

Francesca Carvalho Romagnoli

**ESTABILIDADE DA VACINA ANTI-RÁBICA
LIOFILIZADA E RECONSTITUÍDA - AMOSTRA SAD**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial a
obtenção do grau de mestre em
Medicina Veterinária.**

**Área de concentração: Medicina
Veterinária Preventiva**

Orientador: Élvio Carlos Moreira

**Belo Horizonte
1996**



BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

23.04.97

1211577-24

MV-000C8148-0

R 757e Romagnoli, Francesca Carvalho, 1966-

Estabilidade da vacina anti-rábica liofilizada e reconstituída- Amostra SAD / Francesca Carvalho Romagnoli. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1996.

51 p.: il.

Dissertação (Mestrado)

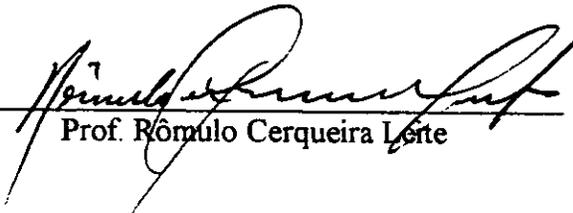
1- Raiva - Vacinas - Teses. I. Título.

CDD - 636 089 695 3

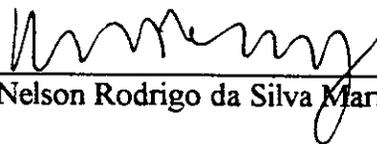
Dissertação defendida e aprovada em 13 / 12 / 96 pela Comissão
Examinadora constituída por:



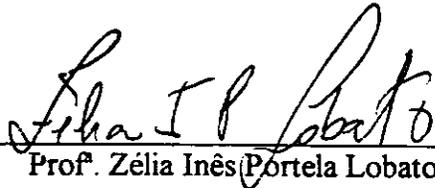
Prof. Elvio Carlos Moreira



Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Prof. Zélia Inês Portela Lobato



Dra. Marília de Oliveira Cavaleri

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao prof. Élvio, prof. Rômulo e profa. Zélia pela orientação, paciência e amizade.

Aos meus pais, responsáveis pelos valores e conceitos formadores do meu caráter.

As minhas irmãs, pessoas maravilhosas que eu muito amo.

A minha avó pela paciência e compreensão.

Ao Júlio e D. Lia pelo carinho, atenção e apoio sempre presentes.

A minha grande amiga Cacaia e a toda sua família, companheiros nas tristezas e alegrias.

A Cenira pela sua atenção e carinho.

A Dra. Benedita, Luíza e Inês, pessoas que muito me apoiaram e ensinaram.

A Cláudia, Cid e Mariângela, professores e amigos do coração.

Ao Marquinhos por sua ajuda e seu interesse inestimável.

Aos amigos Lui, Alexandre, Ricardo, Israel, Marcos, Betânia, Teresa, Regina, Simone, Nina e Rejane, pessoas muito próximas e importantes na minha vida.

A Fátima e Lalá, companheiras de laboratório e amigas.

Aos colegas de curso, Andréa, Célia, Cláudio, Clóvis, Cristina, Denise, Edísio, Hélio, João Cláudio, Jorge, Marcelo, Maria Carmen, Marília, Maurílio, Paula, Patrícia Gomes, Patrícia Macedo, companheiros nas horas difíceis.

Ao setor de doenças de aves pelos momentos de descontração.

Aos professores Néelson e José Sérgio pelo carinho e interesse.

A professora Mônica do DTIPOA pela cooperação e fornecimento da estufa BOD.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida durante o curso de mestrado.

Ao pessoal da secretaria do DMVP: Beth, Luciana e Jorge.

A Nádia pela paciência e boa vontade.

Ao pessoal da Biblioteca, em especial à Rosilene por toda a ajuda prestada.

A professora Lígia e à Cristina da Escola de Farmácia da UFMG pela realização dos testes de umidade.

Ao Laboratório LEMA BIOLOGIC pelo fornecimento das amostras.

Ao Sérgio, Inês, Marcus e Guilherme pela ajuda.

A Theomar, Mariângela e Eduardo, do Laboratório HERTAPE, pela disponibilidade e boa vontade.

A Ana e Ronaldo, do IMA, pela confiança e apoio.

Ao Dr. Deak, diretor do LARA-Campinas pela disponibilidade e interesse.

A Dra. Ângela pelo fornecimento dos animais necessários para a primeira etapa deste experimento.

A Dra. Gonçala e Juliana pelo fornecimento das amostras do vírus de rua DR 19.

Ao Dr. Tomás Aquino, diretor do LARA-Pedro Leopoldo pela disponibilidade e interesse.

Ao professor Francisco Lobato e Ricardo pelo apoio e confiança.

Aos funcionários do Biotério do LARA- Pedro Leopoldo: João e Ercílio pela cooperação.

Ao setor de transportes da Escola de Veterinária da UFMG pela cooperação.

A todas as pessoas que, oportunamente me apoiaram e ajudaram.

SUMÁRIO

	PAG.
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
RESUMO	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 LITERATURA CONSULTADA	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Vírus	27
3.3 Vacina	27
3.4 Testes	27
3.4.1 Teste de Koprowski	28
3.4.2. Teste de titulação	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÕES	42
6 SUMMARY	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

**LISTA DE TABELAS**

	PAG.
TABELA 1 Titulação da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e horas após a reconstituição.	34
TABELA 2 Porcentagem de proteção no teste de Koprowski da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e horas após a reconstituição.	36
TABELA 3 Titulação da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e dias de armazenagem.	38
TABELA 4 Porcentagem de proteção no teste de Koprowski da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e dias de armazenagem.	40

LISTA DE FIGURAS

	PAG.
FIGURA 1 Titulação da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e horas após a reconstituição.	35
FIGURA 2 Porcentagem de proteção no teste de Koprowski da vacina anti-rábica amostra SAD em temperaturas e horas após a reconstituição.	37
FIGURA 3 Titulação da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e dias de armazenagem.	39
FIGURA 4 Porcentagem de proteção no teste de Koprowski da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e dias de armazenagem.	41



RESUMO

A estabilidade da vacina anti-rábica amostra SAD foi testada frente a diferentes condições de conservação.

Um "pool" de 10 frascos de vacina anti-rábica amostra SAD de um laboratório comercial do Brasil, elaborada em cultivo celular (BHK₂₁) foi reconstituído e testado quanto a potência e eficiência em diferentes temperaturas: banho de gelo, 25°C e 37°C de hora em hora até quatro horas após a reconstituição. No banho de gelo e a 25°C a vacina mantém os requisitos mínimos por quatro horas após a reconstituição. A vacina mantida a 37°C não alcançou estes requisitos em nenhum dos tempos testados.

