

PEDRO MANUEL LEAL GERMANO

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE COLORAÇÃO DE SELLERS,
IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA E INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS APLICA
DAS AO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA CANINA.

Trabalho apresentado à Faculdade
de Saúde Pública da Universidade
de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre.

São Paulo
1976

BIBLIOTECA
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SP - 0

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Omar Miguel, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela orientação.

Ao Prof.Dr. Gil Vianna Paim, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela revisão deste trabalho.

Ao Dr. Murilo P. de Azevedo, Diretor do Instituto Pasteur da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, por nos ter franqueado o Laboratório de Diagnóstico da Raiva, e suas colaboradoras, Dras. Esther Luiza B. Chamelet e Luiza Terezinha M.S. Morita, pela execução das provas diagnósticas.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

Í N D I C E

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
1. Material.....	4
1.1. Animais.....	4
1.2. Vírus.....	4
1.3. Diluente.....	5
2. Métodos.....	5
2.1. Coloração de Sellers.....	5
2.2. Imunofluorescência Direta.....	5
2.3. Inoculação em Camundongos.....	6
2.4. Método Estatístico.....	6
III. RESULTADOS.....	7
IV. DISCUSSÃO.....	13
V. CONCLUSÕES.....	18
VI. RESUMO.....	20
VII. SUMMARY.....	21
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

I. INTRODUÇÃO.

Na epidemiologia da raiva urbana o cão representa a principal fonte de infecção para o homem²⁷, sendo extraordinariamente grande em nosso meio, o número de casos de exposição humana ao risco da infecção²⁰.

Poucas doenças causam tanta preocupação quanto a raiva; isto se aplica tanto aos indivíduos expostos, como às autoridades sanitárias responsáveis pela sua prevenção e controle⁸, razão esta que se prende ao fato da raiva ser quase sempre fatal^{3, 10, 24}.

O diagnóstico puramente clínico da doença é difícil, em razão da diversidade de sintomas que o animal infectado pode apresentar³⁰, além de que, muitas vezes é difícil estabelecer um diagnóstico diferencial preciso com outras enfermidades que também apresentam manifestações nervosas, tais como, Cinomose, Hepatite Infecciosa Canina, Doença de Aujeszky e Toxoplasmose.

A utilização de técnicas laboratoriais sensíveis e específicas, permitem diagnosticar de modo claro e inequívoco a raiva, baseando-se sob os seus resultados a decisão de

submeter ou não os indivíduos expostos a longos tratamentos, - bem como a decisão de instituir medidas para o controle de uma epidemia numa comunidade ^{8, 14, 22}. No entanto, a instituição de medidas terapêuticas em indivíduos expostos como é recomendada pela Organização Mundial da Saúde ³⁴, nunca deve aguardar os resultados do diagnóstico laboratorial, uma vez que o mesmo poderá ser demorado em função de várias razões e o tratamento precoce, tanto local como sistêmico, pode ser um fator crítico para salvar a vida de um paciente⁸; portanto, um diagnóstico laboratorial rápido e preciso é fator primordial para o tratamento e controle da raiva ²². Em função dos resultados obtidos, suspender-se-á ou não o tratamento dos indivíduos expostos ⁸.

Muitas são as técnicas laboratoriais descritas, aplicadas ao diagnóstico da raiva canina ^{11, 21, 23}, porém, a utilização de qualquer uma delas deverá obedecer a três exigências fundamentais, quais sejam, sensibilidade, rapidez e especificidade⁷, o que nem sempre é possível reunir em uma mesma técnica. Desta forma, o que se utiliza na prática laboratorial é a associação de duas ou mais técnicas^{1, 13, 16, 17, 21, 31, 33}, onde estas exigências se complementam, aumentando a precisão de diagnóstico ^{6, 7, 12, 14}.

As associações mais frequentemente utilizadas - nos laboratórios de diagnóstico da raiva são, a Coloração de

Sellers, a Imunofluorescência Direta e a Inoculação em Camundongos 17, 18, 19, 26, 30, 34. Os exames histopatológicos, em alguns laboratórios, são realizados em associação com as três técnicas precedentes^{13, 14, 31} ou, então, em lugar da Coloração de Sellers 1, 4, 6, 7. Também, a técnica de Coloração de Faraco tem sido utilizada, seja em associação com essas três técnicas²¹, seja em substituição à Coloração de Sellers²⁹. Outros preferem associar apenas a Imunofluorescência Direta com a Inoculação em Camundongos 12, 28.

