

MARILIA DE OLIVEIRA CAVALIERI

**IMUNIDADE ANTI-RÁBICA CONTRA DIFERENTES
AMOSTRAS DE VÍRUS DE RUA**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Medicina
Veterinária Preventiva
Orientador: Elvino Carlos Moreira**

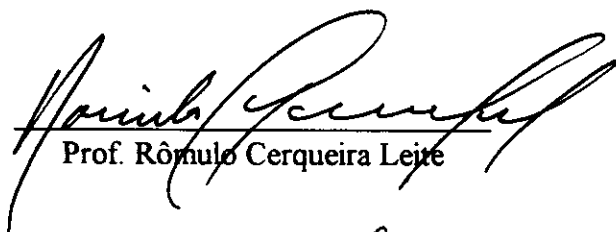
**Belo Horizonte
1996**

C377a Cavalieri, Marília de Oliveira, 1952 -
Imunidade anti-rábica contra diferentes
amostras de vírus de rua / Marília de
Oliveira Cavalieri. - Belo Horizonte:
UFMG - Escola de Veterinária, 1996.
54p.: il
Dissertação (Mestrado)
1. Raiva - Vacinas - Teses. 2.
Imunidade - Teses. I. Título.
CDD - 636.089 695 3

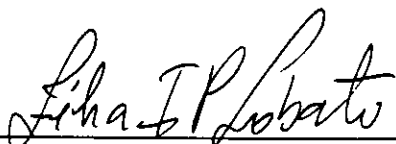
Dissertação defendida e aprovada em 06 / 09 / 96 pela Comissão Examinadora constituída por:



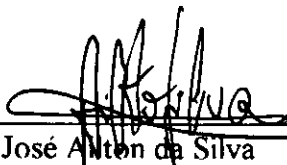
Prof. Elvio Carlos Moreira



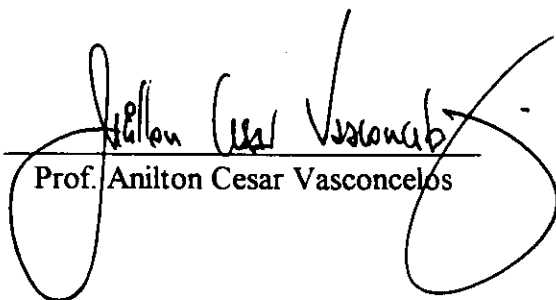
Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof.ª Zélia Inês Portela Lobato



Prof. José Anton da Silva



Prof. Anilton Cesar Vasconcelos

**“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho
e sobre ele lança toda a força de sua alma...
Todo o universo conspira a seu favor!”
GOETHE**

**Aos meus pais e irmãos, em especial ao Wagner,
presentes em todos os momentos de minha vida.**

A Daniela, filha e a grande amiga de todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao comitê de orientação, professores Élvio Carlos Moreira, Rômulo Cerqueira Leite e Zélia Inês Portela Lobato, pela acolhida, orientação e constante incentivo em todas as etapas do trabalho.

Aos professores José Ailton da Silva e Anilton Cesar Vasconcelos pelas valiosas sugestões.

Aos meus pais, à minha filha Daniela e ao meu irmão Wagner, pelo apoio, incentivo e paciência.

Ao Dr. Antônio Cândido Martins Borges, diretor geral do IMA, por ter me proporcionado a oportunidade de crescimento científico.

Ao Dr. José Marques, chefe de divisão do laboratório do IMA, Dra Eneida de Souza Costa, assistente técnica, responsável pelo laboratório de saúde animal do IMA, pelo empenho para que eu pudesse cursar o mestrado.

Ao Márcio Geraldo Ribeiro, colega de graduação e do IMA, grande amigo e colaborador.

Aos colegas do laboratório do IMA, Laércio, Ronaldo, Liana, Marilda, Vera, Fatinha, Maria da Glória, Ana Beatriz, Ana Maria, Joana e Deia, pelo incentivo.

Ao professor Israel José da Silva pela ajuda prestada como chefe do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Ao professor Romário Cerqueira Leite pelos ensinamentos durante a disciplina de Seminários em Medicina Veterinária Preventiva, nos auxiliando na elaboração e apresentação dos trabalhos científicos.

Aos funcionários do DMVP, Beth, Luciana, Jorge, Creuza, Doris, Robson, André, Toninho, Joãozinho, Ismael, D^a Sônia e D^a Aurita, pela colaboração e amizade.

À Nádia Maria da Silva pela amizade e ajuda durante todo o curso.

Ao professor Antônio de Pinho Marques Júnior e funcionárias do Colegiado de Pós-graduação, Nilda, Fátima e Cláudia, pela boa vontade e colaboração.

Ao chefe do setor de transportes, Milton Luiz de Jesus, e motoristas, Hudson, Garrafinha, Tião do Mato, Tião Poeira, Roberto, Burrinho, Edson Elias e Emerson, pela valiosa cooperação.

Aos funcionários da biblioteca da Escola de Veterinária da UFMG, em especial a Marília Ferreira de Carvalho, pela boa vontade e amizade.

Ao Dr Francisco Gama (DCZ/ PBH), Dr Sérgio Luiz de Freitas Balsamão (LEMA BIOLOGIC DO BRASIL), Dra Telmar de Figueiredo Silva Barcelos e Dr Eduardo Souto Bernardes (HERTAPE), Dr Carlos José da Silva (SES-MG), Dr João Maia (LARA/Pedro Leopoldo) e Dra Juliana (LARA/Campinas) pela boa vontade e doação dos materiais necessários ao desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas de mestrado, Cláudio, Clóvis, Edísio e Márcia, Francesca, Hélia, João Paulo, Jorge, Marcelo, Patrícia Gomes pelos momentos de agradável convivência.

Nossos corações na amizade de sempre: Aos amigos Célia, Cecília, Denise, Eliane, Henrique, Patrícia Macedo, Paula Aryane e Santa Rosa, mais que colegas foram meus grandes colaboradores fazendo com que todos os momentos se tornassem inesquecíveis.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

E sobretudo a Deus que nos deu o dom maior da vida e saúde para executarmos nossas tarefas.