Esta mesma vacina liofilizada foi dividida em seis lotes de cinco frascos, submetidos às temperaturas de 25° e 37° e testados quanto a potência e eficiência após 10, 20 e 30 dias na estufa. Após 10 dias a 25°C a vacina apresentou título mínimo mas não apresentou eficiência e aos 20 e 30 dias nas temperaturas de 25°C e 37°C não manteve os requisitos mínimos de potência e eficiência. Um lote de 10 frascos foi armazenado em geladeira e testado após 365 dias apresentando eficiência e título superior ao mínimo exigido.



1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças animais, causadas por vírus, a raiva merece destaque por acometer um grande número de espécies. O período de incubação variável, que em alguns animais pode ser muito longo, favorece a manutenção e a propagação contínua do vírus entre os animais susceptíveis. A erradicação do vírus é praticamente impossível devido à manutenção de um ciclo selvagem principalmente em morcegos e em carnívoros silvestres tais como raposas, lobos, guaxinins e gambás.

Além dos prejuízos econômicos, estimados em 250 milhões de dólares anualmente na América Latina (Instituto Mineiro de Agropecuária, 1993), deve-se salientar que a raiva constitui séria ameaça à saúde pública, por se tratar de zoonose de curso rápido e na grande maioria dos casos fatal.

A vacinação constitui método bastante efetivo no controle da infecção, tendo sido empregada com êxito em diversos países do mundo. No meio urbano, a vacinação de cães e gatos rompe eficazmente a cadeia de transmissão de raiva ao homem. Por outro lado, a vacinação de ruminantes no meio rural, diminui consideravelmente a ocorrência de raiva transmitida por quirópteros.

Existe atualmente grande número de vacinas inócuas e muito eficientes para uso em animais que se encontram classificadas em dois grupos: inativadas e de vírus vivo modificado (Baer, 1991; WHO, 1992).

No Brasil, as vacinas de vírus vivo modificado são produzidas a partir de amostras FLURY LEP (Low egg passage)/ HEP (High egg passage) e SAD (Street, Alabama, Dufferin). As vacinas amostra SAD possuem propriedades imunogênicas superiores às vacinas com as amostras FLURY e às inativadas (Baer, 1991; WHO, 1992). Trabalhos experimentais e de campo comprovam que a vacina SAD confere imunidade de longa duração e mantém sua potência mesmo quando diluída (Baer, 1989), protegendo também contra diferentes variantes antigênicas do vírus rábico (Erbolato, 1989; Cordeiro, 1990; Silva, 1992).

O vírus SAD original foi isolado em 1935, em Montgomery (Alabama - E.U.A.), de cão raivoso e adaptado ao camundongo após sucessivas passagens intracerebrais. Após quatro passagens em camundongo foi denominado SAD₄. Este vírus foi adaptado ao cultivo celular de rim de hamster e após 25 passagens foi denominado SAD₄ HK₂₅.

O SAD₄ HK₂₅ após dez passagens em saco vitelino de embrião de pinto foi adaptado ao cultivo celular de rim de suíno e após seis passagens considerado suficientemente atenuado para várias espécies animais. Foi designado amostra ERA pelos pesquisadores Eva Gaynor, Rotniki e Abelseth, e as passagens 35-45 foram utilizadas para a produção da vacina amostra ERA (Abelseth, 1964; Aguer & Badano, 1974). Atualmente, com esta amostra, são produzidas vacinas em linhagens celulares de rim de hamster (BHK₂₁) e suíno (PK₁₅) (WHO, 1992).

O vírus amostra SAD, conhecido comercialmente como ERA (Lawson et al., 1987; Lawson et al., 1989), é inócuo e altamente imunogênico para cães, caprinos, bovinos e equinos, sendo eficaz em avaliação nos testes de laboratório e de campo (Abelseth, 1967; Arrelano et al., 1972; Arnold et al., 1973; Gialletti et al., 1973; Aguer & Badano, 1974; Abelseth, 1975; WHO, 1984). Possui também grande capacidade imunogênica sendo capaz de multiplicar-se em células hospedeiras susceptíveis sem provocar nenhum

sintoma de enfermidade e produzir uma infecção que confere uma imunidade sólida e duradoura (Abelseth, 1967; Gialleti et al., 1973; Blancou et al., 1984; Cordeiro, 1990).

A imunogenicidade destas vacinas depende da inoculação de quantidade suficiente de vírus rábico vivo, que penetrando no organismo é capaz de se multiplicar e promover resposta imunológica (Atanasiu, 1968; Habel, 1973). A eficácia destas vacinas é reduzida quando as condições não permitem a manutenção do título mínimo infectante, sendo que nestes casos o antígeno rábico age como um produto inativado em quantidades insuficientes para obtenção de resposta imunogênica protetora) (Sikes, 1975).

Por ser o vírus rábico sensível ao calor, um dos fatores importantes nas vacinas vivas modificadas é a manutenção da estabilidade frente às más condições de preservação. A fragilidade ao calor é devida ao fato do vírus rábico ser sensível a numerosos agentes físicos resistindo mal à dessecação lenta e à luz solar (os raios ultra violeta inativam o vírus em segundos); resiste algumas horas a 40°C, quinze minutos a 50°C, trinta e cinco segundos a 60°C e uma fervura de alguns segundos é suficiente para esterilizar o material contaminado pelo vírus (Chantal & Blancou, 1985).

A ocorrência de falhas vacinais no Brasil em animais inoculados com vacinas de vírus vivo modificado poderia estar relacionada ao clima e ao manejo do produto. O Brasil é um país caracterizado por extensas áreas de clima tropical, altas temperaturas e problemas sócio-econômicos e culturais que variam de região para região gerando comportamentos diferenciados na adoção de tecnologias aplicadas na produção animal.

Fatores importantes nos programas de vacinação são o transporte, o armazenamento e a utilização das vacinas em condições adequadas (Okolo, 1992). As vacinas inativadas são indicadas para serem usadas frente a condições difíceis de preservação, tais como

exposição ao calor e transporte a longas distâncias, pois apresentam melhor estabilidade e oferecem maiores garantias de eficácia que as de vírus vivo modificado (Abelseth, 1975; Pastoret et al., 1985; WHO, 1992).

As vacinas vivas requerem cuidados especiais quanto a sua preservação (Habel, 1973; Skewes, 1978; WHO, 1992). É necessário que as vacinas sejam conservadas à temperatura de 0° a 8°C durante o transporte e o armazenamento (Edsall, 1969; Morales & Flores, 1975). Uma vez reconstituídas devem ser mantidas em banho de gelo e utilizadas nas duas horas seguintes (WHO, 1984).

Uma das causas prováveis para os casos de raiva em animais anteriormente vacinados é a falta de estabilidade da vacina (Larghi, 1972). Na literatura não foram encontradas informações sobre a estabilidade da vacina anti-rábica amostra SAD após a reconstituição. Maiores estudos nesta área são importantes para se determinar o tempo e as condições que inviabilizam o uso das vacinas vivas.

