Pedro Manuel Leal Germano

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS PROVAS DE SORONEUTRALIZAÇÃO E
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS
ANTI-RÁBICOS EM SOROS DE CÃES, E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO
DA VACINA ANTI-RÁBICA PREPARADA EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS
LACTENTES, APLICADA EM CÃES PRIMO VACINADOS, EM CONDIÇÕES NATURAIS**

**Trabalho apresentado à Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo, para
a obtenção do Título de Doutor**

**São Paulo
1981**

Aos meus pais,
esposa e
filho.

Ao Professor Doutor Gil Vianna Paim
pela orientação e incentivo.

Ao Professor Doutor Adolpho Ribeiro Netto
pelo muito que aprendemos com sua colaboração.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a. Masaio Mizuno Ishizuka

Ao Prof. Dr. Moacyr Rossi Nilsson

À Dr^a. Luiza Terezinha M.S. Morita

À Dr^a. Esther Luiza B. Chamelet

À Srt^a Ana Maria Silveira Barone

À Srt^a Leonor Vasconcelos da Silva

pela valiosa colaboração e apoio técnico
prestados a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Omar Miguel

Ao Prof. Dr. José Alberto Neves Candeias

Ao Prof. Dr. José Maria Pacheco de Souza

pelas críticas e sugestões.

E, a todos que direta ou indiretamente
colaboraram na execução deste trabalho.

R E S U M O.

RESUMO.

Procedeu-se ao estudo comparativo entre as provas de soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI) para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de cães. A prova de IFI apresentou associação significativa de alta intensidade e elevada concordância com a prova de SN, não se verificando, porém, correlação significativa entre os resultados obtidos por ambas as provas.

A avaliação do comportamento da vacina anti-rábica, preparada em cérebros de camundongos lactentes e aplicada em cães nunca antes vacinados, revelou pela prova de SN uma ascensão lenta e de pequena magnitude e um declínio rápido, da curva das medianas dos títulos de anticorpos anti-rábicos, já aos 45 dias da vacinação. Relativamente à prova de IFI, a resposta imunitária revelou-se mais intensa, e o declínio da curva das medianas dos títulos de anticorpos ocorreu aos 60 dias da vacinação.

S U M M A R Y.

S U M M A R Y.

A comparative study was made between the serum-neutralization (SN) and indirect immunofluorescence (IIF) techniques for the evaluation of rabies antibodies in sera from dogs. The IIF technic showed significant association of high intensity and concordance with the SN technic. No significant correlation, however, was observed between the results obtained from both techniques.

The evaluation of the suckling-mouse-brain rabies vaccine, applied in dogs never vaccinated before, showed by the SN technic a slow rise of small magnitude and a fast decline of the curve of the median rabies antibodies titers, as early as 45 days after vaccination. With regard to the IIF technic, the immunitary reaction showed itself more sensitive, and the decline of the curve of the median antibodies titers occurred 60 days after vaccination.

Í N D I C E

	pág.
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
1. Material.....	6
1.1. Soros.....	6
1.1.1. Para o estudo comparativo entre as pro vas de SN e IFI.....	6
1.1.2. Para a avaliação do comportamento da vacina anti-rábica preparada em cêre bro de camundongos lactentes.....	6
1.1.3. Coleta e Conservação.....	7
1.1.4. Critério de classificação.....	7
1.2. Camundongos.....	7
1.3. Suspensão de cérebro de camundongo normal (CN)	8
1.4. Suspensão de vírus.....	8
1.5. Decalques.....	8
1.6. Conjugado anti-globulina canina-fluoresceína	9
1.6.1. Anti-gama-globulina de cão.....	9
1.6.2. Marcação das anti-globulinas.....	9
1.6.2.1. Determinação da atividade fluorescente inespecífica...	10
1.6.2.2. Determinação da atividade fluo rescente específica.....	10
1.7. Soros testemunhos.....	11
1.8. Decalques testemunhos.....	11
1.9. Vacina.....	11
2. Métodos.....	11
2.1. Soroneutralização.....	11
2.2. Imunofluorescência indireta.....	12
2.3. Análise estatística.....	13
III. RESULTADOS.....	14
IV. DISCUSSÃO.....	20
V. CONCLUSÕES.....	30
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

I . INTRODUÇÃO .

I. INTRODUÇÃO.

Na raiva urbana, a espécie canina representa a principal fonte de infecção para o homem ^{19, 43}; assim, a prevenção desta doença baseia-se fundamentalmente na imunização ativa da população canina ^{10, 47, 51, 55}, mediante a instituição de programas de vacinação em massa da população canina, bem como, na apreensão e sacrifício dos cães errantes ⁵¹.

O número de casos de raiva canina e os verificados no homem apresentam relação estreita, pois quando do controle adequado da doença no cão, o número de casos no homem cai proporcionalmente ⁴³, bem como o número de tratamentos vacinais humanos pós-exposição ⁵⁰.

Para que estes programas possam trazer os efeitos desejados é necessário que as vacinas utilizadas tenham eficiência conhecida e comprovada ³⁹ e que confirmem imunidade duradoura ⁴⁶.

A eficiência de uma determinada vacina anti-rábica pode ser avaliada através da utilização de provas sorológicas, as quais revelam os níveis de anticorpos séricos específicos ³⁰, nos animais ou nos seres humanos, fornecendo desta

forma, subsídios valiosos para este tipo de estudo epidemiológico ⁴⁷. Isto se prende ao fato de estar suficientemente comprovado que a presença de anticorpos séricos pós vacinais indica proteção contra a infecção pelo vírus rábico ^{2, 7, 9, 11, 37}, embora não sejam estes anticorpos os únicos responsáveis pela imunidade ^{3, 15, 23, 37, 42, 45, 52}.

Dentre todas as provas sorológicas, a soroneutralização (SN) é o método mais tradicional para a detecção do anticorpo anti-rábico ^{1, 32, 49, 54} tanto no homem quanto nos animais ⁴⁸, posto que os níveis de anticorpos mensuráveis, por sua aplicação, apresentam estreita relação com os resultados do "challenge" ^{7, 11, 43, 48} sendo considerada até o momento como prova padrão ^{9, 17, 24, 36}. No entanto, apresenta várias limitações de correntes da variabilidade apresentada pelos diferentes valores da DL_{50} do vírus empregado em diferentes provas para fins de titulação dos soros, do elevado número de camundongos a utilizar, da variabilidade de respostas resultantes de outros fatores inerentes ao próprio sistema biológico, além do tempo prolongado necessário à leitura de resultados ^{9, 24, 27, 29, 32, 34, 35, 37, 49}.

Tais restrições motivaram pesquisas para o desenvolvimento de outras provas sorológicas que oferecessem maior praticidade, tomando naturalmente como marco de referência a prova de SN. Assim, as provas de inibição da hemaglutinação (IHA) e SN, são comparáveis, embora a sensibilidade de IHA seja inferior à da SN ⁵⁵. Os resultados obtidos através da prova de hemaglutinação passiva (HAP) apresentam correlação com aqueles da SN, no entanto, tem como desvantagens principais, as dificuldades técnicas no preparo do antígeno e na obtenção dos eritrócitos apropriados ²¹.