SUMÁRIO

| | PAG. |
|---|-------------|
| LISTA DE TABELAS | 15 |
| RESUMO | 17 |
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 2- LITERATURA CONSULTADA | 23 |
| 2.1. Vírus rábico: patogenicidade | 23 |
| 2.2. Vacinas inativadas | 25 |
| 2.3. Vacinas modificadas | 27 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 3.1. Animais: característica e manutenção | 30 |
| 3.2. Vacinas | 30 |
| 3.3. Amostras de vírus | 31 |
| 3.3.1. Vírus de rua | 31 |
| 3.3.2. Vírus fixo | 33 |
| 3.4. Grupos experimentais | 34 |
| 3.4.1. Grupo A | 34 |
| 3.4.2. Grupo B | 35 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 5. CONCLUSÃO | 45 |
| SUMMARY | 47 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | | PAG. |
|----------|--|-------------|
| Tabela 1 | Título e período de incubação dos vírus de raiva, em camundongos, isolados em Minas Gerais, 1995. | 42 |
| Tabela 2 | Nível de proteção dos camundongos do grupo A imunizados com vacina tipo Fuenzalida & Palacios, comparado com cntroles. | 43 |
| Tabela 3 | Nível de proteção das cobaias do grupo B imunizadas com vacina modificada amostra SAD, comparado com controles. | 44 |

RESUMO

A imunidade anti-rábica, conferida por vacina inativada tipo Fuenzalida & Palacios e modificada amostra SAD, foi avaliada por desafio com seis amostras de vírus de rua isoladas do homem, cão, bovino, equino, suíno e morcego hematófago, em Minas Gerais, em 1993 e 1995. A multiplicação e titulação dos vírus de rua e dos vírus fixo CVS-24 e DR-19 foram realizados em camundongos de 21 dias de idade. Utilizou-se os testes de Habel e Koprowski, recomendados pela OMS, para testar o grau de proteção conferido pelas vacinas frente ao desafio com vírus de rua e fixo. A proteção conferida pelas vacinas, inativada tipo Fuenzalida & palacios e modificada amostra SAD, foi respectivamente de 70% a 100% e 100%, de acordo com as amostras de vírus empregadas no desafio.

INTRODUÇÃO

A raiva animal, devido ao seu caráter endêmico e surtos frequentes, é uma das doenças que tem causado sérios problemas econômicos e de saúde pública ao país.

Doença transmitida essencialmente pela mordida de animais doentes, a raiva é conhecida há cerca de 4000 anos, relatada por filósofos e mencionada por escritores e poetas gregos e romanos. Os gregos denominaram a raiva de Lyssa que significa loucura. A infectividade da saliva dos animais doentes foi descrita por Celso no primeiro século e por Cardanos que acreditava que o material infeccioso era um veneno, vírus em latim. Esta idéia persistiu até o século XIX, quando Pasteur demonstrou a causa da raiva. Após os primeiros estudos sobre a transmissibilidade da raiva através da inoculação da saliva por Galtier, Pasteur inoculou saliva e fragmentos do sistema nervoso em animais e concluiu que o agente se tratava de um micróbio infinitamente pequeno e que este não se encontrava apenas na saliva, mas também no cérebro, gânglio e medula espinhal. Pasteur também observou que os animais que se recuperavam após os primeiros sintomas ficavam imunes a posteriores inoculações, e discutiu a base teórica do processo da imunização. Após ensaios em cães, procedeu em seis de julho de 1885 à primeira vacinação pós-exposição no homem. Paradoxalmente, as aplicações profiláticas antecederam o conhecimento do agente e apesar de Pasteur ter demonstrado a possibilidade de vacinação em cães, somente em 1920 a imunização de animais domésticos foi desenvolvida e usada na prática (Baer, 1991).

Desde a original elaborada por Pasteur em tecido nervoso, houve grande melhora com o desenvolvimento de vacinas parcialmente inativadas tipo FERMI e totalmente inativada pelo fenol tipo SEMPLE. Atualmente contamos com vacinas mais eficazes e seguras, estando compreendidas pelas vacinas a base de vírus vivo modificado amostra Flury e SAD ou seus derivados e pelas inativadas, que apresentam uma produção mais diversificada, variando as amostras vacinais e substratos (Lepine & Gamet, 1969, WHO, 1973). Dentre as vacinas produzidas em tecido nervoso, a inativada tipo Fuenzalida & Palacios é a utilizada na campanha nacional de combate à raiva urbana. Entretanto, a presença de tecido cerebral pode desenvolver uma encefalite pós-vacinal (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 1980). As vacinas modificadas ainda são largamente utilizadas em áreas de grande endemicidade, principalmente para herbívoros e carnívoros, por apresentarem elevado poder antigênico. Contudo, apresentam o inconveniente de sua possível falta de inocuidade para algumas espécies, e sua estabilidade térmica é um problema para países tropicais (Andral & Blancou, 1982; Precausta & Soulebot, 1985). As vacinas inativadas, quando produzidas em condições adequadas, conferem imunidade de longa duração, além de permitirem associações antigênicas e a perspectiva da utilização de vacinas de bactéria *E.coli* como célula produtora de antígeno rábico (Chantal & Blancou, 1985).

Durante muito tempo, acreditou-se na unicidade do vírus rábico. Contudo, através da utilização dos anticorpos monoclonais proposta por Wiktor & Koprowski (1978), descobriu-se no continente africano vários vírus morfológicamente e antigênicamente semelhantes, porém se afastando um pouco do sorotipo 1. Assim, o grupo rábico é atualmente classificado em quatro sorotipos: sorotipo 1- o protótipo é a amostra "Challenge Virus Standard" (CVS) isolada em diferentes partes do mundo e em diferentes espécies animais, sendo o sorotipo existente no Brasil. Os sorotipos 2, 3 e 4, respectivamente, Lagos Bat Virus (LBV), Mokola e Duvenhage foram isolados no continente africano, sendo que o sorotipo

Duvenhage foi também isolado em morcegos na Europa (Wiktor, 1985; Chantal & Blancou, 1985; Bourhy et al, 1990; WHO, 1992).

No Brasil são graves as perdas por mortes devido à raiva, tanto de animais quanto de humano, havendo dois grupos antigenicamente diferentes: um grupo silvestre em que o morcego hematófago infecta bovinos e um outro grupo em que a população canina infecta o homem (Wiktor, 1985). Os Ministérios e as Secretarias da Agricultura e da Saúde estão trabalhando em conjunto no controle e erradicação da raiva, havendo dois programas distintos: o primeiro coordenado pelo Ministério da Saúde que luta contra a raiva urbana e o segundo coordenado pelo Ministério da Agricultura que luta contra a raiva dos herbívoros. A raiva urbana, basicamente transmitida por cães tem declinado significativamente, ao passo que a raiva transmitida por morcegos ainda afeta milhares de herbívoros e esporadicamente o homem, estando longe de alcançar os patamares obtidos nas áreas urbanas (BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL 1980-1988).

Em Minas Gerais, a raiva bovina que ocorria de forma endêmica na Zona da Mata registrou, a partir de 1982, aumento crescente do número de focos nos vales do Jequitinhonha e Mucuri em face da intensificação da ocupação econômica da terra. Apesar do trabalho de controle, ocorreu rápida difusão para outros municípios sendo que em 1995, ela foi registrada em 139 municípios¹ contra 35 municípios e 74 propriedades afetadas em 1982².

Embora atualmente tenha-se conhecimento sobre a ocorrência de variantes antigênicas no Brasil (Hayashi, et al, 1984; Germano et al, 1988a; Germano et al, 1988b; Germano et al, 1990b; Preto & Germano, 1990a), as vacinas anti-rábicas utilizadas para o controle da infecção continuam a ser preparadas a partir das cepas clássicas.

¹ Banco de dados- Escola de Veterinária/UFMG

² Informações relativas aos trabalhos de raiva, em Minas Gerais, no período de 1982 a 1995. Instituto Mineiro de Agropecuária/APC. Dados não publicados.

