

## Resposta imune produzida por vacinas anti-rábicas em sagüis (*Callithrix* sp)

Immune response produced by rabies vaccines in marmosets (*Callithrix* sp)

Márcia Cristina Ribeiro Andrade, Alexandre Nunes de Oliveira,  
Phyllis Catharina Romijn e Leda Maria Silva Kimura

**Resumo** Visando avaliar a resposta imunológica produzida por vacinas anti-rábicas em primatas não humanos neotropicais, trinta sagüis (*Callithrix* sp) foram divididos em cinco grupos de seis indivíduos e submetidos a cinco diferentes esquemas de vacinação anti-rábica, utilizando-se duas vacinas animais distintas existentes no mercado. A primeira produzida em cérebro de camundongos lactentes (Fuenzalida e Palacios), e a segunda, em cultura de células NIL-2. Acompanhamento sorológico pós-vacinal foi realizado periodicamente. Os resultados mostraram que a vacina Fuenzalida e Palacios não foi eficaz para a proteção dos animais, utilizando-se uma única dose ou mesmo com o reforço. Porém, os sagüis apresentaram anticorpos detectáveis, ao adotar-se o esquema semelhante ao de pré-exposição indicado para os seres humanos, e apenas um animal contraiu raiva após o desafio viral. Por outro lado, a vacina produzida em cultura de células NIL-2 produziu elevados títulos de anticorpos em todos os animais imunizados e todos os animais resistiram ao desafio viral.

**Palavras-chaves:** Raiva. Vacina. Imunização. Sagüi. *Callithrix* sp.

**Abstract** In order to evaluate the immune response produced by rabies vaccines in new world nonhuman primates, thirty marmosets (*Callithrix* sp) were divided into five groups of six individuals and submitted to five different antirabies vaccination schemes using two distinct commercially available animal vaccines. The first was produced in suckling mouse brain (Fuenzalida and Palacios), and the second in NIL-2 cell culture. Post-vaccine serological monitoring was carried out periodically. The results showed that the Fuenzalida and Palacios vaccine was not able to protect the animals when using a single dose or even with a booster. But when submitted to a vaccination routine similar to that used for humans, the marmosets showed detectable antibodies, and only one succumbed to rabies after being challenged. In addition, the vaccine produced in NIL-2 cell culture induced high antibody levels in all vaccinated animals and all animals survived the viral challenge.

**Key-words:** Rabies. Vaccine. Immunization. Marmoset. *Callithrix* sp.

Dentre as numerosas zoonoses conhecidas, a raiva é considerada uma das mais importantes, devido ao seu desenlace invariavelmente fatal<sup>24</sup>. Assim, todos os cuidados devem ser tomados a fim de que se possa preservar as espécies suscetíveis e a sua profilaxia é a adoção mais

importante, seja pelos aspectos de saúde pública, seja pelos aspectos econômicos. Atualmente, são adotados programas de controle da raiva através de rotinas de vacinação anual dos animais domésticos. Os animais silvestres, no entanto, se encontram permanentemente

Laboratório de Biologia Animal - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Niterói, RJ, Brasil.  
Endereço para correspondência: Dr<sup>a</sup> Márcia Cristina Ribeiro Andrade, Centro de Criação de Animais de Laboratório, Dept. de Primatologia/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel: 55 21 598-4257/598-4389; Fax: 55 21 260-6707.  
E-mail: andrade@bionet.biomang.fiocruz.br  
Recebido para publicação em 13/1/99.

expostos aos riscos de uma infecção nas áreas endêmicas. Em muitos países, a raiva canina tem sido controlada pela imunização maciça, consistindo em um processo bastante satisfatório. Todavia, a imunização de animais selvagens em vida livre torna-se complexa.

Apesar de proibições por lei no que se refere à manutenção de animais silvestres em cativeiro, atualmente no Brasil vem crescendo nos grandes centros urbanos, o hábito de se criar animais selvagens como animais de estimação e, dentre os mamíferos, os sagüis são os exemplares silvestres mais cobiçados, o que é possível de ser constatado pela sua presença freqüente nas campanhas de vacinação anti-rábica destinada a cães e gatos.