A prova de fixação do complemento (FC) pode ser utilizada para a determinação quantitativa de anticorpos anti-rálicos ^{28, 31, 33, 36, 37}, todavia, em muitos estudos comparativos a FC foi considerada como menos sensível do que a SN, especialmente na detecção de anticorpos precoces ou na determinação de títulos residuais de longa duração ⁵⁵.

JIRAN & ZÁVORA (1975) ²⁶ utilizando treze soros de cães vacinados contra a raiva, foram de parecer que a prova de IFI é apenas um teste adicional e de orientação para a avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-rábicos e indicaram ausência de relação entre os títulos de anticorpos determinados por ambas as provas (SN e IFI).

A vacina anti-rábica, preparada em cérebros de camundongos lactentes (FUENZALIDA & PALAZIOS, 1955 ¹⁸), foi utilizada pela primeira vez em programas de imunização em massa, em 1961 no Chile, mais precisamente nas cidades de Santiago e Valparaíso ⁵¹. Em 1964, os resultados práticos destas campanhas de vacinação, concomitantes com a erradicação de cães errantes, demonstraram sensível redução no número de animais raios ⁵¹.

SIKES e cols. (1971) ⁴⁴ realizaram estudo comparativo entre cinco tipos de vacinas de vírus vivo modificado (amostra Flury origem de embrião de galinha, baixa passagem; amostra Flury em cultura de tecido de fibroblasto de galinha, baixa passagem; amostra Flury em cultura de tecido de rim de cão, alta passagem; amostra Flury em cultura de tecido de rim de hamster, baixa passagem; e amostra ERA em cultura de tecido de rim de porco) e três tipos de vacinas inativadas (CVS - challenge virus standard - em cultura de tecido de rim de hamster com adjuvante, vacina preparada em cérebros de camundongos lactentes e vacina de vírus purificado). Cada uma destas vacinas, foi aplicada em animais da espécie canina como primo vacinação, em condições experimentais. Todas as vacinas de vírus vivo modificado conferiram imunidade por 12 meses e 100% de sobrevivência dos animais submetidos ao "challenge". Das vacinas de vírus inativado, a preparada em cérebros de camundongos lactentes e utilizada nas campanhas de vacinação anti-rábica na América Latina, foi superior à de CVS em cultura de tecido de rim de hamster com adjuvante, observando-se 100% de sobrevivência ao "challenge" após um ano da sua aplicação e 80% ao final de 3 anos. A única vacina que conferiu imunidade por 3 anos, com 100% de sobrevivência ao "challenge" foi a de vírus rábico purificado.

FIELDS e cols. (1976) ¹⁶ também estudaram a duração da imunidade conferida pela vacina anti-rábica preparada em cêrebros de camundongos lactentes, em cães primo vacinados e em condições experimentais. Os resultados obtidos por estes autores, quando comparados âqueles obtidos por SIKES e cols. (1971) ⁴⁴ para o mesmo tipo de vacina, evidenciaram comportamento semelhante, observando-se 100% de sobrevivência ao "challenge" 37 meses após a aplicação da vacina.

A partir dos resultados práticos das campanhas de vacinação em massa da população canina, realizadas no Chile ⁵¹ e daqueles obtidos em condições experimentais por SIKES e cols. (1971) ⁴⁴, a vacina anti-rábica preparada em cêrebros de camundongos lactentes foi adotada em toda a América Latina, e particularmente no Brasil, nos programas de controle da raiva urbana ⁴³.

Desta forma, o presente trabalho propõe-se, de um lado a comparar, em soros de cães, o comportamento das provas de SN e IFI segundo dois critérios: qualitativo e quantitativo. Assim, pretende-se verificar em que medida há concordância de resultados quando soros de cães, submetidos às provas de SN e IFI são classificados como reagentes ou não reagentes a pelo menos uma delas, e como se correlacionam os resultados de ambas as provas quando se procede à titulação dos soros de cães reagentes a pelo menos uma delas.

Propõe-se ainda, por outro lado, a estudar o comportamento da resposta imunitária de cães primo vacinados com a vacina anti-rábica preparada em cêrebros de camundongos lactentes. Para a realização deste estudo, utilizar-se-á a prova sorológica que, no objetivo anterior deste trabalho, apresentar maior grau de indicação de reagentes, desde que os resultados obtidos por ambas as provas (SN e IFI) apresentem correlação.

II. MATERIAL E MÉTODOS.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1. Soros

1.1.1. Para o estudo comparativo entre as provas de SN e IFI

Foram testadas 90 amostras de soros, pertencentes a 90 animais da espécie canina, com idades compreendidas entre 6 e 18 meses, procedentes do Ambulatório do Serviço Médico Cirúrgico e Hospitalar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

1.1 2. Para a avaliação do comportamento da vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes

Foram testadas 80 amostras de soros procedentes de 20 animais da espécie canina com idades variando de 4 a 6 meses, sem antecedentes de vacinação anti-rábica, cujas

amostras de soros previamente submetidas às provas de SN e IFI, comprovaram a condição de não portadores de anticorpos anti-rábicos, simultaneamente a ambas as provas. Estes cães haviam sido primo vacinados com uma única dose de vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes e amostras de soro foram coletadas no dia da vacinação e 21, 45, 60 e 90 dias após a aplicação da vacina. Os animais foram mantidos nos domicílios de seus proprietários em diferentes locais do Município de São Paulo.

1.1.3. Coleta e Conservação

Todas as amostras de soro, foram coletadas através dos métodos usuais e conservadas à temperatura de -20°C , até o momento de sua utilização.

1.1.4. Critério de classificação

Os soros, após serem submetidos às provas de SN e IFI, foram classificados em reagentes e não reagentes. O critério adotado para se classificar um dado soro como reagente, para qualquer uma das provas, foi o da presença de anticorpos anti-rábicos na diluição de 1:5. Como não reagente, foi classificado o soro, que nesta mesma diluição, não apresentava anticorpos anti-rábicos (valor nulo), sendo o seu título considerado como <5 (menor do que cinco).

1.2. Camundongos

Foram utilizados camundongos albinos suíços, normais, com pesos variando entre 11 e 15 g, pertencentes à criação do Instituto Biológico da Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura de São Paulo, tanto para o preparo das suspensões de cérebro de camundongo normal e de vírus quanto para a realização da prova de SN.

1.3. Suspensão de cérebro de camundongo normal (CN)

A partir de um lote de 500 camundongos, sacrificados com éter, foram coletados assepticamente os cérebros destes animais. O processo de desagregação dos cérebros foi realizado com o auxílio de um "mixer", preparando-se uma suspensão a 20% em água destilada contendo 2% de soro normal de cavalo. Após centrifugação a 1.500 r.p.m., durante 15 minutos, alíquotas do sobrenadante foram acondicionadas em frascos estéreis, com capacidade para 10 ml, e mantidas a -20°C até o momento do uso.

1.4. Suspensão de vírus

A semente de CVS (challenge virus standard), fornecida pela Seção de Raiva e Encefalomyelite do Instituto Biológico da Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura de São Paulo, foi inoculada em um lote de 10 camundongos, por via intracerebral. Após sacrificados com éter na fase final da doença, foram coletados assepticamente os cérebros destes animais, utilizando-se os procedimentos anteriores. Preparada uma suspensão a 10^{-4} com este material, procedeu-se à inoculação de outro lote de 10 camundongos, com a finalidade de aumentar o título do vírus. O material coletado deste segundo lote foi inoculado em aproximadamente 500 camundongos que, após sacrificados na fase da doença, forneceram a matéria prima para o preparo da suspensão de CVS a 20% em água destilada contendo 2% de soro normal de cavalo. Antes de cada fase de inoculação, amostras dos inóculos foram submetidas às provas de esterilidade bacteriana de rotina. O título obtido para a suspensão de vírus foi igual a $10^5 \text{ DL}_{50}/0,03 \text{ ml}$.

