

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNITÁRIA DA VACINA ANTI-RÁBICA PREPARADA EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS LACTENTES APLICADA EM CÃES PRIMO VACINADOS, EM CONDIÇÕES NATURAIS

PEDRO MANUEL LEAL GERMANO
Professor Assistente Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

MASAI O MIZUNO ISHIZUKA
Professor Adjunto
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

MOACYR ROSSI NILSSON
Pesquisador Nível VI
Instituto Biológico da Secretaria de Estado dos
Negócios da Agricultura de São Paulo

OMAR MIGUEL
Professor Livre-Docente
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

GERMANO, P.M.L.; ISHIZUKA, M.M.; NILSSON, M.R.; MIGUEL, O. Avaliação da resposta imunitária da vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes aplicadas em cães primo vacinados, em condições naturais. *Rev.Fac.Med.vet. Zootec.Univ.S.Paulo*, 19(1): 67-74, 1982.

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

UNITERMOS: Raiva, cães*; Imunidade*; Imunofluorescência indireta*; Vacina anti-rábica, cérebro de camundongos lactentes

INTRODUÇÃO

Na raiva urbana, a espécie canina representa a principal fonte de infecção para o homem^{8,15}; assim, a prevenção desta doença baseia-se, fundamentalmente, na imunização ativa da população canina^{5,18,20,22}, mediante a instituição de programas de vacinação em massa da população canina, bem como, na apreensão e sacrifício dos cães errantes^{20,22}.

O número de casos de raiva canina e os verificados no homem apresentam relação estreita, pois quando do controle adequado da doença no cão, o número de casos no homem cai proporcionalmente¹⁵, bem como o número de tratamentos vacinais humanos pós-exposição¹⁹.

Para que estes programas possam trazer os efeitos desejados é necessário que as vacinas utilizadas tenham eficiência conhecida e comprovada¹³ e que confirmem imunidade de duradoura¹⁷.

A vacina anti-rábica, preparada em cérebros de camundongos lactentes (FUENZALIDA e PALAZIOS⁷, 1955), foi utilizada pela primeira vez em programas de imunização em massa, em 1961 no Chile, mais precisamente nas cidades de Santiago e Valparaíso²⁰. Em 1964, os resultados práticos destas campanhas de vacinação, concomitantes com a erradicação de cães errantes, demonstraram sensível redução no número de animais raivosos²⁰.

SIKES e cols¹⁶ (1971) realizaram estudo com a vacina preparada em cérebros de camundongos lactentes observando 100% de sobrevivência ao "challenge" após um ano da sua aplicação e 80% ao final de 3 anos.

FIELDS e cols⁶ (1976) também estudaram a duração da imunidade conferida pela vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes, em cães primo vacinados e em condições experimentais. Os resultados obtidos por estes autores, quando comparados àqueles obtidos por SIKES e cols¹⁶ (1971) para o mesmo tipo de vacina, evidenciaram comportamento semelhante, observando-se 100% de sobrevivência ao "challenge" 37 meses após a aplicação da vacina.

A partir dos resultados práticos das campanhas de vacinação em massa da população canina, realizadas no Chile²⁰ e daqueles obtidos em condições experimentais por SIKES e cols¹⁶ (1971), a vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes foi adotada em toda a América Latina, e particularmente no Brasil, nos programas de controle da raiva urbana¹⁵.

Desta forma, o presente trabalho propõe-se a estudar, com o auxílio das provas de soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI), o comportamento da resposta imunitária de cães primo vacinados com a vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes e mantidos em condições usuais no domicílio de seus proprietários, dada a elevada concordância entre os resultados de ambas as provas⁹.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

Cães

Utilizaram-se 20 animais da espécie canina com idades variando de 4 a 6 meses, sem antecedentes de vacinação anti-rábica, cujas amostras de soros previamente submetidas às provas de SN e IFI, comprovaram a condição de não portadores de anticorpos anti-rábicos, simultaneamente a ambas as provas. Estes cães foram primo vacinados com uma única dose de vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes e amostras de soro foram coletadas 21, 45, 60 e 90 dias após a aplicação da vacina. Os animais foram mantidos nos domicílios de seus proprietários em diferentes locais do Município de São Paulo.

