

TÍTULO DO PROJETO: *Vacinação e Imunodiagnóstico na Infecção Esquistossomótica: "Estudo de Extrato Salino e suas frações visando a caracterização dos antígenos e o seu emprego na proteção à infecção".*

PROCESSO Nº: 30.0088/79-BM
 Área - Doenças Infecciosas e Parasitárias - Imunologia
 Sub-área - cód. nº 0979

RESPONSÁVEL: MIRIAM TENDLER (FIOCRUZ - LAB. ESQUISTOSSOMOSE - DEPTº HELMINTOLOGIA)

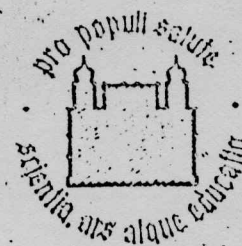
COLABORADORES: NAFTALE KATZ (FIOCRUZ - CENTRO DE PESQUISAS RENE RACHOU - BH)

A. OLIVEIRA LIMA (FUNDAÇÃO ATAU - PHO DE PAIVA, RJ)

R. R. MAGALHÃES PINTO (FIOCRUZ - LAB. ESQUISTOSSOMOSE - DEPTº HELMINTOLOGIA)

OSCAR BERRO (FIOCRUZ - BIO - MANGUINHOS)

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
 Cx. Postal 926 - CEP 20000
 Tel. (021) 280-8787 PABX
 Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

PROJETO: Vacinação e Imunodiagnóstico na Infecção Esquistossomótica: "Estudo de Extrato Salino e suas frações visando a caracterização dos antígenos e o seu emprego na proteção à infecção".
 (em continuação).

INTRODUÇÃO.

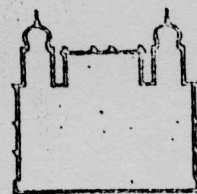
Em experiências preliminares realizadas principalmente em coelhos, observou-se acentuada atividade vacinante do antígeno, denominado Extrato Salino (ES) contra a infecção esquistossomótica posterior. Concluímos através de ensaios em cerca de 100 coelhos, que a imunização dos animais determina o desenvolvimento de importante resposta imune celular e humoral avaliada por provas específicas e significativa redução da carga parasitária, de infecção realizada após a vacinação, que representa uma taxa de 70 a 100% de proteção em relação a controles normais não vacinados (SCAPIN e cols., 1980; TENDLER e cols., 1982).

O presente projeto, refere-se à continuação dos trabalhos acima, cujos objetivos básicos presentemente, dizem respeito à avaliação da imunogenicidade do ES para sua possível utilização no homem e realização de ensaios experimentais empregando o coelho e outros animais de laboratório para a avaliação cuidadosa dos diferentes aspectos relativo ao esquema de vacinação empregado, tais como dosagem dos antígenos para cada aplicação; número de doses, vias de administração; associação com adjuvantes, visando o seu aprimoramento e aplicabilidade na vacinação humana em larga escala. Serão realizados, com o mesmo propósito, análises físico-químicas com a finalidade de se obter uma purificação adequada da vacina. (vide objetivos e delineamentos experimentais das etapas em andamento (1985) e programadas para 86/87).

Tendo em vista a acentuada atividade imunogênica e protetora do ES nos ensaios já realizados, admitimos serem os antígenos nele contidos altamente específicos e portanto adequados também ao emprego em testes de imunodiagnóstico que serão avaliados visando sua padronização.

OBJETIVOS PRIORITÁRIOS E METODOLOGIA ESPECÍFICA.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
 Cx. Postal 926 - CEP 20000
 Tel. (021) 280-8787 PABX
 Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

1 - Obtenção de vermes adultos do Schistosoma mansoni:

Para manutenção do ciclo biológico do Schistosoma mansoni (Cepa LE) inerente à obtenção dos vermes adultos empregados para a preparação dos antígenos protetores específicos, em estudo, será observada metodologia específica discriminada abaixo:

1.1. Manutenção da colônia de B. glabrata.

1.2. Infecção dos caramujos obtidos da colônia mantida no laboratório, com miracídeos de ovos eliminados por camundongos previamente infectados com a cepa LE do S. mansoni.

