Brasil. A vacinação contra a Raiva é, pois, de fundamental importância, de vez que permite não só prevenir, mas também realizar o tratamento de pessoas agredidas por animais raiosos ou suspeitos.

A vacina contra a Raiva mais utilizada na América Latina e Caribe é do tipo Fuenzalida & Palacios⁴, cuja eficiência imunológica tem sido comprovada em vários trabalhos experimentais^{2,10,13}. Entretanto, essa eficiência é real quando seu valor antigênico (VA) é maior ou igual ao requisito mínimo de potência da vacina Referência⁵.

A vacina contra a Raiva de uso humano é distribuída pelo Ministério da Saúde a todas as regiões do país. Fatores tais como longas distâncias a serem percorridas e clima quente contribuem para expor a vacina a temperaturas inadequadas e constantemente a Rede Oficial de Saúde tem dúvidas quanto ao uso ou não de vacinas expostas a temperaturas impróprias por períodos variáveis de tempo.

Embora a estabilidade de vários tipos de vacinas contra a Raiva, em função do tempo de estocagem, tenha sido objeto de estudos^{6,7}, pesquisa mais detalhada sobre a termoestabilidade da vacina tipo Fuenzalida & Palacios (uso humano) se fazia necessária, constituindo-se no objetivo deste artigo.

MATERIAL E MÉTODOS

Vacina - Dez lotes de vacina contra a Raiva, líquida, tipo Fuenzalida & Palacios, uso humano, inativados por radiação ultra-violeta, envasados em

(1) Seção de Vírus Neurotrópicos, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

(2) Unidade de Produção de Vacina Contra o Sarampo, Instituto Butantan.

Endereço para correspondência: Dr. Avelino Albas, Instituto Butantan, Seção de Vírus Neurotrópicos. Av. Vital Brasil, 1500. CEP 05504 São Paulo, SP.

ampolas de 1,0 ml, que haviam sido produzidos há 4 meses pelo Instituto Butantan, foram utilizados nesta pesquisa. A escolha dos lotes e das ampolas foi feita ao acaso.

Vacina Referência - A vacina Referência usada foi a denominada Referência Nacional PB_{25L}, produzida a partir de cérebros de coelhos e aferida conforme Padrão Internacional do Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO), com requisito mínimo de 0,3.

Animais - Camundongos suíços albinos de 11-14 g, criados e mantidos pelo biotério do Instituto Butantan, foram utilizados em todos os testes.

Teste de Potência NIH - Para aferir o valor antigênico (VA) das vacinas, utilizou-se o método do National Institutes of Health, EUA, descrito por SELIGMANN⁹, calculando-se a DE₅₀ (dose eficaz 50%) pelo método de REED e MÜENCH⁸. Os testes de potência foram feitos duas vezes e, em cada um, foi usado um "pool" de cinco ampolas de vacina e uma amostra referência.

Vírus desafio - O vírus usado para desafio foi o CVS 31-2 (Challenge Virus Standard) do Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO - Calle Cordoba, 1901 - Martinez - Buenos Aires, Argentina), mantido através de duas passagens em cérebros de camundongos de 11-14 g⁴.

Estocagem e colheita de amostras - Vacinas ampoladas foram estocadas às temperaturas de 45, 37, 28 e 2-8°C. Amostras foram colhidas após 1, 2, 3, 4, 8 e 24 h quando estocadas a 45°C; 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 30 dias a 37°C; 10, 15, 30, 60 e 90 dias a 28°C, e a cada 90 dias até 18 meses, quando mantidas à temperatura de 2-8°C.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nos testes de potência realizados com os dez lotes de vacina contra a Raiva estocados às temperaturas de 2-8, 28, 37 e 45°C, são apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

As médias desses resultados demonstraram que os valores antigênicos (VA) dos lotes de vacina pesquisados diminuíram mais rapidamente em função do aumento da temperatura de estocagem. Assim, nas temperaturas mais elevadas a queda desses valores ocorreu num período mais curto de tempo.

Tabela 1
Valores antigênicos de dez lotes de vacina contra a Raiva tipo Fuenzalida & Palacios, estocadas a 2-8°C

VA de vacinas contra a Raiva estocadas a 2-8°C							
Lotes de Vacinas	Tempo de estocagem (dias)						
	0*	90	180	270	360	450	540
01	1,39	1,39	0,58	0,85	0,59	0,80	0,80
02	4,26	0,85	1,97	1,14	1,03	1,02	0,95
03	1,87	0,56	0,50	3,20	0,78	0,89	0,76
04	2,19	1,11	1,88	2,40	1,86	0,77	0,76
05	3,65	2,45	1,04	1,36	3,50	0,32	0,43
06	0,84	0,73	0,66	0,73	0,47	0,41	0,16
07	1,02	0,41	0,41	1,08	0,63	0,27	0,10
08	1,40	1,70	0,84	1,33	0,65	0,44	0,20
09	1,74	0,66	0,56	1,05	0,69	0,65	1,01
10	2,09	1,86	0,59	1,53	3,30	0,89	0,56
Médias (VA)	2,04	1,17	0,90	1,47	1,35	0,65	0,57

* O dia zero corresponde a uma estocagem (2-8°) de quatro meses pós-produção.