Vacina

Utilizou-se a vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes⁷ inativada pela β propiolactona, aplicada por via subcutânea na dose de 2 mililitros por animal. Este tipo de vacina pertencia à partida 05-76 do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), e o grau de potência, determinado pelo método de Habel¹⁰ forneceu um valor igual a 48.350 DL₅₀.

2. Métodos

Soroneutralização

Realizada de acordo com o preconizado por ATA-NASIU¹ (1967), oscilando as DL₅₀ do vírus entre 10 e 40.

Imunofluorescência indireta

Realizada de acordo com a técnica de CAMARGO⁴ (1967) e adaptação de ISHIZUKA¹¹ (1972).

RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os títulos de anticorpos anti-rábicos medidos pelas provas de SN e IFI, em diferentes períodos de tempo após a primo vacinação realizada com a vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes, com a finalidade de avaliar a resposta imunitária induzida por este imunógeno.

Da mesma forma, o gráfico 1 mostra as curvas construídas a partir dos valores das medianas destes títulos, calculadas com base nos resultados obtidos com ambas as provas (SN e IFI), segundo BERQUÓ e cols³ (1980) e constantes da tabela 1.

DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra os títulos dos anticorpos anti-rábicos, medidos simultaneamente pelas provas de SN e IFI, de

amostras de soros de cães primo vacinados contra a raiva, com vacina anti-rábica preparada com cérebros de camundongos lactentes, coletadas aos 21, 45, 60 e 90 dias após a vacinação.

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

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

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

Os resultados obtidos pela SN, com as amostras de soro do animal número 16, revelaram ter o mesmo, resposta imunitária nula, frente à vacina utilizada. Estes valores, porém, são discordantes daqueles obtidos pela IFI, quando este tipo de resposta foi traduzido por expressivos títulos de anticorpos anti-rábicos, da ordem de 45, os quais se mantiveram estáveis até 60 dias após a vacinação, declinando apenas aos 90 dias, quando atingiram valor igual a 5.

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

Estes tipos de comportamento, observados quando da análise dos resultados obtidos pela SN, podem ser atribuídos às limitações impostas pela própria técnica⁹, principalmente àquela relativa à variabilidade apresentada pelos valores da DL₅₀ do vírus empregado para a titulação dos soros,

as quais embora adequadamente controladas oscilaram entre 10 e 40.

O gráfico 1 mostra as curvas obtidas através do cálculo das medianas a partir dos resultados dos títulos de anticorpos anti-rábicos expressos na tabela 1.

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

Desta forma, constata-se que os títulos de anticorpos medidos pela SN encontram-se de fato aquém daqueles obtidos pela IFI, tal como havia sido referido durante a discussão da tabela 1.

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

SIKES e cols¹⁶ (1971) testaram experimentalmente a vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes, em um lote de 40 cães da raça Beagle, comprovadamente desprovidos de anticorpos anti-rábicos, mantidos em condições de cativeiro durante todo o período de estudo (3 anos) inoculando-os, por via intramuscular, entre os 9 e os 12 meses de idade. A vacina utilizada, quando submetida ao teste de potência, realizado através do método do NIH¹⁴ como é recomendado para qualquer vacina anti-rábica de uso humano, forneceu um valor antigênico igual a 1,5, ou seja, cinco vezes maior do que a potência mínima requerida para sua utilização no homem¹⁶.