Segundo a WHO (1973) e a legislação de Defesa Sanitária Animal Brasileira (Moreira et al., 1996), o título mínimo das vacinas vivas atenuadas deve ser $10^{3.3}$ DL₅₀/0,03 ml IC em camundongos de 11-14 g, a eficiência deve ser maior ou igual a 70%, o pH deve estar entre 6,8-7,6, o tempo de reconstituição do liofilizado deve ser no máximo 60 segundos e deve haver presença de vácuo no frasco no momento da reconstituição. Outro fator importante na manutenção do título é o processo de liofilização que é determinante da umidade residual que deve ser menor ou igual a 3% (indicador do máximo permitido para a manutenção da estabilidade do produto). Mesmo com todos estes cuidados o tempo de viabilidade do vírus SAD após reconstituição é restrito.

Cada partida de vacina produzida deve ser testada e avaliada periodicamente conforme recomendação da WHO (1992). No Brasil, o Ministério da Agricultura, através do LARA-Campinas



(Laboratório de Apoio e Referência Animal) realiza em cada partida, após a produção, os testes de pH, esterilidade, inocuidade, potência e eficiência para efeito de liberação do produto. Entretanto, não faz parte da rotina a avaliação da potência e eficiência das vacinas após sua comercialização até o uso nos animais.

O objetivo deste trabalho é testar a estabilidade de uma vacina anti-rábica de vírus vivo modificado amostra SAD, produzida no Brasil, liofilizada e reconstituída.

2 LITERATURA CONSULTADA

Valadão (1955) concluiu que o vírus rábico sem estabilizante não foi recuperável após nove dias à temperatura ambiente.

Kuwert & Liepenow (1959) testaram vírus rábico fixo (Pitman-Moore) em tampão universal Britton-Robinson em temperaturas de 4°C, 18°C, 37°C, 56°C e concluíram que a estabilidade cae rapidamente com aumento da temperatura, mesmo em pH 7,0 o vírus foi 100% inativado após cinco horas a 56°C.

Soave (1964) testou vacina anti-rábica amostra FLURY LEP e demonstrou que o vírus vivo liofilizado pode sobreviver pelo período de cinco anos após sua produção, se mantido à temperatura de geladeira.

Batalla (1969) preparou lotes de vacina anti-rábica liofilizada amostra HEP e armazenou a 2°C, 20°C e 37°C. As vacinas armazenadas a 37°C perderam potência rapidamente, as armazenadas a 20°C mantiveram títulos acima do mínimo exigido por 20 dias e algumas até os 30 dias. As vacinas conservadas a 2°C mostraram títulos satisfatórios até 120 dias.

Jaeger & Barth (1969) estudaram uma vacina anti-rábica experimental com amostra Novi-sad de vírus fixo produzida em cérebro de coelho, liofilizada e inativada. A vacina foi mantida à 4°C e a 56°C. Após um ano não encontraram diferenças significantes na antigenicidade pelo teste de Habel, mas após 15 meses a vacina armazenada a 56°C apresentou título menor que o mínimo exigido neste teste.

Crick & Brown (1971) produziram uma vacina anti-rábica inativada amostra Flury LEP que após seis meses de armazenamento a 4°C apresentou somente uma pequena perda de potência.

Kilchsperger et al. (1973a, 1973b) concluíram que a vacina anti-rábica cepa Flury LEP mantida à temperatura ambiente mantém o requisito mínimo por não mais de dois meses, se mantida à temperatura de geladeira o título cai abaixo dos limites após aproximadamente dois anos e após reconstituída permanece viável por 24 horas sob ótimas condições (pH 7,0 e temperatura entre 2-8°C).

Précausta (1974) produziu uma vacina anti-rábica inativada liofilizada e líquida: a vacina inativada liofilizada manteve o título mínimo exigido pela WHO (1973) por quatro anos e meio a 4°C já a vacina líquida após um ano a 4°C satisfaz as normas exigidas pela WHO.

Schneider et al. (1974) conservaram uma vacina anti-rábica liofilizada inativada amostra Novi-sad por 20 meses a 56°C sem perda significativa de potência, indicando grande estabilidade ao calor. Após 18 meses a 56°C as amostras não mostraram diferença significativa comparadas ao índice de potência da vacina mantida a 4°C.

Winkler et al. (1975) prepararam iscas com a vacina anti-rábica liofilizada inativada ERA que apresentaram instabilidade com perda de título quando mantidas a 4°C e a 25°C por 96 horas antes de serem fornecidas para a alimentação de raposas.

Häfliger et al. (1982) produziram uma vacina anti-rábica de vírus vivo modificado amostra SAD estabilizada contra inativação por calor pela adição de 10% de gema de ovo, resultando numa perda de título de 90% após 72 horas a 37°C e praticamente nenhuma a 4°C e a 25°C após 72 horas.

Melgarejo et al. (1983) testaram uma vacina anti-rábica liofilizada de vírus vivo modificado cepa V-319/Acatlan por 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas após reconstituída e mantida à temperatura de 4°C e 28°C. A vacina reconstituída manteve o título mínimo por 15 horas e 36 minutos à 4°C e por quatro horas e 24 minutos à 28°C.

Ciuchini et al. (1985) testaram a vacina anti-rábica amostra SAD-B₁₉ mantida durante 14 dias a temperatura ambiente (-2° a 15°C) e a perda do título não ultrapassou um log₁₀ que não comprometeu o êxito da vacinação.

Diaz et al. (1988) prepararam uma vacina inativada em cérebro de camundongos lactentes líquida e liofilizada. O lote de vacina inativada líquida manteve sua potência acima do limite mínimo exigido pela WHO quando armazenada por 15 meses a 4°C e a 25°C e por três meses a 37°C. O lote de vacina inativada liofilizada manteve sua potência acima do limite mínimo por 15 meses a 4°, 25° e 37°C.

Osidze et al. (1988) produziram uma vacina anti-rábica inativada liofilizada em cérebro de carneiro que manteve seu título por nove meses quando armazenada a 37°C e por 15 meses à 4°C.

Lawson et al. (1989) testaram a vacina anti-rábica de vírus amostra SAD em iscas por 21 dias em temperaturas diárias variando de 9°-24°C e obtiveram títulos de 10^{6.3} a 10^{6.4} DICC₅₀ (dose infectante em cultivo celular).

Lawson et al. (1992) testaram uma vacina anti-rábica de vírus vivo modificado amostra SAD colocada em iscas. As iscas foram colocadas no ambiente por 21 dias. A variação diária da temperatura ambiental ficou entre 0,7°C e 15,7°C com a mínima de -3°C e a máxima de 22°C. A vacina perdeu 0,6 log₁₀ DICC de título após o período.