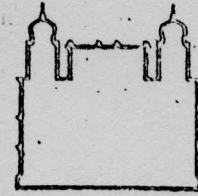
1.3. Inoculação de cerca de 200 camundongos SW/semana oriundos do Biotério Central do I.O.C., com 150-200 cercárias do S. mansoni eliminadas dos caramujos previamente infectados como descrito em 1.2., empregando as vias de infecção percutânea e subcutânea convencionais.

1.4. Recuperação dos vermes adultos, através de perfusão venosa hepática e mesentérica dos camundongos SW, após a infecção experimental, de acordo com metodologia específica, empregando solução de NaCl 0.85% e pipetadora automática (Pellegrino & Siqueira, 1956, Rev. Soc. Bras. Malariol. D. Trop., 8: 589-591).

2 - Preparação do antígeno vacinante bruto ("ES"):

O ES é obtido de vermes adultos do S. mansoni, íntegros com o emprego de solução salina extratora (NaCl 0.85M) de acordo com o método anteriormente descrito (Tendler & Scapin, 1979, Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 21: 293-296; Scapin et al., 1980, Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 22: 164-172) e abaixo sumarizado:

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
 Cx. Postal 926 - CEP 20000
 Tel. (021) 280-8787 PABX
 Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

02.

2.1. Estocagem dos vermes adultos obtidos por perfusão do sistema venoso porta hepático e mesentérico, em solução salina de composição e força iônica apropriadas, sob congelamento, por um período de tempo determinado.

2.2. Centrifugação, purificação, concentração e avaliação do teor de proteínas e carboidratos da solução de estocagem para obtenção do ES na concentração desejada.

3 - Obtenção da fração purificada "FI" para os ensaios de vacinação e imunodiagnóstico:

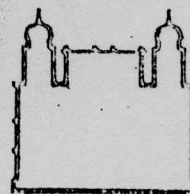
O extrato bruto (ES) é percolado em colunas de cromatografia por peneiramento molecular, utilizando-se colunas "Pharmacia" K15/90 e K26/100 cm com fase fixa de Sephadex G-100 ou G-200. As amostras de ES são concentradas por ultrafiltração molecular com sistema "Millipore" ICX10 e submetidas a cromatografia através as fases fixas adequadas e eluídas com solução salina tamponada com pH e força iônica determinadas (Scapin et al., 1980, Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 22: 164-172).

Do fracionamento descrito, a 1ª fração eluída da coluna com o volume de exclusão, foi denominada "FI", apresentou as mesmas atividades vacinantes de ES e será empregada nos protocolos específicos.

4 - Obtenção das sub-frações de "FI" para os ensaios de vacinação experimental:

FI será processada para a obtenção de FIa, FIb e FIc, de acordo com a metodologia que se segue:

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
 Cx. Postal 926 - CEP 20000
 Tel. (021) 280-8787 PABX
 Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

03.

Os componentes purificados do extrato total (FI) submetidos a uma percolação através coluna cromatográfica cuja matriz (fase fixa) é a Sépharose 4B apresentam uma conduta cujo resultado pode ser visualizado através da absorção em 280 nm (Ultra-violeta), ou ainda através do método de Lowry e cols., do conteúdo de cada tubo onde as frações são eluídas da cromatografia.

O subfracionamento, encerra fundamentalmente 3 nítidas frações detectadas por qualquer dos dois métodos empregados aqui citados (absorção 274 nm ou determinação de proteínas pelo método de Lowry e cols.).

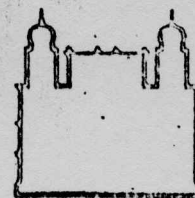
Estas tres frações denominadas F1a, F1b e F1c podem estar mais ou menos definidas seja por absorção em 274 nm ou dosagem de proteínas, de acordo com a amostra.

A sub-fração F1a é completamente excluída da coluna de Sepharose 4B. Em coluna analítica 9 cm/56 cm coletando 2,5 ml por tubo é eluída entre os tubos 5 e 7, com volume de eluição de 12,5 a 17,5 ml e por isto apresentando um coeficiente de partição (K_{av}) em torno de 0 (Zero).

A sub-fração b é retida pela coluna de Sepharose 4B. Em coluna analítica 9/56 cm e coletando 2,5 ml por tubo é eluída entre os tubos 12 a 15, com volume de eluição variando de 30 a 37,5 ml. Esta sub-fração apresenta-se com um K_{av} em torno de 0,4, apresenta uma absorção em 274 nm mais baixa que a sub-fração a, porém com um teor de proteínas detectado pelo método de Lowry e cols., mais acentuado que as sub-frações a e c.