Os símios são transmissores de diversas doenças e o seu convívio com o ser humano é extremamente arriscado, pois albergam uma grande gama de vírus e bactérias e são altamente suscetíveis a infecções comuns ao homem. Inúmeras pessoas, em todo o mundo, já receberam tratamento anti-rábico como resultado da exposição a macacos raivosos<sup>8</sup>. No Estado do Ceará, é comum os sagüis criados como animais de estimação, tendo sido registrados inúmeros casos de agressões, sendo responsáveis por seis casos de raiva humana no período de 1989 a 1996 (NB Moraes: dados não publicados). Deste modo, surge a necessidade de proteger esses animais contra as diversas zoonoses conhecidas, entre elas a raiva, na tentativa de assegurar a saúde destes e do homem. A vacinação profilática poderia cumprir este papel, se comprovada sua eficiência nesses animais. No Brasil, a vacina anti-rábica animal utilizada nas campanhas de vacinação é a do tipo Fuenzalida e Palacios<sup>12</sup> e a sua eficácia em sagüis permanece desconhecida.

A vacina anti-rábica com vírus vivo modificado pode promover o desenvolvimento da doença em primatas não humanos. As vacinas inativadas são seguras, mas sua eficácia é desconhecida.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais.** Foram utilizados sessenta sagüis (*Callithrix* sp) adultos, de ambos os sexos, sem histórico vacinal e sem anticorpos anti-rálicos detectáveis, doados por várias instituições de pesquisa. Foram alojados em gaiolas individuais numeradas, identificados por colar e tatuagem. Inicialmente, permaneceram em quarentena, sendo vermifugados e sangrados para verificar a presença de anticorpos anti-rálicos.

**Vírus.** Utilizou-se o vírus fixo CVS-31 (Challenge Virus Standard), 5ª passagem,

Muitas vacinas anti-rálicas são licenciadas para uso subcutâneo em animais domésticos nos Estados Unidos da América, mas nenhuma delas está atualmente aprovada para primatas não humanos<sup>8,15</sup>.

A raiva silvestre é mantida entre os animais selvagens sem interferir com o homem e os animais domésticos, sendo os mamíferos selvagens reservatórios desta zoonose, que é uma ameaça crescente para a espécie humana em todo o mundo<sup>3</sup>. Os símios têm sido, há anos, atração popular em circos e zoológicos, por sua semelhança comportamental e física com o homem, e tornaram-se também, populares como animais de estimação. Infelizmente eles dividem muitas doenças com o homem e, por isso, representam risco potencial para a saúde pública<sup>10</sup>. Quando do manuseio com qualquer animal de sangue quente que tenha tendência para morder, a raiva deve ser sempre considerada. Claramente, os macacos se enquadram nessa categoria<sup>8</sup>.

Em primatas não humanos, a raiva pode manifestar-se sob as formas furiosa e parálitica<sup>5</sup>. Macacos rhesus apresentaram a raiva do tipo furiosa e posteriormente do tipo parálitica<sup>7</sup>. Os sintomas da enfermidade em primatas não humanos são caracterizados principalmente por hidrofobia e paralisia, mas um animal pode se tornar agressivo e morder, se provocado. Os mais freqüentes sintomas clínicos da raiva parálitica em macaco são salivação, automutilação e paralisia ou morte súbita<sup>15</sup>.

Com o intuito de obter subsídios para um controle sanitário eficaz no sentido de impedir a difusão da raiva para o homem quando do seu contato com os sagüis, este trabalho teve o objetivo de determinar a resposta imunológica humoral produzida por vacinas anti-rálicas, em primatas não humanos do gênero *Callithrix*, através de uma análise do perfil sorológico de animais primovacinados, e posterior desafio viral.

proveniente do laboratório de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IMMVJV) / RJ, com título viral de 10<sup>-5,61</sup>, calculado de acordo com Reed e Muench (1938)<sup>18</sup>.

### *Vacinas.*

Vacina produzida em cérebro de camundongos lactentes (2% p/v), amostra CVS, inativada pela beta-propiolactona, Fuenzalida e Palacios, produzida pelo Instituto de Tecnologia do Paraná;

Vacina produzida em cultura de células NIL-2 (feto de *hamster*), inativada e adjuvada com hidróxido de alumínio, fornecida pelo Laboratório Rhodia Merieux de Paulínia, SP.