Rubi & Rubio (1994) testando a estabilidade da vacina anti-rábica V-319/Acatlan inativada com radiação gama encontraram uma flutuação no título dos lotes e concluíram que este efeito variável dentro das titulações está relacionado com variáveis de manejo na produção e titulação das vacinas, assim como a susceptibilidade individual de cada animal (que em provas biológicas devem ser sempre estimadas).

Svrcek et al. (1995) produziram uma vacina anti-rábica cepa SAD-Vnukovo-32/107 que pode ser estocada por 10 dias a 4°C sem decréscimo do título. A armazenagem por 10 dias a 20°C resultou numa diminuição de 1,5 log₁₀ do título.

Moreira et al. (1996) analisaram a equivalência entre o método de Koprowski (P) e a titulação (T) para a aprovação das vacinas anti-rábicas, em virtude da ocorrência de reprovações por apenas um deles. Foram testadas 679 partidas pelos dois métodos, sendo aprovadas 642 por P, 650 por T e 627 por P e T, representando 94,5%, 95,7% e 92,3%, respectivamente. O teste estatístico (hipótese de nulidade) mostrou que não há diferença entre a probabilidade de aprovação de partidas de vacinas entre os dois testes, sendo o risco estimado de reprovar apenas por P=3,5% e apenas por T=2,3%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) de 11 a 14 g para o teste de potência da vacina. Para o teste de eficiência foram utilizadas cobaias adultas (*Cavia porcellus*) com peso entre 300-400 g.

Ao início do experimento, as instalações e os materiais da sala foram lavados e desinfetados com hipoclorito de sódio, sendo posteriormente usado o lança chamas para o piso e paredes. Durante o experimento, as janelas permaneceram semi abertas para a manutenção da ventilação e arejamento adequados.

Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas com tampa de metal e as cobaias em caixas plásticas com tampa de tela. A cama de cepilho de madeira era trocada a cada dois dias tanto para os camundongos quanto para as cobaias. Os recipientes de água e ração eram limpos diariamente, sendo oferecidos água fresca e ração à vontade durante todo o experimento. Às cobaias além de água fresca e ração foi oferecido diariamente capim verde à vontade.

Na primeira etapa do experimento foram utilizados 520 camundongos e 140 cobaias fornecidos pelo LARA- Campinas¹.

1. LARA- Campinas - Av. Heitor Penteado, Km 3,5 - Campinas, S. P.

Na segunda etapa foram utilizados 120 camundongos e 60 cobaias fornecidos pelo Laboratório Hertape² e pela FUNED³.

3.2 Vírus

O vírus DR₁₉ de trabalho utilizado para o desafio no teste de eficiência (Koprowski) foi fornecido pela unidade de Controle biológico do LARA- Campinas. O vírus apresentava título $10^{7.2}$ e a diluição recomendada foi 1:80.

3.3 Vacina

Foram utilizados 50 frascos de 10 doses de vacina anti-rábica liofilizada de vírus vivo modificado amostra SAD, elaborada em cultivo celular (BHK₂₁) com 20% de estabilizante peptona, partida 010/95 (ABR 95), laboratório Lema Biologic do Brasil Ltda⁴, testadas e aprovadas pelo Ministério da Agricultura. As vacinas foram coletadas diretamente do laboratório e, segundo testes realizados no LARA- Campinas, apresentavam título $10^{4.499}$ DL₅₀/0,03 ml IC em camundongos de 11-14 grs, umidade residual 0,9 %, pH 7,2 e eficiência de 100%.

3.4 Testes

Os testes de potência e eficiência foram realizados segundo técnica recomendada pela WHO (1973) e serão descritos posteriormente.

2. HERTAPE- R. Cardoso, 55- Belo Horizonte- M.G.

3. FUNED- R. Cd. P. Carneiro, 80- Belo Horizonte- M.G.

4. LEMA BIOLOGIC- Av. Hum 2218- Contagem- M.G.

Na primeira etapa foram reconstituídos 10 frascos de vacina com 20 ml de água destilada por frasco. Estes foram agrupados em um becker de 250 ml, de onde foram tiradas as amostras. Logo após a reconstituição foi retirado 0.5 ml para as diluições de 10^{-1} a 10^{-5} (titulação) e 1 ml para a diluição 1:10 (eficiência). Foram separadas amostras de 10 ml em 12 frascos que ficaram divididos em:

- frascos que foram colocados em banho de gelo numa caixa de isopor que permaneceu aberta durante o experimento;
- frascos que foram para a estufa à temperatura de 25°C;
- frascos que foram para a estufa à temperatura de 37°C.

Uma hora após a reconstituição um frasco de cada grupo foi retirado e testado quanto a eficiência e titulação. Este procedimento foi adotado às duas, três e quatro horas após a reconstituição.

Em uma segunda etapa foram separados seis lotes de cinco frascos de vacina liofilizada. Três lotes foram armazenados em uma estufa de 25°C e testados aos 10, 20 e 30 dias após armazenados. Três lotes foram armazenados em uma estufa de 37°C e testados aos 10, 20 e 30 dias após armazenagem. Um lote de 10 frascos foi armazenado em geladeira e testado após 365 dias quanto a eficiência e titulação. O procedimento foi o mesmo descrito na primeira etapa.

3.4.1 Teste de Koprowski (1973)

Um grupo de 10 cobaias foi vacinado com 0,25 ml da vacina diluída 1:10, via intramuscular, na pata posterior direita do animal e um grupo de 10 cobaias foi mantido como controle. Após 21 dias, os animais foram desafiados com o vírus DR₁₉, na diluição 1:80 (concentração que produziu mais que 80% de mortalidade nos animais controle). No desafio foi inoculado 0.3 ml do vírus no músculo da pata posterior esquerda. Os animais foram observados diariamente por 21 dias. A eficiência é considerada satisfatória

quando 80% dos animais controle morrem com sintomas de raiva e pelo menos 70% dos vacinados sobrevivem e não apresentam sintomas de raiva.

3.4.2 Teste de titulação (WHO/1973)

A vacina após reconstituída foi submetida a diluições de 10^{-1} a 10^{-5} em água destilada com 2% de soro normal equino e mantida em banho de gelo até sua inoculação. Foram inoculados 10 camundongos por diluição com o peso de 11 a 14 grs. A dose por camundongo foi 0,03 ml via intracerebral (IC). Não foram considerados casos de raiva mortes ocorridas nos quatro primeiros dias após inoculação. O título da vacina foi calculado pelo método de Reed & Muench (1938) devendo apresentar título mínimo de $10^{3.3} \text{DL}_{50}/0,03 \text{ ml IC}$ em camundongos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vacina anti-rábica amostra SAD manteve os requisitos mínimos de potência ($10^{3.3}/0,03$ ml IC em camundongos) e eficiência (70%) por quatro horas após reconstituída, quando mantida em banho de gelo e à temperatura de 25°C (Tabs. 1 e 2, Figs. 1 e 2). Quando submetida à temperatura de 37°C, uma hora após reconstituída apresentou eficiência abaixo do mínimo exigido e a partir de três horas não atendeu aos requisitos mínimos de potência e eficiência (Tabs. 1 e 2, Figs. 1 e 2). Estes resultados estão relacionados com a sensibilidade do vírus rábico ao calor (Valadão, 1955; Chantal & Blancou, 1985; Baer, 1991).