A sub-fração c é a última a ser eluída, e na coluna em escala analítica anteriormente citada com eluição de 2,5 ml/tubo aparece nos tubos 16 e 17.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
 Cx. Postal 926 - CEP 20000
 Tel. (021) 280-8787 - PABX
 Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

04.

5 - Avaliação de diferentes parâmetros da vacinação experimental com FI:
Adequação da metodologia para vacinação humana:

5.1. Estudo da atividade imunogênica de FI no homem:

Através da avaliação da resposta imune humoral (ELISA e imuno-fluorescência) e celular (transformação blastogênica com mitógenos e antígenos específicos) em indivíduos de área endêmica de Minas Gerais. A amostra de habitantes expostos à infecção, será selecionada por meio de exames coprológicos (método Kato-Katz) e imunológicos prévios. A resposta imune induzida pela administração subcutânea de FI será avaliada por meio das provas imunológicas acima referidas, repetidas em diferentes períodos.

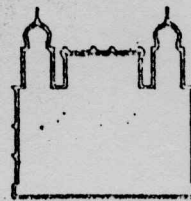
6 - Avaliação de diferentes parâmetros de vacinação experimental em ca-
mundongos e coelhos:

6.1. Dosagem ideal da fração ativa FI → utilização de doses alternativas de 25 e 50 µg de FI/dose para comparação com os resultados obtidos com 100 µg/dose.

6.2. Definição do número de doses do esquema de vacinação → ensaio de 1-3 doses, por via subcutânea para avaliação da possibilidade de eliminação do "booster" intraperitoneal.

6.3. Avaliação de adjuvantes adequados à vacinação humana → ensaio de C. parvum e B. pertussis.

6.4. Avaliação da atividade protetora das sub-frações de FI → ensaios experimentais com as sub-frações a, b, c, isoladas e em associações.



7 - Estudo da atividade imunogênica e protetora induzida por FI em macacos:

7.1. Vacinação de macacos Rhesus sp. e Cebus sp. no esquema básico utilizado para o coelho.

7.2. Estudo da resposta imune induzida pela vacinação, através de provas específicas para avaliar resposta humoral (ELISA e imunofluorescência) e celular (transformação blastogênica).

7.3. Estudo da bioquímica sanguínea (hemograma, função hepática, ureia, glicose) e sumário de urina, antes, durante e após o esquema de vacinação.

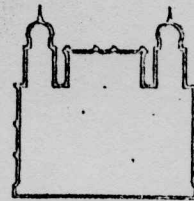
7.4. Estudo anatomo-patológico dos órgãos dos macacos vacinados com FI, antes e após o "challenge" cercariano.

7.5. Avaliação da atividade protetora induzida pela vacinação com FI através da determinação da carga parasitária (oograma seriado e perfusão no término da experiência) oriunda da infecção controlada, pós-vacinação. Correlação com os controles normais submetidos à infecção simultânea.

8 - Estudo da localização no verme adulto, dos antígenos de ES, FI e sub-frações:

Através da técnica de imunofluorescência indireta, com anti soros específicos anti soro de coelho, empregando vermes adultos e schistosômulos vivos (antes e após a extração de ES) e mortos fixados em formol a 5%.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
Cx. Postal 926 - CEP 20000
Tel: (021) 280-8787 PABX
Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

06.

9 - Avaliação da imunidade concomitante em coelhos:

Coelhos previamente infectados com 1000 cercárias serão submetidos ao "challenge" com o mesmo número de cercárias, 60 dias após a 1ª infecção.

10- Identificação dos sítios de morte parasitária, induzidos pelo antígeno específico "ES" e fração ativa "FI":

Perfusão de pele, pulmão e mesentério aos 2º, 6º, 45º e 60º dias após o "challenge" para avaliação das cargas parasitárias dos animais vacinados em relação aos controles normais.

11- Aprimoramento do imunodiagnóstico da infecção humana:

Determinar a sensibilidade e especificidade do teste intradérmico com os antígenos protetores purificados (FI) em indivíduos parasitologicamente positivos (área endêmica de Minas Gerais) e negativos (Rio Grande do Sul).

