

Impl.

M O A C Y R R. N I L S S O N *nt*

VACINAS ANTI-RÁBICA FLURY HEP: RELAÇÃO ENTRE O TÍTULO  
INFECTANTE EM CAMUNDONGOS LACTENTES E AS PROVAS DE PO  
TÊNCIA EM COBAIAS E CAMUNDONGOS.

Tese de doutoramento apresentada  
ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas.

SÃO PAULO  
1974

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

"In memoriam"

A meu pai

pela vida exemplar dedicada ao estudo, ao trabalho e às obrigações, sempre preso a elevados princípios éticos, profundo espiritualista, principal responsável pela nossa formação moral e humanista, do qual almejamos seguir os exemplos, mas que nem sempre conseguimos alcançar na plenitude.

---

A minha mãe, por tudo.

Aos queridos Tsugui

Moacir Akira

Maurice Seiji

Mônica Sayuri

À primeira por todo o incentivo, estímulo, colaboração e sacrifício e aos filhos pelo muito que souberam esperar e deixaram de conosco contar, principalmente aos sábados, domingos e feriados, dedicados à realização da presente e que podem ser considerados como a razão de ser determinante para que se concretize <sup>nosso</sup> objetivo na realização desta.

A meu irmão Jurandyr

jurista, homem das leis, julgador de fatos e feitos humanos, fiel seguidor dos princípios e exemplos paternos.

Ao

Prof. Dr. Humberto de Araujo Rangel *st*

pela orientação do presente trabalho,

a quem agradecemos reconhecidos.

## Homenagens especiais

A nossos precursores e mestres, direta ou indiretamente, os grandes virologistas veterinários brasileiros, que nos antecederam e deixaram exemplos marcantes e toda uma vida dedicada a pesquisas científicas nos assuntos em que estamos nos especializando:

Sylvio Torres

Victor Carneiro

Fúlvio José Alice

Raymundo Cunha

e Renato Augusto da Silva

## "In memoriam"

Dr. Ewald Ernesto Trapp, nosso Chefe na Seção de Enzootias do Instituto Biológico, hoje Seção de Raiva e Encefalomielite.

Dr. Paulo da Cunha Nóbrega, nosso Diretor no Instituto Biológico.

## Agradecimentos

Ao colega e amigo Dr. José de Angelis Côrtes que nos prestou toda sorte de ajuda e colaboração, sem o qual muito do que aqui está, não estaria.

Ao Centro Panamericano de Zoonoses pelo fornecimento das amostras de vírus e de conjugado anti-rábico.

Ao Dr. Adolpho Martins Penha pela valiosa colaboração nas análises estatísticas.

Ao Dr. Ernani Ibirá Gonçalves, do Ministério da Agricultura, pelos auxílios prestados.

Aos Assistentes de nossa secção:

Dr. Washington Sugay  
Dr. Anis Daher Saad  
Dra. Zélia Maria Pinheiro Peixoto  
Dra. Conceição Aparecida Nagata  
Dr. Domingos de Lucca Neto

Aos funcionários, colaboradores indispensáveis:

Sr. José Calixto da Silva  
Sr. Benedito Rodrigues  
Sra. Luiza Iida  
Sra. Maria Corrêa de Souza  
Sr. Antonio Fernandes de Souza  
Sr. Synésio Perez da Cunha - "in memoriam"

À Srta. Sonia Rebouças pela prestimosa orientação e realização das ilustrações fotográficas.

A todos os que nos estimularam para a realização da presente e contribuíram com sugestões, destacando-se especialmente:

Dr. Walter Maurício Corrêa  
Dr. Aramis Augusto Pinto  
Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro  
Dr. Octávio Augusto Carvalho Pereira

Aqueles que prestaram qualquer ajuda e que por esquecimento tenhamos deixado de assinalar, apresentamos também agradecimentos e escusas.

**Abreviaturas:**

CVS = "challenge virus standard"  
HEP = "high egg passage"  
LEP = "low egg passage"  
DL<sub>50</sub> = dose letal 50%  
DP<sub>50</sub> = dose de proteção 50%  
IC = intracerebral  
IM = intramuscular  
IP = intraperitonal  
SC = subcutânea  
OMS = Organização Mundial da Saúde  
NIH = "National Institute of Health"  
NYLAR = "New York Laboratory and Research"

## Í N D I C E

|                                                | pág. |
|------------------------------------------------|------|
| I. Introdução.....                             | 1    |
| II. Material e Métodos.....                    | 23   |
| II <sub>1</sub> ) Vacinas.....                 | 23   |
| II <sub>2</sub> ) Animais.....                 | 24   |
| II <sub>3</sub> ) Diluente.....                | 24   |
| II <sub>4</sub> ) Vírus.....                   | 24   |
| II <sub>5</sub> ) Prova de Infecciosidade..... | 25   |
| II <sub>6</sub> ) Reprodutibilidade.....       | 27   |
| II <sub>7</sub> ) Provas de Potência.....      | 27   |
| III. Resultados.....                           | 31   |
| IV. Discussão.....                             | 37   |
| V. Conclusões.....                             | 45   |
| VI. Referências Bibliográficas.....            | 47   |

## I. I N T R O D U Ç Ã O.

A elaboração de vacinas contra a raiva, a exemplo de qualquer produto biológico para uso médico ou veterinário, exige sempre prévia verificação experimental de eficiência em sistema biológico adequado.

A prova de potência ideal deveria ser realizada em animal da própria espécie para a qual é indicada a vacina, bem como nas mesmas ou em condições que procurem simular a ocorrência natural da doença. Tal prova, embora ideal, encontra, o mais das vezes, óbices insuperáveis que a tornam praticamente inexecutável. O caminho a seguir, com a finalidade de superar as dificuldades inerentes, é a procura de uma prova em animal de laboratório, que seja prática e se aproxime o mais possível daquelas condições mencionadas.

O primeiro teste de potência das vacinas anti-rábica, pode-se dizer veio a luz com a própria vacina descoberta por PASTEUR et al. (1884, 1884 a)<sup>90, 91</sup>, indicada para o homem, mas experimentalmente provada em cães, apesar dos trabalhos pioneiros de GALTIER (1881)<sup>35</sup> em tentativas para imunizar animais domésticos, via intravenosa.

As principais experiências sobre testes de potência das vacinas contra a raiva, de 1884 a 1938, foram reunidas e revistas criticamente por WEBSTER (1939, 1942)<sup>118, 120</sup>. Nesta revisão, WEBSTER revelou que os resultados obtidos pelos diversos pesquisadores, em sua grande maioria foram muito irregulares, inconsistentes, não quantitativos e pouco comparáveis entre si, ressaltando a necessidade de teste quantitativo mais prático para a avaliação do poder imunizante das

vacinas. O próprio WEBSTER (1936)<sup>117</sup> havia desenvolvido teste em camundongos, que consistia essencialmente em vaciná-los e verificar a imunidade três semanas mais tarde, frente a doses graduadas de vírus virulento. WEBSTER (1939a)<sup>119</sup> descreveu o teste com maiores detalhes, aplicando-o a 33 vacinas para uso humano e a 41 para animais. Neste teste, as vacinas para uso humano, diluídas ao décimo, eram injetadas intraperitonalmente em camundongos, com 1/8 da dose estabelecida e indicada pelo fabricante, diariamente, por 3 a 5 dias; vacinas para animais eram inoculadas uma única vez, diluídas ao décimo e na quantidade de 1/8 da dose indicada. Depois de três semanas, os camundongos vacinados e os controles eram inoculados com diluições diversas do vírus, pelas vias intramuscular (IM) ou intracerebral (IC).

WEBSTER & CASALS (1940)<sup>121</sup> verificaram o paralelismo entre os resultados obtidos nos testes em camundongos e em cães.

WICKOFF & BECK (1940)<sup>122</sup> confirmaram a utilidade do teste de vacinas em camundongos, introduziram algumas modificações, fixaram em 5 o número de vacinações e realizaram o desafio ("challenge") pela via IC, aos 12 dias da primeira dose.

WICKOFF & TESAR (1941)<sup>123</sup> aplicaram o teste a 45 vacinas, além de realizarem várias repetições e réplicas com as mesmas partidas, confirmando sua reprodutibilidade.

HABEL (1940)<sup>38</sup> reestudou com detalhes a aplicação do teste em camundongos para as vacinas contra a raiva, verificando algumas variáveis implicadas. Fixou a via IC para a inoculação do vírus de prova e determinou o limite mínimo de proteção contra 1.000 doses letais 50% (DL<sub>50</sub>) para aprovação da vacina.

KUBES & GALLIA (1942)<sup>72</sup> consideraram o teste de Habel adequado para a efetivação de estudos imunológicos sobre vacinas contra a raiva, por sua alta sensibilidade e aplicaram-no em provas de imunidade cruzada com diferentes vacinas, quando verificaram variações antigênicas entre amostras diversas do vírus rábico.

O teste de Habel, aceito e adotado pelo "Bureau of Animal Industry" e pelo "United Public Service" dos Estados Unidos da América, como método de escolha para controle das vacinas contra a raiva (CUNHA, 1947)<sup>23</sup>, passou por nova revisão de HABEL & WRIGHT (1948)<sup>43</sup> que o padronizaram, ao estudarem os fatores que poderiam exercer influência sobre ele, quando destacaram a amostra do vírus de prova e a raça dos camundongos.

CUNHA (1947)<sup>23</sup> utilizou o teste de Habel pela primeira vez no Brasil, no controle de 23 vacinas contra a raiva, de 13 diferentes laboratórios, destacando seu valor para a comprovação rotineira do poder imunizante das vacinas.

TENBROECK (1950)<sup>106</sup> empregou cobaias em teste para avaliar a qualidade de vacinas contra a raiva, aplicando-as pela via intraperitoneal (IP) na dose de 1 ml e nas diluições 1:50 e 1:250. Três semanas mais tarde, as cobaias vacinadas e outras não vacinadas mantidas nas mesmas condições, são inoculadas com vírus de rua originário de cão, no músculo gastrocnêmio, na dose de 0,5 ml. O autor discute as vantagens de seu teste sobre o de Habel, considerando-o superior e mais lógico, por mais próximo das condições naturais.

BÉQUIGNON & VIALAT (1953)<sup>8</sup> criaram prova em coelho, consistindo numa série de aplicações da vacina e inoculando o vírus de prova via IC, 30 dias depois de iniciada a vacinação. Todos os vacinados devem sobreviver e os não vacinados morrer.

KOPROWSKI & BLACK (1954)<sup>66</sup> observaram, em experiências preliminares, que o teste de Habel não dava bons resultados com as vacinas avianizadas a vírus vivo, cujas pesquisas vinham sendo desenvolvidas (KOPROWSKI & COX, 1948, KOPROWSKI & BLACK, 1950, 1952)<sup>68, 64, 65</sup>. Em tentativa para superar esta dificuldade, criaram prova em cobaia, que se resumia em inocular a vacina pela via IM e o vírus virulento de prova pela mesma via, 21 dias depois, devendo sobreviver 70% das cobaias vacinadas, contra 80% de morte das testemunhas. Demonstraram haver correlação entre os resultados dos testes em cobaias e em cães, efetuados simultaneamente. Em todos os testes empregaram sempre, nas comprovações, vírus de rua originário de glândulas salivares de cães (KOPROWSKI & BLACK, 1954)<sup>66</sup>.

KOPROWSKI et al. (1954)<sup>69</sup> relataram a transformação sofrida pela amostra avianizada Flury, na 179a. passagem em ovo embrionado de galinha, que se tornou apatogênica para camundongos de 14 ou mais dias de idade, mesmo quando inoculada pela via IC, mas induzia resistência contra amostra de vírus de rua, inoculada igualmente pela via IC. Esta amostra avianizada, a partir da passagem em que se tornou apatogênica para camundongos adultos, passou a receber a denominação HEP ("high egg passage").

KOPROWSKI & BLACK (1954 a)<sup>67</sup> efetuaram experiências mais completas sobre o poder imunizante da amostra Flury HEP para diversas espécies animais, confirmaram a vacinação IC em camundongos de 14 dias e consideraram ainda a possibilidade de emprego desta propriedade em futuro teste de potência para a vacina preparada a partir da amostra Flury HEP.