O controle de qualidade das vacinas estudadas foi realizado através do teste Habel (1976)<sup>9</sup>. A vacina Fuenzalida e Palacios apresentou o título de  $10^{-3,46}$ , que protegeu os camundongos vacinados contra o desafio  $>2.884 DL_{50}$ . A vacina

produzida em células NIL-2 apresentou título de  $10^{-4,40}$ , protegendo os camundongos vacinados contra um desafio viral de 25.119  $DL_{50}$ .

**Imunização. Grupos vacinados.** Adotou-se cinco esquemas diferentes (Tabela 1). Os sagüis foram divididos em cinco grupos, sendo cada um constituído de seis indivíduos. Cada dose administrada foi de 1,0ml por via subcutânea.

Tabela 1 - Esquemas de vacinação utilizados nos sagüis.

Grupo	Animais (nº)	Esquema	Vacina
1	1-6	Dose única	Fuenzalida & Palacios
2	7-12	1 dose + reforço (28 dias)	Fuenzalida & Palacios
3	13-18	3 doses em dias alternados + reforço (30 dias)	Fuenzalida & Palacios
4	19-24	Dose única	produzida em cél. NIL-2
5	25-30	1 dose + reforço (28 dias)	produzida em cél. NIL-2

#### Grupos controle (animais não vacinados).

Seis animais destinados ao controle negativo (grupo 6), que não foram vacinados nem inoculados com o vírus rábico e seis animais destinados ao controle positivo (grupo 7), inoculados com o vírus rábico e não vacinados.

#### Coleta e manipulação das amostras sorológicas.

Os animais, previamente anestesiados com Cloridrato de Ketamina (15mg/kg), foram submetidos à coleta de sangue pela veia femoral. De cada animal, foi coletada uma amostra com cerca de 1,5ml de sangue e após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas. Os soros obtidos tiveram o complemento inativado em banho maria a 56°C por 30 minutos, estocados e conservados a -20°C. Os exames sorológicos foram realizados pelo Teste de Neutralização em camundongos (TNC)<sup>1</sup>.

Para os grupos 1 e 2, realizou-se sangrias nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 45, 65, 80 e 95 após a

primeira dose vacinal. No grupo 3, os animais foram sangrados nos dias 0, 15, 30, 37 e 45. Nos grupos restantes, os animais foram sangrados nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 45.

**Determinação da dose letal.** Para estipular a  $DL_{50}$  do vírus rábico para a espécie animal utilizada nos experimentos, adotou-se o padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde para camundongos<sup>13</sup>. Utilizou-se uma suspensão viral com título de  $10^{-5,61}$ , correspondendo a 40,74 $DL_{50}$ . Os animais utilizados para o desafio com o vírus rábico foram anestesiados e, após trepanação do crânio, inoculados com a suspensão viral, considerada  $DL_{50}$ , diretamente no córtex frontal esquerdo.

**Diagnóstico de raiva.** A confirmação laboratorial do óbito causado pela infecção do vírus rábico foi feita através da prova de imunofluorescência direta (IFD)<sup>11</sup>, prova biológica<sup>27</sup> e exame histopatológico do material encefálico<sup>14</sup>.

## RESULTADOS

**Manifestação da raiva nos animais.** Os animais que demonstraram sinais clínicos sugestivos de raiva, tiveram um período de incubação compreendendo de 4 a 8 dias, apresentando sintomas característicos da doença, compreendendo: incoordenação motora, debilidade, prostração, inapetência, hiperexcitabilidade (87,5% dos animais), opstótono (75%) e vômito (10%). Não foi verificada febre, com 71% dos animais acometidos revelando quadro de hipotermia e os demais permanecendo com a temperatura corporal normal. Invariavelmente,

todos eles apresentaram paralisia de membros posteriores e de cauda, culminando em respiração marcadamente abdominal até o óbito, que variou de 3 a 6 dias a partir do aparecimento dos sintomas.

**Diagnóstico de raiva.** Todos os cérebros examinados dos animais que apresentaram sinais clínicos sugestivos de encefalite viral, foram positivos tanto pela técnica de IFD quanto pela prova biológica.