11.1. MODELO EXPERIMENTAL.

Na execução deste estudo, serão obedecidas as seguintes etapas:

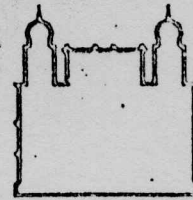
- Obtensão de vermes adultos do Schistosoma mansoni (Cepa LE de Belo Horizonte).

Desenvolvimento experimental como descrito nos itens 1.1., 1.2., 1.3. e 1.4., da preparação dos extratos vacinantes.

- Preparação do Extrato Salino (ES).

Seguir as instruções recomendadas nos itens 2.1. e 2.2. da preparação dos extratos vacinantes.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manginhos
Cx. Postal 926 - CEP 20000
Tel. (021) 280-8787 PABX
Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

07.

- Purificação e dosagem de proteínas do Extrato Salino (ES) e frações para o imunodiagnóstico.

. Diálise do ES a 4°C durante 24 horas contra a salina extrato - ra.

. Avaliação do teor proteico das partidas do Extrato Salino e ajuste da dosagem para 100 µg/ml de proteínas.

- Avaliação da atividade biológica de FI para diagnóstico da infecção humana.

Serão analisados os seguintes parâmetros: sensibilidade, toxicidade, irritabilidade inespecífica, antigenicidade e especificidade através de testes intradérmicos de leitura imediata, visando a sua padronização.

Estes ensaios serão realizados em indivíduos de diferentes faixas etárias em número superior à 100, em diversas áreas endêmicas e índices para o infecção esquistossomótica e os resultados serão comparados com os obtidos pelos exames de fezes quantitativos (método de Kato-Katz) e com a intradermoreação classicamente descrita por Pellegrino, 1968.

- Análise estatística dos resultados com o assessoramento do Dr. Carlos Maurício Antunes.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
Cx. Postal 926 - CEP 20000
Tel. (021) 280-8787 PABX
Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

08.

12 - Análise Físico-Química de ES e suas Frações:

Serão adotados os procedimentos detalhados abaixo, que permitirão a obtenção e análise da fração denominada FI, bem como outras frações a serem avaliadas, conforme as especificações metodológicas.

Metodologia:

As diferentes partidas do extrato bruto de S. mansoni (Extrato Salino - ES), serão divididas em 02 (duas) aliquotas e a uma destas, será adicionado um inibidor de proteases (phenyl, methyl sulfonyl fluoride - PMSF).

As amostras resultantes serão então submetidas à filtração em gel, metodologia na qual serão utilizadas colunas de cromatografia contendo Sephadex G-200, com o propósito de obtenção das diferentes frações componentes do ES, segundo seus respectivos pesos moleculares. A eluição será realizada através da utilização de solução salina fosfatada tamponada (PBS) 0.15M pH 6.8. Serão a seguir, comparados os perfis obtidos entre a porção do extrato bruto não tratada pelo inibidor de protease e aquela tratada pelo PMSF.

As frações eluídas da coluna contendo Sephadex G-200 serão analisadas por espectrofotometria e terão avaliadas as suas concentrações proteicas através dos métodos de Elman (método do biureto modificado) e do método de Lowry. Esse material será também submetido à focalização isoeletrica (para separação das proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (para separação dos componentes em função dos seus pesos moleculares, através dos efeitos de peneiramento molecular do gel) para a caracterização dos seus componentes.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
Cx. Postal 926 - CEP 20000
Tel. (021) 280-8787 PABX
Rio de Janeiro - RJ - BRASIL

09.

Todas as frações obtidas nesta etapa de purificação, serão tratadas por imunodifusão dupla contra soro de coelhos imunizados com o ES.

Posteriormente, todas as frações serão submetidas a uma nova etapa de purificação, utilizando-se a metodologia de cromatografia em troca iônica. Serão utilizadas colunas contendo DEAE Celulose (DE52) para cromatografia de troca aniônica e de CM celulose, para cromatografia de troca catiônica.

A eluição do material (sub-frações) será efetuada utilizando-se tampão fosfato 0.01 M pH 7.2 para a cromatografia usando DE52 e tampão fosfato 0.01 M pH 6.4 para a de troca catiônica.

As sub-frações então obtidas terão suas concentrações proteicas avaliadas pelos métodos anteriormente mencionados e serão submetidas a focalização isoelétrica, a eletroforese (SDS-PAGE) e a imunodifusão dupla contra soro de coelhos imunizados com o ES.