KAPLAN (1954)<sup>54</sup> descreveu a prova de potência empregada pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos da América. Em essência a prova compreende a

inoculação em camundongos, via IP, de 3 ou mais diluições da vacina, múltiplas de 5, em duas doses, com intervalo de uma semana entre ambas. A inoculação comprovante é realizada 14 dias depois da primeira dose, via IC. Esta prova exige confronto com vacina de referência e se considera aprovada a vacina se superior à de referência.

HABEL (1954)<sup>39</sup> propôs modificação de seu teste original, para ser utilizada pelos laboratórios de menores recursos, reduzindo o número de camundongos para 20 vacinados e 15 testemunhos e fixando a dose de vírus de confronto em 500 DL<sub>50</sub>, devendo sobreviver pelo menos 50% dos camundongos vacinados.

A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (1954)<sup>84</sup> adotou e recomendou as técnicas de Habel, Habel modificado, Béguignon e Vialat e NIH para as vacinas inativadas de uso humano ou veterinário e a de Koprowski & Black em cobaias para as vacinas avianizadas a vírus vivo.

ALICE (1954)<sup>2</sup>, na Bahia, adaptou com sucesso em ovos embrionados de galinha, amostra regional do vírus da raiva, denominada "Lagôa", produziu vacina a partir desta amostra e aplicou o teste de Habel à vacina, obtendo resultado favorável.

CASTAGNOLI & ORFEI (1955)<sup>19</sup> propuseram a criaram prova de controle do poder imunizante em cobaia, semelhante ao teste de Habel, isto é, esquema múltiplo de vacinações, mas pela via IM, e confronto intracerebral com vírus fixo. Não efetuaram comparações com outros testes.

BINDRICH (1956)<sup>9</sup> empregou pela primeira vez no teste de cobaias de Koprowski & Black, emulsão de vírus fixo, mas contendo extrato de testículo de rato.

NAZAROW (1956)<sup>79</sup> introduziu a inoculação do vírus no focinho, para comprovação de vacinas contra a raiva, em lugar da via IC usada no teste de Habel, defendendo-a por aproximar-se das condições naturais.

KAPLAN (1956)<sup>55</sup>, em estudos sobre produtos biológicos utilizados para combater a raiva nos animais, descreveu os testes indicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), acrescentando para as vacinas avianizadas Flury de alta passagem, o teste de Koprowski & Black para camundongos adultos, que exige proteção dos camundongos vacinados, até a diluição de  $10^{-3}$  da vacina, contra amostra de vírus fixo ou de rua, capaz de matar todos os testemunhos.

MÜLLER (1956)<sup>78</sup> preparou nova vacina anti-rábica para bovinos, adsorvida pelo hidróxido de alumínio, denominada "Formidogel", para a qual introduziu modificações na prova de potência em cobaias, que se traduziram pela inoculação dupla da vacina, com intervalo de 21 dias entre as doses e comprovação com vírus rábico de rua, inoculado no masseter, seis semanas depois da última vacinação. Na prova de potência utilizou vacina glicerofenicada, tipo Umeno-Doi, previamente aprovada no teste de Habel.

KRAUSE (1957)<sup>70</sup> realizou inoculação de vírus de prova pela via plantar, em provas de potência de vacinas contra a raiva, comparando-a à inoculação IC usada no teste de Habel, concluindo pela superioridade de sua técnica, principalmente por determinar curvas monofásicas de mortalidade nos camundongos vacinados, enquanto no Habel as curvas são difásicas ou mesmo polifásicas.

A OMS (1957)<sup>85</sup> recomendou o estudo e a aplicação do teste Koprowski & Black em camundongos adultos para as vacinas avianizadas de alta passagem.

CAMARGO NUÑEZ & VELAZQUEZ (1957)<sup>17</sup>, no México, trabalhando com amostra avianizada de baixa passagem, realizaram as comprovações das vacinas por meio de diluições seriadas do vírus, múltiplas de 10, de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , nas co<sup>ba</sup>ias vacinadas e testemunhas, obtendo índices de proteção pa<sup>ra</sup> julgamento das vacinas. Nas provas comuns, quando utiliza<sup>vam</sup> uma só diluição do vírus, efetuavam o cálculo da proteção levando em consideração a diferença entre testemunhas e vaci<sup>nadas</sup>.

NIKOLITCH (1957)<sup>81</sup> criticou o teste em co<sup>ba</sup>ias, argumentando que a percentagem de mortalidade das vaci<sup>nadas</sup> não deve ultrapassar 10% da mortalidade das testemunhas. Referiu-se também a obstáculos, dificilmente superáveis, para a padronização dos testes de controle das vacinas contra a raiva.

A OMS (HABEL, 1958)<sup>40</sup> indicou o uso do ví<sup>rus</sup> fixo CVS ("challenge virus standard") no teste de cobaias, em lugar do vírus de rua.

HUYGELEN & MORTELMANS (1959)<sup>48</sup> verificaram em cobaias, que a vacina Flury injetada pela via intramuscu<sup>lar</sup>, não dá proteção contra o vírus fixo inoculado pela via IC nos testes de confronto das vacinas, efetuando ainda críti<sup>cas</sup> ao teste de Habel, por fugir às condições naturais e lem<sup>brando</sup> que o teste de Krause (via intradérmica plantar) forne<sup>ce</sup> resultados mais favoráveis, por determinar curvas monofási<sup>cas</sup> de mortalidade.

MATEWA (1959)<sup>74</sup> comparou os teste de Ha<sup>bel</sup> e de Krause na comprovação de 4 vacinas fenoladas, con<sup>cluindo</sup> pela superioridade do método de Krause, desde que a<sup>presentou</sup> resultados mais regulares, não revelando, ao contrá<sup>rio</sup> do de Habel, diferenças consideráveis entre as vacinas.

Ainda MATEWA (1959 a)<sup>75</sup> empregou o teste de Krause para a vacina Flury, comparando-a com vacina fenicadas e demonstrou assim a possibilidade de sua aplicação na comprovação das vacinas avianizadas, verificando ainda não haver paralelismo entre o título infectante das vacinas e a imunidade conferida.

BACZIÁSKI (1959)<sup>6</sup> utilizou 3 métodos (Habel, Béquignon & Vialat e NIH) de titulação de vacinas contra a raiva e considerou o de Habel o mais exequível e econômico, pois o de Béquignon & Vialat, em coelhos, consome mais tempo e é mais caro, enquanto o NIH, embora bastante acurado, exige vacina padrão de referência.

HUYGELEN (1960)<sup>46</sup> inoculou cobaias via IC com vacina Flury de alta passagem, assinalando resistência à dose de confronto, quer pela via IM, quer pela via IC, confirmando também que cobaias vacinadas pela via IM não resistiram ao desafio via IC.

A OMS (1960)<sup>86</sup> voltou a recomendar o teste em camundongos adultos para as vacinas avianizadas Flury e Kelev (KOMAROV & HORESTEINS, 1953)<sup>60</sup>, paralelo ao teste em cobaias. Revelou também que há igualdade de eficácia no emprego do vírus fixo ou de rua na comprovação e que a correlação entre as amostras foi demonstrada.

OTT & CARLSON (1960)<sup>89</sup> analisaram o teste de potência em cobaias para as vacinas vivas modificadas, lembrando que há exigência de 80% de morte das não vacinadas, enquanto devem sobreviver pelo menos 70% das vacinadas, o que representa uma diferença mínima de 50% de mortalidade entre vacinadas e testemunhas. Assinalaram também, pela primeira vez, que as vacinas devem ter um título infectante em camundongos de não menos do que  $10^{3,5}/0,03$  ml, via IC. Concluíram

que não há relação entre o conteúdo de vírus na vacina e a eficiência em cobaias. Criticando o teste em cobaias, propuseram a utilização de raposas em lugar de cobaias, nos testes de vacinas para cães, pelo maior parentesco biológico.

HUYGELEN (1960 a)<sup>47</sup> comparou o emprego de coelhos e camundongos em teste de proteção de vacinas contra a raiva, efetuando a comprovação pela via IC e concluiu pela superioridade dos camundongos, pois os coelhos não revelaram qualquer valor protetor das vacinas. Na comprovação pela via IM, os coelhos resistiram melhor do que pela via IC.

DEAN & SHERMAN (1961)<sup>27</sup>, ao submeterem 28 vacinas Flury LEP de 5 diferentes laboratórios, ao teste em cobaias, verificaram que alguma correlação aparentemente existe entre o título infectante em camundongos e a proteção em cobaias, mas não seria aconselhável uma confiança total no teste de infecciosidade (viabilidade). Recomendaram o mínimo de 14 cobaias vacinadas e 10 testemunhas, o que reduziria a possibilidade de aprovação de más vacinas, devida ao acaso. Esta possibilidade casual, nas condições exigidas oficialmente, é de 1:10 e com a modificação sugerida passaria a 1:55.

THOMPSON (1961)<sup>107</sup> propôs reduzir ainda mais o risco citado, isto é, de aprovação de más vacinas ao acaso, utilizando o mesmo número de cobaias sugerido por DEAN & SHERMAN, porém inoculando maior quantidade de vírus nas cobaias vacinadas do que nas testemunhas, desde que aquelas têm a seu favor maior resistência conferida pela vacina.

DEAN & SHERMAN (1962)<sup>28</sup> empregaram comparativamente os testes de Habel e NIH, na dosagem de vacinas à base de cérebro e de embrião de pato, verificando que de 19 vacinas de embrião de pato, nenhuma foi aprovada no NIH, mas 5 o foram no teste de Habel, concluindo pela não relação entre os dois testes.

DEAN et al. (1963)<sup>29</sup> verificaram que camundongos adultos de 20 a 30g podiam ser utilizados em novo teste de potência para as vacinas vivas modificadas contra a raiva, ante a inoculação da vacina pela via IP e a comprovação pelas vias IM ou IC, realizada 21 dias depois. Tal prova veio a ser conhecida por "Nylar test" (New York Laboratory and Research).

TORLONE et al. (1963)<sup>109</sup> aplicaram o teste de potência em camundongos adultos (Koprowski & Black), para vacinas Flury HEP e estabeleceram para a comprovação, a inoculação de 20 DL<sub>50</sub> do vírus, comparando os resultados obtidos com teste paralelo em cães, pesquisando nestes a taxa de anticorpos e resistência à inoculação do vírus virulento. Não encontraram correspondência precisa entre a quantidade de vírus na vacina e o valor protetor em camundongos.

STECK & SCHNEIDER (1963)<sup>104</sup> e STECK (1963)<sup>103</sup> demonstraram nos testes de proteção em camundongos, que na administração da vacina anti-rábica, tanto em uma única como em dose dupla, as curvas dose-efeito mostraram direção linear e paralela. As formas das curvas permitiram, portanto, apreciação quantitativa das vacinas anti-rábica segundo o princípio de "padronização geral".

PHILIPS (1964)<sup>92</sup> verificou, trabalhando com 145 séries de vacinas Flury LEP, de 14 diferentes laboratórios, que 78 séries foram julgadas satisfatórias nos testes de potência em cobaias e titulação em camundongos. Houve correlação entre a titulação do vírus e o teste de potência em cobaias.

DEAN et al. (1964)<sup>30</sup> avaliaram a proteção conferida pelas vacinas Flury LEP, obtidas a partir de ovos embrionados e de cultura de tecido (fibroblastos de embrião de galinha), a cães, cobaias e camundongos. Houve correlação-

entre a presença de anticorpos no soro de cães vacinados e proteção ao desafio com vírus virulento. Algumas vacinas não aprovadas nos testes em cobaias, protegeram cães e passaram no "Nylar test" em camundongos. Todas as vacinas aprovadas no teste em cobaias, também o foram em cães. Segundo eles, se ria importante a inclusão de vacina de referência em todos os testes.

ABELSETH (1964)<sup>1</sup> aplicou com êxito o teste de proteção em cobaias, para verificar o poder imunizante da vacina ERA, obtida em cultivo de células de rim de porco.