Apesar de não terem sido encontrados na revisão bibliográfica trabalhos com a estabilidade da vacina anti-rábica amostra SAD após reconstituída, foram citados abaixo autores que trabalhando com vacinas anti-rábicas de vírus vivo modificado produzidas com outras amostras encontraram resultados semelhantes.

A temperatura de banho de gelo não foi padronizada mas se aproxima à temperatura de 4°C usada por Melgarejo et al. (1983) com a vacina anti-rábica de vírus vivo modificado amostra V-319/Acatlan que após reconstituída obteve o título superior ao mínimo por 15 horas e 36 minutos. O resultado obtido neste trabalho com a amostra SAD em banho de gelo foi de até quatro horas após reconstituída. Na temperatura de 28°C estes autores obtiveram a manutenção do título mínimo por quatro horas e 24 minutos, resultado muito semelhante ao obtido neste trabalho com a amostra SAD na temperatura de 25°C que conservou o título e a eficiência por quatro horas após reconstituída. É importante salientar que neste trabalho a amostra SAD não foi testada por tempo indefinido

até a completa inativação viral. Kilchsperger et al. (1973b) obtiveram um resultado melhor com a amostra FLURY LEP que conservada em ótimas condições (pH 7,0 e temperatura entre 2-8°C) permaneceu viável por 24 horas.

Na temperatura de 25°C observou-se que três horas após reconstituída a vacina apresentou título menor que após quatro horas (Tab. 1). A provável explicação para estes resultados seria de que a titulação é uma prova biológica feita em camundongos na qual a susceptibilidade individual de cada animal deve ser sempre considerada (Rubi & Rubio; 1994).

Os resultados obtidos com a vacina amostra SAD após reconstituída e conservada a temperatura de 37°C condizem com os resultados de Kuwert & Liepenow (1959) demonstrando que a estabilidade do vírus rábico cai rapidamente com o aumento da temperatura. Quanto maior a temperatura e o tempo após a reconstituição da vacina anti-rábica amostra SAD menor a sua eficácia demonstrada por uma baixa significativa no título capaz de interferir na imunização dos animais vacinados.

A vacina anti-rábica amostra SAD liofilizada quando conservada a 25°C por 10 dias apresentou título superior ao exigido mas não manteve o mínimo de eficiência (Tabs. 3 e 4, Figs. 3 e 4) e, após 20 e 30 dias nesta temperatura não manteve os requisitos mínimos exigidos tanto de potência quanto de eficiência (Tabs. 3 e 4, Figs. 3 e 4).

Os testes usados para a aprovação oficial das vacinas anti-rábicas veterinárias de vírus vivo modificado são testes biológicos e utilizam animais de diferentes espécies podendo ocorrer a reprovação no teste de titulação (T) e a aprovação no teste de Koprowski (P) ou o contrário. Contudo, Moreira et al. (1996), responsáveis pela aprovação destas vacinas no LARA- Campinas, verificaram que para a aprovação são necessários os dois testes, em virtude da

ocorrência de reprovação em um dos testes e aprovação no outro (risco estimado por $P= 3,5\%$ e por $T= 2,3\%$).

A vacina liofilizada armazenada a 37°C após 10, 20 e 30 dias não apresentou os requisitos mínimos de potência e eficiência (Tabs. 3 e 4, Figs. 3 e 4). Estes resultados reafirmam a instabilidade do vírus rábico ao calor, mesmo em presença de 20% de peptona como estabilizante da vacina.

Batalla (1969) em experimentos com a vacina anti-rábica amostra FLURY HEP armazenada a 25°C obteve títulos superiores ao mínimo por 20 dias e com alguns lotes até os 30 dias, contudo nos resultados obtidos com a amostra SAD encontramos título superior ao mínimo por 10 dias embora no teste de eficiência não foi obtido o mínimo exigido. Lawson et al. (1989) em trabalhos com a vacina amostra SAD colocada em iscas à temperatura ambiente (9°C a 24°C) obteve títulos superiores ao mínimo exigido por 21 dias.

A vacina anti-rábica amostra ERA em testes conduzidos por Winkler et al. (1975) apresentou título inferior ao mínimo quando mantida a 4°C e a 25°C por quatro dias, porém Häfliger et al. (1982) testando a vacina anti-rábica amostra SAD nas mesmas temperaturas pelo mesmo período obtiveram praticamente nenhuma perda de título e a 37°C houve uma queda de 90% no título após quatro dias. Os resultados deste trabalho demonstram uma queda de 57% no título da vacina amostra SAD após 10 dias a 37°C .

Ciuchini et al. (1985) mantiveram a amostra SAD B₁₉ por 14 dias à temperatura ambiente (-2 a 15°C) e obtiveram a perda de um \log_{10} no título, Lawson et al. (1992) utilizando a amostra SAD colocada em iscas à temperatura ambiente (-3°C a 22°C) por 21 dias obtiveram uma diminuição de $0,6 \log_{10}$ DICC de título e Svrcek et al. (1995) conservando a vacina anti-rábica amostra SAD Vnokovo 32/107 por 10 dias a 20°C obtiveram diminuição de $1,5 \log_{10}$ do título. Neste trabalho o resultado obtido no mesmo período com a amostra SAD a 25°C foi uma diminuição de $2,08 \log_{10}$ do título.

Quando comparamos os resultados encontrados neste trabalho com a vacina de vírus vivo amostra SAD com os resultados de trabalhos com as vacinas inativadas (Jaeger & Barth, 1969; Crick & Brown, 1971; Precausta, 1974; Schneider et al., 1974; Diaz et al., 1988, Ozidze et al., 1988), observamos que as vacinas inativadas apresentaram uma maior estabilidade ao calor. Jaeger & Barth (1969) trabalhando com a vacina inativada amostra Novi-sadi a 56°C obteve título superior ao mínimo após um ano e Schneider et al. (1974) trabalhando com a mesma amostra nesta temperatura obtiveram título acima do mínimo por 20 meses. Diaz et al. (1988) com a vacina inativada liofilizada produzida em cérebro de camundongos na temperatura de 37°C obtiveram potência acima do limite mínimo por 15 meses e Ozidze et al. (1988) com a vacina inativada liofilizada produzida em cérebro de carneiro conservada nesta temperatura obtiveram potência superior ao mínimo por nove meses.

A vacina anti-rábica amostra SAD mantida em geladeira (2-8°C) pelo período de 365 dias apresentou título e eficiência superiores aos exigidos. Soave (1964) demonstrou que o vírus rábico amostra FLURY LEP sobrevive por cinco anos à temperatura de geladeira e Kilchsperger et al. (1973a) manteve a vacina viva amostra FLURY LEP em geladeira obtendo título acima do mínimo por aproximadamente dois anos.