As amostras de soros dos animais em apreço, referentes aos diferentes períodos de observação foram submetidas à SN, evidenciando os resultados das medianas dos títulos de anticorpos uma ascensão de alta intensidade, já aos 14 dias pós vacinação, tendo sido o valor igual a 280. Porém, a partir deste ponto se iniciou o declínio da curva, atingindo aos 30 dias de observação um valor igual a 69, o qual foi aproximadamente 1/4 daquele registrado no limite máximo.

Esta fase de declínio processou-se lentamente até o final do experimento quando a mediana acusou um valor inferior a 5.

FIELDS e cols⁶ (1976) em trabalho conduzido nos moldes do experimento anterior, testaram o mesmo tipo de vacina, em 24 cães sem raça definida, cujos títulos de anticorpos anti-rábicos determinados antes da vacinação, pela SN, forneceram valores inferiores a 2. Estes animais tinham idade superior a 12 meses e foram vacinados por via intramuscular com uma vacina cujo valor antigênico, determinado pelo método do NIH, foi igual a 3,0, ou seja, o dobro da potência da vacina utilizada por SIKES e cols¹⁶ (1971).

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

Quando da comparação dos perfis das curvas das medianas dos títulos de anticorpos anti-rábicos, detectados pela prova de SN, constatou-se que os valores obtidos neste experimento são muito inferiores àqueles dos trabalhos de SIKES e cols¹⁶ (1971) e FIELDS e cols⁶ (1976). Por outro lado, já aos 45 dias após a vacinação, a mediana dos títulos de anticorpos atinga no presente estudo um valor igual a 5, enquanto que, valores mais próximos a este, iguais a 6, só foram encontrados aos 24 meses por SIKES e cols¹⁶ (1971) e aos 36 meses por FIELDS e cols⁶ (1976).

No caso específico do presente trabalho, a potência da vacina utilizada foi determinada pelo método de HABEL¹⁰, tendo fornecido um valor de 48.350 DL₅₀, o qual é considerado como satisfatório para a aplicação em animais. No entanto, os resultados obtidos pela utilização deste método não apresentam correlação com aqueles fornecidos pelo método do NIH, empregado nos trabalhos experimentais^{6,16}, conseqüentemente, os valores antigênicos encontrados por um método e pelo outro não podem ser comparados¹⁷.

Embora este fato seja verdadeiro, os dados referidos por aqueles autores^{6,16}, sugerem, que a potência das vacinas por eles utilizadas era superior ao da testada neste experimento, podendo talvez, justificar assim a elevada magnitude dos valores das medianas dos títulos por eles obtidos, bem como a prolongada persistência destes títulos.

No estudo realizado por SIKES e cols¹⁶ (1971) em cães, a mediana dos títulos de anticorpos anti-rábicos, obtida através dos resultados fornecidos pela prova de SN, 12 meses após a aplicação deste tipo de vacina, apresentava um valor igual a 10. Quando estes animais foram submetidos ao "challenge" registrou-se 100% de sobrevivência. No trabalho de FIELDS e cols⁶ (1976) esta mediana do título de an-

ticorpos, também obtida através dos resultados da prova de SN, 11 meses após a aplicação da vacina, era igual a 146. O "challenge" realizado somente após a conclusão do experimento, ou seja, 3 anos após a aplicação da vacina, demonstrou 100% de sobrevivência por parte dos animais vacinados.

Com base nos resultados obtidos por SIKES e cols¹⁶ (1971) e FIELDS e cols⁶ (1976) a vacina anti-rábica, preparada em cérebros de camundongos lactentes, conferiu boa imunidade por 12 meses, sendo necessária apenas uma única dose da vacina, aplicada a partir dos 3 meses de idade do animal²².

De acordo com RIBEIRO NETTO¹³ (1969), embora a imunidade guarde estreita relação com a taxa de anticorpos, não se pode aquilatar, "a priori", se a intensidade da resposta imunitária é suficiente para proteger o animal contra as doses infectantes usuais a que estaria sujeito na natureza. De outra parte, a ausência de anticorpos ou a sua presença em nível baixo, não equivale sempre à condição de suscetibilidade.