**Patologia.** Macroscopicamente, os animais acometidos de raiva apresentaram moderada

congestão cerebral, gases intestinais, fezes endurecidas na porção distal do intestino e bexiga repleta de urina, em maior ou menor intensidade. Microscopicamente, evidenciou-se predomínio de infiltrados inflamatórios constituídos de células mononucleares.

**Estudo sorológico. Grupo 1.** Apenas um animal apresentou título detectável pelo TNC, tendo um pico máximo com título de 1:11, aos 65 dias (Tabela 2).

**Grupo 2.** Dos seis animais que receberam reforço vacinal aos 28 dias após a primeira dose,

Tabela 2 - Títulos\* de soros de sagüis vacinados com Fuenzalida & Palacios (dose única) obtidos pelo TNC.

Animal nº	Dia**								
	0	7	14	21	28	45	65	80	95
1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
2	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
3	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
4	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
5	<5	<5	<5	<5	8	10	11	<5	<5
6	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5

\*Recíproca da diluição; \*\* Período após a primeira dose vacinal

apenas dois apresentaram título detectável, sendo o título máximo obtido de 1:55 pelo TNC (Tabela 3).

**Grupo 3.** Todos os animais que receberam doses de acordo com o esquema de vacinação semelhante ao de pré-exposição adotado para

Tabela 3 - Títulos\* de soros de sagüis vacinados com Fuenzalida & Palacios (1 dose + reforço aos 28 dias) obtidos pelo TNC.

Animal nº	Dia**								
	0	7	14	21	28	45	65	80	95
7	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	nd	<5
8	<5	<5	<5	<5	<5	8	18	15	21
9	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
10	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
11	<5	<5	<5	<5	<5	7	14	10	55
12	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5

nd = não determinado, porque não foi possível realizar a sangria

\*Recíproca da diluição; \*\* Período após a primeira dose vacinal.

humanos, mostraram anticorpos detectáveis. Aos 45 dias, todos eles apresentaram títulos, sendo o máximo de 1:183 (Tabela 4).

**Grupos 4 e 5.** O grupo imunizado com a vacina produzida em células NIL-2 revelou anticorpos detectáveis a partir do 14<sup>o</sup> dia e

Tabela 4 - Títulos\* de soros de sagüis vacinados com Fuenzalida & Palacios (3 doses alternadas + reforço aos 30 dias) obtidos pelo TNC.

Animal nº	Dia**				
	0	15	30	37	45
13	<5	<5	10	44	72
14	<5	<5	20	172	183
15	<5	<5	<5	34	100
16	<5	<5	<5	11	55
17	<5	13	49	146	152
18	<5	<5	25	51	44

\*Recíproca da diluição; \*\* Período após a primeira dose vacinal

elevados títulos foram encontrados nas semanas subseqüentes estudadas (Tabela 5). Os animais pertencentes ao grupo 5, que receberam uma dose e um reforço aos 28 dias, constituíram um perfil sorológico semelhante ao encontrado no grupo 4 (Tabela 6).

**Grupos controle (6 e 7).** Nenhum animal pertencente aos grupos controle apresentou anticorpos anti-rábiticos detectáveis pela técnica empregada no decorrer do experimento.

**Desafio viral.** Os grupos 1 e 2 foram desafiados aos 95 dias após a primeira dose de

*Tabela 5 - Títulos\* de soros de sagüis imunizados com vacina produzida em cultivo celular (dose única) obtido pelo TNC.*

Animal nº	Dia**					
	0	7	14	21	28	45
19	<5	<5	<5	29	75	2123
20	<5	<5	7	79	>3125	>3125
21	<5	<5	<5	80	2238	>3125
22	<5	<5	8	nd	1106	1285
23	<5	<5	8	166	727	>3125
24	<5	<5	<5	37	319	522

nd = não determinado, porque não foi possível realizar a sangria.

\*Recíproca da diluição; \*\* Período após a primeira dose vacinal

*Tabela 6: Títulos\* de soros de sagüis imunizados com vacina produzida em cultivo celular (1 dose + reforço aos 28 dias) obtidos pelo TNC.*

Animal nº	Dia**					
	0	7	14	21	28	45
25	<5	<5	<5	90	1059	1663
26	<5	<5	<5	149	625	3125
27	<5	<5	11	25	35	>3125
28	<5	<5	10	298	1216	>3125
29	<5	<5	<5	65	270	>3125
30	<5	<5	125	1205	1259	3125

\*Recíproca da diluição; \*\* Período após a primeira dose vacinal

vacina, enquanto que os demais grupos foram inoculados aos 45 dias. Os resultados referentes

ao desafio viral encontram-se expressos na Tabela 7.