1.5. Decalques

Os decalques em número de oito por lâmina, foram preparados a partir de cérebros (cornos de Ammon) de cães comprovadamente raivosos, obtidos junto ao Instituto Pasteur da Secretaria de Estado dos Negócios da Saúde de São Paulo. Antes

de sua utilização como antígeno, o material era submetido à prova de imunofluorescência direta conforme DEAN (1973)¹² para fins de confirmação de positividade e avaliação de riqueza do material em corpúsculos de Negri. Os decalques foram fixados em acetona a -20°C , durante 4 horas, sendo mantidos, posteriormente, à mesma temperatura até o momento do uso, nunca excedendo a 48 horas.

1.6. Conjugado anti-globulina canina-fluoresceína

O preparo do conjugado empregado na execução da prova de IFI, foi efetuado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com ISHIZUKA e cols. (1974)²⁵.

1.6.1. Anti-gama-globulina de cão

Foram utilizados dois coelhos albinos, adultos, procedentes da criação do Instituto Butantã da Secretaria de Estado dos Negócios da Saúde de São Paulo, para inoculação de gama-globulina canina, previamente fracionada com solução de sulfato de amônio saturada, obedecendo ao esquema de imunização preconizado por CAMARGO (1967)⁸. A resposta imunitária destes animais foi acompanhada empregando-se a técnica de precipitação em gel de ágar como descrito por BEUTNER (1965)⁵. Utilizaram-se os animais que apresentaram título igual ou superior a 128.

1.6.2. Marcação das anti-globulinas

Utilizou-se o isotiocianato de fluoresceína, BBL, isômero I, cristalino, cromatograficamente puro, lote 9101581, para a marcação pelo método lento. O excesso de fluorocromo foi retirado por gel filtração em coluna de Sephadex G 25, de acordo com a técnica descrita por CAMARGO (1967)⁸. As características do conjugado obtido foram as seguintes:

- Isotiocianato de fluoresceína (F) 9,1 mg %
- Proteína (globulina) (P) 2,2 mg %
- Relação ponderal F/P $4,1 \times 10^{-3}$

As dosagens foram realizadas de acordo com BEUTNER (1971)⁶.

1.6.2.1. Determinação da atividade de fluorescente inespecífica

Submeteram-se à ação de diferentes diluições de conjugado, 1:2, 1:4, 1:16 e 1:32, decalques de cérebros (cornos de Ammon) procedentes de cães raivosos e normais. Em nenhum destes decalques assim tratados foi observada coloração inespecífica.

1.6.2.2. Determinação da atividade fluorescente específica

Foram preparados dois pares de lâminas, cada uma com cinco decalques de cérebros (cornos de Ammon) procedentes de cão raivoso e de cão normal, respectivamente. Cada par compreendia uma lâmina com decalques positivos e a outra com negativos. Um dos pares foi tratado com soro reagente à prova de SN e outro com não reagente, nas diluições de 1:5. O conjugado foi diluído na razão 2 a partir do puro (1:1 até 1:16) e à diluição foram adicionadas suspensão de cérebro de camundongo normal e solução de Azul de Evans a 0,02 g %, na proporção de uma parte de conjugado diluído, três partes de suspensão de cérebro de camundongo normal e quatro partes de Azul de Evans. Os decalques positivos tratados com soro reagente apresentaram intensa fluorescência em todas as diluições, e ausência de fluorescência em todas as diluições dos decalques testemunhos. O conjugado foi posteriormente diluído, ainda na razão 2, até 1:256, e submetido ao procedimento anterior, verificando-se fluorescência até à diluição 1:128 e ausência na 1:256. O conjugado foi utilizado na diluição de 1:16.

1.7. Soros testemunhos

A cada diluição incluiu-se um soro reagente às provas de SN e IFI.

1.8. Decalques testemunhos

Examinaram-se sistematicamente, em paralelo, preparados testemunhos de decalques de cérebro (corno de Ammon) de cão normal.

1.9. Vacina

Utilizou-se a vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes ¹⁸ inativada pela β -propiolactona, aplicada por via subcutânea na dose de 2 mililitros por animal. Este tipo de vacina pertencia à partida 05-76 do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), e o grau de potência, determinado pelo método de HABEL ²² forneceu um valor igual a 48.350 DL₅₀.

2. Métodos

2.1. Soroneutralização

Realizada no serviço de rotina da Seção de Raiva e Encefalomielite do Instituto Biológico da Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura de São Paulo, de acordo com o preconizado por ATANASIU (1967) ¹, oscilando as DL₅₀ do vírus entre 10 e 40.

As amostras dos soros foram descongeladas à temperatura ambiente e, posteriormente, inativadas em banho-maria a 56°C durante 30 minutos. Cada uma destas amostras foi diluída a 1:2,5, 1:12,5 e 1:62,5 em água destilada contendo 2% de soro normal de cavalo, de modo a que no final das diluições cada uma delas apresentasse um volume de 0,4 ml. A cada uma

destas diluições foi adicionada 0,4 ml da suspensão de vírus, que mediante titulação prévia correspondia a 40 DL₅₀, elevando deste modo as diluições para 1:5, 1:25 e 1:125, respectivamente. Simultaneamente, a suspensão de vírus era titulada, fazendo-se quatro diluições múltiplas de 10 a partir da DL₅₀ utilizada, adicionando-se a cada uma delas, igual quantidade de soro de cão normal (0,4 ml) desprovido de anticorpos anti-rábicos e previamente inativado em banho-maria a 56°C durante 30 minutos. As amostras homogeneizadas foram colocadas em estufa à temperatura de 37°C durante 90 minutos, e após, transferidas para banho de gelo, procedendo-se à inoculação intracerebral dos camundongos, na dose de 0,03 ml por animal. Para a dosagem dos soros, os camundongos foram distribuídos uniformemente em lotes de 5 animais para cada diluição, enquanto que para a titulação da suspensão de vírus utilizaram-se 10 camundongos por diluição. O período de observação destes animais foi de 21 dias, registrando-se tão somente, os óbitos ocorridos a partir do 4º dia da inoculação, após a manifestação dos sinais clínicos de raiva. Os títulos dos soros e da suspensão de vírus foram calculados empregando-se o método de REED & MUENCH (1938) ³⁸.

2.2. Imunofluorescência indireta

Realizada no Laboratório de Imunologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com a técnica de CAMARGO (1967) ⁸ e adaptação de ISHIZUKA (1972) ²⁴.

As amostras dos soros após descongeladas e adequadamente inativadas, foram diluídas paralelamente em suspensão de cérebro de camundongo normal e de vírus na razão 3, de 1:5, 1:15, 1:45 e 1:135 e, incubadas a 37°C durante 30 minutos. As diluições dos soros sobre os decalques foram distribuídas de acordo com o indicado na figura.