Tabela 2
Valores antigênicos de dez lotes de vacina contra a Raiva tipo Fuenzalida & Palacios, estocadas a 28°C

VA de vacinas contra a Raiva estocadas a 28°C						
Lotes de Vacinas	Tempo de estocagem (dias)					
	0*	10	15	30	60	90
01	1,39	0,52	1,12	0,31	0,68	0,11
02	4,26	1,54	1,58	0,86	1,04	0,35
03	1,87	1,33	0,45	0,08	0,31	0,28
04	2,19	2,00	0,47	0,84	1,86	0,24
05	3,65	1,36	1,80	0,53	0,47	0,29
06	0,84	0,48	0,25	0,45	0,22	0,24
07	1,02	2,00	0,46	0,37	0,20	0,14
08	1,40	1,29	0,76	0,52	0,35	0,73
09	1,74	1,24	1,58	0,44	0,19	0,15
10	2,09	0,33	0,31	0,17	0,48	0,31
Médias (VA)	2,04	1,21	0,88	0,46	0,58	0,28

* O dia zero corresponde a uma estocagem (2-8°) de quatro meses pós-produção.

Outro fator que influi nessa queda é a potência inicial da vacina, onde lotes com valores superiores vão resistir ao aumento de temperatura mantendo a potência mínima requerida (VA ≥ 0,3) por mais tempo.

Tabela 3

Valores antigênicos de dez lotes de vacinas contra a Raiva tipo Fuenzalida & Palacios, estocadas a 37°C

VA de vacinas contra a Raiva estocadas a 37°C								
Lotes de Vacinas	Tempo de estocagem (dias)							
	0*	2	3	4	5	10	15	30
01	1,39	0,51	0,59	0,25	0,37	1,22	0,83	0,07
02	4,26	0,63	0,79	0,32	1,34	0,39	0,37	0,11
03	1,87	0,47	0,39	0,23	0,35	0,23	0,33	0,45
04	2,19	0,44	0,79	0,67	0,21	0,10	0,12	0,12
05	3,65	0,60	0,80	0,32	0,32	0,30	0,22	0,10
06	0,84	0,44	0,49	0,23	0,22	1,10	0,16	0,11
07	1,02	0,70	0,66	0,29	0,12	0,19	0,12	0,20
08	1,40	0,36	0,47	0,69	0,34	0,41	0,42	0,52
09	1,74	0,66	0,56	0,67	0,57	0,51	0,14	0,09
10	2,09	0,38	0,57	0,34	0,79	0,22	0,30	0,13
Médias (VA)	2,04	0,52	0,61	0,40	0,46	0,47	0,30	0,19

* O dia zero corresponde a uma estocagem (2-8°) de quatro meses pós-produção.

Tabela 4

Valores antigênicos de dez lotes de vacina contra a Raiva tipo Fuenzalida & Palacios, estocada a 45°C

VA de Vacinas contra Raiva estocadas a 45°C							
Lotes de Vacina	Tempo de Estocagem (horas)						
	0*	1	2	3	4	8	24
01	1,39	1,21	0,32	0,24	0,44	0,43	0,20
02	4,26	1,18	0,76	0,32	0,20	0,16	0,11
03	1,87	1,99	1,10	1,49	0,68	0,76	0,20
04	2,19	1,23	0,53	0,33	0,53	0,14	0,33
05	3,65	2,75	1,01	0,34	0,40	0,36	0,21
06	0,84	0,89	0,70	0,49	0,75	0,28	0,22
07	1,02	1,46	0,24	0,35	0,28	0,23	0,14
08	1,40	1,15	0,88	0,56	0,56	0,19	0,16
09	1,74	0,67	0,37	0,17	0,27	0,13	0,07
10	2,09	0,77	0,95	0,26	0,20	0,30	0,06
Médias (VA)	2,04	1,33	0,69	0,45	0,43	0,30	0,17