As discordâncias de resultados obtidos por diferentes técnicas sobre uma mesma amostra, observadas muitas vezes na prática de diagnóstico laboratorial não podem ser atribuídas somente à imprecisão das técnicas nem ao modo como elas são empregadas pelos técnicos, mas também, estão muito ligadas ao estado de conservação da amostra e em menor grau às reações individuais à doença, período de incubação e evolução, seja para a morte natural ou sacrifício precoce³¹.

Diante destas considerações, propusemo-nos, no presente trabalho, a estudar comparativamente a Sensibilidade, a Concordância, os Coeficientes de Associação de Yule e o Teste de Associação (χ^2), das seguintes técnicas laboratoriais aplicadas ao diagnóstico da raiva canina: Coloração de Sellers, Imunofluorescência Direta e Inoculação em Camundongos.

II. MATERIAL E MÉTODOS.

1. Material.

1.1. Animais.

1.1.1. Cães.

Utilizamos os resultados obtidos com amostras de cérebros coletadas de 2.242 cães que foram submetidos às técnicas laboratoriais de diagnóstico da raiva, no Instituto Pasteur, da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

1.1.2. Camundongos.

Foram utilizados camundongos albinos suíços, pertencentes à criação do biotério do Instituto Pasteur, da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, com 21 dias de idade e peso variando entre 12 e 15 g, distribuídos em lotes de 6 a 8 indivíduos, conforme a disponibilidade do laboratório, para cada animal examinado.

1.2. Vírus.

O vírus empregado constituiu-se de uma suspensão a 20% de cérebros de camundongos infectados com vírus rábico

fixo, amostra CVS (Challenge Virus Standard) com título superior a 10^{-5} .

1.3. Diluyente.

Para o preparo de suspensões de CVS e CN (Cérebro Normal) utilizamos água destilada estéril, contendo 2% de soro de equino normal, inativado convenientemente, adicionado de 2,4 mg de cloridrato monohidratado de lincomicina por mililitro.

2. Métodos.

2.1. Coloração de Sellers.

A pesquisa de Corpúsculos de Negri utilizando a técnica de Coloração de Sellers foi realizada de acordo com as normas da Organização Mundial da Saúde ³².

2.2. Imunofluorescência Direta.

Realizada conforme a técnica preconizada por GOLDWASSER & KISSLING⁵, utilizando-se Fotomicroscópio binocular, marca Nikkon, modelo FL, com lâmpada Osram HBO 200, filtro excitador VO, filtros barreiras Emplay O e Wrathen 2B e condensador de campo escuro.

2.3. Inoculação em Camundongos.

O teste biológico obedeceu à técnica descrita -
por KOPROWSKI ⁹.

2.4. Método estatístico.

Utilização do Teste de χ^2 (Qui quadrado) ao ní-
vel de rejeição de 5%, segundo MARASCUILLO ¹⁵.

III. RESULTADOS.

Os resultados obtidos figuram nas Tabelas que se seguem.

TABELA I - Resultados obtidos com material coletado de animais da espécie canina submetidos às diferentes provas laboratoriais de diagnóstico da raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

Resultados	Frequência	Porcentagem (%)
S ⁻ IF ⁻ IN ⁻	1.168	52,10
S ⁺ IF ⁺ IN ⁺	859	38,32
S ⁻ IF ⁺ IN ⁺	156	6,96
S ⁻ IF ⁻ IN ⁺	51	2,27
S ⁺ IF ⁺ IN ⁻	6	0,27
S ⁻ IF ⁺ IN [*]	1	0,04
S ⁺ IF ⁻ IN ⁻	1	0,04
S ⁺ IF ⁻ IN ⁺	0	0,00
TOTAL	2.242	100,00

S = Coloração de Sellers

IF = Imunofluorescência Direta

IN = Inoculação em Camundongos

+ = Positivo

- = Negativo

* = Amostra enviada ao laboratório, conservada em formol não tendo, por isso, sido submetida à prova.