Nº do	a	b	c	d
soro	a'	b'	c'	d'

- a - diluição 1: 5 do soro em suspensão de CN
- b - diluição 1:15 do soro em suspensão de CN
- c - diluição 1:45 do soro em suspensão de CN
- d - diluição 1:135 do soro em suspensão de CN
- a' - diluição 1: 5 do soro em suspensão de vírus
- b' - diluição 1:15 do soro em suspensão de vírus
- c' - diluição 1:45 do soro em suspensão de vírus
- d' - diluição 1:135 do soro em suspensão de vírus

Para cada amostra de soro, utilizaram-se duas lâminas com decalques de cérebros (cornos de Ammon), uma proveniente de cão raivoso e outra de cão normal. Os preparados foram incubados em estufa por 30 minutos a 37°C. Retirados da estufa, foram lavados duas vezes em salina tamponada (NaCl 0,15M, fosfatos 0,01M, pH 7,2), escorridas em porta-lâminas e secas com jato de ar quente. Sobre os decalques distribuiu-se o conjugado devidamente diluído e em quantidade suficiente para recobrir os preparados, incubando-se novamente a 37°C durante 30 minutos. O processo de lavagem das lâminas foi repetido. Secas as lâminas, a montagem foi feita com glicerina tamponada (nove partes de glicerina pura e uma parte de solução tampão carbonato-bicarbonato 0,5M e pH 8,5) e vedação com esmalte.

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência, marca Zeiss, binocular, com objetiva de imersão 40x provida de diafragma; ocular de 10x; campo escuro, com condensador cardióide. A fonte de luz foi fornecida por uma lâmpada HBO-200, filtro excitador UG-1 e filtro barreira 43 (Zeiss).

2.3. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se as seguintes técnicas: o Coeficiente de Associação de Yule, o Teste X^2 (qui quadrado) com correção para a continuidade da variável, o Coeficiente de Correlação de Spearman e o Teste t de "Student" para a avaliação da significância do Coeficiente de Correlação de Spearman, segundo descrito em BERQUÓ e cols. (1980) ⁴.

O nível de rejeição para a análise estatística dos dados foi fixado em 5%.

III. RESULTADOS.

III. RESULTADOS

As TABELAS I e II registram os valores concernentes ao estudo comparativo entre as provas de SN e IFI. Assim, a TABELA I expressa os resultados obtidos pelas referidas provas, classificando os soros em reagentes e não reagentes.

Com base nos dados da TABELA I, calculou-se o valor do Coeficiente de Associação de Yule e do χ^2 com correção para a continuidade da variável, os quais foram respectivamente iguais a 0,98 e 57,20. Ainda, a partir desta tabela obteve-se para a Concordância um valor igual a 92,2%.

Na TABELA II, encontram-se os títulos de anticorpos anti-rábicos medidos pelas provas de SN e IFI, que permitiram os cálculos do Coeficiente de Correlação de Spearman, cujo valor foi igual a 0,17, que é não significante quando feita a verificação pelo Teste t de "Student" ($t = 1,44$).

A TABELA III apresenta os títulos de anticorpos anti-rábicos medidos pelas provas de SN e IFI, em diferentes períodos de tempo após a primeira vacinação realizada com a vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lacten

tes, com a finalidade de avaliar a resposta imunitária induzida por este imunógeno.

Da mesma forma, o GRÁFICO I mostra as curvas construídas a partir dos valores das medianas destes títulos, calculadas com base nos resultados obtidos com ambas as provas (SN e IFI) e constantes da TABELA III.

TABELA I - Soros de cães, segundo os resultados das provas de soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI), São Paulo, 1980.

IFI \ SN	Reagente	Não Reagente	Total
Reagente	58	5	63
Não Reagente	2	25	27
Total	60	30	90

TABELA II - Títulos de anticorpos anti-rábicos segundo as provas de soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI), em soros de cães, São Paulo, 1980.

IFI	SN	IFI	SN	IFI	SN	IFI	SN
<5	8	5	125	45	5	135	11
<5	9	15	<5	45	5	135	19
5	<5	15	5	45	5	135	19
5	<5	15	10	45	9	135	21
5	5	15	14	45	15	135	25
5	5	15	19	45	77	135	32
5	7	15	21	45	95	135	37
5	7,5	15	21	45	125	135	38
5	8,5	15	23	45	125	135	40
5	18	15	29	45	125	135	43
5	21	15	88	45	125	135	45
5	21	15	125	135	5,5	135	52
5	29	15	125	135	5,5	135	125
5	45	15	125	135	6,5	135	125
5	45	45	<5	135	8	135	125
5	55	45	<5	135	9	135	125
5	67						

TABELA III - Títulos de anticorpos anti-rábicos, segundo as provas de soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI) e o tempo decorrido da vacinação, em cães primo vacinados contra a raiva, com vacina preparada em cérebros de camundongos lactentes, São Paulo, 1980.

Prova		Soroneutralização				Imunofluorescência indireta			
Animal	Dias	21	45	60	90	21	45	60	90
1		13	19	5	13	15	45	45	15
2		125	87	10	8	135	45	15	15
3		8	19	11	5	15	15	15	15
4		31	125	125	5	45	135	135	15
5		125	11	13	9	135	45	15	15
6		<5	<5	5	5	5	45	45	45
7		125	125	19	125	135	135	45	45
8		11	10	5	11	15	45	45	15
9		12	5	5	5	15	45	45	15
10		6,5	5	5	5	15	45	45	15
11		45	45	5	13	15	15	5	5
12		5	5	5	5	45	45	15	15
13		65	11	6,5	5	45	45	15	5
14		11	19	5	5	5	45	45	15
15		19	45	6,5	<5	<5	15	15	15
16		<5	<5	<5	<5	45	45	45	5
17		5	5	5	57	5	5	5	5
18		5	5	5	5	5	45	45	15
19		9	5	<5	<5	15	45	45	5
20		8	14	10	5	5	45	15	15
Mediana		11	11	5	5	15	45	45	15

GRÁFICO I - Mediana dos títulos de anticorpos anti- rábicos em soros de cães primo vacinados contra a raiva, com vacina preparada em cérebros de camundongos lactentes, segundo as provas de soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI) e tempo decorrido da vacinação, São Paulo, 1980.

IV. DISCUSSÃO.

IV. DISCUSSÃO

A TABELA I apresenta os resultados da comparação das provas de SN e IFI. O cálculo do Coeficiente de Associação de Yule para os dados desta tabela forneceu valor igual a 0,98, indicando existência de uma intensa associação entre os resultados obtidos empregando-se as provas de SN e IFI. Calculando-se a estatística X^2 obteve-se valor igual a 57,2 que, comparado ao valor crítico do X^2 , para 1 grau de liberdade ($X^2_{\alpha} = 3,84$), foi significativa, ultrapassando de muito o valor fixado para o nível de rejeição adotado, igual a 5%, permitindo, assim, a rejeição da hipótese de nulidade, segundo a qual haveria independência entre os resultados obtidos com ambas as provas, e consequentemente, levando à aceitação da hipótese alternativa da existência de uma associação significativa entre elas, tal como já havia sido observada nos estudos com soros humanos^{27, 35}, de bovinos^{14, 24} e de cães²⁶.

