

NOTA SOBRE O EMPREGO DA GLICERINA NA CONSERVAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA AMOSTRA C.V.S. §

José de Angelis CÔRTEZ *
Moacyr Rossi NILSSON **

RFMV-A/22

CÔRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. — *Nota sobre o emprego da glicerina na conservação do vírus da raiva amostra C.V.S.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 12:235-40, 1975.

RESUMO: *Suspensões a 20% de cérebro de camundongos infectados com vírus da raiva, amostra C.V.S., foram adicionados a igual volume de diluente comum (água destilada com 2% de soro de cavalo normal), líquido de Bedson e glicerina, e estocados a -15°C .*

Os resultados obtidos nas titulações em camundongos, realizados aos 2, 60, 120, 150 e 180 dias, revelaram maior estabilidade da suspensão conservada em glicerina.

UNITERMOS: *Glicerina*; Raiva, vírus*; C.V.S.*.*

I N T R O D U Ç Ã O

A variabilidade dos resultados obtidos na determinação do poder infectante de vírus rábico de comprovação, em camundongos, interfere nos valores obtidos nos testes de potência de vacinas^{4, 12, 18} e nas provas de soroneutralização^{1,2,5,6,7,15}

Flutuação de tal natureza depende de vários fatores, entre os quais se destaca a adequada conservação da suspensão de vírus utilizada .

O frio, em temperatura situada ao redor de -70°C , tem sido utilizado com sucesso

para manter inalteradas preparações de vírus da raiva, por períodos consideráveis^{3, 4, 9, 10, 18}. Não existindo esta condição na disponibilidade desejada e na impossibilidade de adequarem-se, a curto prazo, os laboratórios carentes de recursos, urge pois, estudar-se outros processos de conservação capazes de minimizar a perda do poder infectante de suspensões deste vírus mantidas necessariamente em estoque por longo tempo.

Entre as substâncias usadas rotineiramente como conservador de amostras de

§ Nota prévia apresentada no II Congresso da Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, 1970.

* Professor Assistente Doutor.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da U.S.P.

** Médico Veterinário Pesquisador Científico Seção de Raiva e Encefalomielite do Instituto Biológico de São Paulo.

material biológico enviadas ao laboratório com evidências sugestivas de causa viral, sobressai-se primariamente a glicerina^{10,17}. Aliada às suas qualidades como conservador de tecidos há de considerar-se o seu poder de modificar o ponto crioscópico do meio líquido onde se encontra, permitindo, quando em concentração adequada, a manutenção de suspensões em estado líquido, mesmo quando submetidas às temperaturas negativas ususalmente encontradas nos congeladores comuns (-20°C).^{11,14}.

Tem, pois, o presente trabalho, a finalidade de apreciar a ação da glicerina como elemento auxiliar na conservação de suspensões do vírus da raiva.

Assim, admitindo-se como inócua a ação da glicerina, era de se esperar que os resultados obtidos nas titulações de uma suspensão de vírus da raiva tratada por esta substância, realizadas em diferentes oportunidades no decorrer de certo período de tempo, não diferissem daqueles obtidos em idênticas condições com a mesma suspensão mantida como controle ou tratada pelo líquido de Bedson.

Em contrapartida, na hipótese de sua ação ser considerada efetiva, poder-se-ia esperar a superioridade nos resultados obtidos com a suspensão de vírus tratada pela glicerina, expressa em termos de menor variabilidade nos valores resultantes.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos — Utilizamos camundongos suíços albinos pesando 10 a 15 gramas, procedentes da criação do Instituto Biológico de São Paulo, originários da Fundação Rockefeller.

Vírus — Representado por uma suspensão a 20% de cérebro de camundongos infectados com vírus fixo da raiva, amostra C.V.S., (Challenge Virus Standard) preparada recentemente.

Diluente — Água destilada contendo 2% de soro de equino normal inativado a 56°C durante 30 minutos, adicionada de 1.000

unidades de penicilina e 1,25 miligramas de estreptomicina por mililitro.

Líquido de Bedson — Solução de glicerina a 40% em água destilada, contendo tampão de fosfatos e preparada de conformidade com o descrito por SANTOS & MELLO¹⁶.

Glicerina — Utilizamos o produto puro p.a., neutro.

Titulação do vírus — A sistemática adotada para a titulação do vírus foi desenvolvida de conformidade com o estabelecido por KOPROWSKI.

Tratamentos — Desenvolvemos o nosso experimento em duas etapas.