TABELA II - Animais da espécie canina, segundo a Sensibilidade às técnicas de Coloração de Sellers (S), Imunofluorescência Direta (IF) e Inoculação em Camundongos (IN), para o diagnóstico da raiva, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

Técnica	Resultados	Sensibilidade (%)
Coloração de Sellers	866/1074	80,63
Imunofluorescência Direta	1.022/1074	95,15
Inoculação em Camundongos	1.066/1073	99,34

TABELA III - Animais da espécie canina, segundo os resultados obtidos com as técnicas de Coloração de Sellers (S) e Imunofluorescência Direta (IF), para o diagnóstico laboratorial da raiva, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

Coloração de Sellers / Imunofluorescência Direta	Positivos	Porcentagem (%)	Negativos	Porcentagem (%)	Total	Porcentagem (%)
Positivos	865	84,54	157	15,36	1.022	100,00
Negativos	1	0,08	1.219	99,92	1.220	100,00
Total	866	-	1.376	-	2.242	-

TABELA IV - Animais da espécie canina, segundo os resultados obtidos com as técnicas de Coloração de Sellers (S) e Inoculação em Camundongos (IN) para o diagnóstico laboratorial da raiva, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

Coloração de Sellers / Inoculação em Camundongos	Positivos	Porcentagem (%)	Negativos	Porcentagem (%)	Total	Porcentagem (%)
	Positivos	859	80,58	207	19,42	1.066
Negativos	7	0,60	1.168	99,40	1.175	100,00
Total	866	-	1.375	-	2.241	-

TABELA V - Animais da espécie canina, segundo os resultados obtidos com as técnicas de Imunofluorescência Direta (IF) e Inoculação em Camundongos (IN), para o diagnóstico laboratorial da raiva, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

Imunofluorescência Direta / Inoculação em Camundongos	Positivos	Porcentagem (%)	Negativos	Porcentagem (%)	Total	Porcentagem (%)
Positivos	1.015	95,21	51	4,79	1.066	100,00
Negativos	6	0,51	1.169	99,49	1.175	100,00
Total	1.021	-	1.220	-	2.241	-

TABELA VI - Resultados dos cálculos de Concordância, Coeficiente de Associação de Yule e Teste de X^2 (Qui quadrado), para as relações entre as diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial da raiva, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

Resultados Relações	Concordância (%)	Coeficiente de Associação de Yule	Valor de x^2
S/IF	92,95	0,99	1.675,48
S/IN	90,45	0,99	1.507,73
IF/IN	97,46	0,99	2.018,60

S = Coloração de Sellers
 IF = Imunofluorescência Direta
 IN = Inoculação em Camundongos

Para o nível de rejeição (α) de 5% $\rightarrow x^2_{\alpha} = 3,84$

IV. DISCUSSÃO.

A TABELA I apresenta os resultados obtidos com as associações das técnicas de Coloração de Sellers, Imunofluorescência Direta e Inoculação em Camundongos, realizadas em 2.242 amostras de cérebros de cães na rotina do laboratório de diagnóstico da raiva do Instituto Pasteur de São Paulo. Pela análise desta tabela, podemos observar que do total de amostras examinadas, 1.074 se revelaram positivas por uma ou mais técnicas; calculando-se o quociente entre o número de amostras positivas simultaneamente com as três técnicas (859) e o número total de positivos, (1074) encontramos um valor igual a 79,98%.

A TABELA II mostra a Sensibilidade de cada uma das técnicas, calculada através da relação entre o número de amostras positivas com a técnica considerada e o número total de amostras positivas; constatamos como mais sensível a técnica de Inoculação em Camundongos, seguida da de Imunofluorescência Direta e com menor Sensibilidade a de Coloração de Sellers.

As TABELAS III, IV e V apresentam os resultados da comparação das técnicas de Coloração de Sellers com Imunofluorescência Direta, Coloração de Sellers com Inoculação em Camundongos e Imunofluorescência Direta com Inoculação em Ca

mundõgos respectivamente. Com os resultados destas tabelas, construimos a TABELA VI, onde estão apresentados os resultados dos cálculos de Concordância das diferentes relações entre as técnicas, Coeficiente de Associação de Yule e Teste de Associação (X^2), realizado ao nível de rejeição de 5%. A análise desta última tabela nos mostra que a Concordância maior ocorreu com a relação Imunofluorescência Direta-Inoculação em Camundõgos, seguida pela relação Coloração de Sellers-Imunofluorescência Direta e a menor Concordância foi registrada com a relação Coloração de Sellers-Inoculação em Camundõgos. O Coeficiente de Associação de Yule foi o mesmo para as três relações e o Teste de Associação, forneceu valores de X^2 (Qui quadrado), que comparados ao valor de $X_{\alpha}^2 = 3,84$, para o nível de rejeição de 5%, foram altamente significantes para as três relações citadas, sendo de maior intensidade para a relação Imunofluorescência Direta-Inoculação em Camundõgos, seguindo-se em ordem de crescente o valor do X^2 (Qui quadrado) para as relações Coloração de Sellers-Imunofluorescência Direta e Coloração de Sellers-Inoculação em Camundõgos.