A TABELA I permite concluir que houve concordância de 92,2% dos resultados obtidos com ambas as provas. O exame de outros trabalhos de pesquisa, indica que o valor da concordância, registrado neste experimento, é de magnitude semelhante aos verificados por outros autores, quando comparam

estas provas utilizando soros humanos^{20, 27, 29, 32, 35, 49} ou soros de bovinos^{14, 24} e encontraram valores que se situaram, respectivamente, entre 80 e 97% e 88 e 95%. A concordância menor (69%) encontrada por JIRAN & ZÁVORA (1975)²⁶ pode dever-se ao reduzido número de observações (treze) realizadas pelos mencionados autores.

Ainda a partir dos dados constantes da TABELA I, usando-se o teste exato pela binomial ao nível de 5%, verificou-se que as proporções de reagencibilidade são semelhantes para ambas as provas.

A TABELA II apresenta os resultados da titulação dos soros com as provas de SN e IFI. Procedeu-se ao estudo da correlação destes resultados, calculando-se o Coeficiente de Correlação de Spearman que forneceu valor igual a 0,17 indicando a existência de correlação positiva de baixa intensidade entre ambas as provas. Quando testado o valor do Coeficiente de Correlação de Spearman utilizando-se o Teste t de "Student", este forneceu valor de t igual a 1,44 que comparado ao valor crítico de t igual a 1,96 indicou ser esta correlação não significativa ao nível de rejeição adotado. Aceitamos, portanto, a hipótese de nulidade segundo a qual não há correlação entre os resultados das provas de IFI e SN.

ISHIZUKA (1972)²⁴ no trabalho desenvolvido com soros de bovinos vacinados contra a raiva, ao observar uma correlação positiva de baixa magnitude (0,33) entre as provas, embora significativa ao nível de rejeição adotado, procurou justificar tal comportamento, atribuindo naturezas diferentes aos anticorpos medidos por uma e por outra prova.

A confirmação desta hipótese foi parcialmente obtida através dos experimentos de WIKTOR e cols. (1973)⁵³ com o vírus da raiva. Estes autores fracionaram o vírus rábico em seus componentes estruturais e os inocularam em camundongos, cobaias e coelhos, com a finalidade de imunizá-los contra a raiva, obtendo os níveis mais elevados de anticorpos neutralizantes apenas com a fração glicoproteica, sugerindo esta evidência ser o envelope glicoproteico o único antígeno capaz de

induzir a formação de anticorpos neutralizantes. Ainda como complementação do trabalho, os autores observaram que apenas o grupo de camundongos imunizados com esta fração(glicoproteica) sobreviveu ao "challenge" com CVS, concluindo daí que, o envelope glicoproteico é também o único antígeno que apresenta a capacidade de induzir a formação de anticorpos capazes de proteger os animais contra subsequentes "challenge" com vírus rábico.

A hipótese de ISHIZUKA (1972) ²⁴ só foi plenamente confirmada após a apresentação dos resultados do trabalho de SCHNEIDER e cols. (1973) ⁴⁰ também com o vírus da raiva. Estes autores conseguiram isolar de células BHK-21 infectadas com o vírus rábico, proteína ribonuclear, a qual sorologicamente foi confirmada como antígeno puro, livre de contaminantes dos constituintes do envelope glicoproteico. O soro anti-proteína ribonuclear assim obtido, continha anticorpos vírus específicos imunofluorescentes, além de precipitantes e fixadores de complemento, e estava completamente livre da capacidade vírus neutralizante, confirmando-se desta forma ser este tipo de constituinte proteico viral o responsável pela indução de anticorpos fluorescentes.

Com base nos trabalhos de WIKTOR e cols.(1973) ⁵³ e SCHNEIDER e cols. (1973) ⁴⁰, ficou perfeitamente caracterizada a natureza diversa dos anticorpos anti-rábicos, constituindo-se este fato, numa das razões mais consistentes para explicar as diferenças entre os valores dos títulos obtidos por uma e por outra prova.

No concernente à prova de SN, um fator que deve contribuir, para a maior variabilidade de resultados, diz respeito à própria natureza da prova, a qual utiliza para a fase de inoculação em camundongos, suspensão de vírus com título conhecido. Porém, durante o intervalo de tempo destinado à execução da prova o título desta suspensão de vírus tende a declinar, acarretando obviamente diminuição do número da DL_{50} por inoculação. Como consequência, obtêm-se oscilações dos valores dos títulos de anticorpos anti-rábicos. De acordo com CÔRTEZ & NILSSON (1974) ⁹ a quantidade de vírus empre

gada na prova de SN é outra variável capaz de influenciar significativamente os resultados desta.

LEFFINGWELL & IRONS (1965)³³ e KING e cols. (1965)²⁷ referem ainda as variáveis biológicas, resistência individual e mortalidade inespecífica, encontradas quando da utilização de animais de laboratório e refletida por respostas variadas ao antígeno como responsáveis pelas possíveis oscilações dos resultados da prova de SN.

A partir do trabalho de WIKTOR e cols. (1973)⁵³ a SN ganhou maior consistência para sua utilização, dado que, ficou provado ser o anticorpo neutralizante o responsável pela defesa do organismo à infecção pelo vírus rábico. Consequentemente, os valores dos títulos de anticorpos anti-rálicos medidos por sua aplicação são muito importantes, pois avaliam em níveis quantitativos o grau de defesa de um organismo suscetível.

Não obstante esta constatação, há que considerar que, no mesmo antígeno rábico, existe concomitância dos elementos responsáveis pela indução, no organismo de um suscetível, da formação de anticorpos tanto neutralizantes quanto fluorescentes. Portanto, o anticorpo fluorescente pode ser utilizado como indicador da presença de anticorpo neutralizante, embora entre eles não haja uma relação quantitativa direta. Isto é possível em função da elevada concordância observada entre as provas, como já foi demonstrado neste trabalho, confirmando inclusive, pesquisas de outros autores^{14, 20, 24, 27, 32, 35, 49}.

A TABELA III mostra os títulos dos anticorpos anti-rálicos, medidos simultaneamente pelas provas de SN e IFI, de amostras de soros de cães primo vacinados contra a raiva, com vacina anti-rábica preparada com cérebros de camundongos lactentes, coletadas aos 21, 45, 60 e 90 dias após a vacinação.

A utilização simultânea das provas de SN e IFI, para o estudo da resposta imunitária destes animais, se prende ao fato que, no primeiro objetivo do presente trabalho, não

se observou diferença significativa entre os graus de indica
ção de reagentes de cada uma das provas e os resultados por
elas fornecidos não apresentaram correlação.

O conjunto de dados referidos nesta Tabela de
monstra que os valores dos títulos medidos pela prova de IFI
são superiores aos da SN, enquanto que as oscilações verifica
das entre estes mesmos títulos são de menor intensidade quan
do determinados pela IFI, ao contrário do que ocorre com aque
les obtidos pela SN. Em apenas uma amostra de soro (animal
número 15) o resultado da prova de IFI demonstrou a condição
de não reagente enquanto que a SN evidenciou ser o mesmo rea
gente e com um título de anticorpos igual a 19.