VALDES-ORNELAS & ROLDAN DE GORDON (1965)<sup>111</sup> trabalharam com 76 lotes de vacinas Flury HEP e 21 LEP, comparando o poder imunizante em cobaias com a titulação em camundongos. Encontraram estreita relação entre os títulos infectantes e a potência em cobaias, de modo que títulos iguais ou maiores do que  $10^{3,4}$  para HEP e  $10^{2,4}$  para LEP, corresponderam a proteção suficiente em cobaias.

CABASSO et al. (1965)<sup>16</sup> efetuaram teste de potência em cães e cobaias com vacinas Flury LEP, obtidas a partir de cultivos celulares. Obtiveram correlação de 100% entre presença de anticorpos neutralizantes nos soros de cães e proteção face à inoculação de vírus virulento. Três partes em 7, não passaram na prova em cobaias, embora protegidas sem cães no teste correspondente. Propuseram dois parâmetros para julgar as vacinas: presença de anticorpos nos soros dos animais vacinados e título infectante da vacina em camundongos.

KUBES (1965)<sup>71</sup> verificou que a prova de precipitação em gel (imunodifusão) pode ser utilizada para quantificar o vírus nas vacinas Flury LEP, desde que se empregue soro obtido a partir de imunização com vacinas LEP. Os resultados com vacinas HEP foram negativos.

EL-SABBAN (1966)<sup>31</sup> relatou suas observações com 23 partidas de vacina Flury LEP, submetidas ao teste em cobaias e à verificação do título infectante em camundongos. Das 23, cinco não passaram no teste em cobaias. Houve correlação entre a quantidade de vírus na vacina e a proteção em cobaias e o autor concluiu que um alto título foi fator importante para o sucesso da vacina.

CABASSO (1966)<sup>15</sup> referiu-se novamente a comparações efetuadas em cães e cobaias, de testes de potência de vacinas Flury LEP obtidas a partir de cultivos celulares. Duas vacinas inoculadas em cobaias, que receberam doses correspondentes a 1:80 da dose-cão, não passaram no teste em cobaias, dando somente 44% e 33% de proteção, respectivamente, mas deram 100% em cães. Retestadas em cobaias com dose igual a 1:8 da dose-cão, deram 100% de proteção. Outra vacina aprovada no teste em cobaias com 1:80 da dose-cão, não passou no mesmo teste realizado em outro laboratório, com 1:48 da dose-cão. Relatou ainda perfeita correlação entre proteção de cães ao vírus na comprovação e presença de anticorpos neutralizantes no soro. Criticou as recomendações da OMS para vacinas vivas, porque não tomaram por base a quantidade de vírus, mas sim a de tecido embrionário.

KOPROWSKI (1966)<sup>62</sup> recomendou em relação à vacina avianizada Flury LEP, título mínimo em camundongos de  $10^{3,3}$   $DL_{50}$  por 0,03 ml, que deve ser mantido durante todo o período de validade da vacina. Acrescentou também que o título para liberação deveria ser 0,5 log mais alto.

HABEL (1966)<sup>41</sup>, tecendo considerações gerais sobre testes de potência de vacina contra a raiva, enumerou três importantes fatores para avaliação de qualquer teste de potência: a) determinação da efetividade na profilaxia da raiva no homem ou nos animais; b) praticabilidade; c) padroniza

ção dos testes. Considerou também que os testes de extinção do antígeno, NIH para as vacinas inativadas e "Nylar" para as vacinas vivas, em condições ideais, são melhor padronizadas e dão resultados estatisticamente mais significativos. Ambos re que re m ob riga to ria me nt e vac ina de re fe re nc ia.

O teste NIH foi novamente descrito e enfatizado pela OMS (SELIGNAN, 1966)<sup>98</sup> para as vacinas inativadas e o "Nylar test" (DEAN, 1966 a)<sup>26</sup> para as vacinas vivas modificadas. Ainda segundo DEAN (1966 a)<sup>26</sup> a vacina de referência para o "Nylar test", deverá ter título mínimo de  $10^{3,5}$  em camundongos adultos jovens e cumprir os requisitos mínimos no teste de potência em cobaia.

Na descrição do teste de potência em cobaias, recomendado pela OMS para as vacinas vivas modificadas, houve referência à correlação entre os testes de potência em coba ias e a titulação intracerebral do vírus, em camundongos. A paralisia das cobaias, observada de 4 a 10 dias após o desafio, correlacionou bem com o título de vírus da vacina e poderia, portanto, servir para facilitar a seleção de produtos potentes (KOPROWSKI, 1966 a)<sup>63</sup>.

GLATHE (1966)<sup>36</sup> aplicou os testes de Habel e de Krause a vacinas inativadas e concluiu que os resultados - em ambos os testes foram similares.

SELIMOV & AKSENOVA (1966)<sup>99</sup>, em trabalho sobre vacinas de cultura de tecido para uso humano, introduziram a inoculação dos vírus fixo e de rua, pela via intralabia l, em camundongos, além da inoculação IC empregada no teste de Habel, mas não revelaram dados comparativos.

FENJE & PINTERIC (1966)<sup>33</sup> empregaram coelhos para a avaliação de vacinas contra a raiva, de cultura de tecido, para uso humano, comparando as taxas de anticorpos neu

tralizantes e a comprovação pela inoculação de vírus virulento, verificando haver correlação.

NICOLAU & DRAGANESCU (1966)<sup>80</sup> utilizaram os testes de Habel e de Béquignon & Vialat na comprovação de vacinas contra a raiva, inativadas por sais de prata (argentadas), obtendo resultados favoráveis em ambos os testes, mas não fizeram referências a comparação entre eles.

SCHNEIDER (1966)<sup>96</sup>, complementando trabalho antes referido (STECK & SCHNEIDER, 1963)<sup>104</sup>, realizou experiências com vacinas inativadas contra a raiva, empregando dose única na imunização de camundongos, dose dupla (NIH) e doses múltiplas (teste de Habel), verificando que os valores obtidos no teste de Habel corresponderam mais aos valores após uma só dose imunizante do que após duas (NIH). Justificou sua experimentação baseado na observação de que a finalidade de qualquer teste de potência de vacinas, é a determinação direta da imunogenicidade primária, o que os testes de Habel e NIH não permitem.

SWEET (1966)<sup>105</sup>, em discussão no Simpósio Internacional de Raiva de Talloires, França, relatou comparações entre os testes de potência em cobaia e o "Nylar", com grande número de vacinas Flury LEP e HEP, produzidas em ovos embrionados e em cultivos celulares de embrião de galinha, achando que o "Nylar" foi tão bom quanto o teste em cobaias.

O 5º INFORME DOS PERITOS EM RAIVA DA OMS (1966)<sup>87</sup> referiu-se a sugestões propostas para modificação do critério estabelecido para as provas de potência, isto é, de terminação do título infectante das vacinas e capacidade de produzir anticorpos, mas considerou inaceitáveis estas provas em substituição às que requerem o confronto pela inoculação de vírus nos animais vacinados, pois somente assim haveria

completa segurança da eficácia da vacina. Recomendou ainda a utilização de vacinas de referência.

CORREA & SOLANA (1967)<sup>21</sup> trabalharam com testes de vacinas Flury HEP em cobaias, utilizando na prova de confronto, amostra de vírus isolada de bovino e CVS. De 4 testes com o vírus de bovino, só um não preencheu a condição mínima, ou seja, morte de 80% das cobaias testemunhas, enquanto de 8 testes com vírus CVS, 5 falharam em relação ao mesmo requisito.

JAEGER & BARTH (1967)<sup>51</sup> estudaram o comportamento das vacinas inativadas contra a raiva no teste de Habel e relataram resultados reprodutíveis, embora sujeitos a flutuações que não prejudicaram a avaliação, não confirmando as irregularidades apontadas por outros autores.

IRAÍROZ-LABARTA (1967)<sup>50</sup>, em estudos sobre testes em cobaias para a determinação do poder imunizante de vacinas Flury LEP, encontrou melhores resultados quando realizou a comprovação aos 31 dias da vacinação, em lugar dos 21 normalmente recomendados e ainda melhores aos 42 dias. Utilizou em seus testes 40 cobaias vacinadas e igual número de testemunhas, mas considerou 20 suficientes. Informou também que parecia haver relação entre a percentagem de cobaias sobreviventes e o título de infecciosidade do vírus em camundongos.

BROWN et al. (1967)<sup>14</sup> efetuaram provas comparadas de potência com vacinas anti-rábica preparadas com vírus Flury HEP, a partir de cultivo celular de rim de cão. Verificaram correlação, em cães, entre nível de anticorpos e resistência à inoculação do vírus; cães e cobaias inoculados pela via IC com a vacina, resistiram à comprovação; houve relação entre título infectante da vacina em camundongos e a prova de potência em cobaias; foi necessário usar 4 a 5 vezes

mais vacina para imunizar uma cobaia do que um cão. Sugeriram que a dose vacinante para cobaias poderia ser 1:20 da dose-cão, em vez da diluição 1:80, que é a exigida oficialmente. Algumas vacinas protegeram cães até a diluição 1:1000 da dose-cão. Referiram-se a experiências oficiais do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América, em que algumas vacinas foram aprovadas no teste de potência em cobaias inoculadas com vírus de rua, mas o mesmo não aconteceu quando as cobaias foram submetidas a dose de confronto com vírus fixo.

SOULEBOT et al. (1968)<sup>102</sup> criticaram os métodos de controle da atividade das vacinas contra a raiva, considerando-os insatisfatórios. Sugeriram revisão das normas mínimas requeridas, principalmente em face do desenvolvimento de vacinas produzidas a partir de cultivos celulares. Demonstraram, adicionalmente, correlação entre a taxa de anticorpos produzida no animal e a quantidade de vacina inoculada.

BRANCHE et al. (1968)<sup>10</sup>, estudando vacina anti-rábica inativada, obtida a partir de cultivos celulares, aplicaram os testes de Habel e NIH, além da titulação de anticorpos pela soroneutralização. Em relação ao teste de Habel, consideraram delicado calcular índice de proteção e estimar a precisão da resposta obtida, principalmente por causa do resultado bifásico de mortalidade, encontrado nos camundongos vacinados, que compararam a uma espécie de fenômeno de zona. Apesar destas objeções, acharam que o teste ainda é muito eficaz, porque permite julgar qualitativamente o valor da vacina. Quanto ao NIH expressaram que, muitas vezes, é impossível obter constantemente precisão estatística satisfatória, mas tem a vantagem de ser quantitativo. A titulação de anticorpos pela soroneutralização deu resultados muito bons. Incluíram ainda a titulação pela fixação do complemento e determinaram relação entre esta prova e a titulação do vírus pela inoculação. Finalmente, opinaram que as normas internacionais deveriam ser revistas no que concerne às vacinas de cultivos celulares.

MERED & GLEDEL (1969)<sup>76</sup> referiram-se a dificuldades encontradas no controle da eficácia em cobaias das vacinas Flury LEP, quando submeteram ao teste 3 vacinas e em uma só conseguiram o mínimo de 80% de morte dos testemunhos, falhando as 2 restantes. Tal fato, somado a outras limitações, levou os autores a renunciarem ao preparo da vacina Flury LEP.

MOHAMED et al. (1969)<sup>77</sup> estudaram 80 partidas de vacinas Flury LEP e concluíram que aquelas de alto título, usualmente, deram bons resultados imunológicos no teste em cobaias.

CUPERA (1969)<sup>40</sup> trabalhou com 70 partidas de vacina Flury LEP utilizando o "Nylar test", sem vacina de referência, efetuando a infecção dos camundongos pela via subcutânea, no focinho, com 100 DL<sub>50</sub> de vírus fixo. A proteção de dois terços ou mais dos camundongos em todas as diluições da vacina, foi usada como critério de aprovação e considerada satisfatória. Afirmaram que o método usado consome menos tempo e é mais econômico do que outros testes de potência.