TABELA VII - Resultados obtidos em amostras de cérebros de animais da espécie canina, submetidos às técnicas de Coloração de Sellers (S), Imunofluorescência Direta (IF) e Inoculação em Camundongos (IN), segundo diversos autores.

AUTOR	ANO	Total de Amostras	Positivos	RESULTADOS			Sensibilidade (%)		
				Coloração de Sellers	Imunofluorescência Direta	Inoculação em Camundongos	Coloração de Sellers	Imunofluorescência Direta	Inoculação em Camundongos
MCQUEEN	1960	244	35	33/35	35/35	35/35	94,28	100,00	100,00
PILO MORON	1967	13	13	7/13	7/10	13/13	53,85	70,00	100,00
RICHTER	1969	34	19	-	19/19	19/19	-	100,00	100,00
GUILLOM	1970	77	5	-	5/5	5/5	-	100,00	100,00
MOGGIA	1970	86	57	48/57	57/57	57/57	84,21	100,00	100,00
LUCAS	1971	295	17	9/11	12/17	16/17	81,82	70,60	94,12
SUBRAHMANYAM	1971	37	23	16/23	23/23	23/23	69,56	100,00	100,00
SILVA	1972	301	64	-	64/64	64/64	-	100,00	100,00

A TABELA VII resume os resultados obtidos, por diferentes autores para as três técnicas realizadas sobre amostras de cérebros de cães coletados em diferentes laboratórios de diagnóstico da raiva. Sua análise nos mostra que o cálculo da Sensibilidade para a técnica de Coloração de Sellers variou muito de um autor para o outro. Para a técnica de Imunofluorescência Direta, verifica-se um acordo maior entre os diferentes autores, embora dois deles apresentem valores bastante afastados dos demais. Os resultados para a técnica de Inoculação em Camundongos foram os que apresentaram maior concordância, embora um dos valores apresente uma pequena variação em relação aos outros, devendo-se ressaltar que todos os autores, excetuando SILVA²⁹, trabalharam com camundongos adultos. Acreditamos que, se tivessem sido utilizados camundongos lactentes, em razão da sua maior suscetibilidade^{2, 25}, esse valor ligeiramente discrepante, talvez não aparecesse; isto explica também, o porque, de nós não termos obtido Sensibilidade para a Inoculação em Camundongos igual a 100%.

Ainda pela análise desta tabela, podemos observar que os resultados dos cálculos da Sensibilidade, quando comparados aos por nós apresentados na Tabela II, estão bem próximos dos valores obtidos pelos diferentes autores à exceção da técnica de Coloração de Sellers, onde se registrou maior discrepância. Devemos, no entanto, considerar que o núme

ro de amostras por nós utilizadas para o cálculo desses valores foi muito superior ao dos demais, o que justifica plenamente as discrepâncias observadas. Por esta razão, calculamos, o valor da Sensibilidade de cada uma das técnicas utilizando as somas dos valores fornecidos por todos os autores, dado que, todos empregaram sempre as mesmas técnicas sobre amostras de cérebros de cães. Assim, obtivemos 81,30% de Sensibilidade para a Coloração de Sellers, 96,52% para a Imunofluorescência Direta e 99,50% para a Inoculação em Camundongos. Esses valores teóricos assim calculados se aproximam muito mais daqueles por nós obtidos, conforme a TABELA II, que aqueles obtidos individualmente pelos autores, onde as variações foram maiores, principalmente, no que concerne à técnica de Coloração de Sellers.

V. CONCLUSÕES.

Tendo em vista os resultados obtidos, analisados e discutidos no presente trabalho, parece lícito concluir que:

- na rotina de diagnóstico laboratorial de raiva, deve-se sempre utilizar a associação de duas ou mais técnicas, para maior precisão dos resultados;
- a técnica de Coloração de Sellers, quando comparada com as de Imunofluorescência Direta e Inoculação em Camundongos é a que apresenta menor grau de Sensibilidade, embora seja a de maior praticidade e rapidez de resultados, os quais podem ser obtidos 2 a 3 horas, após o recebimento da amostra suspeita, podendo continuar a ser utilizada na rotina em associação com outras técnicas;
- a técnica de Imunofluorescência Direta, apresenta elevado grau de Sensibilidade e foi da sua associação com outras técnicas, Inoculação em Camundongos e Coloração de Sellers, que se ob

tiveram os maiores valores para as Concordâncias e os valores significantes mais altos para o X^2 (Qui quadrado). Sua execução é relativamente simples e os resultados podem ser obtidos 24 horas após a recepção das amostras, devendo ser sempre aplicada na rotina de diagnóstico;