Os resultados obtidos neste trabalho com a vacina amostra SAD reconstituída e liofilizada permitem verificar a importância da boa conservação da vacina. Dentre as possíveis causas de falhas vacinais devemos considerar a conservação inadequada desta vacina no laboratório e durante sua comercialização até sua aplicação nos animais. As vacinas anti-rábicas de vírus vivo modificado são eficazes e altamente antigênicas, mas requerem condições especiais de temperatura (2-8°C) e manejo adequado até o momento da aplicação.

Tabela 1. Titulação da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e horas após reconstituição.

HORAS	TITULO (\log_{10})*		
	B. G.**	25°C	37°C
0	5,44		
1	4,75	4,81	3,92
2	4,37	4,23	3,67
3	3,58	3,87	2,74
4	3,33	4,0	1,02

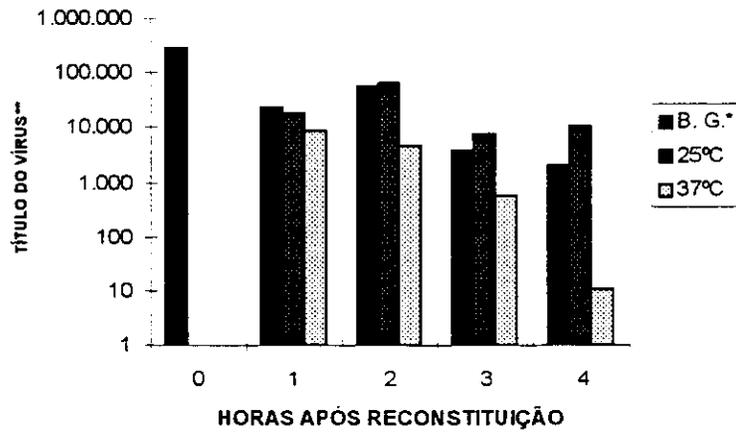
*em $DL_{50}/0,03$ ml IC em camundongos de 11 a 14 gramas, calculado por Reed & Muench

**Banho de gelo



FIGURA 1.

Titulação da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e horas após reconstituição



*Banho de gelo

**em $DL_{50}/0,03$ ml IC em camundongos de 11 a 14 gramas, calculado por Reed & Muench

Tabela 2. Porcentagem de proteção no teste de Koprowski* da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e horas após a reconstituição.

HORAS	PROTEÇÃO**			
	B.G.***	25°C	37°C	CONTROLE
0	100%	---	---	0%
1	80%	80%	60%	0%
2	80%	80%	50%	0%
3	70%	70%	30%	0%
4	80%	80%	30%	0%

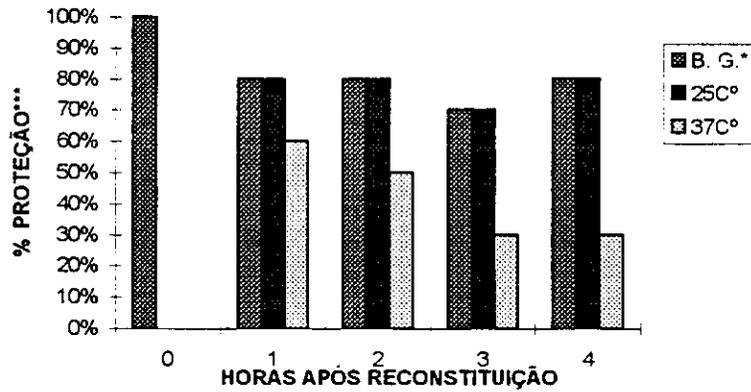
*desafio com o vírus rábico amostra DR₁₉, 1:80

**em cobaias de 300-400 gramas

***Banho de gelo

FIGURA 2.

Porcentagem de proteção no teste de Koprowski** da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e horas após a reconstituição



*Banho de gelo

**desafio com o vírus rábico amostra DR₁₉, 1:80

***em cobaias de 300-400 gramas

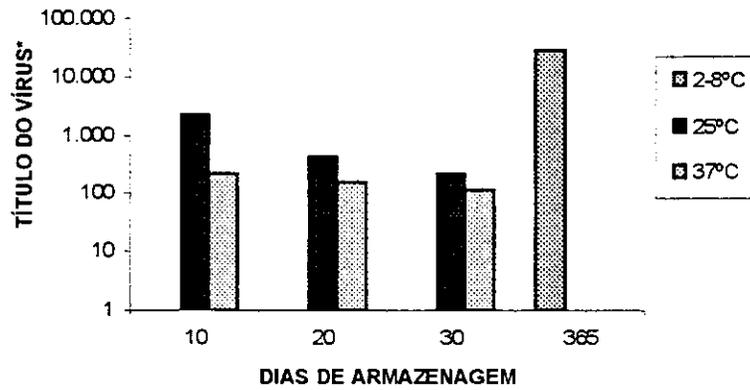
Tabela 3. Titulação da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e dias de armazenagem.

DIAS	TITULO (\log_{10})*		
	2-8°C	25°C	37°C
10	---	3,36	2,34
20	---	2,62	2,20
30	---	2,33	2,05
365	4,45	---	---

*expresso em $DL_{50}/0,03$ ml IC em camundongos de 11-14 gramas, calculado por Reed & Muench

FIGURA 3.

Titulação da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e dias de armazenagem



*expresso em $DL_{50}/0,03$ ml IC em camundongos de 11-14 gramas, calculado por Reed & Muench

Tabela 4. Porcentagem de proteção no teste de Koprowski* da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e dias de armazenagem.

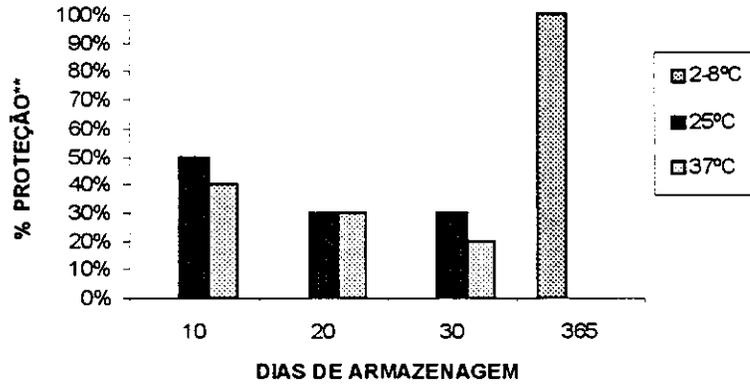
DIAS	PROTEÇÃO**			CONTROLES
	2-8°C	25°C	37°C	
10	---	50%	40%	0%
20	---	30%	30%	20%
30	---	30%	20%	0%
365	100%	---	---	0%

*desafio com o vírus rábico amostra DR₁₉, 1:80

**em cobaias de 300-400 gramas

FIGURA 4.