CROGHAN (1970)<sup>22</sup>, revendo e comentando vacinas contra a raiva e respectivos testes, expressou a opinião de que estes deveriam ser feitos nos próprios animais para os quais a vacina é indicada e que havia falta de trabalhos correlativos entre a aplicação de vacinas nestes animais e nos - de laboratório, mas considerou que o uso de vírus fixo dá resultados errôneos em cães e o vírus de rua oferece demasiado perigo para ser empregado na rotina. Faz referência também a novas determinações a serem aplicadas no teste em cobaias, que passariam a exigir proteção mínima de 80% das cobaias vacinadas.

HUMPHREY (1970)<sup>45</sup> analisou o trabalho de CROGHAN, assim como os regulamentos oficiais para o registro de

vacinas contra a raiva nos Estados Unidos e informou que as principais críticas aos testes têm sido: a) utilização do CVS em lugar do vírus de rua (de glândula salivar); b) uso de pequeno número de animais, quer vacinados, quer testemunhos; c) emprego de doses de vírus excessivamente elevadas na comprovação; d) nos testes em que cães são usados, falta de resultados da prova de soroneutralização antes da vacinação; e) ausência de dados sobre os fatores idade e sexo dos animais empregados; f) não há informações de mortes acidentais e g) falta de indicações sobre os títulos das vacinas usadas para imunizar cães.

VEERARAGHAVAN et al. (1971)<sup>116</sup> submeteram vacinas inativadas aos testes de Habel, NIH e Nylar, encontrando boa proteção de todas as vacinas nos dois últimos testes, enquanto só a de referência foi aprovada no de Habel.

SIKES et al. (1971)<sup>101</sup> expuseram os resultados de teste de infecciosidade em camundongos e de potência em cobaias e camundongos. As vacinas foram aprovadas em quase todos os testes, exceto duas que não passaram no teste em cobaia.

VEERARAGHAVAN & GAJANANA (1972)<sup>113</sup> realizaram experiências preliminares com o teste de adsorção do antígeno (ARKO et al., 1973)<sup>4</sup>, comparando-o com os de Habel e "Nylar" e concluíram pela boa reprodutibilidade, além de requerer menos tempo, podendo ser empregado, portanto, preferentemente.

TIGNOR & SHOPE (1972)<sup>108</sup>, em estudos sobre imunidade cruzada com vírus relacionados ao da raiva, aplicaram 2 tipos de testes em camundongos, o primeiro inoculando vírus Flury HEP, via IC, e efetivando a comprovação com o vírus em estudo e o segundo vacinando camundongos pela via IP e compro

vando-os via IC com os diversos vírus do grupo. Em ambos os casos o índice de proteção serviu para definir os resultados.

VEERARAGHAVAN & GAJANANA (1973)<sup>114</sup> efetuaram comparações entre os testes de Habel, NIH, "Nylar", de "adsorção de antígeno" (Arco test) e em cobaias, obtendo resultados similares em todas as provas, exceto os de uma vacina, que deu resultado inferior nos testes NIH e "Nylar", pela excessiva quantidade de vírus usada no confronto, não passou no teste de Habel, mas foi aprovada no "Arco test" com alto título e na prova em cobaias.

Ainda VEERARAGHAVAN & GAJANANA (1973 a)<sup>115</sup> experimentaram modificação no teste de potência em cobaia, que consistiu na introdução direta do vírus no nervo ciático, na dose de prova. Obtiveram com tal modificação sofisticada, mortalidade dos testemunhos próxima de 100%, mesmo quando usaram tão pouco quanto 2 a 4 DL<sub>50</sub> de vírus.

TURNER (1973)<sup>110</sup>, em artigo de revisão sobre vacinas contra a raiva, comentou diversos aspectos relacionados à prova de potência, destacando que os processos devem ser de 2 tipos: 1) quebra de imunidade, nos quais os animais são imunizados com quantidade fixa de antígeno e submetidos a confronto com quantidades variáveis de vírus; 2) extinção do antígeno, pelo qual quantidades variáveis de vacina são administradas, seguidas de dose fixa de confrontação. O emprego de animais da mesma colônia, a utilização de vírus de comprovação específico bem conhecido e a comparação dos resultados obtidos com os de vacina de referência, reduziriam ao mínimo a variabilidade dos resultados.

O 6º INFORME DOS ESPECIALISTAS EM RAIVA DA OMS (1973)<sup>88</sup>, a exemplo do que ocorrera no 5º INFORME (OMS, 1966)<sup>87</sup>, voltou a refutar as proposições que recomendam o em

prego de outros critérios de atividade imunogênica, como o grau de infecciosidade das vacinas a vírus vivo modificado ou a capacidade de elaboração de anticorpos séricos neutralizantes. Insistiu o Comitê da OMS que estes métodos de atividade nunca devem ser empregados em substituição aos baseados na inoculação direta do vírus nos animais vacinados, pois este é o único que certifica a especificidade da eficácia da imunidade fornecida pela vacina.

HABEL (1973)<sup>42</sup>, nas considerações sobre os testes de potência de vacinas, em monografia especializada da OMS (KAPLAN & KOPROWSKI, 1973)<sup>57</sup>, destacou a importância da determinação da quantidade de vírus infectante na vacina viva modificada, para assegurar o mínimo requerido, concomitantemente, com a realização da prova de eficiência em cobaias. Além disso, a mesma publicação excluiu o "Nylar test" dentre as provas de potência.

Outra modificação proposta pela OMS (KAPLAN & KOPROWSKI, 1973)<sup>57</sup> no teste NIH, com a finalidade principal de permitir sua aplicação para a verificação antigênica das vacinas obtidas a partir de cultivos celulares, foi a introdução, além do método gravimétrico adotado até então, do método volumétrico, que utiliza a potência relativa da vacina face à de referência, com base na mais alta diluição que protege 50% dos camundongos e expresso o resultado em ml de vacina e não em mg de tecido como no método gravimétrico, utilizado para as vacinas de tecido nervoso (SELIGNAN, 1973)<sup>98</sup>.

Ainda em 1973, na mesma publicação da OMS, surgiu nova prova já citada anteriormente em nosso trabalho. - (VEERARAGHAVAN & GAJANANA, 1973)<sup>114</sup>, para a verificação antigênica das vacinas contra a raiva, o teste de ligação de anticorpos ("antibody binding test") ou de adsorção do antígeno, que inclui além da vacina de referência, soro de referência. Dois processos podem ser utilizados neste teste, a inoculação

de camundongos e o método de "redução de placas" em cultivos celulares. O valor antigênico é determinado pela divisão da dose de adsorção 50% da vacina em teste, pela da vacina de referência (ARKO et al., 1973)<sup>4</sup>.

A literatura compulsada, como acabamos de ver, apesar das variadas e importantes contribuições, é bastante - controvertida, mas indicou caminhos diversos a percorrer e deixou problemas vários, longe de resolvidos, dando-nos oportunidade para a realização do presente trabalho.

Resolvemos aproveitar nossa experiência com testes de vacinas avianizadas Flury de alta passagem, adquirida no período de 1960 a 1973, quando acumulamos dados que poderiam, se bem explorados e interpretados, trazer alguma contribuição para o encontro de respostas a questões relacionadas ao assunto, ainda discutidas e sem solução satisfatória.

São conhecidas as dificuldades para a obtenção de cobaias de mesmo peso e em número suficiente para a realização das provas de potência das vacinas Flury HEP, de acordo com as recomendações da OMS (1954, 1966)<sup>61, 62</sup> e exigências da nossa legislação específica (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1967, 1974)<sup>12, 13</sup>, o que nos conduziu a procurar outro parâmetro, além da prova em cobaias, que pudesse servir para a verificação do poder imunizante das vacinas e sua consequente liberação para consumo.

Objetivamos comparar, em base quantitativa, o título infectante obtido em camundongos neonatos, para quantificação do vírus ativo existente na vacina viva modificada, Flury HEP, com provas de potência em cobaias e camundongos, assim como relacionar estas últimas entre si.

Pretendemos, portanto, verificar:

1. se há relação entre o título infectante (prova de viabilidade) e o teste de potência em cobaias;
2. qual a correspondência entre o título infectante e a prova de potência em camundongos (KOPROWSKI & BLACK, 1954 a)<sup>67</sup>;
3. se a quantidade de vírus usada na prova de potência em camundongos (KOPROWSKI & BLACK, 1954 a)<sup>67</sup>, exerce influência no título de proteção das vacinas;
4. a possibilidade de utilização de novo teste em camundongos, inoculados pela via IC com dose fixa da vacina e submetidos depois a diluições variadas do vírus de confronto;
5. no caso afirmativo, se existe analogia entre este teste e os de potência em cobaias e camundongos, citados nos itens anteriores;
6. se é viável a determinação do título infectante do vírus contido nas vacinas, através do sacrifício dos camundongos e exame dos seus cérebros pela técnica de anticorpos fluorescentes;
7. se, positiva a hipótese anterior, o título obtido por esta prova é comparável ao resultado da inoculação, dado pelo critério de morte dos camundongos, após apresentação dos sintomas;
8. qual o comportamento do "Nylar test" para a verificação da potência das vacinas, face às outras provas.

## II. MATERIAL E MÉTODOS.

### II<sub>1</sub>) VACINAS.

Empregamos vacinas avianizadas Flury HEP, preparadas segundo KOMAROV (1954)<sup>59</sup>. A técnica de elaboração das vacinas, descrita em trabalho anterior (NILSSON, 1968)<sup>82</sup>, foi em resumo a seguinte: ovos embrionados de galinha, com 7 dias de incubação, adquiridos de fornecedores diversos, eram inoculados com seringa automática, no saco vitelino, através a câmara de ar, com amostra de vírus Flury HEP, 197 a 201 passagens, na dose de 0,2 ml e diluição  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$ . Depois de fechados com cera e parafina, voltavam os ovos para incubação a 36,5°C, durante 9 a 10 dias. Decorrido este período, após o voscopia, colhemos apenas os embriões vivos, que eram triturados em liquidificador e suspensos a 66% (peso/volume) em solução de glicocola a 1% e glicose a 0,5% em água destilada. Após centrifugação a 1800 rpm durante 10 minutos, em temperatura - de 4°C, o sobrenadante era filtrado em 4 camadas de gaze. Adicionamos então penicilina (1000 unidades/ml) e estreptomicina (1,25 mg/ml). Muitas vezes substituímos estes dois antibióticos pela kanamicina (0,2 mg/ml). As vacinas para bovinos eram distribuídas em frascos com 5 doses e as para cães em dose individual, correspondendo a lg de tecido embrionário por dose. O produto era liofilizado em aparelho "Edwards", em período - médio de 36 horas para os frascos de 5 doses e de 24 horas para as doses individuais.

Usamos também algumas partidas de laboratórios particulares, recebidas para testes, mas cujo processo de elaboração era semelhante, em linhas gerais, ao nosso.

As vacinas depois de liofilizadas, permaneciam em temperatura de 4 a 6°C.

Todas as vacinas, antes da verificação do poder imunizante, eram submetidas a testes de esterilidade e inocuidade.

## II<sub>2</sub>) ANIMAIS.

Camundongos: brancos, suiços, originários da Fundação Rockefeller, da criação de nosso Instituto.

Os lactentes, utilizados na determinação do título infectante das vacinas, possuíam 4 a 5 dias de idade. Os adultos para as provas de potência e titulações diversas dos vírus de confronto, tinham mais de 21 dias de idade e pesavam 12 a 30 gramas, com variações em relação ao peso, conforme descrito em cada teste.

Cobaias: albinas, da criação de nosso Instituto, com peso entre 350 a 400 gramas.

## II<sub>3</sub>) DILUENTE.

Água destilada com 2% de soro de cavalo normal para as titulações das vacinas e das amostras de vírus.

## II<sub>4</sub>) VÍRUS.

Empregamos três diferentes amostras:

- a) CVS ("challenge virus standard") - vírus fixo padrão fornecido pelo Centro Panamericano de Zoonoses, da Organização Sanitária Panamericana. A amostra, quando recebida, foi a 23-4 e sofreu em nosso laboratório, várias passagens, via IC, em camundongos.