Assim, deve-se lembrar que para a prevenção da infecção rábica é necessário não só o conhecimento da existência de diferentes amostras de vírus, mas principalmente a eficácia das vacinas utilizadas no campo frente a essas mesmas amostras. O controle das vacinas anti-rábicas e da imunidade que conferem constitui um importante problema da profilaxia da raiva, pois a eficácia deste controle depende a erradicação da enfermidade.

Em Minas Gerais existem registros de reclamações de veterinários que trabalham em áreas endêmicas de raiva, onde relata-se que animais vacinados e revacinados dentro do período de proteção têm morrido com diagnóstico de raiva confirmado no laboratório. Tendo em vista a possibilidade de existir amostras de vírus da raiva com virulência ou antigenicidade diferentes em Minas Gerais, pretende-se avaliar se essas características são capazes de romper a imunidade induzida por vacinas vivas ou inativadas.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Vírus rábico: patogenicidade

Nilsson (1969) relacionou 29 amostras de vírus de rua recebidas para diagnóstico de raiva que se mostraram pouco patogênicas para camundongos inoculados pela via intracraniana. Quase todos os casos de bovinos e equídeos eram provenientes de locais em que ocorria raiva transmitida por morcegos, tendo apresentado períodos de incubação maiores do que os comumente encontrados.

Visando o diagnóstico ante-mortem, Moreira (1973) estudou aspectos relacionados com a precocidade do aparecimento do vírus da raiva, fixo e de rua, na saliva, glândula salivar submandibular, córnea e humor aquoso de bezerros inoculados experimentalmente. Materiais colhidos ante-mortem e post-mortem foram examinados pelos métodos de imunofluorescência direta e inoculação em camundongos lactentes.

Vírus rábicos, isolados de glândulas submaxilares de raposas e furões, foram inoculados por Baer et al (1977) para determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes e exames histopatológicos, cujos resultados indicaram grandes diferenças nas propriedades invasivas do vírus rábico em animais da mesma espécie e da mesma área geográfica a despeito de apresentarem o mesmo título intracerebral em camundongos ($DL_{50}/0,03$ ml IC/camundongos).

Estudando a variabilidade da patogenicidade entre as amostras ERA, CVS e seus mutantes, Dietzschold et al (1983) relataram que esta foi

afetada pela substituição da arginina por glutamina para a amostra CVS e da arginina por isoleucina para a amostra ERA na posição 333 da glicoproteína. Eles consideraram o uso de variantes não patogênicas com o propósito de vacinação.

As características físico-químicas, genéticas, propriedades biológicas, poder patogênico do vírus rábico foram revisadas por Chantal & Blancou (1985), que revelaram os progressos ocorridos nas últimas décadas em que o vírus rábico tornou-se um dos vírus mais conhecidos, permitindo não somente aperfeiçoar os métodos de diagnóstico, como compreender sua patogenicidade e poder imunogênico e melhorar a eficácia e segurança da vacinação dos suscetíveis, além de levantar a questão da vacinação anti-rábica em relação à existência de variantes antigênicas do vírus rábico.

A patogenicidade da amostra CVS e de 58 mutantes deste vírus foi estudada por Seif et al (1985), concluindo que a substituição da arginina na posição 333 da glicoproteína afeta a patogenicidade dos mutantes do CVS.

Através da técnica de anticorpos monoclonais, foram encontrados no Brasil e Argentina, dois grupos de vírus antigenicamente diferentes: um isolado de morcegos hematófagos e de bovinos por eles infectados e outro isolado de outras espécies animais, muito próximo do vírus rábico isolado na Europa (Wiktor, 1985).

O vírus rábico de morcego *Eptesicus serotinus*, isolado no norte da Europa, foi inoculado em ovinos e raposas por Baltazar et al (1988) e apresentou grau variável de patogenicidade nas espécies contaminadas.

Três amostras de vírus rábico antigenicamente distintas, sendo duas de cães, uma proveniente de Jales e outra da Nigéria, e a terceira de um morcego hematófago, *Desmodus rotundus* foram comparadas por Germano et al (1988a) quanto ao período médio de incubação,

período clínico e título dos vírus nos cérebros de camundongos inoculados com as amostras aos 21 e 28 dias de idade. Os mesmos autores (1988b) estudaram o perfil antigênico destas três amostras utilizando anticorpos monoclonais antinucleocapside e observaram que as amostras apresentaram perfil antigênico característico do sorotipo 1, porém antigenicamente distintas entre si.

Vacinas anti-rábicas vivas e inativadas de baixa antigenicidade foram avaliadas por Bijlenga et al (1988) em camundongos imunizados e infectados por vírus silvestre. As vacinas não induziram a produção de interferon e não protegeram os camundongos, tendo ocorrido a diminuição do período médio de incubação quando comparado com o grupo controle.

Quatro variantes antigênicas do vírus rábico, duas delas agrupadas como uma amostra canina e outras duas como uma amostra bovina, foram inoculadas em camundongos pela via intracerebral para comparação dos títulos virais e dos períodos de observação clínica. Os resultados mostraram diferenças de comportamento entre as quatro variantes que apresentaram um certo grau de individualidade em relação aos parâmetros utilizados (Preto & Germano, 1990a).

2.2 Vacinas inativadas

Variantes antigênicas do vírus da raiva foram identificadas por Hayashi et al (1984), utilizando testes de proteção cruzada em camundongos imunizados com vacina anti-rábica canina tipo Fuenzalida & Palacios modificada, elaborada com amostra CVS e desafiadas com amostras de vírus de rua. As amostras dos vírus de rua foram distribuídas em diferentes grupos segundo o grau de proteção conferido por esta vacina.

A eficácia de vacinas inativadas preparadas em cérebro de camundongo lactente a partir da amostra CVS e em cultura de

células NIL-2 a partir da amostra PV, foram avaliadas em camundongos por Germano et al (1990a) frente a variantes antigênicas de vírus da raiva isolados no Brasil. Concluiu-se que ambas vacinas foram eficazes frente às variantes, independente do perfil antigênico das amostras utilizadas.

Preto & Germano (1990b) avaliaram a eficácia da vacina anti-rábica preparada em cultivo celular, inativada pela betapropiolactona e com hidróxido de alumínio como adjuvante, contra quatro variantes antigênicas do vírus da raiva caracterizadas por anticorpos monoclonais antinucleocapside. Os autores confirmaram a alta eficácia desta vacina em proteger os animais suscetíveis contra diferentes variantes do vírus da raiva.

O poder imunogênico da vacina PV/BHK em emulsão oleosa foi avaliado por Preto et al (1991) com a finalidade de determinar a dose vacinal e a duração da imunidade conferida por este tipo de vacina em bovinos. Os resultados indicaram elevado poder imunogênico, conferindo proteção por dois anos e podendo contribuir eficazmente para o controle da raiva.

Vacinas anti-rábicas com amostra ERA, inativadas, com e sem adjuvante foram avaliadas por Silva et al (1992) frente a diferentes amostras de vírus rábico imunogenicamente distintas, isolados no Brasil e África. Os autores concluíram que as vacinas foram eficazes contra as variantes rábicas utilizadas, havendo uma discreta superioridade por parte do imunógeno com hidróxido de alumínio como adjuvante.