- a técnica de Inoculação em Camundongos é a que apresenta maior grau de Sensibilidade e sua associação com a Imunofluorescência Direta é a que fornece maior Concordância e valor significante mais alto para o X^2 (Qui quadrado). No entanto, necessita para a sua execução, de grande número de animais e o prazo para a obtenção do diagnóstico é muito longo, no mínimo 8 dias. Sua utilização na rotina, na dependência do laboratório, poderá ser destinada tão somente, às amostras que forneceram resultados negativos às outras técnicas.

VI. RESUMO.

Procedeu-se ao estudo comparativo das técnicas - de Coloração de Sellers, Imunofluorescência Direta e Inoculação em Camundongos, utilizadas na rotina de diagnóstico laboratorial da raiva e praticadas sobre 2.242 amostras de cérebro de cães, enviadas ao Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

As técnicas de Inoculação em Camundongos e de Imunofluorescência Direta foram as que apresentaram maior grau de Sensibilidade, sendo essa associação a que forneceu maior Concordância e valor significativo mais alto para o X^2 (Qui quadrado).

A técnica de Coloração de Sellers foi a que apresentou menor grau de Sensibilidade e sua associação com as técnicas de Imunofluorescência Direta e de Inoculação em Camundongos forneceu resultados de Concordância e X^2 (Qui quadrado) inferiores aos obtidos pela associação dessas duas técnicas.

VII. SUMMARY.

A comparative study was made of three techniques: Coloration of Sellers, Direct Immunofluorescence, and Inoculation in Mice - used in the routine of laboratory diagnosis of rabies and applied on 2,242 samples of dog brains which were sent to the Pasteur Institute of São Paulo, between January 1974 and April 1976.

The techniques of mice inoculation and of direct immunofluorescence were the ones which presented higher degree of sensitivity; this association resulted in a greater rapport and a higher significative value for the X^2 (square Qui).

The techniques of Sellers Coloration resulted in a lower degree of sensitivity, and its association with the techniques of direct immunofluorescence and inoculation in mice gave lower results of rapport and X^2 than those obtained by the association of the two latter techniques.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ATANASIU, P. et al. Limites du diagnostic de la rage au laboratoire. Rec. Méd. vét., 144(11): 1083-8, 1968.
2. BAGNAROLLI, R.A. et al. Susceptibilidad de ratones lactantes y adultos al virus rabico demonstrada por inmunofluorescencia. Bol. Ofic. sanit. panamer., 68(5): 388-92, 1970.
3. BELL; J.F. Abortive rabies infection: experimental production in white mice and general discussion. J. infect. Dis., 114(3): 249-57, 1964.
4. CARSKI, T.R. et al. Pathogenesis of rabies in wildlife. II. Fluorescent antibody studies. Amer. J. vet. Res., 23(96): 1048-52, 1962.
5. GOLDWASSER, R. A. & KISSLING, R.E. Fluorescent antibody - staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., 98(2): 219-23, 1958.
6. GUILLON, J.C. et al. La rage dans l'est de la France. Enseignements tirés par le laboratoire. Bull. Acad. vét. Fr., 43(1): 29-32, 1970.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências bibliográficas: PNB/66. Rio de Janeiro, 1970. (Mimeo - grafado).

7. JOUBERT, L. & ANDRAL, L. Diagnostic biologique de la rage. Bull. Soc. Sci. vét. Méd. comp. Lyon, 76(1): 37-46, 1974.
8. KAPLAN, M.M. An assessment of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION Laboratory techniques in rabies. 3rd. ed., Geneva, 1973. p.19-25.
9. KOPROWSKY, H. The mouse inoculation test. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION Laboratory techniques in rabies. 3rd. ed., Geneva, 1973. p. 85-93.
10. LODMELL, D.L. et al. Comparative study of abortive and nonabortive rabies in mice. J. infect. Dis., 119(6): 569-80, 1969.
11. LOPEZ ROS, J. Técnicas actuales de detección de la rabia. Gac. vet., B. Aires, 30(220): 556-66, 1968.
12. LUCAS, A. et al. Le diagnostic de la rage au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort en 1968. Rec. Méd. vét., 145(4): 353-60, 1969.
13. LUCAS, A. et al. Diagnostic de la rage. Observations faites au cours de l'examen de 1.000 prélèvements suspects. Bull. Acad. vét. Fr., 43(3): 161-72, 1970.