As oscilações dos títulos de anticorpos anti
-râbicos, determinados pela prova de SN, podem ser comprova
dos pela análise do comportamento destes títulos nos animais,
durante o período de observação. Assim, os soros dos cães de
números 1, 8 e 11, aos 60 dias após a vacinação apresentaram tí
tulos de anticorpos anti-râbicos inferiores aos determinados
aos 45 e 90 dias, sendo esta oscilação de baixa intensidade,
ao passo que, no caso do soro do animal de número 7, com o
mesmo tipo de comportamento, esta oscilação do título de anti
corpos foi bastante acentuada. Estes mesmos soros, quando
avaliados pela prova de IFI não apresentaram nenhuma flutua
ção.

O soro proveniente do animal de número 17, pe
la prova de SN, demonstrou comportamento irregular, visto que
apresentou ascensão do nível de anticorpos num momento tão dis
tante quanto 90 dias, enquanto que pela prova de IFI o valor
dos títulos permaneceu estável durante todo o período de ob
servação.

Os resultados obtidos pela SN, com as amostras
de soro do animal número 16, revelaram ter o mesmo, resposta
imunitária nula, frente à vacina utilizada. Estes valores,
porém, são discordantes daqueles obtidos pela IFI, quando es
te tipo de resposta foi traduzido por expressivos títulos de
anticorpos anti-râbicos, da ordem de 45, os quais se mantive

ram estáveis até 60 dias após a vacinação, declinando apenas aos 90 dias, quando atingiram valor igual a 5.

Comportamento semelhante foi verificado com as amostras de soro do animal de número 6, quando analisados os resultados obtidos pela SN. Assim, o animal só apresentou resposta imunitária a partir de 60 dias após a vacinação, enquanto que pela prova de IFI, esta resposta ocorreu já aos 21 dias de observação mantendo-se os títulos estáveis até o final do período. Estes mesmos tipos de comportamento foram ainda observados nos animais de número 19 (aos 60 e 90 dias) e 15 (aos 90 dias).

Estes tipos de comportamento, observados quando da análise dos resultados obtidos pela SN, podem ser atribuídos às limitações impostas pela própria técnica, principalmente àquela relativa à variabilidade apresentada pelos valores da DL_{50} do vírus empregado para a titulação dos soros, as quais embora adequadamente controladas oscilaram entre 10 e 40.

O GRÁFICO I mostra as curvas obtidas através do cálculo das medianas a partir dos resultados dos títulos de anticorpos anti-rábicos expressos na TABELA III.

A simples análise das curvas destas medianas evidencia que, decorridos 21 dias da aplicação da vacina anti-rábica, o valor das mesmas sofreu uma elevação de pequena intensidade, não sendo a diferença entre os valores determinados por uma e por outra prova muito acentuada, embora o registrado pela IFI tenha sido ligeiramente superior ao da SN, respectivamente iguais a 15 e 11. Aos 45 dias, registrou-se uma ascensão da mediana dos títulos determinados pela IFI, cujo valor foi da ordem de 45, sendo muito superior àquele obtido através da SN, o qual permaneceu igual a 11. Aos 60 dias, o valor da mediana obtida através da IFI permanecia no mesmo nível anterior, igual a 45, enquanto que a da SN sofria um declínio atingindo um valor igual a 5. Aos 90 dias, também, se observou o declínio da mediana dos títulos de anticorpos anti-rábicos determinados pela IFI a qual atingiu um valor igual a 15, permanecendo inalterado aquela da SN.

Desta forma, constata-se que os títulos de anticorpos medidos pela SN encontram-se de fato aquém daqueles obtidos pela IFI, tal como havia sido referido durante a discussão da TABELA III.

O perfil da curva correspondente à SN evidenciou que as medianas dos títulos de anticorpos anti-rábicos atingiram o limite máximo de seu valor em 21 dias, porém a um nível de baixa intensidade, igual a 11, procedendo-se o declínio da curva já a partir dos 45 dias de observação, atingindo a mediana seu valor mínimo (igual a 5) aos 60 dias. Pela IFI, a ascensão ao limite máximo levou 45 dias, permanecendo o valor da mediana estável (igual a 45) até aos 60 dias após a vacinação, quando se iniciou a fase de declínio.

SIKES e cols. (1971)⁴⁴ testaram experimentalmente a vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes, em um lote de 40 cães da raça Beagle, comprovadamente desprovidos de anticorpos anti-rábicos, mantidos em condições de cativeiro durante todo o período de estudo (3 anos) inoculando-os, por via intramuscular, entre os 9 e os 12 meses de idade. A vacina utilizada, quando submetida ao teste de potência, realizado através do método do NIH⁴¹ como é recomendado para qualquer vacina anti-rábica de uso humano, forneceu um valor antigênico igual a 1,5, ou seja, cinco vezes maior do que a potência mínima requerida para sua utilização no homem⁴⁴.

As amostras de soros destes animais, referentes aos diferentes períodos de observação foram submetidas à SN, evidenciando os resultados das medianas dos títulos de anticorpos uma ascensão de alta intensidade, já aos 14 dias pós vacinação, tendo sido o valor igual a 280. Porém, a partir deste ponto se iniciou o declínio da curva, atingindo aos 30 dias de observação um valor igual a 69, o qual foi aproximadamente 1/4 daquele registrado no limite máximo. Esta fase de declínio processou-se lentamente até o final do experimento quando a mediana acusou um valor inferior a 5.

FIELDS e cols. (1976) ¹⁶ em trabalho conduzi do nos moldes do experimento anterior, testaram o mesmo tipo de vacina, em 24 cães sem raça definida, cujos títulos de anticorpos anti-rábicos determinados antes da vacinação, pela SN, forneceram valores inferiores a 2. Estes animais tinham idade superior a 12 meses e foram vacinados por via intramuscular com uma vacina cujo valor antigênico, determinado pelo método do NIH, foi igual a 3,0, ou seja, o dobro da potência da vacina utilizada por SIKES e cols. (1971) ⁴⁴.

Os resultados das medianas dos títulos de anticorpos anti-rábicos induzidos por esta vacina, mostraram uma resposta imunitária de alta intensidade já aos 30 dias após a vacinação, traduzida por um valor igual a 512. Aos 11 meses, pós vacinação, esta mediana sofreu um declínio, mas seu valor ainda se manteve em nível elevado (igual a 146). Este declínio foi mais acentuado aos 24 e 36 meses pós vacinação, quando as medianas atingiram, respectivamente, valores da ordem de 19 e 6.

Quando da comparação dos perfis das curvas das medianas dos títulos de anticorpos anti-rábicos, detectados pela prova de SN, constatou-se que os valores obtidos neste experimento são muito inferiores àqueles dos trabalhos de SIKES e cols. (1971) ⁴⁴ e FIELDS e cols. (1976) ¹⁶. Por outro lado, já aos 45 dias após a vacinação, a mediana dos títulos de anticorpos atingia no presente estudo um valor igual a 5, enquanto que, valores mais próximos a este, iguais a 6, só foram encontrados aos 24 meses por SIKES e cols. (1971) ⁴⁴ e aos 37 meses por FIELDS e cols. (1976) ¹⁶.

No caso específico do presente trabalho, a potência da vacina utilizada foi determinada pelo método de HABEL ²², tendo fornecido um valor de 48.350 DL₅₀, o qual é considerado como satisfatório para a aplicação em animais. No entanto, os resultados obtidos pela utilização deste método não apresentam correlação com aqueles fornecidos pelo método do NIH, empregado nos trabalhos experimentais ^{16, 44}, consequentemente, os valores antigênicos encontrados por um método e pelo outro não podem ser comparados ⁴⁶.