Lodmell et al (1995) examinaram a habilidade de quatro diferentes vacinas em proteger camundongos desafiados com variantes antigênicas do vírus rábico, selecionados em diversos países. Os resultados obtidos evidenciaram um forte suporte epidemiológico de que não há necessidade de agrupar os vírus rábicos segundo a área

geográfica de procedência e que uma vacina preparada a partir de uma única amostra vacinal é capaz de conferir proteção aos suscetíveis.

2.3 Vacinas modificadas

Após realização de prova sorológica e desafio com amostra de vírus de raposa altamente virulenta, Abelseth (1964) constatou alta antigenicidade de vacinas de vírus vivo modificado com amostra ERA e preparadas em cultura de tecido renal de suíno, para imunização de cães, bovinos e ovelhas. O vírus fixo amostra ERA, após passagem em células de rim de suíno perdeu a patogenicidade para bovinos, mesmo quando inoculados pela via intracerebral e a contínua passagem em células de rim de suíno aumentou o título em camundongos. O autor concluiu que a dose utilizada deve ser a mesma independente da espécie animal.

Diferenças imunogênicas entre as amostras DR-19 e CVS foram demonstradas por Fuenzalida & Larghi (1972) através de soroneutralização e proteção cruzada. Eles descreveram a virulência da amostra DR-19 para cobaias, hamsters e bovinos e sugeriram a conveniência de usar uma amostra de morcego hematófago para o controle de vacinas anti-rábicas para uso bovino na América Latina.

Koprowski (1973) preconizou a titulação do vírus fixo para o teste de potência de vacinas preparadas com vírus vivo modificado, no qual um volume de 0,3 ml das diluições 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 do vírus diluído a 20% é inoculado via intramuscular em 10 cobaias para cada diluição, sendo a diluição utilizada na prova, a antecedente à última diluição em que a mortalidade for 100%.

A utilização de vacinas inativadas preparadas em cultivo celular foi recomendada pelos especialistas da Organização Mundial da Saúde, devido à sua inocuidade e imunogenicidade, devendo a utilização

das vacinas de vírus vivo modificado ficar restrita às áreas onde a raiva é muito frequente nos animais domésticos, e tão logo seja controlada a enfermidade, deve-se preferir a imunização com vacinas inativadas (WHO, 1984).

Revisão sobre vacinas inativadas e atenuadas foi realizada por Andral & Blancou (1982), abordando aspectos concernentes à sua aplicação, escolha da amostra vacinal, a vacinação dos animais domésticos e silvestres, assim como o controle das vacinas e imunidade por elas conferida.

A eficácia da vacina anti-rábica atenuada, amostra ERA, foi avaliada experimentalmente em camundongos por Erbolato et al (1989) contra quatro amostras de vírus rábico, distintas antigenicamente, sendo duas de origem canina, uma de morcego e uma amostra fixa (CVS). Os autores concluíram que a despeito da variabilidade do poder patogênico das amostras, a vacina ERA preveniu eficazmente a raiva nos ruminantes domésticos e nos cães, sobretudo pela sua capacidade de proteger os suscetíveis contra diferentes variantes antigênicas do vírus rábico.

Os níveis de proteção conferidos pela vacina anti-rábica atenuada, preparada em cultura de tecido renal de suíno a partir da amostra ERA, foram avaliados por Cordeiro et al (1990) em camundongos imunizados e desafiados com diferentes variantes antigênicas do vírus da raiva, provenientes de cães, morcegos e raposa, tendo utilizado dois esquemas de vacinação, representados por uma única dose e por seis doses aplicadas em dias alternados. Os resultados obtidos permitiram constatar que a vacina ERA foi eficaz contra todas as variantes, sejam de rua ou silvestres, independente do esquema vacinal.

As vacinas atenuadas para uso de animais domésticos, foram revisadas por Precausta & Soulebot (1991), em que, apesar das

limitações da vacina devido à possível virulência residual, estas são muitas vezes preferidas por conferirem imunidade de longa duração, recomendando uma única dose da vacina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais: característica e manutenção

Foram utilizados camundongos albinos suíços de 11 a 14 g para a primeira passagem dos vírus de rua, titulação dos vírus de rua e de desafio e avaliação do nível de proteção da vacina inativada tipo Fuenzalida & Palacios e cobaias adultas (*Cavia porcellus*) com peso entre 350 a 450g ao início do teste, para a avaliação imunogênica da vacina de vírus modificado amostra SAD.

Ao início do experimento, tanto as instalações quanto os materiais existentes na sala foram lavados e desinfetados com hipoclorito de sódio, sendo posteriormente usado o lança-chamas para o piso e paredes. Durante a fase experimental, as janelas permaneceram semi-abertas, para manter a ventilação e arejamento adequados.

Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas com tampa de grade de metal e as cobaias em caixas plásticas com tampa telada. A cama para os camundongos e cobaias, de sepilho de madeira, era trocada a cada dois dias. Os recipientes de água e ração eram limpos diariamente, sendo oferecidos água fresca e ração à vontade durante todo o experimento. Às cobaias, além da água fresca e ração, também era oferecido, diariamente, capim napier à vontade.

3.2 Vacinas

Foram utilizados dois tipos de vacina anti-rábica: vacina com vírus vivo modificado e vacina inativada.

A vacina com vírus vivo modificado foi preparada em cultura primária de tecido renal de suíno a partir da amostra SAD (Street Alabama Dufferin), produzida no Laboratório LEMA BIOLOGIC DO BRASIL LTDA¹, partida 016/95 gentilmente fornecida pelo produtor. Na prova de inoculação intracerebral em camundongos, esta vacina apresentou título da ordem de $10^{3,89}$ DL₅₀/0,03 ml e, quando submetida à prova de proteção em cobaias (Koprowski, 1973), forneceu resultado protetor de 100%.

A vacina inativada tipo Fuenzalida-Palacios, elaborada com a amostra CVS e inativada pela Betapropiolactona, partida 186/94, foi produzida no Instituto de Tecnologia do Paraná- TECPAR² e fornecida pela Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, sendo utilizada na Campanha Nacional de combate à raiva urbana. Na prova de potência (Habel, 1973), apresentou título de $10^{5,5}$ DL₅₀/0,03 ml tendo sido desafiado com $10^{7,2}$ DL₅₀/0,03 ml de CVS-24.