Os anticorpos circulantes, embora não sejam os únicos responsáveis pela imunidade, têm participação importante na profilaxia da infecção rábica¹², principalmente no que concerne ao anticorpo neutralizante, comprovadamente responsável pela resistência a subsequentes "challenge" com o vírus da raiva²¹.

Isto posto, causam apreensão os resultados dos títulos de anticorpos anti-rábicos obtidos tanto com a prova de SN quanto com a prova de IFI, tal como foram observados neste trabalho, dado que, embora estes títulos pudessem ser inferiores aos referidos naqueles trabalhos experimentais^{6,16}, em função, talvez, das possíveis diferenças de potência das vacinas, não se pode compreender uma diferença de magnitude tão acentuada e um declínio tão precoce, mormente quando a medida mais eficiente para o controle da raiva urbana consiste na realização de campanhas de vacinação em massa da população canina e que o intervalo de tempo preconizado entre uma vacinação e outra é de 12 meses²⁰.

Estas constatações sugerem, portanto, a conveniência de outras pesquisas, principalmente no sentido de se estabelecer com mais propriedade estes intervalos de vacinação, haja visto, que no caso específico do trabalho em pauta, o declínio da mediana dos títulos de anticorpos anti-rábicos, obtida através dos resultados da prova de SN, registrou um

valor igual a 5, já aos 60 dias da aplicação da vacina. No concernente ao esquema de vacinação adotado para cães primo vacinados, poder-se-ia considerar ainda a possibilidade de aplicação de uma dose de reforço, pois de acordo com ATANASIU e cols² (1968), quando da utilização de antígenos inativados inoculados em uma única dose, a resposta imunitária é menos intensa do que quando da aplicação fracionada deste mesmo imunógeno.

CONCLUSÕES

1— A vacina anti-rábica, preparada em cérebros de camundongos lactentes, determina em cães primo vacinados resposta imunitária evidente já aos 21 dias da inoculação. Esta resposta avaliada pelas medianas dos títulos de anticorpos anti-rábicos é de maior magnitude, quando medida pela prova de IFI, comparativamente à prova de SN, no intervalo de tempo compreendido entre 21 e 90 dias da vacinação.

2— O declínio acentuado de anticorpos anti-rábicos medidos pelas provas de IFI e SN, em cães primo vacinados com vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes, após 90 dias da vacinação, sugere a conveniência de se estudar com maior detalhe a duração da imunidade induzida por esta vacina, para aquilatar-se da adequação do intervalo de tempo entre as campanhas de vacinação em nossa população canina, e se não haveria conveniência de se aplicar dose de reforço em cães primo vacinados.

GERMANO, P.M.L.; ISHIZUKA, M.M.; NILSSON, M.R.; MIGUEL, O. Evaluation of a suckling-mouse-brain rabies vaccine in unvaccinated dogs studied in natural conditions. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo*, 19(1): 67-74, 1982.