Os resultados dessas avaliações serão comparados com os obtidos na primeira etapa de purificação usando a cromatografia em Sephadex G-200.

As frações e sub-frações que tiverem apresentado reatividade contra os soros de coelhos imunizados com o extrato bruto, serão utilizadas na imunização de animais para verificação de suas respectivas propriedades imunogênicas e protetora.

As etapas acima discriminadas, serão desenvolvidas com a colaboração da equipe técnica do grupo de purificação de antígenos de Bio-Manguinhos, sob a Superintendência do Dr. Akira Homa e composta pelos especialistas: Oscar Jorge Berro e Otávio Oliva.

TÍTULO DO PROJETO: *Vacinação e Imunodiagnóstico na Infecção Esquistossomótica: "Estudo de Extrato Salino e suas frações visando a caracterização dos antígenos e o seu emprego na proteção à infecção".*

PROCESSO Nº: 30.0088/79-BM
Área - Doenças Infecciosas e Parasitárias - Imunologia
Sub-área - cód. nº 0979

RESPONSÁVEL: MIRIAM TENDLER (FIOCRUZ - LAB. ESQUISTOSSOMOSE - DEPTº HELMINTOLOGIA)

COLABORADORES: NAFTALE KATZ (FIOCRUZ - CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU - BH)

A. OLIVEIRA LIMA (FUNDAÇÃO ATAUÍDE DE PAIVA, RJ)

R. R. MAGALHÃES PINTO (FIOCRUZ - LAB. ESQUISTOSSOMOSE - DEPTº HELMINTOLOGIA)

OSCAR BERRO (FIOCRUZ - BIO - MANGUINHOS)

DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

- 1 - OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS DO SCHISTOSOMA MANSONI*.
- 2 - PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO VACINANTE BRUTO ("ES")*.
- 3 - OBTENÇÃO DA FRAÇÃO PURIFICADA "FI" PARA OS ENSAIOS DE VACINAÇÃO E IMUNODIAGNÓSTICO*.
- 4 - OBTENÇÃO DAS SUB-FRAÇÕES DE "FI" PARA OS ENSAIOS DE VACINAÇÃO EXPERIMENTAL*..

ETAPAS *	1	2	3	4	5	6
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Infecção de <u>B.glabrata</u> (600 ani - mais) com miracídios de <u>S.mansoni</u>	Infecção de camundongos SW (600 ani mais) com 150-200 cer. cárias	Obtenção de vermes adultos (6 g)	Extração do antígeno "ES" (240 mg proteínas/mes)	Obtenção de "FI" (49 mg proteínas/mes)	Obtenção das sub-frações FIA, FIB e FIC

* PRODUÇÃO MENSAL.

6 - AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PARÂMETROS DE VACINAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS E COELHOS.

6.1. Dosagem ideal da fração ativa FI - utilização de doses alternativas de 25 e 50 µg de FI/dose para comparação com os resultados obtidos com 100 µg/dose.

IA	0	7	28	118	163	178
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	1ª dose de imunização (via sc) de FI+C.par- <u>vum</u>	2ª dose de imunização dos grupos A, B, C, D, E e F idem à 1ª dose	3ª dose de imunização Booster intraperitoneal idem às 1ª e 2ª doses, sem adjuvante nos grupos A, B, C, D E e F	"Challenge" nos animais dos grupos A, B, C, G com 100 cercárias/animal e D, E, F e H com 1000 cercárias/animal	Perfusão dos animais dos grupos A, B, C, G	Perfusão dos grupos D, E, F, H
	grupo A: 20 cdgs. SW 25 µg FI+500µg C.par- <u>vum</u>				Avaliação de <u>Proteção*</u>	Avaliação de <u>Proteção*</u>
	grupo B: 20 cdgs. SW 50 µg FI+500µg C.par- <u>vum</u>					
	grupo C: 20 cdgs. SW 100µg FI+ 500µg C.par- <u>vum</u>					
	grupo D: 4 coelhos 25 µg FI+500µg C.par- <u>vum</u>					
	grupo E: 4 coelhos 50 µg FI+500µg C.par- <u>vum</u>					
	grupo F: 4 coelhos 100µg FI+500µg C.par- <u>vum</u>					
	grupo G: 20 cdgs. nor- mais (controle da infecção)					
	grupo H: 4 coelhos normais (controle da infecção)					

* A avaliação da proteção será dada pela fórmula:

$$P = \frac{C - V}{C} \times 100$$

onde P = % proteção

C = parasitos recuperados dos animais controle.