*Tabela 7 - Desafio viral realizado nos animais após a vacinação anti-rábitica.*

Grupo	Mortos/total
1	5 / 6
2	3 / 6
3	1 / 6
4	0 / 6
5	0 / 6

## DISCUSSÃO

Os sintomas manifestados pelos sagüis foram semelhantes aos descritos na literatura, porém constatou-se também, hipotermia, vômitos e

fotofobia. No presente estudo, os sagüis desenvolveram a forma clínica paralítica; entretanto, este resultado não anula a

possibilidade desta espécie animal apresentar em vida livre a raiva furiosa, considerando que os animais foram inoculados com vírus fixo. Nos experimentos de Perl e Good<sup>16</sup>, um macaco *rhesus* morreu 108 dias após ser infectado com vírus de rua e a duração da fase clínica foi de oito dias. A utilização do vírus CVS-31 neste experimento, permitiu abreviar o período de incubação, assim como a manifestação dos sinais clínicos e o óbito dos animais experimentais, possibilitando desenvolver o trabalho em menor período.

Na necropsia dos sagüis acometidos de raiva, constatou-se a presença de gases intestinais, fezes endurecidas na porção distal do intestino e bexiga também repleta de urina, provavelmente devido à paralisia dos esfíncteres vesical e anal, obtendo-se resultados compatíveis com trabalhos já descritos<sup>20</sup>. Microscopicamente, a encefalite rábica caracteriza-se por uma hiperemia meningoencefálica acompanhada de infiltração mononuclear, formada principalmente por linfócitos<sup>21 25</sup>. Estas conclusões se comparam aos resultados obtidos com os sagüis infectados.

Na natureza, o animal pode ser agredido em diferentes partes do corpo e serem inoculadas doses virais variadas. A distância do local de inoculação até o sistema nervoso central é também fator importante para o desenvolvimento da doença<sup>4</sup>. Este fato dificulta estipular a dose letal mínima capaz de causar raiva em um animal. Como não foram encontrados dados experimentais referentes à dose letal do vírus rábico para a espécie animal sob estudo, esta teve que ser previamente definida. Para camundongos, está estabelecida a  $DL_{50}$ <sup>13</sup>, sendo esta utilizada como procedimento de rotina nos desafios para os testes de verificação de potência de vacinas anti-rábicas de uma forma geral. Como foram usadas algumas destas vacinas e o vírus CVS, considerou-se adequado determinar a  $DL_{50}$  para sagüis da mesma forma como para camundongos.

A eficiência da vacina Fuenzalida e Palacios para carnívoros domésticos, tem sido comprovada experimentalmente<sup>6 22</sup> e também na prática, no decorrer de anos de campanhas de vacinação anti-rábica. A vacina Fuenzalida e Palacios foi utilizada inicialmente nos sagüis mantidos em cativeiro como animais de estimação, que com frequência são levados aos postos de vacinação por ocasião das campanhas anti-rábicas realizadas anualmente, promovidas por autoridades locais. A eleição desta vacina para a realização do trabalho baseou-se na necessidade de se constatar se ela é realmente eficaz ou apenas

promove falsa idéia de proteção sem se ter um respaldo científico comprovado.

No experimento específico aqui descrito e analisado, ao se procurar averiguar a eficácia da vacina Fuenzalida e Palacios, se verificou que sagüis provavelmente respondem sorologicamente de maneira semelhante aos seres humanos, ou seja, uma única dose, ou mesmo com o reforço, não protegeram o animal mediante um desafio viral; porém, o esquema de vacinação adotado para pré-exposição em humanos, imunizou os animais em estudo. Por outro lado, os animais responderam mais satisfatoriamente quando imunizados com a vacina produzida em cultivo de células. Deste modo, avaliou-se que sagüis, caso sejam vacinados durante as campanhas anti-rábicas anuais para animais domésticos, não podem ser considerados protegidos. Apresenta-se então, a dificuldade da imunização de sagüis com este tipo de vacina, devido à necessidade de se administrar múltiplas doses, como no esquema empregado em seres humanos.