- b) M.95/60 - amostra isolada de bovino raivoso, do município de Santa Isabel, em 1960 (NILSSON et al., 1964)<sup>83</sup>, com várias passagens em cobaias, via IM, e camundongos, via IC.
- c) M.37/60 - amostra isolada de cão, recebida para diagnóstico em abril de 1960, do município de Santo André, com duas passagens via IC em camundongos.

Todas as amostras foram conservadas em congelador a temperaturas de  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-25^{\circ}\text{C}$ , sob as formas de cérebro ou de suspensão de cérebro a 20% em diluente.

## II<sub>5</sub>) PROVA DE INFECCIOSIDADE (Viabilidade).

Verificamos nesta prova o título do vírus contido na vacina. Usamos sempre pelo menos dois frascos de cada partida de vacina. Empregamos dois critérios:

### a) Determinação do título pela morte dos camundongos.

Obtivemos a diluição  $10^{-1}$  adicionando 10 ml - de diluente a cada dose de vacina. A partir desta, efetuamos as diluições em série, múltiplas de 10, de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  ou  $10^{-6}$ . Cada diluição era inoculada na dose de 0,01 ml, via IC, em 8 camundongos de 4 a 5 dias de idade, mantidos na mesma caixa com a mãe. Observamos os camundongos pelo menos uma vez por dia, durante 14-15 dias, quando a prova era dada por encerrada. Os animais que morriam antes do 6º dias da inoculação não eram computados. Usamos como critério para a contagem, os sintomas da raiva, culminando com paralisias e morte, que ocorriam entre o 7º e o 13º dia, mais comumente. Calculamos o título infectante do vírus, expresso em logaritmo da  $DL_{50}/0,01$  ml, pelo método de REED & MUENCH (1938)<sup>94</sup>.

b) Determinação do título pela técnica de anticorpos fluorescentes.

Inoculamos os camundongos como descrito acima, mas em duplicata, isto é, cada diluição era injetada pela via IC em dois grupos de 8 camundongos. Entre o 5º e o 7º dia sacrificamos a metade dos camundongos de cada diluição (4 camundongos por caixa), retiramos seus cérebros, com os quais realizamos decalques e esfregaços em lâminas próprias para fluorescência, duas por camundongo. Utilizamos a técnica de anticorpos fluorescentes recomendada por DEAN (1966)<sup>25</sup> e pelo "CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS" (1969)<sup>20</sup>, constando, de um modo geral, do seguinte: em cada lâmina efetuamos dois decalques ou esfregaços do cérebro do camundongo, que eram fixados em chama (JENTZSCH, 1967)<sup>52</sup>. Em um dos decalques colocamos 11 gotas do conjugado anti-rábico, diluído convenientemente, na dependência do título previamente determinado, em suspensão de cérebros de camundongos normais a 20% e no outro o mesmo conjugado, na mesma diluição, porém em suspensão de cérebro de camundongo raivoso, também a 20%. Incubamos as lâminas em estufa a 37°C, em câmara úmida, durante 30 minutos. Lavamos em solução salina tamponada de fosfatos de potássio (Cl Na 0,15M; PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> e PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 0,01M) pH 7,4-7,6 e depois em água destilada. Secamos e montamos com lamínula em glicerina alcalina (pH 7,6-8,0). Efetuamos os exames em microscópio binocular "Nikon FT", com lâmpada de mercúrio HBO 200, oculares 5X, objetivas acromáticas 10X, 20X, 40X e de imersão 70X, filtros excitador ultravioleta UG 1, de 2 mm e barreira Wratten 2B e condensador de campo escuro.

Registramos como positivos os casos em que a pareciam corpúsculos fluorescentes com máxima intensidade (Figura 1), que correspondem aos resultados +++ e ++++ na leitura de rotina da imunofluorescência aplicada ao diagnóstico da raiva. Os positivos + e ++ na rotina para o diagnóstico, com

raros elementos fluorescentes (Figura 2), consideramos negativos. Determinamos tal conduta por observações preliminares próprias.

Sempre utilizamos conjugado anti-rábico fornecido pelo Centro Panamericano de Zoonosis, preparado com soro de hamster hiperimunizado e cujo título variou de 1:80 a 1:160.

## II<sub>6</sub>) REPRODUTIBILIDADE.

Efetuamos 6 repetições da prova de viabilidade de com uma partida de vacina e 4 com outra, em ambas as quais também utilizamos 8 camundongos por diluição e diluições múltiplas de 10, sucessivas, de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ . Visamos com isto - conhecer a precisão e a reprodutibilidade da prova.

Adicionalmente, para verificar também a reprodutibilidade de título da vacina pela imunofluorescência, em paralelo com o título resultante de morte dos camundongos, - submetemos uma partida de vacina a 6 repetições. Para cada camundongo sacrificado realizamos 8 decalques de secções dos cérebros e 8 esfregaços dos cérebros triturados, perfazendo 16 lâminas por camundongo.

## II<sub>7</sub>) PROVAS DE POTÊNCIA.

### a) Em cobaias.

Seguimos em essência o preconizado por KO PROWSKI (1954)<sup>61</sup>, exceto que não utilizamos vírus de glândula salivar de cão raivoso para a comprovação, mas sim, cérebros de cobaias e camundongos.

Dez ou mais cobaias de 350 a 400 gramas eram inoculadas via intramuscular, na coxa, com 0,25 ml da vacina diluída a  $5 \times 10^{-2}$ . Pelo menos 5 cobaias de mesmo peso, eram separadas e deixadas como controle. Decorridos 21 dias da vacinação, inoculamos as cobaias vacinadas e as do grupo controle com vírus virulento, via IM, na coxa oposta àquela em que foi aplicada a vacina, em dose variável de 0,1 ml a 0,5 ml e diluição entre  $10^{-1}$  e  $1,25 \times 10^{-2}$ . Observamos os animais durante 30 dias, anotando-se os que adoeciam com sintomas de raiva e que apresentavam sempre paralisia precedendo a morte.

O requisito mínimo exigido para o teste era sobrevivência de pelo menos 70% das cobaias vacinadas, contra morte de pelo menos 80% das cobaias testemunhas. Quando havia qualquer dúvida em relação às cobaias mortas, verificamos o diagnóstico pelas técnicas usuais, isto é, coloração pelo método de SELLERS (1927)<sup>100</sup> e/ou FARACO (1938)<sup>32</sup>, para pesquisa de corpúsculo de Negri, imunofluorescência e inoculação em camundongos.

b) Em camundongos.

b<sub>1</sub>) Prova de KOPROWSKI & BLACK (1954 a)<sup>67</sup>.

Inoculamos 0,03 ml das diluições sucessivas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  ou  $10^{-5}$  da vacina, via IC, em 8 a 10 camundongos de 15 a 25 g de peso. Depois de 14 a 21 dias, inoculamos nos camundongos vacinados e em não vacinados de mesmo peso e mantidos em idênticas condições, 0,03 ml de suspensão de vírus contendo 20 a 100 DL<sub>50</sub> teóricas, baseados em determinação prévia do título infectante. No dia da prova repetimos sempre e s t a determinação do título, com a finalidade de quantificar as DL<sub>50</sub> realmente empregadas. O critério de julgamento para aprovação da vacina era o título de proteção igual ou superior a  $10^3$ , isto é, a DL<sub>50</sub> dos camundongos vacinados deve

ria situar-se pelo menos na diluição  $10^{-3}$  da vacina. Os camundongos eram observados diariamente pelo prazo de 21 dias; com putando-se os mortos que houvessem antes apresentado sintomas de raiva, a partir do 49 dia da inoculação do vírus.

Submetemos a este teste uma partida de vacina, diluída de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , quando usamos 10 camundongos por diluição, mas em 6 repetições e confrontamos cada uma destas 4 diferentes  $DL_{50}$  teóricas do vírus, múltiplas de 5, isto é, 5, 25, 125 e 625, com a finalidade de verificar a possível variabilidade existente no teste e se a variação na quantidade de vírus influi no título de proteção da vacina.. Efetuamos também titulações paralelas do vírus, realizadas em duplicata, para determinar as  $DL_{50}$  realmente empregadas.

b<sub>2</sub>) Prova para a determinação do índice de proteção.

Camundongos de 15 a 20 gramas de peso, foram inoculados pela via IC, na dose de 0,03 ml, com a vacina diluída a  $5 \times 10^{-2}$ , ou seja, a mesma diluição usada no teste de cobaias. Depois de 14 dias, inoculamos vírus CVS, em diluições sucessivas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , via IC, dose de 0,03 ml, nos camundongos vacinados e em outros não vacinados, de igual idade e peso, mantidos nas mesmas condições. Após observações durante 21 dias, calculamos os títulos infectantes nos vacinados e nos testemunhos, pelo método de REED & MUENCH (1938)<sup>94</sup>, estabelecendo-se a diferença entre os dois títulos, que dá o índice de proteção.

Utilizamos sempre 10 camundongos por diluição e todas as provas foram repetidas 5 vezes, objetivando-se estudar a variabilidade, desde que o valor da média aritmética obtida, assegura maior confiança do que os valores individuais.

b<sub>3</sub>) "Nylar test" (DEAN, 1966 a)<sup>26</sup>.

Camundongos de 20 a 30 gramas de peso foram inoculados, via IP, com as diluições 1:5, 1:25 e 1:125 da vacina, a partir de suspensão a 33% (indicada para uso, na prática). Decorridos 21 dias da vacinação, todos os vacinados e mais 10 não vacinados, de mesmo peso e mantidos em condições similares, foram inoculados com 0,05ml de vírus fixo CVS, na coxa, via IM. O título infectante deste vírus de prova, foi - determinado em camundongos de peso igual, via IC, pelo método de REED & MUENCH (1938)<sup>94</sup>. Para a prova ser válida, deve haver morte de todos ou quase todos os camundongos não vacinados (90-100%). Vacinas de referência não foram incluídas em nosso caso, ao contrário do indicado.

### III. R E S U L T A D O S.

A tabela 1 registra os resultados das provas de infecciosidade em camundongos lactentes e de potência em cobaias, de 198 vacinas, numeradas segundo a ordem crescente dos títulos infectantes, expressos em logarítmos na base 10.

Dos 198 testes de potência em cobaias, somente 110 (55,5%) preencheram os requisitos mínimos, nos quais foram aprovadas 58 vacinas (52,7%).

Se considerarmos que poderia ter sido excessiva a quantidade de vírus utilizada em 60 dos testes, determinando mortalidade de 100% nas cobaias testemunhas (tabela I), resolvemos verificar o que ocorreria se estimássemos unicamente as mortalidades compreendidas entre 80% (mínimo exigido) e menos do que 100%; os resultados assim obtidos estão na tabela II.

Os 110 testes aproveitados segundo o critério anterior, reduzir-se-iam agora a apenas 50, nos quais 31 vacinas foram aprovadas (62%).

Aplicamos aos dados obtidos na tabela II, tratamento estatístico desenvolvido segundo os princípios recomendados por GOLDSTEIN (1965)<sup>37</sup>, que permite determinar se há correlação entre o título infectante (prova de viabilidade) e a prova de potência em cobaias.

Os valores obtidos para os parâmetros a e b foram 2,2761 e 0,0206, respectivamente, resultantes da regressão linear calculada para os dados da tabela II. Expressamos então a equação da reta de regressão por  $\hat{Y} = 2,2761 + 0,0206 X$ .

A sequência da análise , forneceu para r o valor 0,76, indicando estreita relação positiva entre as duas variáveis, isto é, quanto mais se eleva o título infectante da vacina, maior a porcentagem de proteção das cobaias vacinadas.

O valor t de Student igual a 8,1 revelou-se -  
significante ao nível de 5%.

O gráfico I representa a reta de regressão obtida a partir dos valores constantes da tabela II, representadas por X as porcentagens de proteção das cobaias vacinadas e por Y os títulos infectantes em camundongos lactentes.

Esta relação positiva entre as provas de potência em cobaias e de infecciosidade em camundongos lactentes, admite a utilização da última para a avaliação das vacinas. Assim, seria conveniente o estudo de alguns aspectos desta técnica.