3.3 Amostras de vírus

3.3.1 Vírus de rua

Foram utilizadas seis amostras de vírus rábico, multiplicadas por inoculação intracerebral em camundongos a partir de cérebros de casos de campo remetidos ao Laboratório de Diagnóstico Animal do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e confirmados através da técnica de imunofluorescência direta. Estes vírus foram selecionados com o objetivo de abranger, não somente o Estado, mas também as espécies suscetíveis e codificados da seguinte maneira:

¹LEMA BIOLOGIC DO BRASIL

Av. Cardeal Eugênio Pacelli, 2218 Contagem FAX: 333-9242

²INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ TECPAR

Rua dos Funcionários, 1357 Curitiba Paraná FAX: 247-6788

- Código 78/93, vírus isolado de humano procedente do município de Pavão. A criança, de sete anos foi agredida por um cão desconhecido e não recebeu vacina. Curso da doença: 11 dias.
- Código 499/93, vírus isolado de suíno de três meses de idade, procedente do município de Teófilo Otoni. Não vacinado, foi agredido por um cão. O curso da doença foi de três dias.
- Código 07/95, vírus isolado de bovino de seis meses procedente do município de Passa Quatro. Tratava-se de animal vacinado que foi agredido por morcego hematófago. O curso da doença foi de oito dias.
- Código DRC/95, vírus isolado de morcego hematófago, *Desmodus rotundus*, procedente do município de Corinto e encontrado se alimentando em uma vaca durante o dia.
- Código 296/95, vírus isolado de equino de cinco meses, não vacinado, procedente do município de São Gonçalo do Sapucaí.
- Código 358/95, vírus isolado de um cão de 13 anos de idade, vacinado, e procedente da zona urbana de Teófilo Otoni que agrediu uma criança e galinhas.

Para o preparo dos vírus foram utilizados 180 camundongos divididos em lotes compostos de 30 camundongos inoculados pela via intracerebral com 0,03 ml de suspensão a 10% para cada amostra de vírus de rua. Os animais foram observados diariamente, por 21 dias, para verificação dos períodos médios de incubação e coleta asséptica dos cérebros daqueles que apresentavam paralisia típica. Em seguida, para cada amostra foi preparada uma suspensão a 20% de

cérebros em diluente a 2%, pH 7,3, constituído de água destilada, soro normal de equino e antibióticos (1000U.I. de penicilina e 2mg/ml de estreptomicina). Após centrifugação a 866g durante 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 1 ml e estocadas a -70°C.

A titulação das amostras de vírus de rua foi realizada segundo técnica preconizada por Atanasiu (1973). Um frasco contendo suspensão a 20% de cada amostra viral foi retirada ao acaso e descongelada rapidamente em água corrente. Para cada amostra viral foram inoculados 40 camundongos, divididos em grupos de 10 e inoculados com 0,03 ml pela via intraerebral das diluições 10^{-2} a 10^{-5} . Os títulos foram calculados pelo método de Reed-Muench (1938).

3.3.2 Vírus fixo

Para o desafio dos camundongos imunizados com a vacina inativada tipo Fuenzalida-Palacios foi utilizada a amostra de vírus CVS-24, utilizada na rotina da prova de Habel e cedida pela unidade do LARA de Campinas¹ do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (MARA).

A determinação do título do vírus CVS-24 foi realizada de acordo com técnica padronizada por Habel (1956) onde grupos de 10 camundongos receberam desafio intracerebral com 0,03 ml das diluições de 10^{-5} a 10^{-8} . O título encontrado foi $10^{6,50}/0,03$ ml, segundo método de Reed-Muench (1938).

Para o desafio das cobaias imunizadas com vacina modificada amostra SAD foi utilizada a amostra DR-19, utilizada na prova de potência de Koprowski e cedida pelo LEMA BIOLOGIC DO BRASIL.

¹LARA/ CAMPINAS

Av. Heitor Penteado, Km 3 Campinas

A determinação do título do vírus DR-19 foi realizada de acordo com técnica preconizada por Koprowski (1973), no qual um volume de 0,03 ml das diluições 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320 do vírus diluído a 20% foi inoculado pela via intramuscular em 10 cobaias para cada diluição, sendo a diluição utilizada na prova a antecedente àquela em que a mortalidade for 100%.

3.4 Grupos experimentais

Para a avaliação da diferença de proteção entre as amostras de vírus de rua foram constituídos grupos de camundongos e de cobaias, vacinados e não vacinados, denominados grupos A e B e desafiados com 50 DL₅₀ das amostras de vírus de rua.

3.4.1 Grupo A

O grupo A foi constituído de 140 camundongos de 21 dias, sem distinção de sexo, subdivididos em sete sub-grupos de 20 camundongos, um para cada amostra de vírus de rua e controle CVS, sendo 10 vacinados e 10 não vacinados.

Os sub-grupos de vacinados receberam seis doses de 0,25 ml da vacina inativada tipo Fuenzalida-Palacios a 0,5% pela via intraperitoneal em dias alternados.

No 14^o dia, cada sub-grupo, constituído de vacinados e não vacinados, foi desafiado pela via intracerebral com 0,03 ml contendo 50DL₅₀ de cada amostra de vírus de rua e CVS-24 e observado durante 21 dias (Habel, 1973). Como previamente

estabelecido para o teste potencial de vacinas (Koprowski, 1973), 70% foi considerando como limite mínimo de proteção conferida pela vacina inativada nos sub-grupos vacinados e desafiados com as diferentes amostras de vírus de rua e CVS.

3.4.2 Grupo B

O grupo B foi constituído de 140 cobaias de 350 a 450g, sem distinção de sexo, subdivididos em sete sub-grupos de 20 cobaias, um para cada amostra de vírus de rua e um controle DR-19, sendo 10 vacinados e 10 não vacinados.

Os sub-grupos de vacinados receberam uma única dose de 0,25 ml da vacina viva modificada diluída a 1:10 por via intramuscular na pata posterior direita.

Após 21 dias, cada sub-grupo constituído de vacinados e não vacinados, foi desafiado com 0,3 ml contendo 50 DL₅₀ dos vírus de rua e DR-19 por via intramuscular na pata posterior esquerda e observado por 21 dias. De acordo com o teste de potência de vacinas modificada, 70% das cobaias vacinadas deverão sobreviver, enquanto 80% das não vacinadas deverão morrer com os sintomas (Koprowski, 1973).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as amostras de vírus de rua e respectivos títulos expressos em $DL_{50}/0,03$ ml/IC em camundongos, médias dos períodos de incubação em dias com os respectivos desvios padrão e coeficientes de variação.

O período de incubação da raiva, qualquer que seja a espécie animal, é extremamente variável, podendo levar de alguns dias até meses (Chantal & Blancou, 1985) sendo esta flutuação atribuída aos tipos de vírus, à dose infectante, ao local de inoculação, à espécie animal e idade. A inoculação intracerebral do vírus rábico em camundongos reproduz a sintomatologia observada nos animais acometidos de raiva, causando aguda e fatal doença, associada com intensa replicação viral (Chantal & Blancou, 1985).

Os períodos médios de incubação encontrados neste experimento são semelhantes aos descritos por outros autores (Moreira, 1973; Bijlenga et al, 1988; Germano et al 1988a; Preto & Germano, 1990a), tendo sido registrados os menores valores para as amostras 296/95 e 358/95. As amostras 07/95 e DRC/95 apresentaram os maiores valores, tanto em relação à média do período de incubação, expresso em dias, quanto ao desvio padrão. A DRC/95 foi isolada de morcego hematófago *Desmodus rotundus*. A 07/95 é proveniente de bovino infectado por morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Alguns autores têm demonstrado que amostras oriundas de animais selvagens possuem baixa patogenicidade e apresentam maiores médias de período de incubação (Nilsson, 1969).