Os sagüis vacinados com uma dose única de vacina anti-rábica produzida em cultivo celular, mostraram-se imunes ao vírus da Raiva 45 dias pós-vacinação. A administração de vacina anti-rábica inativada e produzida em cultivo celular foi eficaz na indução de anticorpos anti-rábicos neutralizantes em primatas não humanos da espécie *Macaca nemestrina*<sup>15</sup>. Quando utilizada a mesma via de administração em sagüis, esta vacina levou a resultados semelhantes. Outros estudiosos também observaram a eficácia de tal vacina em outras espécies animais<sup>17 22 23</sup>. Em algumas delas, porém, havia necessidade do reforço para assegurar a imunização mais duradoura. O presente trabalho não verificou se a elevação de título à aplicação de um reforço foi representativa. Ressalta-se, no entanto, que apenas uma única dose foi considerada protetora durante o período estudado.

É importante enfatizar que os grupos de animais foram desafiados em datas diferentes, não sendo possível realizar um estudo comparativo entre as respostas vacinais. Além disso, este estudo não nos oferece base para afirmar sobre a imunidade desses animais por períodos mais longos (6 meses ou mais).

Mensurar os títulos de anticorpos neutralizantes é um parâmetro conveniente para avaliar a imunogenicidade das vacinas<sup>26</sup>. Entretanto, a titulação de anticorpos apenas não necessariamente comprova a imunidade de uma espécie animal contra uma determinada doença. A proteção real

pode ser avaliada mais corretamente através do desafio viral.

A dificuldade da administração por via parenteral de animais silvestres, pode ser contornada, por meio de uma vacina oral. Entretanto, não foi possível testar vacinas anti-rábicas orais do tipo recombinantes nos sagüis, devido às restrições da legislação brasileira para o uso de organismos geneticamente modificados no meio ambiente, embora existam trabalhos realizados em primatas não humanos<sup>2 19</sup> que indicam que esta opção poderia ser viável para *Callithrix* sp. Portanto, o uso de uma vacina oral para imunização de animais silvestres contra a doença, deve ser pesquisada mais a fundo, para a sua introdução, de forma segura, nas regiões onde a raiva ocorre endemicamente.

Os resultados obtidos nas condições do experimento permitiram chegar às seguintes conclusões: - a vacina Fuenzalida e Palacios foi

ineficaz na imunização dos sagüis, utilizando o esquema adotado na campanha de vacinação anual destinada aos animais domésticos. Entretanto, o esquema de pré-exposição semelhante ao adotado para humanos, mostrou ser efetivo, embora este processo de imunização não apresente boa praticidade, em função do número de doses aplicadas; - a vacina produzida em células NIL-2 induziu boa imunidade e proteção nos sagüis vacinados com dose única; - os sintomas e as lesões apresentados pelos sagüis com raiva foram semelhantes aos observados em outros animais estudados, quando empregada amostra CVS; - os sagüis apresentam semelhança com a espécie humana no que se refere à sua resposta frente a uma imunização anti-rábica e, portanto, estes animais poderiam ser mais estudados como modelo animal para os testes de imunização anti-rábica humana.

#### AGRADECIMENTOS

Aos veterinários do Laboratório de Diagnóstico de Raiva do IMMJVJ, pelo auxílio nos exames laboratoriais e à FIOCRUZ, pelo