A reprodutibilidade da prova de infecciosidade pode ser apreciada pela análise dos dados resultantes de 6 repetições realizadas com uma mesma partida, assim como de 4 repetições efetuadas com outra partida. Estes dados estão na tabela III, que revela também os valores das médias aritméticas, dos desvios padrões, dos coeficientes de variabilidade de Pearson e dos erros padrões das médias.

A tabela IV exprime os títulos infectantes em camundongos lactentes, expressos em logarítmo na base 10, de 25 diferentes partidas de vacinas, obtidos segundo dois critérios diferentes: morte dos camundongos entre 6 a 15 dias da inoculação e sacrifício dos camundongos entre o 5º e o 7º dia da inoculação e exame de seus cérebros pela imunofluorescência. Está assinalada também a média aritmética obtida segundo cada tratamento.

A tabela V assinala os resultados de 5 réplicas de titulações de uma vacina em camundongos lactentes. Os títulos expressos em log da  $DL_{50}$ , foram obtidos pela imunofluorescência dos cérebros de camundongos sacrificados e pelo critério morte dos camundongos. A mesma tabela indica ainda, as médias aritméticas, os desvios padrões, os coeficientes de variabilidade e os erros padrões da média.

Com base ainda nos valores constantes da tabela II, dividimos em classes com intervalo de 0,30 os títulos infectantes obtidos em camundongos lactentes, a partir de 1,30 até 5,20 e distribuímos as vacinas nestas classes, segundo a condição de aprovada ou não. Assim fizemos com o objetivo de determinar aquele título que pudesse indicar o limite de aprovação das vacinas. A tabela VI resume os dados obtidos com este tratamento, trazendo adicionalmente, as frequências acumuladas das vacinas aprovadas e reprovadas. Expressamos os títulos em log na base 10/0,01 ml.

Como vemos na tabela VI, nenhuma vacina com título inferior a  $10^{3,4}$  passou no teste, enquanto foram aprovadas 70% das vacinas com títulos entre  $10^{3,4}$  e  $10^{3,7}$ , sendo, portanto, válido considerar  $10^{3,5}$  (valor intermediário) como o título indicador para aprovação das vacinas.

Apoiados neste título infectante de  $10^{3,5}/$  - 0,01 ml, construímos as tabelas VII e VIII, com os valores das tabelas I e II, respectivamente. Ambas as tabelas relacionam a condição de aprovação ou não, aos títulos infectantes maiores ou iguais a  $10^{3,5}$  ou menores do que  $10^{3,5}$ , obtidos em camundongos lactentes (prova de viabilidade ou infecciosidade).

Os valores dos  $x^2$  (qui-quadrado) calculados com base nos dados das tabelas VII e VIII, respectivamente, foram 46,40 e 30,91, que se revelaram altamente significantes

ao nível de 1%, quando comparados ao valor crítico do  $\chi^2$  (qui quadrado) para 1 grau de liberdade.

O tratamento exato para tabela de contingência 2 x 2 (FISHER, 1941)<sup>34</sup>, aplicado aos valores da tabela VIII, revelou alta significância ao nível de 1%, indicada pelo resultado da fórmula  $P = 3,069 \times 10^{-9}$ .

Critério de interpretação aceitável para o julgamento das provas de potência das vacinas, embora não oficializado, seria o proporcionado pela diferença de 50% de mortalidade entre cobaias vacinadas e testemunhas, com o mínimo de 80% de morte das testemunhas (OTT & CARLSON, 1960)<sup>89</sup>, isto é, mortalidade de 80% das testemunhas contra mortalidade de 30% das vacinadas (70% de proteção), mortalidade de 90% das testemunhas contra 40% das vacinadas (60% de proteção) e mortalidade de 100% das testemunhas contra 50% das vacinadas (50% de proteção). Adotado tal julgamento, os resultados seriam, em resumo, os da tabela IX, com os dados da tabela I. Esta tabela IX substitui a VII, face a este novo critério de julgamento, pois ambas foram construídas com os mesmos números.

Como se vê, o  $\chi^2$  (qui quadrado) de 77,58 é altamente significativo ao nível de 1% e o número de vacinas aprovadas ascendeu a 74, indicando que 16 vacinas antes rejeitadas passaram à condição de aprovadas. Destas últimas, 14 com títulos superiores a  $10^{3,5}$  e somente duas com títulos inferiores.

A tabela X fornece os resultados dos testes de proteção em camundongos (KOPROWSKI & BLACK, 1954 a)<sup>63</sup> de 90 partidas de vacinas, comparados aos dos testes de infecciosidade em camundongos lactentes e de eficiência em cobaias.

Em 90 testes tivemos só 35 vacinas aprovadas, em termos absolutos, isto é, a  $DP_{50}$  (dose de proteção 50%) das

vacinas foi igual a  $10^3$ , independentemente da quantidade de vírus utilizada.

Na tabela XI estão os resultados resumidos da tabela X, segundo a condição de aprovação ou rejeição das vacinas, relacionada esta aos títulos infectantes maiores ou menores do que  $10^{3,5}$ , obtidos na prova de viabilidade.

O  $x^2$  (qui quadrado) de 24,38, resultante da - tabela XI é significativa ao nível de 1%.

A tabela XII registra os títulos de proteção de uma vacina, expressos em logarítmo na base 10, obtidos face a 4 diferentes  $DL_{50}$  de vírus CVS, isto é, 4, 18, 93 e 465. A cada uma destas  $DL_{50}$ , correspondem 6 repetições do mesmo teste e na mesma tabela figuram os valores da média aritmética, do desvio padrão, do coeficiente de variabilidade e do erro padrão da média.

O tratamento estatístico dos dados da tabela XII, efetuado segundo GOLDSTEIN (1965)<sup>34</sup>, levou à obtenção dos valores 4,28 e -0,0039 para os parâmetros  $a$  e  $b$ , respectivamente, dando em consequência a expressão  $\hat{Y} = 4,28 - 0,0039 X$  para a equação da reta de regressão. Na sequência da análise, obtivemos o valor de  $r$  igual a -0,8, que revelou estreita relação negativa entre as duas variáveis, isto é, quando crescem os valores das  $DL_{50}$  do vírus, diminuem os títulos de proteção das vacinas. O teste " $t$ " de Student revelou o valor de 6,1 para os nossos dados, significativa ao nível de 5%. O gráfico II mostra a reta de regressão obtida a partir dos dados da tabela XII.

A tabela XIII expõe os resultados de provas de potência em camundongos, de 5 diferentes vacinas, realizadas em quintuplicata, onde se procurou a obtenção de índices de proteção dos vacinados em relação aos grupos controle, com

os correspondentes desvios padrões, coeficientes de variabilidade e erros padrões da média. Contém a mesma tabela, dados comparativos de cada uma destas vacinas, com as provas de viabilidade, potência em cobaias e em camundongos.

Como se vê na tabela XIII, a única vacina que cumpriu os requisitos mínimos para aprovação em todos os testes, conferiu aos camundongos inoculados, índices de proteção superiores a 10.000  $DL_{50}$  de vírus. A vacina B 2, que forneceu resultados inferiores, não sendo aprovada nos outros testes, ainda acusou índices de proteção contra 1000  $DL_{50}$  de vírus, enquanto as demais não passaram em qualquer dos testes e apresentaram índices de proteção inferiores a 1000  $DL_{50}$ .

Os dados de provas de eficiência em camundongos ("Nylar test") de 39 diferentes vacinas, comparados aos títulos infectantes em camundongos lactentes (prova de viabilidade) e a provas de potência em cobaias e camundongos (KO PROWSKI & BLACK, 1954 a)<sup>67</sup>, encontram-se na tabela XIV.

Das 39 vacinas submetidas ao teste, 16 puderam ser aproveitadas (morte de pelo menos 90% dos testemunhos), das quais apenas 4 apresentaram título infectante elevado em camundongos lactentes e foram aprovadas na maioria dos outros testes.

#### IV. D I S C U S S Ã O.

A prova de eficiência em cobaias para vacinas avianizadas Flury de alta passagem, em nossas condições, revelou-se de baixa reprodutibilidade, desde que realizamos 198 testes para aproveitamento de apenas 110 (55,5%), que preencheram os requisitos mínimos, isto é, mortalidade de pelo menos 80% das cobaias não vacinadas. Dificuldades semelhantes foram assinaladas por DEAN & SHERMAN (1961)<sup>27</sup>, DEAN et al. (1963)<sup>29</sup>, CORREA & SOLANA (1967)<sup>21</sup>, MERED & GLEDEL (1969)<sup>76</sup> e VEERARAGHAVAN & GAJANANA (1973)<sup>115</sup>.

Talvez uma das causas de nosso insucesso, possa ser atribuída a não utilizarmos amostra de vírus de glândula salivar de cão e temperatura de -70°C para a conservação das amostras de vírus, medidas ambas que são recomendadas por KOPROWSKI & BLACK (1954)<sup>66</sup> no teste original e pela OMS (KOPROWSKI, 1954)<sup>61</sup>. Neste sentido, VEERARAGHAVAN (1957)<sup>112</sup> propôs o uso de glândulas salivares virulentas liofilizadas.

A amostra de vírus empregada na comprovação, não parece exercer influência no mau aproveitamento dos testes, uma vez que as falhas ocorreram com todas as amostras de vírus e em 4 oportunidades, onde empregamos no mesmo teste 2 diferentes vírus (CVS e M.95/60), obtivemos coincidentemente 3 falhas com ambas as amostras e, na restante, o CVS funcionou, mas não o M.95/60 (tabela I: vacinas 058, 127, 162 e 191). JOHNSON (1959)<sup>53</sup> referiu-se a vacinas que protegeram animais de laboratório contra vírus de rua, o mesmo não ocorrendo em relação ao vírus fixo, fato este também citado por BROWN et al. (1967)<sup>14</sup>. CORREA & SOLANA (1967)<sup>21</sup> relataram falhas de um teste em 4 com vírus de rua e de 5 em 8 com vírus CVS.

A dependência do acaso da prova de potência em cobaias é evidenciada por si mesma, pois exige para aprovação das vacinas, proteção de 70% das vacinadas e morte de - 80% das testemunhas. A observação da tabela I permite a comprovação do que afirmamos, quando vemos, por exemplo, que 35 provas deixaram de ser aproveitadas pelo fato de uma cobaia testemunha não ter morrido (vacinas 012, 015, 016, 022, 025, 027, 038, 043, 048, 051, 053, 054, 058, 065, 071, 073, 084, 086, 087, 091, 102, 109, 111, 112, 114, 116, 122, 129, 154, 156, 166, 176, 180, 183 e 185). Se esta morte adicional houvesse ocorrido, o número de testes aproveitados passaria de 110 (55,5%) a 145 (73,2%). O mesmo se pode dizer de 14 vacinas não aprovadas porque morreu uma cobaia vacinada a mais, casos das vacinas 032, 057, 070, 076, 081, 085, 093, 121, 140, 144, 175, 179, 190 e 192. Não morresse uma destas cobaias em cada prova, o número de vacinas aprovadas ascenderia de 58 (52,7%) a 72 (65,4%). Em situação idêntica estão vacinas tangencialmente aproveitadas ou aprovadas, modificando-se total-mente a situação se morresse uma cobaia a mais.

Importante argumento contra a prova em cobaias é dado por DEAN et al. (1964)<sup>30</sup> e CABASSO et al. (1965)<sup>16</sup> que trabalharam com vacinas para cães, preparadas a partir de cultivos celulares, as quais não passaram no teste em cobaias, mas protegeram cães contra inoculação de vírus de prova. BROWN et al. (1967)<sup>14</sup> consideraram severo o teste em cobaias e sugeriram fossem as vacinas no referido teste utilizadas a 1:20 da dose-cão e não a 1:80.

Ainda na tabela I pode ser visto que em 60 dos 110 testes aproveitados, houve morte de todas as cobaias testemunhas (100%), o que pode indicar excesso de vírus usado, impedindo correta avaliação quantitativa. CARNEIRO (1952)<sup>18</sup> - dá importância à quantidade de vírus e considera que uma dose de vírus a ser utilizada na comprovação deve matar somente 70 a 80% dos testemunhos.