Embora este fato seja verdadeiro, os dados referidos por aqueles autores ^{16, 44}, sugerem, que a potência das vacinas por eles utilizadas era superior ao da testada neste experimento, podendo talvez, justificar assim a elevada magnitude dos valores das medianas dos títulos por eles obtidos, bem como a prolongada persistência destes títulos.

No estudo realizado por SIKES e cols. (1971) ⁴⁴ em cães, a mediana dos títulos de anticorpos anti-rábicos, obtida através dos resultados fornecidos pela prova de SN, 12 meses após a aplicação deste tipo de vacina, apresentava um valor igual a 10. Quando estes animais foram submetidos ao "challenge" registrou-se 100% de sobrevivência. No trabalho de FIELDS e cols. (1976) ¹⁶ esta mediana do título de anticorpos, também obtida através dos resultados da prova de SN, 11 meses após a aplicação da vacina, era igual a 146. O "challenge" realizado somente, após a conclusão do experimento, ou seja, 3 anos após a aplicação da vacina, demonstrou 100% de sobrevivência por parte dos animais vacinados.

Com base nos resultados obtidos por SIKES e cols. (1971) ⁴⁴ e FIELDS e cols. (1976) ¹⁶ a vacina anti-rábica, preparada em cérebros de camundongos lactentes, conferiu boa imunidade por 12 meses, sendo necessária apenas uma única dose da vacina, aplicada a partir dos 3 meses de idade do animal ⁵¹.

De acordo com RIBEIRO NETTO (1969) ³⁹, embora a imunidade guarde estreita relação com a taxa de anticorpos, não se pode aquilatar, "a priori", se a intensidade da resposta imunitária é suficiente para proteger o animal contra as doses infectantes usuais a que estaria sujeito na natureza. De outra parte, a ausência de anticorpos ou a sua presença em nível baixo, não equivale sempre à condição de suscetibilidade.

Os anticorpos circulantes, embora não sejam os únicos responsáveis pela imunidade, têm participação importante na profilaxia da infecção rábica ³⁷, principalmente no que concerne ao anticorpo neutralizante, comprovadamente responsável pela resistência a subseqüentes "challenge" com o vírus da raiva ⁵³

Isto posto, causam apreensão os resultados dos títulos de anticorpos anti-rábicos obtidos tanto com a prova de SN quanto com a prova de IFI, tal como foram observados neste trabalho, dado que, embora estes títulos pudessem ser inferiores aos referidos naqueles trabalhos experimentais ^{16, 44}, em função, talvez, das possíveis diferenças de potência das vacinas, não se pode compreender uma diferença de magnitude tão acentuada e um declínio tão precoce, mormente quando a medida mais eficiente para o controle da raiva urbana consiste na realização de campanhas de vacinação em massa da população canina e que o intervalo de tempo preconizado entre uma vacinação e outra é de 12 meses ⁵¹.

Estas constatações sugerem, portanto, a conveniência de outras pesquisas, principalmente no sentido de se estabelecer com mais propriedade estes intervalos de vacinação, haja visto, que no caso específico do trabalho em pauta, o declínio da mediana dos títulos de anticorpos anti-rábicos, obtida através dos resultados da prova de SN, registrou um valor igual a 5, já aos 60 dias da aplicação da vacina. No concernente ao esquema de vacinação adotado para cães primo vacinados, poder-se-ia considerar ainda a possibilidade da aplicação de uma dose de reforço, pois de acordo com ATANASIU e cols. (1968) ², quando da utilização de antígenos inativados inoculados em uma única dose, a resposta imunitária é menos intensa do que quando da aplicação fracionada deste mesmo imunógeno.

V. CONCLUSÕES,

V. CONCLUSÕES.

- 1) Na determinação da presença de anticorpos anti-rábicos em soros de cães, isto é, qualitativamente, a prova de IFI apresenta associação significativa de alta intensidade e elevada concordância com a prova de SN.
- 2) Na determinação do título de anticorpos anti-rábicos em soros de cães, isto é, quantitativamente, os resultados da prova de IFI não apresentam correlação significativa com os da prova de SN.
- 3) A vacina anti-rábica, preparada em cérebros de camundongos lactentes, determina em cães primo vacina dos resposta imunitária evidente já aos 21 dias da inoculação. Esta resposta avaliada pelas medianas dos títulos de anticorpos anti-rábicos é de maior magnitude, quando medida pela prova de IFI, comparativamente à prova de SN, no intervalo de tempo compreendido entre 21 e 90 dias da vacinação.

- 4) O declínio acentuado de anticorpos anti-rábicos me
didos pelas provas de IFI e SN, em cães primo vaci
nados com vacina anti-rábica preparada em cérebros
de camundongos lactentes, após 90 dias da vacinação,
sugere a conveniência de se estudar com maior detal
he a duração da imunidade induzida por esta vaci
na, para aquilatar-se da adequação do intervalo de
tempo entre as campanhas de vacinação em nossa popul
lação canina, e se não haveria conveniência de se a
plicar dose de reforço em cães primo vacinados.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. (§)

1. ATANASIU, P. Titration des anticorps rabiques pratiqué sur les sérums humaines. Bull. Off. int. Epizoot., 67: 383-7, 1967.
2. ATANASIU, P. et al. Imunidade antirrábica em bovinos vacinados. Bol. Ofic. sanit. panamer., 64: 431-9, 1968.
3. BAER, G.M. Advances in post-exposure rabies vaccination: a review. Amer. J. clin. Path., 70: 185-7, 1978.
4. BERQUÓ, E.S. et al. Bioestatística. São Paulo, E.P.U. 1980. 256 p.
5. BEUTNER, E.H. et al. A new fluorescent antibody method: mixed antiglobulin immunofluorescence-staining. Nature, Lond., 208: 353-5, 1965.

(§) DE ACORDO COM:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. v. 1, p.13-30.

6. BEUTNER, E.H. et al. Field trials by ten laboratories of six commercial conjugate prepared from antisera to human igG. Ann. N.Y. Acad. Sci., 177: 361-403, 1971.
7. CABASSO, V.J. et al. Tissue-culture rabies vaccine. (Flury LEP) in dogs. Amer. J. vet. Res., 26: 24-32, 1965.
8. CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, 1967. [Apos_{tila}7].
9. CÔRTEZ, J. de A. & NILSSON, M.R. Influência da dose de ví_{rus} sobre o resultado da prova de soroneutralização em camundongos, objetivando a determinação da taxa de anti_{corpos} anti-rábicos. Rev. Fac. Med. vet, Zootec. Univ.S. Paulo, 11: 95-106, 1974.
10. CRICK, J. & BROWN, F. Rabies vaccines for animals and man. Vet. Rec., 99: 162-7, 1976.
11. DEAN, D.J. et al. Studies on the low egg passage Flury strain of modified live rabies virus produced in embryonating chicken eggs and tissue culture. Amer. J. vet. Res., 25: 756-63, 1964.
12. DEAN, D.J. & ABELSETH, M.K. The fluorescent antibody test. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory techniques in rabies. 3. ed. Geneva, 1973. p. 73-84. (Monogr. Ser., 23).
13. DIAZ, A.M.O. & VARELA-DIAZ, V.M. The counterimmunoelectrophoresis test for detection of antibodies to rabies ví_{rus}. Ann. Microbiol., 128A: 331-7, 1977.
14. DINIZ, C.C. & REIS, R. Comparação das provas de imunofluo_{rescência} indireta e soroneutralização na titulação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos vacinados. Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M.Gerais. 27: 29-37, 1975.
15. ERCEGOVAC, D. & COSTOGLOW, M. Contribution à la connaissan_{se} des corps anti-rabiques naturels. Rec. Méd. vét., 144: 1215-20, 1968.