Porcentagem de proteção no teste de Koprowski* da vacina anti-rábica amostra SAD em diferentes temperaturas e dias de armazenagem



*desafio com o vírus rábico amostra DR₁₉, 1:80

**em cobaias de 300-400 gramas

5 CONCLUSÕES

A vacina anti-rábica de vírus vivo modificado amostra SAD foi capaz de se manter viável por quatro horas após sua reconstituição, quando conservada em banho de gelo e na temperatura de 25°C.

A vacina anti-rábica de vírus vivo modificado amostra SAD não manteve os requisitos mínimos exigidos pela legislação se armazenado liofilizado pelo período de 10 dias à 25°C e à 37°C.

A temperatura e o tempo de armazenagem são parâmetros decisivos para a manutenção da infecciosidade da vacina de vírus vivo modificado amostra SAD, sendo que à medida que estes crescem há uma queda no título e na eficiência.



6 SUMMARY

The stability of SAD rabies vaccine has been studied at various storage time and length.

A 10-vial pooled batch of SAD rabies vaccine produced by a brazilian comercial laboratory, grown in BHK₂₁ cells, was reconstituted and tested for potency and efficiency after storage at the following temperatures and times: ice bath, 25°C, 37°C, samples taken at each hour past up to four hours from reconstitution. Ice bath and 25°C conservation maintained the minimum requirements for up to four hours post-reconstitution. At 37°C the vaccine did not maintain the minimum requirements within one hour of storage.

The same rabies vaccine lyophilized was divided into six aliquots of five vials which were submitted to 25°C and 37°C temperatures and tested for potency and efficiency after 10, 20 and 30 days of storage. Within 10 days at 25°C the vaccine maintained the minimum required titer but did not pass the efficiency test, whereas within 20 and 30 days at the same temperature, the vaccine did not maintain neither efficiency nor potency. A batch of 10 vials was maintained in a refrigerator and tested after one year of storage, maintaining higher than minimum recommended titer and efficiency.



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSETH, M. K. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Canine Vet. J.*, v. 5, n. 11, p.279- 286, 1964.
- ABELSETH, M. K. Further studies on the use of ERA rabies vaccine in domestic animals. *Canine Vet. J.*, v. 8, n. 10, p. 221-227, 1967.
- ABELSETH, M. K. Bovine vaccines. In: BAER, G. M. *The natural history of rabies*. New York: Academic Press, 1975. v. 2, p. 202-217.
- AGUER, J., BADANO, C. A new ERA strain rabies vaccine. *Gac. Vet.*, v. 36, n. 285, p. 171-191, 1974.
- ARNOLD, R.M., PERITZ, F. J., SUREAU, P., et al. Immunity against paralytic rabies in cattle following vaccination with ERA vaccine under ranch conditions in Bolivia. Part II- Duration of immunity. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 5, n. 1, p. 01-05, 1973.
- ARNOLD, R. M., PERITZ, F. J., SUREAU P., et al. Immunity against paralytic rabies in cattle following vaccination with ERA vaccine under ranch conditions in Bolivia. Part III- The influence of maternal antibody on the sucess of calves of different ages. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 5, n. 1, p. 06-11, 1973.

- ARRELANO, C., SUREAU, P., BATALLA, D. Avaliação da vacina anti-rábica ERA em bovinos. *Zoonosis*, v. 14, n. 1, p. 284-291, 1972.
- ATANASIU, D. P.; et al. Inmunidad antirrabica en bovinos vacunados. *Bol. Of. San. Panam.*, v. 64, n 5, p. 431-440, 1968.
- BAER, G. M. Vacunas antirrabicas para los animales domesticos: pasado, presente y futuro. In: CONGRESO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 1, 1989, Maracaibo. *Foro Internacional Sobre Rabia*. Maracaibo: 1989. p. 23-32.
- BAER, G. M. *The natural history of rabies*. 2 ed. Boca Raton: CRC, 1991, 620p.
- BATALLA, C. D. Viability of HEP Flury virus at different temperatures using two maintenance media. *Tec. Pec. Mex.*, v. 12/13, p. 33-36, 1969.
- BLANCOU, J., PÉPIN, M., SOULEBOT, J. P., et al. Vaccination of cattle against rabies. Antibody kinetics and resistance to challenge 3 years after vaccination. *Ann. Rech. Vet.*, v. 15, n. 4, p. 543-547, 1984.
- CHANTAL, J., BLANCOU, J. Le virus rabique. In: Pasteur et la rage. *Inf. Tech. Serv. Vét.*, p. 281-292, 1985.
- CIUCHINI F., BUONAVOGLIA C., DI TRANI L., et al.. Influenza della temperatura ambientale sul titolo virale del vaccino SAD-B₁₉ utilizzato per la vaccinazione antirabbica della volpe in Valle Camonica. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, v. 39, n. 2, p. 722-725, 1985.

- CORDEIRO, C. C., SILVA, E. V., MIGUEL, O., et al. Avaliação da vacina anti-rábica ERA, frente a variantes antigênicas do vírus da raiva, em diferentes períodos pós imunização. **Rev. Saúde Públ.**, v. 24, n. 6, p. 512-17, 1990.
- CRICK, J., BROWN, F. An inactivated baby hamster kidney cell rabies vaccine for use in dogs and cattle. **Res. Vet. Sci.**, v. 12, p. 159- 161, 1971.
- DIAZ, AMO, PERDOMO, G. N., BECCO, O. Stability of rabies suckling mouse brain vaccine stored at different temperatures. **P. A. H. O. Bulletin**, v. 22, n. 3, p. 281-291, 1988.
- EDSALL, G. Aspectos tecnicos de los programas de vacunacion. **Bol. Of. San. Panam.**, v. 66, n. 5, p. 385-408, 1969.
- ERBOLATO, E. B., SILVA, E. V., MIGUEL, O. et al. Eficácia da vacina anti-rábica ERA em camundongos frente a quatro diferentes variantes antigênicas do vírus da raiva. **Rev. Saúde Públ.**, v. 23, n. 6, p. 447-454, 1989.
- GIALLETI, L., GRANIERI, M., TITOLI, F., et al. Safety and efficacy of the live virus rabies vaccine ERA strain. **Arch. Vet. Ital.**, v. 24, n. 5/6, p. 191-199, 1973.
- HABEL, K. General considerations in safety and potency testing. In: KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 3 ed. Geneva: World Health Organization, 1973. p. 271-276.
- HÄFLIGER, V., BICHSEL, P., WANDELER, A. et al. Oral immunization of foxes against rabies: stabilization and bait application of the virus. **Zentralbl. Veterinärmed.**, v. 28, n. 8, p. 608-618, 1982.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Projeto de combate à raiva dos herbívoros em Minas Gerais. Belo Horizonte, 1993. 10p.