Inicialmente, partindo-se de uma mesma fonte, preparamos três suspensões do vírus da raiva, denominadas I, II e III e procedemos a titulação em quintuplicata das duas primeiras visando verificar, em nossas condições de trabalho, a variabilidade usual do processo de titulação deste vírus em camundongos.

Num passo seguinte, a terceira suspensão foi dividida em três alíquotas iguais, a cada uma das quais agregou-se igual volume de *diluente*, *líquido de Bedson* e *glicerina*, para constituir os lotes A, B e C, respectivamente. Cada um destes lotes, após adequada homogeneização, foi dividido em dez alíquotas iguais, levadas imediatamente ao congelador onde permaneceram à temperatura de -15°C ± 3, até o momento de serem tituladas.

Imediatamente antes de cada titulação, uma alíquota correspondente a cada lote, era retirada do congelador e submetida à descongelação em água corrente. A alíquota correspondente ao lote C era dispensada desta operação, pois, já se encontrava em estado líquido, mas mesmo assim permanecia em temperatura ambiente durante o processo de descongelação das demais.

As titulações eram realizadas simultaneamente e foram levadas a efeito aos 2, 60, 120, 150 e 180 dias do preparo da suspensão.

III. RESULTADOS

Na Tabela I figuram os títulos infectantes, expressos em logaritmo de base 10, das replicações da prova de titulação das suspensões I e II de vírus da raiva amostra C.V.S., realizada em camundongos. Aparecem também, para cada suspensão, os valores da média aritmética, do desvio padrão e do coeficiente de variabilidade de Pearson.

A Tabela II apresenta os títulos infectantes, expressos em logaritmo de base 10, das provas de titulação da suspensão número III de vírus da raiva amostra C.V.S., realizadas em camundongos, segundo os tratamentos A, B e C, e a época de sua realização. Oferece ainda, para cada tratamento, os valores da média aritmética, do desvio padrão e do coeficiente de variabilidade de Pearson.

TABELA I

Títulos infectantes, expressos em logaritmo de base 10, das replicações da prova de titulação das suspensões I e II de vírus da raiva amostra — C. V. S., realizada em camundongos. São Paulo, 1975.

	Suspensão I	Suspensão II
	6.640	6.391
	6.633	6.228
	6.521	6.328
	6.453	6.033
	6.390	6.226
Média Aritmética	6.528	6.241
Desvio Padrão	0.098	0.120
Coeficiente de variabilidade de Pearson %	1.49%	1.92%

TABELA II

Títulos infectantes, expressos em logaritmo de base 10, das provas de titulação da suspensão número III de vírus da raiva amostra C. V. S., realizada em camundongos, segundo os tratamentos A, B e C e a época de sua realização. São Paulo, 1975.

Tempo de estocagem (em dias)	Tratamentos		
	A (Diluyente)	B (Líquido de Bedson)	C (Glicerina)
2	5.2	6.2	6.1
60	3.0	3.8	5.0
120	3.3	3.4	5.3
150	2.2	3.2	5.0
180	2.4	2.5	4.5
Média aritmética	3.22	3.82	5.18
Desvio Padrão	1.065	1.262	0.522
Coeficiente de variabilidade de Pearson %	32%	33%	10%

IV. DISCUSSÃO

Os dados constantes da tabela I sugerem que a titulação do vírus da raiva em camundongos, segundo a técnica descrita por KOPROWSKI⁸, apresenta boa reprodutibilidade, desde que seja realizada em condições adequadas de trabalho.

Realmente os parâmetros de dispersão calculados para distribuição de frequência dos valores correspondentes a cada uma das suspensões integrantes da aludida tabela, indicam ser bastante reduzida a variabilidade dos resultados.

Os valores da tabela II, correspondentes à titulação do vírus da raiva em diferentes oportunidades evidenciam, entretanto, que o tempo de estocagem é variável capaz de influir sobre o título infectante, em camundongos, das suspensões do vírus da raiva mantidas em condições de congelamento a -15°C, o que RAMPON & BARBESIER¹³ também verificaram, mas em temperaturas de 4 a 37°C.

Estes mesmos resultados, apreciados relativamente a cada um dos tratamentos,

possibilitam sugerir que, nas condições apontadas, quando mantido em meio com glicerina a 50%, o vírus da raiva apresenta, à titulação em camundongos, maior estabilidade, o que está em concordância com D'SILVA³.

A superioridade nos resultados do tratamento C em relação ao tratamento B, poderia ser explicada se considerássemos que embora o líquido de Bedson contenha glicerina em sua composição, a concentração final deste produto na suspensão de vírus é insuficiente para impedir o processo de congelamento à temperatura considerada.