* O dia zero corresponde a uma estocagem (2-8°) de quatro meses pós-produção

Após duas horas de manutenção a 45°C, um lote apresentou VA inferior a 0,3 (Quadro 1). Já a 37°C, todos os lotes mantiveram valores antigênicos satisfatórios até 3 dias de estocagem, o mesmo ocorrendo durante 10 e 360 dias, respecti-

Quadro 1

Em dez lotes de vacina contra Raiva, número de lotes que mantiveram potência mínima requerida (VA ≥ 0,3), após estocagem a 45°C

Nº de lotes que mantiveram VA ≥ 0,3	Tempo de Estocagem a 45°C (horas)						
	0	1	2	3	4	8	24
	10	10	9	7	6	4	1

vamente, às temperaturas de 28 e 2-8°C (Tabela 5). À temperatura ideal de armazenamento do produto, isto é, 2-8°C, a vacina contra a Raiva manteve a potência mínima requerida até 16 meses após a data de produção (Tabela 6).

O método utilizado para determinar a potência das vacinas (NIH), embora seja oficialmente indicado, pode apresentar grandes variações^{1,12} e para minimizá-las, todos os testes foram feitos duas vezes; portanto, os resultados representam a média dos valores obtidos.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que os dez lotes de vacina tipo Fuenzalida & Palacios, líquida, uso humano, produzidos pelo Instituto Butantan, mantiveram-se estáveis por períodos longos de tempo, quando estocados em temperatura adequada, isto é, a 2-8°C. Com VA satisfatório, a vacina induz resposta imunitária rápida, conferindo efetiva proteção contra a infecção pelo vírus rábico^{2,10,13}, o mesmo não ocorrendo quando é exposta a condições adversas, principalmente pela rápida perda de sua capacidade antigênica. Por isso, a conservação adequada do produto é essencial, principalmente nas regiões quentes, em que a temperatura pode atingir níveis próximos a 45°C.

Neste trabalho experimental, 100% dos lotes pesquisados mantiveram sua capacidade antigênica por 360 dias de estocagem à temperatura de 2-8°C, (Tabela 5) o que corresponde a 16 meses da data de produção, já que as titulações iniciais desses lotes foram feitas quatro meses após a produção.

Resultados semelhantes foram encontrados

Tabela 5

Em dez lotes de vacina contra Raiva, número de lotes que mantiveram valor antigênico $\geq 0,3$

Temp. de Estocagem (°C)	Número de lotes de vacina contra Raiva com VA $\geq 0,3$													
	Tempo de Estocagem (dias)													
	2	3	4	5	10	15	30	60	90	180	270	360	450	540
37	10	10	6	7	6	5	2	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	10	9	8	7	3	-	-	-	-	-
2-8	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	9	7

Tabela 6

Valores antigênicos apresentados por vacinas contra Raiva estocadas à temperatura de 2-8°C, em função da data de sua produção.

Lotes de Vacinas	VA de Vacinas Contra a Raiva estoc. 2-8°C				
	Tempo após produção (meses)				
	04	13	16	19	22
01	1,39	0,85	0,59	0,80	0,80
02	4,26	1,14	1,03	1,02	0,95
03	1,40	1,33	0,65	0,44	0,20
04	1,87	3,20	0,78	0,89	0,76
05	1,74	1,05	0,69	0,65	1,01
06	2,19	2,40	1,86	0,77	0,76
07	3,65	1,36	3,50	0,32	0,43
08	2,09	1,53	3,30	0,89	0,56
09	0,84	0,73	0,47	0,41	0,16
10	1,02	1,08	0,63	0,27	0,10

para seis lotes de vacinas líquidas, uso humano, obtidas de cérebro de camundongos as quais, estocadas a 4°C, foram dosadas pelo CEPANZO e mantiveram a potência mínima requerida (VA $\geq 0,3$) por 15 meses³.

Com relação à estabilidade de vacinas contra a Raiva, líquidas, uso humano, elaboradas em culturas de células, num estudo feito com dois lotes obtidos a partir de células diplóides humanas, foi observado que os VA iniciais de 13,2 e 18,5 caíram para 2,9 e 7,2, respectivamente, após 12 meses de estocagem a 4°C.

Considerando que nesta pesquisa, a vacina contra a Raiva tipo Fuenzalida & Palacios, produzida no Instituto Butantan apresentou VA satisfatório até 16 meses após sua produção, os autores consideram que, quando necessário, a ampliação do seu prazo de validade poderá ser feita

para 16 meses. Entretanto, como no 31º Informe do Comitê de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos, 1981, se recomenda que os prazos de validade das vacinas contra a Raiva sejam fixados a partir do último teste de potência com resultado satisfatório, os autores sugerem também que, para maior segurança, a ampliação do prazo de validade seja após uma redosagem da vacina, ao ser atingido seu 12º mês de produção.