16. FIELDS, M. et al. Suckling-mouse-brain rabies vaccine (SMBV): duration of immunity in dogs. Vet. Med. small Anim. Clin., 71: 37-40, 1976.
17. FITZGERALD, E.A. et al. A collaborative study on the test ing of rabies immune globulin (human) by the mouse neu tralization test (MNT) and the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). J. biol. Stand., 7: 67-72, 1979.
18. FUENZALIDA, E. Suckling-mouse brain vaccine. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory techniques in rabies. 3. ed. Ge neva, 1973. p. 216-20. (Monogr. Ser., 23).
19. GERMANO, P.M.L. et al. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e ino culação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laborato rial da raiva canina. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 14: 133-41, 1977.
20. GISPEN, R. & SASTHOF, B. Neutralizing and fluorescent an tibody response in man after antirabies treatment with suckling rabbit brain vaccine. Arch. ges. Virusforsch., 15: 377-86, 1965.
21. GOUGH, P.M. & DIERKES, R.E. Passive hemagglutination test. In: BAER, G.M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v. 1, p. 115-23.
22. HABEL, K. Habel test for potency. In: WORLD HEALTH ORGANI ZATION. Laboratory techniques in rabies. 3. ed., Gene va, 1973. p. 276-7. (Monogr. Ser., 23).
23. HILL, H.T. Comparison of cellular and humoral immune res pones to rabies and Sindbis virus in mice. Ames, 1974. [Iowa State University] apud Diss. Abstr. int., 35B: 5710, 1975.
24. ISHIZUKA, M.M. Adaptação da prova de imunofluorescência in direta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em so ros de bovinos. Estudo comparativo com a prova de soroneu tralização. São Paulo, 1972. [Tese de Doutorado - Faculda de de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP].

25. ISHIZUKA, M.M. et al. Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e imunofluorescência indireta para avaliação de anticorpos anti-toxoplasmose em soros de cães. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S.Paulo, 11: 127 - 32, 1974.
26. JIRAN, E. & ZÁVORA, M. Průkaz protilátek proti vzteklině metodou nepřímé imunofluorescence. [Demonstration of antibodies against rabies by indirect immunofluorescence method]. Vet. Med., Praha, 20: 363-71, 1975.
27. KING, D.A. et al. A rapid quantitative in vitro serum neutralization test for rabies antibody. Canad. vet. J., 6: 187-93, 1965.
28. KUWERT, E.K. et al. Neutralizing and complement - fixing antibody response in pre- and post-exposure vaccines to a rabies vaccine produced in human diploid cells. J. biol. Stand., 4: 249-62, 1976.
29. LARSH, S.E. Indirect fluorescent antibody and serum neutralization response in pre-exposure prophylaxis against rabies. Ann. intern. Med., 63: 955-64, 1965.
30. LARSON, K.A. Immunologic aspects of veterinary medicine. II. Antibodies. Amer. J. vet. clin. Path., 1: 167-72, 1967.
31. LEBELL, I. et al. Complement-fixing and neutralizing antibody studies on humans vaccinated against rabies. J. Immunol., 73: 225-8, 1950.
32. LEFFINGWELL, L. & IRONS, J.V. Rabies antibodies in human serum titrated by the indirect FA method. Publ. Hlth Rep. Wash., 80: 999-1004, 1965.
33. LIPTON, M.M. & FREUND, J. The formation of complement fixing and neutralizing antibodies after the injection of inactivated rabies virus with adjuvants. J. Immunol., 71: 98-109, 1953.

34. LOUIE, R.E. et al. Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test (MNT) with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). J. biol. Stand., 3: 365-73, 1975.
35. PECK JR., F.B. The detection of human rabies antibody by the indirect fluorescent test. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RABIES, Talloires, 1965. Basel, Karger, 1966. v. 1, p. 201-6.
36. PEREIRA, O.A.C. et al. Anti-rabies revaccination in humans. I. Effect of different schedules on individuals previously vaccinated with 14 or more doses. Rev. Microbiol., 2: 83-6, 1971.
37. PEREIRA, O.A.C. et al. Complement fixation test in evaluation of immunity against rabies. Rev. Microbiol., 1: 85-91, 1970.
38. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg., 27: 493-7, 1938.
39. RIBEIRO NETTO, A. Avaliação da vacinação anti-rábica em bovinos. An. Microbiol., 16: 31-7, 1969.
40. SCHNEIDER, L.G. et al. Rabies group-specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses. J. Virol., 11: 748-55, 1973.
41. SELIGMANN JR., E.B. The NIH test for potency. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory techniques in rabies. 3 ed. Geneva, 1973. p. 279-86. (Monogr. Ser., 23).
42. SHOKEIR, A. A. Immunity against rabies. I. Formation of virus neutralizing antibodies. Vet. med. J., 14: 173-87, 1967.
43. SIKES, R.K. Canine and feline vaccines: past and present. In: BAER, G.M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v. 2, p. 177-87.

44. SIKES, R.K. et al. Rabies vaccines: duration-of-immunity - study in dogs. J. Amer. vet. med. Ass., 159: 1491-9, 1971.
45. SMITH, C.E.G. Immunological responses in virus infections. Proc. roy. Soc. Med., 62: 292-4, 1969.
46. STRATING, A. et al. Efficacy of inactivated tissue culture rabies vaccine in dogs. J. Amer. med. vet. Ass., 167: 809-16, 1975.
47. TAYLOR, D. Rabies: epizootic aspects. Vet. Rec., 99: 157-60, 1976.
48. THOMAS, J.B. The serum neutralization, indirect fluorescent antibody, and rapid fluorescent focus inhibition tests. In: BAER, G.M., ed. - The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v. 1, p. 417-33.
49. THOMAS, J.B. et al. Evaluation of indirect fluorescent antibody techniques for detection of rabies antibody in human sera. J. Immunol., 91: 721-3, 1963.
50. TIERKEL, E.S. Canine rabies. In: BAER, G.M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975, v. 2., p. 123-37.
51. TIERKEL, E.S. Control of urban rabies. In: BAER, G.M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v. 2, p. 189-201.
52. TURNER, G.S. Immunoglobulin (IgG) and (IgM) antibody responses to rabies vaccine. J. gen. Virol., 40: 595-604, 1978.
53. WIKTOR, T.J. et al. Antigenic properties of rabies virus components. J. Immunol., 110: 269-76, 1973.
54. WOJCIECHOWSKI, K. An evaluation of humoral and tissue neutralization tests for the study of immunity in rats after vaccination with antirabies vaccine of the Umeno-Doi type. Epidem. Rev., 23: 38-46, 1969.

55. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Rabies. 6, report. Geneva, 1973. (Techn. Rep. Ser., 523).