fornecimento de camundongos utilizados no Teste de Neutralização, bem como pelo fornecimento de alimentação aos animais do experimento.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atanasiu P. Titulación y prueba de potencia del soro y la inmunoglobulina antirrabicos. In: Kaplan MM, Koprowski H. (eds) La Rabia. Tecnicas de Laboratorio. 3th eddition. Organizacion Mundial de la Salud (Serie de Monografias n.23), Ginebra, p. 332-336, 1976.
2. Bingham J, Perry BD, King AA, Schumacher CL, Aubert M, Kappeler A, Foggin CM, Hill FWG, Aubert A. Oral rabies vaccination of jackal: progress in Zimbabwe. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 60: 477-478, 1993.
3. Corrêa WM, Corrêa NM. Doenças Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. Médica e Científica Ltda, São Paulo, 1992.
4. Dulbecco R, Ginsberg HS. Microbiologia de Davis. Harbra, São Paulo, 1980.
5. Fenner F. Veterinary virology. Academic Press, San Diego, 1993.
6. Fields M, Ament RD, Lamb D, Blades J. Suckling mouse brain rabies vaccine: duration of immunity in dogs. Veterinary Medicine of Small Animals Clinical 71: 37-40, 1976.
7. Fiennes RNTW. Pathology of Simian Primates, Karger, Basel, 1972.
8. Fowler ME. Zoo and wild animal medicine. WB Saunders Company, Philadelphia, 1986.
9. Habel K. Pruebas de Inocuidad y Potencia de las Vacunas. In: Kaplan MM, Koprowski H (eds) La rabia. Tecnicas de laboratorio, 3<sup>th</sup> edition, Organizacion Mundial de la Salud (Serie de Monografias n. 23), Ginebra, p.311, 1976.
10. Kirk RW. Atualização terapêutica veterinária. Manole, São Paulo, 1984.
11. Larghi OP, Jimenez E. Methods for accelerating the fluorescent antibody test for rabies diagnosis. Applied Microbiology 21: 611-613, 1971.
12. Markus HL, Jobim GO, Moura, MCL. Vacina anti-rábica tipo "Fuenzalida" modificada. (Cinco anos de produção e observações). Revista do Instituto de Medicina Tropical. 13:114-120, 1971.
13. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. World Health Organization, Geneva, 1996.
14. Michalane J. Técnica histopatológica em anatomia patológica. EPU, São Paulo, 1980.
15. Nieves PR, Kessler MJ, Bercovitch F. Subcutaneous rabies vaccination of pigtail macaques. Journal of Medical Primatology 25: 14-16, 1996.
16. Perl DP, Good PF. The pathology of rabies in the central nervous system. In: Baer GM (ed) The natural history of rabies, 2<sup>nd</sup> edition, CRC Press, Boca Raton, p. 163-190, 1991.
17. Precausta P, Soulebot JP, Chappuis G, Brun A, Bugand M, Peterman HG. Nil-2 cell inactivated tissue culture

- vaccine against rabies immunization of carnivores. *In: Kwert E, Merieux C, Koprowski H, Bogel K (eds) Rabies in the tropics, Espringer-Verlag, Berlin, p. 227-240, 1985.*
18. Reed LJ, Muench H. *American Journal of Hygiene* 27: 493, 1938.
  19. Rupprecht CE, Hanlon CA, Cummins LB, Koprowski H. Primate responses to a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Vaccine* 10: 368-374, 1992.
  20. Santos JA. *Patologia especial dos animais domésticos. Guanabara, Rio de Janeiro, 1986.*
  21. Schneider LG, Diringer H. Structure and molecular biology of rabies virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 75:153-180, 1976.
  22. Sikes RK, Cleary WF, Koprowski H, Wiktor TJ, Kaplan MM. Effective protection of monkeys against death from street virus by post-exposure administration of tissue culture rabies vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 45:1-11, 1971.
  23. Smith RE, Pirie GJ, England JJ. Rabies vaccination of captive white-handed gibbons potentially exposed to wild rabies virus. *Laboratory Animal Science* 37: 668-669, 1987.
  24. Steele JH, Fernandez PJ. History of rabies and global aspects. *In: Baer GM (ed) The natural history of rabies, 2<sup>nd</sup> edition, CRC Press, Boca Raton, p. 1-24, 1991.*
  25. Sureau P, Ravisse P, Rollin PE. Rabies diagnosis by animal inoculation, identification of Negri bodies, or ELISA. *In: Baer GM (ed) The natural history of rabies, 2<sup>nd</sup> edition, CRC Press, Boca Raton, p. 203-217, 1991.*
  26. Vodopija I, Sureau P, Lafon M, Baklaic Z, Ljubieie M, Svjetlieie M, Smerdel S. An evaluation of second generation tissue culture rabies vaccines for use in man: a four-vaccine comparative immunogenicity study using a pre-exposure vaccination schedule and an abbreviated 2-1-1 postexposure schedule. *Vaccine* 4: 246-248, 1986.
  27. Webster LT, Dawson JR. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proceedings Society Experimental Biology and Medicine* 32: 570-573, 1935.