JAEGER, O., BARTH, R. Heat stability of a lyophilized, inactivated rabies vaccine. *Zentrabl. Bakt. Parasitkde.* v. 210, p. 135-139, 1969.

KILCHSPERGER, G., GÖTZC, V., HARTMANN, H. Rabies vaccination in domestic animal. I- Dogs and cats. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, v. 115, n. 5-6, p. 221- 227, 1973a.

KILCHSPERGER, G., GÖTZC, V., HARTMANN, H. Rabies vaccination in domestic animal. II- Cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, v. 115, n. 5-6, p. 257-262, 1973b.

KOPROWSKI, H. Guinea pig potency test for chicken embryo vaccine. In: KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H. (Ed.) *Laboratory techniques in rabies.* 3 ed. Geneva: World Health Organization, 1973. p. 287-291.

KUWERT, E., LIEPENOW, W. Effect of pH, temperature and formaldehyde on the stability of rabies virus. *Arch. Exp. Vetmed.* ,v. 13, p. 335-344, 1959.

LARGUI, O. L. Tendencias recientes y desarrollo de vacunas contra la rabia para las Américas. *Zoonosis*, v. 14, n.1, p. 354-357, 1972.

LAWSON, K. F., BLACK, J. G., CHARLTON, K. M. et al. Safety and immunogenicity of a vaccine bait containing ERA strain of attenuated rabies virus. *Can. J. Vet. Res.*, v. 51, n. 4, p. 460-464, 1987.

- LAWSON, K. F., CHIU, H., MATSON, M., et al. Studies on efficacy and stability of a vaccine bait containing ERA strain of rabies virus propagated in a BHK21 cell line. *Can. J. Vet. Res.*, v. 56, p. 135-141, 1992.
- LAWSON, K.F., HERTLER, R., CHARLTON, K. M. et al. Safety and immunogenicity of ERA strain of rabies virus propagated in a BHK-21 cell line. *Can. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 4, p. 438-444, 1989.
- MELGAREJO, A., HERNANDEZ, E., HERNANDEZ, O. et al. Duracion de la viabilidad de la vacuna antirrabica cepa V-319/Acatlan, despues de reconstituída. *Tec. Pec. Mex.*, v. 44; p. 96-101, 1983.
- MORALES, R., FLORES R. Prevencion de la rabia paralítica bovina, control de la enfermedad. *Tec. Pec. Mex.*, v. 29, p. 81-86, 1975.
- MOREIRA, J. A., ARITA, G. M.M., ZARONI, M.M.H. et al. Relação entre os resultados dos testes de Koprowski e titulação de vacinas anti-rábicas atenuadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 1996, Goiânia. *Anais...* Goiânia: 1996. p. 87.
- NETTO, A. R., NILSSON, M. R., CÔRTEZ J. A. et al. Comparative study of cattle antirabies vaccines. II.- Protection conferred by Alurrabiffa, ERA and formidogel vaccines. *Zentralbl. Veterinarmed.*, v. 20 b, n. 5, p. 398-404, 1973.
- OKOLO, M. I. O. Epidemiology of post-rabies vaccination failures in rural dogs. *Biomed. letters*, v. 47, n. 166, p. 139-145, 1992.
- OSIDZE, D. F., IVANOVSKII, E. V. , SAFAROV, R. K. Inactivated ethanol vaccine against rabies, for use in animals. *Veterinary*, n.6, p. 25-26, 1988.

- PASTORET, P.P., THIRIART, C., THOMAS, I. et al. A. Vaccination of ruminants against rabies. *Ann. Med. Vet.*, v. 129, n. 4/5, p. 339-349, 1985.
- PERITZ, F. J. Immunity against paralytic rabies in cattle following vaccination with ERA rabies vaccine under ranch conditions in Bolivia. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 4, n. 1, p. 49-53, 1972.
- PRÉCAUSTA, P. Vaccin antirabique inactivé à usage vétérinaire préparé à partir de culture cellulaire. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RABIES, 21, 1972, Lyon. *Proceedings...* Switzerland: S Karger, 1974. p. 162- 178.
- PROSPERI, S., IRSARA, A., BATTELI, G. et al. Vaccination of cattle with live and inactivated rabies vaccines; a study of antibody response. *Vet. Res. Commun.*, v. 8, n. 3, p. 181-185, 1984.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 percent end points. *Am. J. hyg.*, v. 27, p. 493-498, 1938.
- RUBI, J. E. W. & RUBIO, E. L. Estabilidad de la vacuna antirrabica V-319 Acatlan inactivada con radiacion gamma (Cobalto- 60). *Tec. Pec. Méx.*, v. 32, n. 1, p. 43-46, 1994.
- SCHNEIDER, W.; KRASEMANN, C.; SEINSCHKE, D. The stability of a freeze-dried rabies vaccine during a 20 months storage at 56°. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RABIES, 21, 1972, Lyon. *Proceedings...* Switzerland: S. Karger, 1974. p. 295-299.
- SIKES, R. K. Canine and feline vaccines- past and present. In: BAER, G. M. *The natural history of rabies*. New York: Academic Press, 1975, v. 2, p.177-188.

- SILVA, E.V., CORDEIRO, C. F., PRETO, A. A., et al. Avaliação de vacinas anti-rábicas ERA inativadas, com e sem adjuvante, frente a diferentes cepas do vírus da raiva. *Arq. Biol. Tecn.*, v. 35, n. 1, p. 191-202, 1992.
- SOAVE, O. A. Viability of low egg passage, modified live virus rabies vaccine following 3 and 5 years of storage. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 144, p. 387-388, 1964.
- SKEWES, H. R. Rabia in caninos vacunados con virus vivo modificado, cepa FLURY. *Vet. Mexicana*, v. 9, n. 2, p. 73-75, 1978.
- SVRCEK, S., DUROVE, A., ONDREJKA, R. et al. Immunogenic and antigenic activity of an experimental oral rabies vaccine prepared from the strain Vnukovo 32/107. *Vet.- Med.*, v. 40, n. 3, p. 87-96, 1995.
- VALADÃO, F. G. Storage of rabies virus at low and at room temperature. *Anais Serv. Vet. Lourenço Marques*, v. 59, n. 7, p. 77-82, 1955.
- WHO EXPERT COMITEE ON RABIES, 6, 1973, Geneva. *Report...* Geneva: WHO, 1973. 98 p.
- WHO EXPERT COMITEE ON RABIES, 7, 1984, Geneva. *Report...* Geneva: WHO, 1984. 113 p.
- WHO EXPERT COMITEE ON RABIES, 8, 1991, Geneva. *Report...* Geneva: WHO, 1992. 85 p.
- WINKLER, W. G., Mc LEAN, R. G., COWART, J. C. Vaccination of foxes against rabies using ingested baits. *J. Wildl. Dis.*, n. 11, p. 382-388, 1975.