As oscilações encontradas são atribuídas às diferentes amostras de vírus utilizadas, denotando a existência de certa individualidade entre elas. Em condições experimentais, obteve-se graus de virulência de intensidade variável (Dietzschold et al, 1983; Seif et al, 1985; Germano et al, 1988a.). Esse comportamento dos vírus de rua pode ser explicado pelas modificações que o agente sofre ao passar de um hospedeiro a outro ou de uma espécie a outra (Chantal & Blancou, 1985; Baltazar et al, 1988). Por outro lado, grandes diferenças de virulência e patogenicidade podem ocorrer em uma espécie, numa área geográfica, mesmo quando apresentam títulos próximos no teste de inoculação intracerebral em camundongos (Baer et al, 1977). Os dados da Tabela 1 revelam que as amostras de vírus rábico prevalentes em Minas Gerais, apresentaram variabilidade em relação ao período médio de incubação e título.

A análise do poder patogênico dos vírus rábico é feita através de inoculação intracerebral em camundongos que, além de ser mais sensível e segura para evidenciar a presença do vírus, permite determinar a dose letal capaz de matar 50% dos camundongos inoculados, fornecendo o título infeccioso do inóculo. A $DL_{50}/0,03$ ml intracerebral/camundongos é atualmente a unidade de medida mais prática para medir e comparar o poder patogênico do vírus de uma espécie animal à outra (Chantal & Blancou, 1985).

A amostra canina 358/95 apresentou o maior título, $10^{4,9}$, coincidindo com valores encontrados por outros autores que estudaram amostras de vírus rábico de origem canina antigenicamente distintas através do uso de anticorpos monoclonais antinucleocapside (Germano et al, 1988b; Erbolato et al, 1989; Preto & Germano, 1990a). A amostra 358/95 é proveniente de um cão agredido por outro cão, estando o vírus circulando em um mesmo sistema biológico. Wiktor (1985) mencionou a possibilidade de existir no Brasil, dois grupos de vírus antigenicamente diferentes: um grupo silvestre, em que o morcego hematófago infecta bovinos, e um outro grupo em que a população canina infecta o homem, sendo

que as amostras silvestres possuiriam baixa patogenicidade (Nilsson, 1969). Estando a virulência do vírus rábico na natureza relacionada à sua passagem em diferentes hospedeiros, o nível de co-adaptação do vírus a seus hospedeiros influencia sobremaneira a epidemiologia da raiva (Chantal & Blancou, 1985), visto que, mutações na glicoproteína viral afetam a patogenicidade (Dietzschold et al, 1983; Seif et al, 1985).

A Tabela 2 mostra a frequência de proteção conferida pela vacina inativada tipo Fuenzalida & Palacios em camundongos albinos adultos de 11 a 14g desafiados com 50DL₅₀ das amostras de vírus de rua. Observou-se que todas as amostras de vírus de rua apresentaram alto grau de virulência, matando 100% dos camundongos não vacinados expostos. A sintomatologia típica constituída de conjuntivite, fotofobia, pêlo seco e arrepiado, incoordenação motora, paralisia e morte do sétimo ao décimo terceiro dia.

Considerando os resultados de proteção conferida pela vacina inativada tipo Fuenzalida & Palacios, verifica-se que as amostras 296/95, 358/95 e DRC/95 apresentaram diferentes graus de virulência. A mortalidade registrada nos grupos controle foi de 100% para todas as amostras; todavia, a amostra 358/95 foi a mais virulenta causando morte de 30% dos camundongos vacinados, a amostra 296/95 está em segundo lugar e a amostra DRC/95 em terceiro lugar tendo matado, respectivamente, 20% e 10% dos camundongos vacinados. O baixo nível de proteção conferida pela vacina inativada no sub-grupo de camundongos vacinados e desafiados com a amostra 358/95 pode estar relacionado à virulência das amostras estudadas (Hayashi et al, 1984; Erbolato et al, 1989).

A vacina inativada tipo Fuenzalida & Palacios apresentou distintos graus de proteção nos camundongos vacinados e desafiados com diferentes amostras de vírus de rua, resultados análogos aos encontrados por outros autores (Preto & Germano, 1990b; Germano

et al, 1990a; Silva et al, 1992). A vacina tipo Fuenzalida & Palacios foi eficaz contra o CVS, altamente patogênica para camundongos adultos, conferindo 100% de proteção no sub-grupo vacinado. No entanto, no sub-grupo controle o coeficiente de sobrevivência foi zero. Essa resposta deve estar relacionada à grande eficácia dessas vacinas quando são elaboradas com amostras usadas no desafio. Resultados semelhantes foram encontrados para as amostras 78/93, 499/93 e 07/95.

Os diferentes graus de proteção observados em relação aos vírus 296/95, 358/95 e DRC/95 não podem ser atribuídos somente às vacinas, reforçando a hipótese de que outros fatores como susceptibilidade individual dos animais e a própria virulência das amostras dos vírus de rua contribuíram para este resultado, devendo-se ressaltar que, apesar desta variabilidade, a vacina tipo Fuenzalida & Palacios conferiu proteção eficaz. Lodmell et al (1995) em estudo de proteção cruzada utilizando variantes antigênicas do vírus rábico demonstraram a unicidade do poder imunogênico do vírus rábico. A pesquisa epidemiológica revelou não haver necessidade de separá-los segundo a procedência geográfica e os autores concluíram que as vacinas preparadas a partir da amostra do vírus Pasteur (PV) são eficazes para proteger as espécies suscetíveis contra as diversas amostras de vírus de rua. Essas observações reforçam o conhecimento sobre o elevado grau de proteção do homem e dos animais que receberam vacinas anti-rábicas produzidas de acordo com as normas e padrões preconizados pela OMS.

Os graus de proteção conferidos pela vacina inativada tipo Fuenzalida & Palacios frente ao desafio com vírus de rua foram eficazes, conferindo proteção de 70% a 100% e sugerindo que essas diferenças podem ser traduzidas pela virulência. Os testes de avaliação feitos por Germano et al (1990a), Preto & Germano (1990b), Preto et al (1991) e Silva et al (1992) de vacinas anti-rábicas preparadas em cérebro de camundongo a partir dos vírus PV

e CVS, comprovaram sua eficácia contra variantes antigênicas do vírus rábico.

Na Tabela 3 são apresentadas as porcentagens de proteção conferidas pela vacina viva modificada, amostra SAD em cobaias adultas frente ao desafio com 50DL₅₀ dos vírus de rua.