Os resultados da tabela II, criada com o objetivo de melhor avaliar a quantidade de vírus utilizada, em tentativa para corrigir a falha apontada no parágrafo anterior, indicam claramente maior número de vacinas aprovadas, isto é, 31 em 50 (62%), em lugar das 58 em 110 (52,7%) da tabela I, embora com redução dos testes aproveitados, que ficaram diminuídos de 110 a 50. Apesar desta restrição, os resultados são bem mais aceitáveis, pois abrem a possibilidade de quantificar o vírus usado.

Crítica importante a ser feita ao nosso trabalho é termos utilizado na maioria dos testes, só 5 cobaias, ao invés do mínimo de 10 hoje recomendado pela OMS (1973)<sup>88</sup>. A este respeito DEAN & SHERMAN (1961)<sup>27</sup> recomendaram o mínimo de 14 cobaias vacinadas e 10 testemunhas e IRAIROZ-LABARTA - (1967)<sup>50</sup> vinte vacinadas e igual número de testemunhas.

Em resumo, as dificuldades para se conseguir cobaias uniformes e a ausência de regularidade para a reprodução da raiva em pelo menos 80% das cobaias testemunhas, conforme verificamos em nossos resultados, reduzem o valor da referida prova, não obstante as várias exigências e confirmações da OMS (1966, 1973)<sup>87, 88</sup> e de DEAN et al. (1964)<sup>30</sup>. Outros autores (PHILIPS, 1964<sup>92</sup>, VALDES ORNELAS & ROLDAN DE GORDON, 1965<sup>111</sup>, MERED & GLEDEL, 1969<sup>76</sup>) referiram-se a dificuldades encontradas para a realização do teste, além das limitações citadas por DEAN & SHERMAN (1961)<sup>27</sup> e DEAN et al. (1963)<sup>29</sup>. Outras agravantes a estas críticas são o elevado custo das cobaias e a longa duração do teste, que se prolonga até 42 dias, pelo menos.

Os resultados da tabela X evidenciam as dificuldades de interpretação da prova de KOPROWSKI & BLACK - (1954 a)<sup>67</sup> em camundongos, pois as  $DL_{50}$  do vírus foram muito variáveis. O teste recomendado pela OMS (1966)<sup>87</sup> exige que a vacina diluída a  $10^{-3}$  proteja 50% dos camundongos contra mor

de todos os testemunhos, inoculados com a mesma dose fixa de vírus, não definindo qual a mínima  $DL_{50}$  necessária. TORLONE et al. (1963)<sup>109</sup> melhor definiram a prova, exigindo a mesma proteção mínima da diluição  $10^{-3}$  da vacina, mas contra 20  $DL_{50}$  do vírus desafio. Em nosso caso as variações oscilaram - de 1 a 31.250  $DL_{50}$  nos 90 testes, o que impossibilita, a rigor, qualquer estudo comparativo entre as diversas vacinas. Este mesmo problema de variações nas  $DL_{50}$  de vírus existe nas provas de soroneutralização para a pesquisa de anticorpos contra a raiva. É grande a importância desta variação na quantidade de vírus usada, desde que doses crescentes de vírus determinam índices de neutralização decrescentes para um mesmo soro (KING et al., 1965<sup>58</sup>, HRONOVSKY & BENDA, 1970<sup>44</sup>, ANGELIS-CÔRTEZ, 1972<sup>3</sup>). Este mesmo efeito foi por nós verificado nos testes de vacinas, como demonstram a tabela XII e o gráfico II, ou seja, maior a quantidade de vírus empregada, menor o título de proteção da vacina. Torna-se evidente a necessidade do estabelecimento de um fator de correção que possa permitir reajuste dos resultados a valor único, capaz de facilitar comparações entre diferentes testes. São necessárias pesquisas com maior número de animais e de testes repetidos para determinar este fator de correção.

Com a finalidade de contornar os inconvenientes desta prova em camundongos, que acabamos de mencionar, procuramos realizar novo teste, em que usamos quantidade fixa de vacina (5%) e variamos a quantidade de vírus na prova de confronto. Estabelecemos assim uma prova, cujos resultados são dados por índices de proteção, determinados em relação - aos animais não vacinados. Tais resultados (tabela XIII) sugerem estudos posteriores no sentido de determinar certo valor que permita julgamento eficaz para o controle das vacinas. Tal valor, nas condições de nosso trabalho, parece situar-se acima de 1.000  $DL_{50}$ . A única vacina que atendeu plenamente às exigências da prova em cobaias, que é a oficial, apresentou - valor superior a 10.000  $DL_{50}$ .

Nossos testes referentes ao Índice de prote  
ção, evidenciaram boa reprodutibilidade. Sua grande vantagem  
em relação ao precedente (KOPROWSKI & BLACK, 1954 a)<sup>67</sup> é ofe  
recer praticamente 100% de aproveitamento, desde que indepen  
de das variações nas quantidades de vírus de prova utilizadas.

A concentração de vacina fixada para a imuni  
zação dos camundongos (5%) neste nosso teste para a determina  
ção do índice de proteção, foi totalmente arbitrária, empíri  
ca, baseada unicamente na mesma indicada no teste em cobaias.

Outra prova em camundongos que utilizamos, o  
"Nylar test", enfrenta as mesmas dificuldades que a prova em  
cobaias, pois a comprovação realizada pela via IM, determina  
falhas semelhantes. Com efeito, o aproveitamento deste teste  
em nossas condições, limitou-se a 16 em 39, não ultrapassando  
a 41%. Nossos resultados discordam dos referidos por SWEET  
(1966)<sup>105</sup>, VEERARAGHAVAN et al. (1971)<sup>116</sup> e VEERARAGHAVAN &  
GAJANANA (1972, 1973)<sup>113,114</sup>. A principal crítica repousa em  
não usarmos vacina de referência, com o que, talvez, poderia  
mos usufruir de melhor aproveitamento. É possível, por outro  
lado, que este baixo aproveitamento tenha contribuído para  
determinar a exclusão do teste dentre os indicados pela OMS  
(1973)<sup>88</sup>.

A prova de infecciosidade em camundongos lac  
tentes, de acordo com nossos resultados, permitiu o aproveita  
mento de todos os testes, em flagrante contraste com a prova  
de potência em cobaias que só admitiu a utilização de 55% dos  
testes.

Vantagens outras desta prova sobre a de potên  
cia em cobaias, são seu custo reduzido e exigência de menor  
período de observação para a leitura final.

Muito embora não se constitua em prova para  
a verificação da capacidade imunizante da vacina, o teste de

infecciosidade tem sido sugerido como indicador de real valor para a apreciação preliminar de tal condição (PHILIPS, 1964<sup>92</sup>, VALDES-ORNELAS & ROLDAN DE GORDON, 1965<sup>111</sup>, EL-SABBAN, 1966<sup>31</sup>, BROWN et al., 1967<sup>14</sup>, MOHAMED et al., 1969<sup>77</sup>).

Nossos resultados (tabela II mostram estreita associação positiva entre os títulos infectantes das vacinas e os correspondentes valores dos testes de potência em cobaia.

Os resultados expressos na tabela VI indicam que as vacinas com título igual ou superior a  $10^{3,5}$ , passam no teste em cobaias, o que encontra apoio na literatura (PHILIPS, 1964<sup>92</sup>, VALDES-ORNELAS & ROLDAN DE GORDON, 1965<sup>111</sup>, DEAN, 1966<sup>26</sup>). A OMS (KOPROWSKI, 1966)<sup>62</sup> indica para as vacinas de baixa passagem (LEP), título de não menos do que  $10^{3,3}$  DL<sub>50</sub> por 0,03 ml e sugere o título de  $10^{3,8}$  DL<sub>50</sub>/0,003 ml para liberação da vacina. A legislação específica brasileira (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1974)<sup>13</sup> exige este mesmo título de  $10^{3,3}$ /0,01 ml para as vacinas HEP, OTT & CARLSON (1960)<sup>89</sup> opinaram que não há relação entre o conteúdo de vírus na vacina e a prova de potência em cobaias e DEAN & SHERMAN (1961)<sup>27</sup> afirmaram que alguma relação existe, mas seria desaconselhável total confiança no teste de infecciosidade.

As tabelas VII e VIII também comprovam a afirmação de que títulos maiores ou iguais a  $10^{3,5}$  DL<sub>50</sub>/0,01 ml, correspondem à aprovação das vacinas no teste em cobaias.

Reforçam ainda mais nossas demonstrações, as análises estatísticas aplicadas à tabela VIII, não só a que determina o valor do qui-quadrado, como também o tratamento exato para tabela de contingência 2 x 2 de FISHER (1941)<sup>34</sup>.

Vemos ainda na tabela VIII que das 33 partidas com títulos iguais ou maiores do que  $10^{3,5}$ , apenas 3 fo

ram rejeitadas, ou seja 9,1%. Casualmente poderíamos esperar rejeição em 35% das vezes se a vacina fosse boa (probabilidade de 70%). Logo, podemos supor que a capacidade de proteção seja até maior do que 70%. As 3 únicas partidas não aprovadas, como se observa na tabela II, vacinas números 085, 121 e 175, protegeram 6 cobaias das 10 inoculadas. Se não morresse uma só das 4 cobaias, a vacina seria aprovada e, neste caso, todas as vacinas com título igual ou maior do que  $10^{3,5}$ , preencheriam a condição mínima exigida de 70% de proteção.

Consideramos válida, portanto, a apreciação que a prova de infecciosidade pode substituir a de potência em cobaias. Este conceito tem ainda o aval dos dados da tabela III, referentes à reprodutibilidade do teste de infecciosidade.

A prova de infecciosidade tem contra si, em algumas ocasiões, um lado negativo, ou seja, ocorrem mortes inespecíficas diversas entre os camundongos lactentes inoculados, antes mesmo de concluída a leitura final no prazo de 15 dias. Podem morrer até todos os lactentes da mesma ninhada, inoculados com determinada diluição da vacina, o que pode levar à inutilização e consequente obrigatoriedade de repetição do teste. Tais ocorrências, apesar de não abordadas antes neste nosso trabalho, pois não se enquadravam em nossos objetivos, merecem especial referência pela sua importância. No sentido de tentar superar ou minorar esta face negativa da prova, é que introduzimos a técnica de imunofluorescência para a determinação do título infectante nos camundongos lactentes. A aplicação da técnica dos anticorpos fluorescentes à amostra Flury do vírus da raiva, já havia sido realizada por SCHAAL & KLEIKAMP (1967)<sup>95</sup>, porém utilizando camundongos adultos e vírus de baixa passagem. Outros autores (KAPLAN, 1966<sup>56</sup>, PILO-MORON et al., 1967<sup>93</sup>, ATANASIU et al., 1969<sup>5</sup>, BAGNAROLI et al., 1970<sup>7</sup> e MARKSON et al., 1971<sup>73</sup>), por sua vez, recomendaram ou empregaram a prova de imunofluorescência em camundongos lactentes, sacrificados após a inoculação IC de amostras

do vírus rábico de rua, com finalidades diagnósticas, concluindo que a revelação do antígeno rábico pela fluorescência precede os sintomas da raiva nos animais inoculados.

A associação entre a revelação do vírus Flury pela imunofluorescência e o sacrifício dos camundongos inoculados, antes do aparecimento dos sintomas da raiva, constituiu a modificação por nós proposta para a titulação do vírus, paralelamente e/ou em substituição ao método da observação dos sintomas e conseqüente morte durante o período de 7 a 15 dias. A tabela IV demonstra o paralelismo entre os dois métodos de titulação. BRANCHE et al. (1970)<sup>10</sup>, estudando o vírus rábico em cultivo celular pela imunofluorescência, afirmaram haver sempre relação, paralelismo, entre o número e o tamanho das inclusões citoplasmáticas fluorescentes e o título infectante, enquanto ILYASOVA & KLUYEVA (1969)<sup>49</sup> concluíram que os títulos infectantes obtidos em camundongos e em cultivos celulares foram semelhantes, mas, os revelados pela imunofluorescência foram inferiores.