14. LUCAS, A. et al. Sur le diagnostic expérimental de la rage. Observations faites au cours de l'examen de 2.000 prélèvements suspects. Bull. Acad. vét. Fr., 44(7): 317-38, 1971.
15. MARASCUILLO, L.A. Statistical methods for behavioral science research. New York, McGraw-Hill, 1971.
16. MARTELL, D., M.A. & ALDASORO, M.A. Detección de virus rabico. Bol. Ofic. sanit. panamer., 73(2): 117-23, 1972.
17. MARTELL, D., M.A. et al. Estudio de inmunofluorescencia de diferentes segmentos de encefalos de bovinos muertos de rabia paralitica e derriengue en forma natural e inoculados experimentalmente. Téc. pecuár., Mex., (12/13): 24-7, 1969.
18. MCQUEEN, J.L. Rabies diagnosis: special application of fluorescent antibody techniques. In: MEETING OF THE UNITED STATES LIVESTOCK SANITARY ASSOCIATION, 63th, San Francisco, 1959. Proceedings. p. 356-63 Apud Vet. Bull., 30(11): 625, 1960.
19. MCQUEEN, J.L. et al. Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I. Its evaluation in a public health laboratory. Amer. publ. Hlth., 50(11): 1743-52, 1960.

20. MIGUEL, O. Determinação da fração globulina " γ_2 " do soro sanguíneo de cães como elemento auxiliar no diagnóstico precoce da raiva. São Paulo, 1972. (Tese de doutoramento - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP)
21. MOGGIA, J.B. Estudio comparativo de metodos en el diagnóstico de la rabia. Rev. ecuat. Hig., 27(2): 111-15, 1970.
22. MOSELEY, B.L. et al. Responses in dogs exposed to attenuated rabies virus. Amer. vet. Res., 29(11): 2113-18, 1968.
23. NILSSON, M.R. Diagnóstico de laboratório da raiva. An. Microbiol., Rio de J., 16: 11-23, 1969.
24. NILSSON, M.R. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. Bol. Ofic. sanit. panamer., 68(6): 486-94, 1970.
25. NILSSON, M.R. et al. Rabies diagnosis. Comparative study on susceptibility of adult and suckling mice. Arq. Inst. Biol., S. Paulo, 35(2): 43-7, 1968.
26. PILO MORON, E.P. et al. Diagnostic rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous-maxillaire aux souriceaux et par l'immunofluorescence. Arch. Inst. Pasteur Algér., 45: 5-10, 1967.
27. RIBEIRO NETTO, A. & MACHADO, C.G. Alguns aspectos epidemiológicos da exposição humana ao risco da infecção pelo ví

- rus da raiva, na Cidade de São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Med. trop. S.Paulo, 12(1): 16-30, 1970.
28. RICHTER, F. et al. Uso del metodo de inmufluorescencia en el diagnostico de la rabia. Zoonosis, B. Ayres, 11(2): 83-5, 1969.
29. SILVA, R.A. et al. Utilização do método de imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímico e biológico no diagnóstico da raiva. Pesq. agropec. bras., Sér. vet., 8(6): 1-4, 1973.
30. SUBRAHMANYAM, B. & PATHAK, R. C. Diagnosis of rabies in dogs. Comparative study on microscopic, biological and fluorescent antibody tests for diagnosis. Indian vet. J., 48(2): 123-7, 1971.
31. SYKES-ANDRAL, M. & ANDRAL, L. Centre d'études sur la rage a Nancy-Malzeville bilan de seize mois d'activité de la section du diagnostic. Rev. méd. Vét., 37(4): 435-48, 1974.
32. TIERKEL, E.S. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation on specimes for biological test. 3rd. ed., In: WORLD HEALTH ORGANIZATION Laboratory techniques in rabies. Geneva, 1973. p. 41-55.

33. WILSNACK, R. E. & PARKER, R.L. Pathogenesis of skunk rabies virus: rabies inhibiting substance as related to rabies diagnosis. Amer. J. vet. Res., 27(116): 39-43, 1966.

34. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Rabies, 6th., Geneva, 1972. Report. Geneva, 1973. (Technical Report Series, 523).