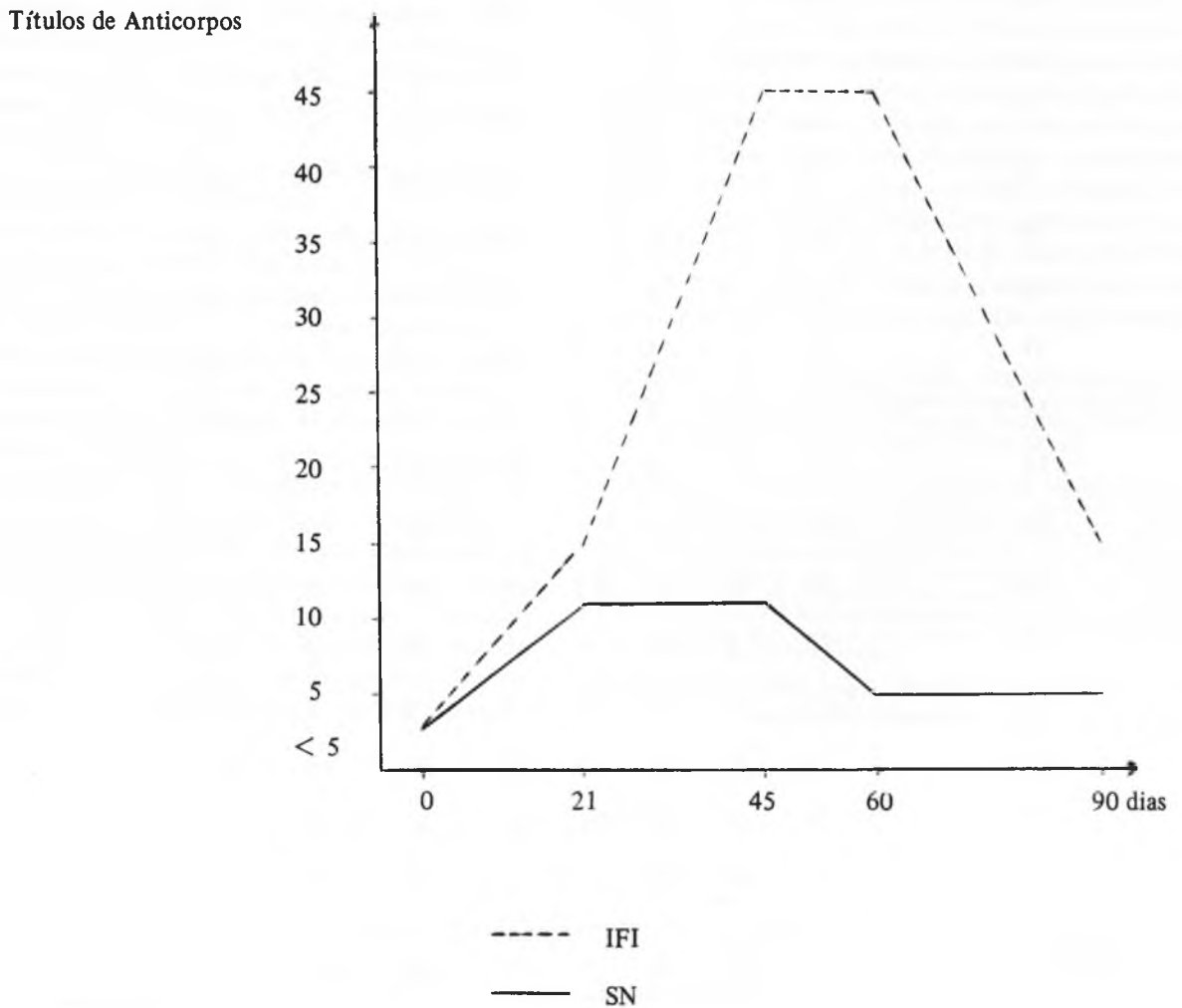
SUMMARY: The evaluation of a suckling-mouse-brain rabies vaccine in unvaccinated dogs was made using two different approaches. When the serum-neutralization technic was employed it was observed a slow and small rise in the median antibodies tittles being this increase followed by a fast decline as early as 45 days after vaccination. Further, it was observed that immunitary reaction was more sensitive to the 2nd procedure employed: the immunofluorescence method. Using this technic the median antibodies tittles declined only after 60 days of vaccination.

UNITERMOS: Rabies, dog*; Immunity*; Fluorescent antibody technique*; Suckling-mouse-brain rabies vaccine

TABELA 1 – Títulos de anticorpos anti-rábicos, segundo as provas de soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI) e o tempo decorrido da vacinação, em cães primo vacinados contra a raiva, com vacina preparada em cérebros de camundongos lactentes, São Paulo, 1980.