V = parasitos recuperados dos animais vacinados.

BR. RICCO. DN. DP. 23. 02. F14

6 - AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PARÂMETROS DE VACINAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS E COELHOS.
 6.2. Definição do número de doses do esquema de vacinação - ensaio de 1-3 doses, por via subcutânea para avaliação da possibilidade de eliminação do "booster" intrape-
 ritoneal.

DIA	0	7	28	110	170
	↓	↓	↓	↓	↓
	1ª dose de imunização com FI + <u>C. parvum</u>	2ª dose de imunização (idem à 1ª dose) nos animais dos grupos B e E	3ª dose de imunização (idem às 1ª e 2ª doses) nos animais dos grupos C e F	"Challenge" com 1000 cercárias/animal dos grupos A, B, C, D, E, F e G	Perfusão dos animais dos grupos A, B, C, D, E, F, G
	grupo A: 4 coelhos com 100µg de FI+500µg <u>C. parvum</u>				<u>Avaliação de Proteção*</u>
	grupo B: 4 coelhos com 100µg de FI+500µg <u>C. parvum</u>				
	grupo C: 4 coelhos com 100µg de FI+500µg <u>C. parvum</u>				
	grupo D: 4 coelhos com 100µg de FI+sali-na				
	grupo E: 4 coelhos com 100µg de FI+sali-na				
	grupo F: 4 coelhos com 100µg de FI+sali-na				
	grupo G: 4 coelhos normais (controle da infecção)				

*Obs.: Vide Delineamento Experimental do item 6.1.

6. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PARÂMETROS DE VACINAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS E COELHOS.

6.3. Viabilização de adjuvantes adequados à vacinação humana → ensaio de C. parvum e

B. pertussis.

DIA	0	7	28	118	163	178
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	1ª dose de imunização	2ª dose de imunização	3ª dose de imunização	"Challenge"*com 100 cercárias/a nimal nos gru - pos A, B, E, G, I e 1000 cercá - rias/animal nos grupos C, D, F, H e J	Perfusão dos animais dos grupos A, B, E, G e I <u>Avaliação da</u> <u>Proteção</u>	Perfusão dos animais dos grupos C, D, F, H e J <u>Avaliação da</u> <u>Proteção</u>
	grupo A: 20 cdgs. SW 1ª esquema	Idem à 1ª dose nos a- nimais dos grupos A, B, C, D, G, H, I e J	Idem à 1ª e 2ª doses nos animais dos gru - pos A, B, C, D, G, H, I e J			
	grupo B: 20 cdgs. SW 2ª esquema					
	grupo C: 4 coelhos 1ª esquema					
	grupo D: 4 coelhos 2ª esquema					
	grupo E: 20 cdgs. controles normais (controle da infecção)					
	grupo F: 4 coelhos (controle da infecção)					
	grupo G: 20 cdgs. 1ª dose de <u>B. pertussis</u> (controle do adjuvante de <u>B. pertussis</u>)					
	grupo H: 4 coelhos 1ª dose de <u>B. pertussis</u> (controle do adjuvan - te)			1ª esquema: 3 doses de 100 µg FI + 500 µg <u>C. parvum</u> /dose: 2ª esquema: 3 doses de 100 µg FI + <u>B. pertussis</u> /dose. * Via percutânea (método do anel).		
	grupo I: 20 cdgs. 1ª dose de <u>C. parvum</u> (controle do adjuvante)					
		grupo J: 4 coelhos. 1ª dose de <u>C. parvum</u> (controle do adjuvante).				

6. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PARÂMETROS DE VACINAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS E COELHOS.

6.4. Avaliação da atividade protetora das sub-frações de FI → ensaios experimentais com as sub-frações a, b, c, isoladas e em associações.