As informações ora obtidas sugerem que suspensões de vírus assim conservadas poderiam ser vantajosamente utilizadas não só nas provas de soroneutralização, permitindo o uso de quantidades constantes de vírus em diferentes intervalos de tempo, mas também, propiciaria melhores condições de trabalho na realização das provas de potência de vacina onde a constância do poder infectante do vírus é de fundamental importância⁴.

RFMV-A/22

CÓRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. — *Studies on storage of rabies virus strain C.V.S., employing glycerin.* *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:235-40, 1975.

SUMMARY: *Twenty percent suspensions of mouse brain infected with strain C.V.S. of rabies virus were mixed with equal volumes of common diluent (distillated water with 2 percent of horse serum), Bedson solution and glycerine and stored at -15°C.*

Results obtained by mouse inoculation carried out at 2, 60, 120, 150 and 180 days, showed a greater stability of the suspension stored in glycerine.

UNITERMS: *Glycerin*; Rabies virus*; C.V.C.*.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATANASIU, P.; BAHMANYAR, M.; BALTAZARD, M.; FOX, J. P.; HABEL, K.; KAPLAN, M. M.; KISSLING, R. E.; KOMAROV, A.; KOPROWSKI, H.; LÉPINE, P.; PEREZ GALLARDO, F.; SCHEFFER, M. — Rabies neutralizing antibody response to different — schedules of serum and vaccine inoculation in non-exposed persons. Part. II. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 17:911-32, 1957.
2. CORTES, J. A. & NILSSON, M. R. — Influência da dose de vírus sobre o resultado da prova de soroneutralização em camundongos, objetivando a determinação da taxa de anticorpos anti-rábicos. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:95-106, 1974.
3. D'SILVA, C. B. — Studies on rabies. III. A note on the preparation — and storage of a local standard challenge rabies virus. *Indian Med. J. Res.*, 38: 489-91, 1950.
4. HABEL, K. & WRIGHT, J. T. — Some factors influencing the mouse potency test for rabies vaccine. *Public Health Reports*, 63(2):44-55, 1948.
5. HRONOVSKY, V. & BENDA, R. — Kinetics of reactions of rabies virus with specific antibodies in conditions of in vitro virus neutralization test. *Acta virol.*, 14:209-16, 1970.
6. ISHIZUKA, M. M. — Adaptação da prova de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. Estudo comparativo com a prova de soroneutralização. São Paulo, 1972. [Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
7. KING, D. A.; CROGHAN, D. L.; SHAW, E. L. — A rapid quantitative "in vitro" serum neutralization test for rabies antibody. *Canad. vet. J.*, 6:187-93, 1965.
8. KOPROWSKI, H. — Mouse inoculation test. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory techniques in rabies*. 2nd. Geneva, 1966, p. 69-80. (WHO Monogr. Ser., 23).
9. KOPROWSKI, H. — Guinea-pig test for chicken — embryo vaccine. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, 1966, p. 152-56. (WHO Monogr. Ser., 23).
10. LÉPINE, P. & SOHIER, R. — *Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies a virus*. Paris, Masson, 1954, p. 10-24.
11. MERYMAN, H. T. — General principles of freezing and freezing injury in cellular material. In: Freezing and drying of biological materials. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85:503-509, 1960.
12. NILSSON, M. R. — Vacinas anti-rábicas Flury HEP: relação entre o título infectante em camundongos lactentes e as provas de potência em cobaias e camundongos. Campinas, São Paulo, 1974. [Tese — Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].
13. RAMPON, R. & BARBESIER, J. — Conservation en glycérine de la virulence du virus rabique. Influence de la température. *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 40:317-27, 1962.
14. REY, L. R. — Thermal analysis of entectics in freezing solutions. In: Freezing and drying of biological materials. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85:510-34, 1960.
15. SALIDO RENGELL, F. — Respuesta serológica en personas vacunadas contra la rabia com vacuna tipo Fuenzalida. *Salud públ. Méx.*, 11(3):317-21, 1969.
16. SANTOS, J. A. & MELLO, M. R. — *Diagnóstico médico — veterinário: colheita de material*. São Paulo, Nobel, 1974, p. 57.
17. TIERKEL, E. S. — Shipment of specimens, and techniques for preparation of animal tissues. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, 1966, 17-25. (WHO Monogr. Ser., 23).
18. VEERARAGHAVAN, N. — Preparation of lyophilized rabies street virus material from infective submaxillary glands for challenge purpose. *Bull. Wld. Hlth Org.*, 17:937-42, 1957.

Recebido para publicação em 14-8-75

Aprovado para publicação em 17-9-75