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

GRÁFICO 1 – Mediana dos títulos de anticorpos anti-rábicos em soros de cães primo vacinados contra a raiva, com vacina preparada em cérebros de camundongos lactentes, segundo as provas de soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI) e tempo decorrido da vacinação, São Paulo, 1980.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1— ATANASIU, P. Titrage des anticorps rabiques pratiqué sur les sérums humaines. **Bull.Off.int.Épi-zoot.**, 67:383-7, 1967.
- 2— ATANASIU, P. et alii. Imunidade antirrábica em bovinos vacunados. **Bol.Ofic.sanit.panamer.**, 64: 431-9, 1968.
- 3— BERQUÓ, E.S. et alii. **Bioestatística**. São Paulo, E.P.U. 1980. 256p.
- 4— CAMARGO, M.E. **Introdução às técnicas de imunofluorescência**. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, 1967. /Apostila/
- 5— CRICK, J. & BROWN, F. Rabies vaccines for animals and man. **Vet.Rec.**, 99:162-7, 1976.
- 6— FIELDS, M. et alii. Suckling-mouse-brain rabies vaccine (SMBV): duration of immunity in dogs. **Vet. Med small Anim.Clin.**, 71:37-40, 1976.
- 7— FUENZALIDA, E. Suckling-mouse-brain vaccine. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory techniques in rabies**. 3.ed. Geneva, 1973. p.216-20. (Monogr. Ser., 23)
- 8— GERMANO, P.M.L. et alii. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo**, 14: 133-41, 1977.
- 9— GERMANO, P.M.L. et alii. Estudo comparativo entre as provas de soroneutralização e imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de cães. **Rev.Fac.Med.vet. Zootec.Univ.S.Paulo**, 18(2):139-45, 1981.
- 10— HABEL, K. Habel test for potency. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory techniques in rabies**. 3.ed. Geneva, 1973. p.276-7. (Monogr. Ser., 23)
- 11— ISHIZUKA, M.M. Adaptação da prova de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. Estudo comparativo com a prova de soroneutralização. São Paulo, 1972. /Tese de Doutorado — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP/
- 12— PEREIRA, O.A.C. et alii. Complement fixation test in evaluation of immunity against rabies. **Rev. Microbiol.**, 1:85-91, 1970.
- 13— RIBEIRO NETTO, A. Avaliação da vacinação anti-rábica em bovinos. **An.Microbiol.**, 16:31-7, 1969.
- 14— SELIGMAN JUNIOR, E.B. The NIH test for potency. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory techniques in rabies**. 3.ed. Geneva, 1973. p.279-86. (Monogr. Ser., 23)
- 15— SIKES, R.K. Canine and feline vaccines: past and present. In: BAER, G.M. ed. **The natural history of rabies**. New York, Academic Press, 1975. v.2, p.177-87.
- 16— SIKES, R.K. et alii. Rabies vaccines: duration-of-immunity-study in dogs. **J.Amer.vet.med.Ass.**, 159: 1491-9, 1971.
- 17— STRATING, A. et alii. Efficacy of inactivated tissue culture rabies vaccine in dogs. **J.Amer.vet.med. Ass.**, 167:809-16, 1975.
- 18— TAYLOR, D. Rabies: epizootic aspects. **Vet.Rec.**, 99:157-60, 1976.
- 19— TIERKEL, E.S. Canine rabies. In: BAER, G.M. ed. **The natural history of rabies**. New York, Academic Press, 1975. v.2, p.123-37.
- 20— TIERKEL, E.S. Control of urban rabies. In: BAER, G.M. ed. **The natural history of rabies**. New York, Academic Press, 1975. v.2, p.189-201.
- 21— WIKTOR, T.J. et alii. Antigenic properties of rabies virus components. **J.Immunol.**, 110:269-76, 1973.
- 22— WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Rabies. **Report**. Geneva, 1973. (Techn.Rep.Ser., 523)

Recebido para publicação em: 16-06-81.
Aprovado para publicação em: 01-02-82.