SUMMARY

Thermoestability of Fuenzalida & Palacios type antirabies Vaccine (human use)

Ten lots of Fuenzalida & Palacios type antirabies vaccine for human use, produced at the Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) were stored at temperatures of 45, 37, 28 and 2-8°C. The potency of each lot was determined in samples taken at varied time intervals using the NIH method and lots presenting antigenic values $\geq 0,3$ were considered satisfactory for use. After 2 hours at 45°C the antigenic value of one out of 10 lots tested was found to be less than the minimum required value. At 37°C all lots maintained satisfactory antigenic values until the third day of storage, whilst at 28 and 2-8°C the potency was fully maintained, respectively for 10 and 360 days. At the ideal temperature of 2-8°C, 100% of the tested vaccines maintained the minimum required antigenicity for a longer period (16 months) than the expiry time of 6-12 months usually recommended for this type of biological produced in Latin American and Caribbean countries. Thus, the obtained data suggested that in countries still producing Fuenzalida & Palacios type vaccine, the expiry time could be extended to 16 months, what could prevent the unnecessary discarding of products still in useful condition.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Dr^a Edda de Rizzo Diretora do Serviço de Virologia do Instituto Butantan, pela discussão e revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTH, R.; DIEDERRICH, G. & WEINMANN, E. - NIH test, a problematic method for testing of inactivated rabies vaccine. *Vaccine*, **6**: 369-377, 1988.
2. DIAZ, A.M.O.; GONZÁLEZ RESIGNO, G.; FERNÁNDEZ MUNILLA, A.; LARGHI, O.P.; MARCHEVSKY, N. & ARROSSI, J.C. - Vacuna antirrábica de cérebro de ratón lactante. Esquemas reducidos de inmunización post-exposición. *Rev. Asoc. argent. Microbiol.*, **11**: 42-44, 1979.
3. DIAZ, A.M.O.; PERDOMO, G.N. & BECCO, O. - Estabilidad de la vacuna antirrabica de cerebro de raton lactante almacenada a distintas temperaturas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, **104**: 261-270, 1988.
4. FUENZALIDA, E. & PALACIOS, R. - Un método mejorado para la preparación de la vacuna antirrábica. *Bol. Inst. bact. Chile*, **8**: 3-10, 1950.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Manual de produção e controle da vacina contra a Raiva. Brasília, 1988.
6. NICHOLSON, K.G.; ALI, S.; BURNEY, M.I. & PERKINS, F.T. - Stability of human diploid-cell-strain rabies vaccine at high ambient temperatures. *Lancet*, **1**: 916-918, 1983.
7. NICOLAS, A.J.; PATET, J.; VINCENT-FALQUET, J.C.; BRANCHE, R.; DELATI, P.; MONTAGNON, B.; PEYRON, L. & SOULEBOT, J.P. - Production of inactivated rabies vaccine for human use on WI-38 diploid cells. Results of potency test, stability of vaccine in liquid and freeze-dried farms. *Develop. biol. Standard.*, **40**: 17-24, 1978.
8. REED, L.J. & MUENCH, H. - A simple method of estimating fifty percent end points. *Amer. J. Hyg.*, **27**: 493-497, 1938.
9. SELIGMANN, E.B. - The NIH test for potency. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. - *Laboratory technique in rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO, 1973. p. 279-286.
10. SERUFO, J.C.; GONÇALVES DE LIMA, M.; HAYASHI, Y.; MONTANO, J.A.; MORA, E. & BELLOTO, A.J. - Reduced schedule for the prophylactic treatment of rabies in man with the suckling mouse brain vaccine. *Arq. Biol. Tecnol.*, **28**: 227-243, 1985.
11. VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA RABIA EN LAS AMERICAS. Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO). v. 18-21, 1986/89.
12. WIKTOR, T.J.; ATANASIU, P.; BAHMANYAR, M.; BOGEL, K.; COX, J.H.; DÍAZ, A.M.O.; FITZGERALD, E.A.; KUWETT, E.K.; NETTER, R.; SELIMOV, M.; TURNER G. & VAN STEENIS, G. - Comparison studies on potency tests for rabies vaccines. *Develop. biol. Standard.*, **40**: 171-178, 1978.
13. ZANETTI, C.R.; FAVORETTO, S.R.; TINO, M.S.; ALBAS, A.; VALENTINI, E.J.G. & PEREIRA, O.A.C. - Reduced Schedule of human antirabies immunization with Fuenzalida & Palacios vaccine. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **31**: 23-27, 1989.

Recebido para publicação em 01/03/1991.

Aceito para publicação em 01/10/1991.