No sub-grupo de cobaias vacinadas, a proteção conferida foi de 100% para os vírus de rua, ao passo que nos sub-grupos controle a taxa de sobrevivência foi de 30% para a amostra 499/93, de 20% para 78/93, 07/95, 296/95 e DRC/95 e de 10% para 358/95. A Tabela 3 permitiu evidenciar que nos sub-grupos controle os vírus 358/95 e DR-19 foram os que apresentaram taxas de sobrevivência de 10%, devendo ressaltar que o DR-19 é um vírus com característica intermediária entre o fixo e o natural (Fuenzalida & Larghi, 1972). Por essa razão, ele é altamente virulento, sendo recomendado como vírus padrão de desafio de animais imunizados com vacina elaborada com vírus vivo modificado (Koprowski, 1973). As taxas de sobrevivência de 20% para os vírus 78/93, 07/95, 296/95 e DRC/95 e de 30% para o 499/93 podem ser consideradas normais por se tratarem de vírus de rua com características peculiares (Chantal & Blancou, 1985) e não serem adaptados ao sistema biológico empregado. Esses achados são similares aos registrados por Erbolato et al (1989). A amostra 358/95 apresentou menor taxa de sobrevivência dentre as cobaias dos sub-grupos controle desafiados com os outros vírus de rua, e o maior título expresso em DL₅₀/0,03 ml/IC. Em relação aos animais imunizados, a vacina modificada amostra SAD conferiu proteção de 100% para todos os sub-grupos vacinados e desafiados com os vírus de rua e o DR-19.

As vacinas elaboradas com vírus vivo modificado apesar de não serem isentas de riscos, dependendo da dose vacinal, espécie e estado imunitário do animal alvo e da idade apresentam elevado poder antigênico conferindo imunidade de longa duração. Andral &

Blancou (1982), afirmaram que a integridade antigênica e o nível de replicação do vírus são os elementos responsáveis pela resposta diversificada desses vírus. Apesar destas limitações, a imunidade conferida pelas vacinas vivas modificadas para cães e bovinos, respectivamente de dois a três anos, não requerendo doses de reforço dentro desses períodos (Abelseth, 1964; Precausta & Soulebot, 1991). Uma única dose é capaz de proteger as espécies suscetíveis contra diversas amostras de vírus de rua, comprovado em condições experimentais e de campo (Erbolato et al, 1989; Cordeiro et al, 1990), sendo sua utilização justificável somente em áreas de alta endemicidade, principalmente para o controle da raiva dos ruminantes (WHO, 1984).

TABELA 1

Título e período de incubação dos vírus de raiva, em camundongos, isolados em Minas Gerais, 1995.

| Amostras | | Inoculação em camundongos | | | |
|----------|--------|---------------------------|-------|----------|-------|
| Origem | Código | Título DL/50 | Média | δ | c.v. |
| humano | 78/93 | $10^{3,10}$ | 13,00 | 1,83 | 14,07 |
| suíno | 499/93 | $10^{3,35}$ | 14,96 | 1,22 | 8,15 |
| bovino | 07/95 | $10^{3,35}$ | 15,16 | 2,03 | 13,39 |
| equino | 296/95 | $10^{3,29}$ | 10,20 | 1,03 | 10,09 |
| canino | 358/95 | $10^{4,90}$ | 11,4 | 1,77 | 15,53 |
| morcego | DRC/95 | $10^{3,64}$ | 16,66 | 2,84 | 17,05 |

δ Desvio padrão c.v. coeficiente de variação

TABELA 2

Nível de proteção dos camundongos do grupo A imunizados com vacina tipo Fuenzalida-Palacios, comparado com controles.

| Amostras | Nível de Proteção | | | | | |
|----------|-------------------|-----|-----|----------|---|--------|
| | Vacinação | | | Controle | | |
| | I* | P** | % P | I | P | % S*** |
| 78/93 | 10 | 10 | 100 | 10 | 0 | 0 |
| 499/93 | 10 | 10 | 100 | 10 | 0 | 0 |
| 07/95 | 10 | 10 | 100 | 10 | 0 | 0 |
| 296/95 | 10 | 8 | 80 | 10 | 0 | 0 |
| 358/95 | 10 | 7 | 70 | 10 | 0 | 0 |
| DRC/95 | 10 | 9 | 90 | 10 | 0 | 0 |
| CVS-24 | 10 | 10 | 100 | 10 | 0 | 0 |

* Inoculados ** Protegidos *** Sobreviventes

TABELA 3

Nível de proteção das cobaias do grupo B imunizadas com vacina modificada amostra SAD, comparado com controles.

| Amostras | Nível de Proteção | | | | | |
|----------|-------------------|-----|-----|----------|---|--------|
| | Vacinação | | | Controle | | |
| | I* | P** | % P | I | P | % S*** |
| 78/93 | 10 | 10 | 100 | 10 | 2 | 20 |
| 499/93 | 10 | 10 | 100 | 10 | 3 | 30 |
| 07/95 | 10 | 10 | 100 | 10 | 2 | 20 |
| 296/95 | 10 | 10 | 100 | 10 | 2 | 20 |
| 358/95 | 10 | 10 | 100 | 10 | 1 | 10 |
| DRC/95 | 10 | 10 | 100 | 10 | 2 | 20 |
| DR-19 | 10 | 10 | 100 | 10 | 1 | 10 |

* Inoculados ** Protegidos *** Sobreviventes

5 CONCLUSÃO

As vacinas anti-rábicas inativada, tipo Fuenzalida & Palacios e modificada, amostra SAD, são capazes de conferir proteção contra a inoculação de vírus de rua provenientes de diferentes espécies prevalentes em Minas Gerais.

SUMMARY

Immunity conferred by Fuenzalida & Palacios inactivated vaccine and by attenuated strain SAD was evaluated by challenge with six strains of street rabies virus isolated from man, dog, cattle, horse, pig and bat in Minas Gerais between 1993 and 1995. The multiplication and titration of street virus and fixed virus CVS-24 and DR-19 were studied in mice of 21 days. To evaluate the protection conferred by vaccines against a challenge with the street and fixed virus, Habel and Koprowski tests were used. The protection conferred by Fuenzalida & Palacios inactivated vaccine and attenuated strain SAD was respectively between 70% and 100% and 100%, according with the virus strains used in challenge.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSETH, M.K. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Can. Vet. J.*, v.5, n.11, p.279-286, 1964.
- ANDRAL, L., BLANCOU, J. La rabia: Nuevos desarrollos en materia de vacunación. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, v.1, n.4, p.961-990, 1982.
- ATANASIU, P. Quantative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin. In: KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (Ed) *Laboratory techniques in rabies*, 3^a ed. Geneva: World Health Organization, 1973, p.314-318.
- BAER, G.M., CLEARY, W.F., DÍAZ, A.M., PERL, D.J. Characteristics of 11 rabies isolates in mice: titers and relative invasiveness of virus, incubation period of infection, and survival of mice with sequelae. *J. Infec. Dis.*, v.36, n.3, p.336-345, 1977.
- BAER, M.B. History of rabies and global aspects. IN: BAER G.M.(Ed). *The natural history of rabies*, 2nd ed. Georgia: CRC Press, 1991, p. 1-24.
- BALTAZAR, R.S., BLANCOU, J., ARTOIS, M. Étude du virus de la rage isolé d'une chauve-souris européenne "Eptesicus serotinus": pouvoir pour les ovins et le renard roux. *Rev. Méd. Vét.*, v.139, n.7, p.615-621, 1988.