DIA	0	7	28	118	163	178
	†	↓	↓	↓	†	†
1ª dose de imunização		2ª dose de imunização nos grupos A, B, C, D	3ª dose de imunização nos grupos A, B, C, D	"Challenge"* com 100 cercárias/animal nos cdgs. e 1000 cercárias/animal (coelhos) dos grupos A, B, C, D e E	Perfusão nos cdgs. dos grupos A, B, C, D e E	Perfusão dos coelhos dos grupos A, B, C, D e E
grupo A: 4 coelhos e 20 cdgs. <u>Esquema 1</u>					<u>Avaliação de Proteção</u>	<u>Avaliação de Proteção</u>
grupo B: 4 coelhos e 20 cdgs. <u>Esquema 2</u>						
grupo C: 4 coelhos e 20 cdgs. <u>Esquema 3</u>						
grupo D: 4 coelhos e 20 cdgs. <u>Esquema 4</u>						
grupo E: 8 coelhos e 20 cdgs. (controles da infecção)						

* Via percutânea (método do anel).

Esquema 1 - FIa + C. parvum/dose (3 doses).

Esquema 2 - FIb + C. parvum/dose.

Esquema 3 - FIc + C. parvum/dose.

Esquema 4 - FIa + FIb + FIc + C. parvum/dose.

7. ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOGÊNICA E PROTETORA INDUZIDA POR FI EM MACACOS.

- 7.1. Vacinação de macacos Rhesus sp. e Cebus sp. no esquema básico utilizado para o coelho.
- 7.2. Estudo da resposta imune induzida pela vacinação, através de provas específicas para avaliar resposta humoral (ELISA e imunofluorescência) e celular (transformação blastogênica).
- 7.3. Estudo da bioquímica sanguínea (hemograma, função hepática, ureia, glicose) e sumário de urina, antes, durante e após o esquema de vacinação.
- 7.4. Estudo anatomo-patológico dos órgãos dos macacos vacinados com FI após o "challenge" cercariano.
- 7.5. Avaliação da atividade protetora induzida pela vacinação com FI através da determinação da carga parasitária (cograma seriado e perfusão no término da experiência) oriunda da infecção controlada, pós-vacinação. Correlação com os controles normais submetidos à infecção simultânea.

DIA	0	1	7	15	28	117	118	148	170	178
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
1ª sangria dos grupos A,B,C,D,E, e cograma	1ª dose de imunização grupo A: 4 macacos Rhesus sp. 1ª esque - ma*	2ª dose de imunização idem à 1ª, dos ani - mais dos grupos A,B C,D	2ª sangria dos grupos A,B,C,D	3ª dose de imunização idem às 1ª e 2ª, dos animais dos grupos A,B,C,D	3ª sangria dos grupos A,B,C,D	"Challenge" com 2000 cercárias via percutânea dos grupos A,B,C,D E,F	4ª sangria dos grupos A,B,C,D,E, F e coleta de fezes e cograma dos mesmos	5ª sangria coleta de fezes e cograma (idem à 4ª)	Perfusão dos animais dos grupos A, B, C,D,E,F	Avaliação da proteção e estudo anatômico das visceras
	grupo B: 4 macacos Cebus sp. 1ª esque - ma*									
	grupo C: 4 macacos Rhesus sp. 2ª esque - ma**									
	grupo D: 4 macacos Cebus sp. 2ª esque - ma**									
	grupo E: 2 macacos Rhesus sp. controles da infecção									
	grupo F: 2 macacos Cebus sp. controles da infecção									

*1ª esquema: 100 µg FI + 1000 µg C. parvum/dose via sc.
 **2ª esquema: 1000 µg C. parvum + salina/dose via sc.

Observações:

As etapas 7.2, 7.3 serão desenvolvidas a partir do material obtido das sangrias que serão acompanhadas por exame do sedimento urinário.

9 - AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CONCOMITANTE EM COELHOS.

DIA	0	60	120
	+	+	+
	1ª infecção (1.000 cercárias/animal) 12 coelhos (grupos A, B, C) 30 cãgs. (100 cercá - rias/animal)	Perfusão 4 coelhos (grupo A) 20 cãgs. (controles da infecção)	Perfusão dos animais dos grupos B, C e D
		2ª infecção 4 coelhos (grupo B) 20 cãgs.	
		1ª infecção 4 coelhos (grupo D) 20 cãgs.	

Grupos experimentais.

4 grupos (A, B, C, D) constituídos de 4 coelhos + 20 camundongos/grupo.

Coelhos: infecção com 1.000 cercárias/animal.