- BIJLENGA, G., GANESSHWARAN, A., JOUBERT, L., LERY, L.
Le phénomène de "mort précoce et stimulée" chez la souris infectée puis vaccinée contre la rage. *Ann. Rech. Vét.*, v.19, p.135-140, 1988.
- BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. Brasília: MARASNAD, v.14-22, 1980-1988.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, MINISTÉRIO DA SAÚDE, FSSP Belo Horizonte, v.12, n.6, p.54-60, 1980
- BOURHY, H., SUREAU, P., TORDO, N. From rabies to rabies related viruses. *Vet. Microbiol.*, v.23, p.115-128, 1990.
- CHANTAL, J., BLANCOU, J. Le virus rabique. *Inf. Tech. Serv. Vét.*, n.92-95, p.281-292, 1985.
- CORDEIRO, C.C., SILVA, E.V., MIGUEL, O., GERMANO, P.M.L. Avaliação da vacina anti-rábica ERA, frente a variantes antigênicas do vírus da raiva, em diferentes períodos pós-imunização. *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo, v.24, n.6, p.512-517, 1990.
- DIETZSCHOLD, B., WUNNER, W.H., WIKTOR, T.J., LOPES, A.D., LAFON, M., SMITH, C.L., KOPROWSKI, H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.80, p.70-74, 1983.
- ERBOLATO, E.B., SILVA, E.V., MIGUEL, O., SUREAU, P., GERMANO, P.M.L. Eficácia da vacina anti-rábica ERA em camundongos, frente a quatro variantes antigênicas do vírus da raiva. *Rev. Saúde Públ.*, v.23, n.6, p.447-454, 1989.

- FUENZALIDA, E., LARGHI, O. Características de uma cepa de vírus rabico aislada del cerebro de *Desmodus rotundus*. **Bol. Sanit. Pan.**, v.63, n.2, p.93-99, 1972.
- GERMANO, P.M.L., MIGUEL, O., SHIZUKA, M.M., SILVA, E.V. Avaliação de três cepas de vírus rábico antigenicamente distintas, em camundongos. 1- Estudo dos períodos de observação clínica. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v.22, n.5, p.375-383, 1988a.
- GERMANO, P.M.L., SILVA, E.V., SUREAU, P. Determinação do perfil antigênico de três cepas de vírus rábico, isolados no Brasil, através da tecnica de anticorpos monoclonais antinucleocapside. **Rev. Fac. Med. Vet. Zoot.**, v.25, n.2, p.199-205, 1988b.
- GERMANO, P.M.L., SILVA, E.V., ENOCK, V., PRETO, A.A., CORDEIRO, C.F. Avaliação em camundongos de vacinas anti-rábicas inativadas frente a variantes antigênicas do vírus da raiva. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.33, n.3, p.551-560, 1990a.
- GERMANO, P.M.L., SILVA, E.V., SILVA, E.V., MIGUEL, O., SUREAU, P. Variantes antigênicas del virus de la rabia aisladas en el nordeste y sudeste del Brasil. Estudio preliminar. **Bol. Sanit. Panam.**, v.108, n.1, p.39-44, 1990b.
- HABEL, K. Effect on immunity to challenge and antibody response of variation in dosage schedules of rabies vaccine in mice. **Bull WHO**, n.14, p.613-16, 1956.
- HABEL, K. Habel test for potency. In: KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (Ed) **Laboratory techniques in rabies**, 3.ed. Geneva: World Health Organization, 1973, p.276-278.

- HAYASHI, H., MORA, E., CHANDELIER, E.L., MONTAÑO, J.A., OHI, M. Estudos de proteção cruzada de 24 cepas de vírus rábico isoladas de diferentes espécimes no Brasil. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.27, n.1, p.27-35, 1984.
- KOPROWSKI, H. Guineapig potency test for chicken-embryo vaccine. In: KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (Ed) *Laboratory techniques on rabies*, 3^a ed., Geneva: World Health Organization, 1973, p.287-291.
- LEPINE, P., GAMET, A. Les vaccins antirabiques. In: LEPINE & GORET (Ed) *La rage*. Paris, 1969, p.96-104.
- LODMELL, D.L., SMITH, J.S., ESPOSITO, J.J., EWALT, L.C. Cross-protection of mice against a global spectrum of rabies variants. *J. Virol.*, v.69, n.8, p.4957-4962, 1995.
- MOREIRA, E.C. Pesquisa do vírus da raiva no humor aquoso, saliva, glândula salivar submandibular e córnea de bezerros inoculados experimentalmente. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária. 1973. 43p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).
- NILSSON, M.R. Comunicação: Diagnóstico da raiva. Observações sobre amostras de vírus de baixa patogenicidade. *Arq. Inst. Biol.*, v.36, n.1, p.63-65, 1969.
- PRECAUSTA, P., SOULEBOT, J.P. Les vaccins antirabiques. Fabrication- contrôle- emploi. *Inf. Tech. Serv. Vét.*, p. 187s-205s, 1985
- PRECAUSTA, P., SOULEBOT, J.P. Vaccines for domestic animals. In: BAER, G.M. (Ed) *The natural history of rabies*, 2nd ed. Georgia: CRC Press, 1991, p.445-459.

- PRETO, A.A., GERMANO, P.M.L. Estudo do comportamento de variantes antigênicas do vírus da raiva, isoladas no Brasil, em camundongos. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.33, n.1, p.205-213, 1990a.
- PRETO, A.A., GERMANO, P.M.L. Evaluation of the rabies vaccine, PV/BHK origin, against rabies virus strains of canine and bovine origin. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.33, n.2, p.317-328, 1990b.
- PRETO, A.A., FERNANDES, M.J., HAYASHI, Y., GERMANO, P.M.L., BURER, S.P. Preparação da vacina anti-rábica PV/BHK em emulsão oleosa e avaliação do poder imunogênico em bovinos. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.34, n.3/4, p.609-616, 1991.
- REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-498, 1938.
- SEIF, I., COULON, P., ROLLIN, P.E., FLAMAND, A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.*, v.53, n.3, p.926-934, 1985.
- SILVA, E.V., CORDEIRO, C.F., PRETO, A.A., GERMANO, P.M.L. Avaliação de vacinas anti-rábicas ERA inativadas, com e sem adjuvante, frente a diferentes cepas do vírus da raiva. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.35, n.1, p.191-202, 1992.
- WIKTOR, T.J., KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Prod. Acad. Sci. USA*, v.75, n.8, p.3938-3942, 1978.
- WIKTOR, T.J. Les anticorps monoclonaux: application à l'étude de la rage. *Inf. Tech. Serv. Vét.*, n.92-95, p.139s-198s, 1985.

WHO EXPERT COMMITTEE ON RABIES, 6, 1973, Geneva,
Report... Geneva: WHO, 1973, 61p.

WHO EXPERT COMMITTEE ON RABIES, 7, 1984, Geneva,
Report... Geneva: WHO, 1984, 117p.

WHO EXPERT COMMITTEE ON RABIES, 8, 1992, Geneva,
Report... Geneva: WHO, 1992, 85p.