A reprodutibilidade da determinação do título infectante pelo critério de morte dos camundongos inoculados e positividade à fluorescência dos camundongos sacrificados, antes do aparecimento dos sintomas, está demonstrada plenamente, em paralelo, pelos resultados expressos na tabela V. Os títulos obtidos por ambos os métodos, praticamente se superpõem, mas o coeficiente de variabilidade da técnica de anticorpos fluorescentes é menor do que o critério morte dos camundongos, o que nos dá garantia de sua maior precisão.

Portanto, tais resultados revelam que a mortalidade dos camundongos inoculados, está efetivamente associada à multiplicação viral revelada pela imunofluorescência.

## V. CONCLUSÕES.

- 1) Há estreita relação positiva entre a prova de potência em cobaias e os títulos infectantes em camundongos lactentes, das vacinas anti-rábica Flury HEP.
- 2) O título infectante igual ou superior a  $10^{3,5} \text{DL}_{50}/0,01 \text{ ml}$  em camundongos lactentes, fornece indicação para a aprovação destas vacinas no teste em cobaias.
- 3) O requisito mínimo da prova de potência em cobaias, que exige morte de 80% a 100% dos animais não vacinados, parece excessivo e poderia ser substituído por critério que adotasse morte de 80% a menos do que 100%, permitindo assim - melhor avaliação.
- 4) O critério de julgamento das provas em cobaias, baseado na diferença de 50% de proteção entre animais vacinados e testemunhos, parece mais válido que o oficial, cujos requisitos são 80 a 100% de morte dos testemunhos e proteção de 70% dos vacinados.
- 5) O teste de potência em camundongos, em que se utiliza a inoculação intracerebral de diluições da vacina, frente a desafio com dose fixa de vírus de prova, apesar das limitações decorrentes das variações quantitativas do vírus empregado, encontra correspondência com a prova de infectiosidade em camundongos lactentes.
- 6) Vacinas com títulos infectantes iguais ou maiores do que  $10^{3,5} \text{DL}_{50}/0,01 \text{ ml}$  em camundongos lactentes, passam, em geral, no teste em camundongos de KOPROWSKI & BLACK.

- 7) Existe estreita relação negativa entre a quantidade de vírus de prova e os títulos de proteção das vacinas, no teste de potência em camundongos de KOPROWSKI & BLACK.
- 8) O emprego de novo teste de eficiência (potência) em camundongos, inoculados pela via intracerebral com dose fixa de vacina, variando-se a quantidade do vírus na comprovação é viável e permite o aproveitamento total dos testes.
- 9) Vacina aprovada neste novo teste em camundongos, também o foi nas demais provas de potência, assim como apresentou título infectante igual ou maior do que  $10^{3,5}$  DL<sub>50</sub>/0,01ml em camundongos lactentes.
- 10) O título infectante das vacinas pode ser determinado pela técnica de anticorpos fluorescentes, através sacrifício precoce dos camundongos lactentes inoculados.
- 11) O título infectante em camundongos lactentes, obtido pela imunofluorescência, não difere significativamente do resultado do critério morte após apresentação dos sintomas da raiva.
- 12) O "Nylar test" em camundongos está sujeito a muitas limitações e apresenta baixo índice de aproveitamento em relação aos demais.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ABELSETH, M.K. - An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. Can. Vet. J., 5 : 279-286, 1964.
2. ALICE, F.J. - Cultura do vírus da raiva bovina em embrião de galinha. Bol. Fund. Gonçalo Moniz, 1: 1-21, 1954.
3. ANGELIS CÔRTEZ, J. - Influência da dose de vírus sobre o resultado da prova de soroneutralização em camundongos, objetivando a determinação da taxa de anticorpos anti-rábicos. São Paulo, 1972 (Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo).
4. ARKO, R. J.; WIKTOR, T. J. & SIKES, R. K. - The antibody binding test for vaccine potency. In KAPLAN, M. M. & KOPROWSKI, H. - Laboratory Techniques in Rabies. 3<sup>rd</sup> ed., Geneva, WHO Monogr. ser. n° 23, 1973, p. 292-294.
5. ATANASIU, P.; LÉPINE, P. & SISMAN, J. - Réplication du virus rabique fixe et du virus des rues chez le souriceau nouveau-né. C. R. Acad. Sc., Paris, 269: 1226-1229, 1969.
6. BACZYŃSKI, Z. - Zasady miareczkowania wirusa wścieklizny oraz szcepcionek przeciwko wściekliźnie ( Titration of rabies virus and vaccines). Med. Vet., WARSZAWA, 15: 653-657, 1959. In: Vet.Bull., 30: 313, 1960.
7. BAGNAROLI, R. A.; LARGHI, O. P. & MARCHEWSKY, N. - Susceptibilidad de ratones lactantes y adultos al virus rábico demonstrad por inmunofluorescencia. Bol. Ofic. Sanit. Panamer., 68: 388-392, 1970.

8. BÉQUIGNON, R. & VIALAT, C. - Contrôle des vaccins antirabiques par épreuve sur le lapin. Ann Inst. Pasteur, 84: 529-531, 1953.
9. BINDRICH, H. - Untersuchungen über den "Flury" Stamm des Tollwutvirus. II. Mitteilung: Immunisierungsversuche. Arch. exptl. Vet.Med., 10: 226-236, 1956.
10. BRANCHE, R.; LANG, R.; PETERMANN, H. G. & SOULEBOT, J. P. - Vaccin rabique inactivé produit a partir de cultures cellulaires. Résultats préliminaires. 10<sup>e</sup> Congrès International de Standardisation Microbiologique, Prague, Sept. 1967, Bâle, S. Karger, éd., 1968, p. 509-520.
11. BRANCHE, R.; LANG, R.; STELMANN, C.; PETERMANN, H. G. & SOULEBOT, J. P. - Étude du virus rabique en culture cellulaire par la technique d'immunofluorescence. Bull. Assoc. Fr. Vét. Microb. Immuno., 5: 3-18, 1970.
12. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Diário Oficial da União, Seção I, Parte I, nº 3665, 1967.
13. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria nº 60 de 4 de março de 1974. Diário Oficial da União, Seção I, Parte I, 11 de março de 1974.
14. BROWN, A. L.; DAVIS, E. V.; MERRY, D. L. & BECKENHAUER, W. H. - Comparative potency tests on modified live-virus rabies vaccine produced from Flury high egg-passage virus grown on permanent dog kidney cell line. Am. J. Vet. Res., 28: 751, 1967.
15. CABASSO, V. J. - Canine rabies vaccines. In: Proceedings National Rabies Symposium, National Communicable disease Center. Atlanta, Georgia, May 5-6, 1966, p. 45-51.

16. CABASSO, V. J.; STERBBINS, M. R.; DOUGLAS, A. & SHARPLESS, C. R. - Tissue culture rabies vaccine (Flury LEP) in dogs. Am. J. Vet. Res., 26: 24-32, 1965.
17. CAMARGO-NUÑEZ, F. & VELASQUES, A. - Desarrollo y producción en México de la vacuna avianizada para el control del derriengue. Bol. Ofic. Sanit. Panamer., 43: 251-259, 1957.
18. CARNEIRO, V. - Problemas de vacinação anti-rábica. In: I Congresso Interamericano de Higiene, Havana, Cuba, 1952, p. 18.
19. CASTAGNOLI, B. & ORFEI, Z. - Controllo su cavia del potere immunizzante del vaccino antirabico. R. C. Ist. Sup. Sanità, Roma, Ital., 18: 419-425, 1955.
20. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS - Prueba de anticorpos fluorescentes para Rabia. Nota Técnica nº 8, Ramos Mejía (Buenos Aires), República Argentina, 1969, 23 p.
21. CORREA, G. P. & SOLANA, M. P. - Potencia de vacunas contra el derriengue adquiridas en farmacias veterinarias y en sus laboratorios de producción. Técnica Pecuaria, 8: 10-18, 1967.
22. CROGHAN, D. L. - Rabies vaccines for veterinary use. J. Am. Vet. Med. Assoc., 156: 1798-1801, 1970.
23. CUNHA, R. - Comprovação do poder imunizante das vacinas anti-rábicas para uso veterinário. Bol. Soc. Bras. Med. Vet., 16: 3-21, 1947.
24. CUPERA, Z. - Potency testing of avianized Flury LEP rabies vaccine in Czechoslovakia. Vet. Med., Praha, 14: 393-400, 1969, In: Vet. Bull., 40: 373, 1970.

25. DEAN, D. J. - The fluorescent antibody test. In: Laboratory Techniques in Rabies. 2<sup>nd</sup> ed., Geneva, WHO Monogr. ser. n° 23, 1966, p. 59-68.
26. DEAN, D. J. - The Nyilar test for measuring potency antirabies vaccine. In: Laboratory Techniques in Rabies. 2<sup>nd</sup> Geneva, WHO Monogr. ser. n° 23, 1966 a, p. 157.
27. DEAN, D. J. & SHERMAN, I. - Potency testing of low egg passage modified live-virus rabies vaccines. Am. J. Vet. Res., 22: 644-649, 1961.
28. DEAN, D. J. & SHERMAN, I. - Potency of commercial rabies vaccine used in man. Public Health Rep., 77: 705-710, 1962.
29. DEAN, D. J.; SHERMAN, I. & THOMPSON, W. R. - The use of mice for the potency testing of modified live-virus rabies vaccine. Am. J. Vet. Res., 24: 614-621, 1963.
30. DEAN, D. J.; EVANS, W. M. & THOMPSON, W. R. - Studies on the low egg passage Flury strain of modified live rabies virus produced in embryonating chicken eggs and tissue culture. Am. J. Vet. Res., 25: 756-763, 1964.
31. EL-SABBAN, M. S. - Rabies and its control in the United Arab Republic using the LEP Flury vaccine. Bull. Off. int. Epiz., 65: 81-98, 1966.
32. FARACO, J. - Nova técnica para a obtenção de esfregaços "por compressão e distensão" de partes do encéfalo, medula espinhal, etc., para a pesquisa de corpúsculos de Negri (Coloração rápida dos esfregaços pelo método de Mann). Rev. Biol. Hig., 9: 90-96, 1938.

33. FENJE, P. & PINTERIC, L. - Potentiation of tissue culture rabies vaccine by adjuvants. Am. J. Publ. Health, 56: 2106-2113, 1966.
34. FISHER, R. A. - Statistical methods for research workers. 8<sup>th</sup> ed., London, Oliver & Boyd, 1941, 344 p.
35. GALTIER, V. - Les injections de virus rabique dans le torrent circulatoire ne provoquent pas l'éclosion de la rage et semblent conférer l'immunité. La rage peut être transmise par l'ingestion de la matière rabique. C. R. Acad. Sci., Paris, 93: 284-287, 1881.
36. GLATHE, H. - Die Wertbestimmung von Tollwutimpfstoff nach Hempt im Habel - und Plantartest nach Krause. Z. Gesamte Hyg., Grenzeb. Dtsch., 12: 449-454, 1966.
37. GOLDSTEIN, A. - Bioestatistics: an introductory text. 2<sup>nd</sup> ed., New York, MacMillan, 1965.
38. HABEL, K. - Evaluation of a mouse test for the standartization of the immunizing power of anti-rabies vaccines. Public Health Rep., 55: 1473-1487, 1940.
39. HABEL, K. - General considerations in potency testing. In: Laboratory Techniques in Rabies. Geneva, WHO Monogr. ser., n° 23, 1954, p. 111-112.
40. HABEL, K. - Prueba de potencia para vacuna antirrábica de embrión de pollo con virus fijo de confrontación. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota Técnica n° 1, Nov. 1958.
41. HABEL, K. - General considerations in potency testing. In: Laboratory Techniques in Rabies. 2<sup>nd</sup> ed., Geneva, WHO Monogr. ser., n° 23, 1966, p. 137-139.

42. HABEL, K. - General considerations in safety and potency testing. In: KAPLAN, M. M. & KOPROWSKI, H. - Laboratory Techniques in Rabies. 3<sup>rd</sup> ed., Geneva, WHO Monogr. ser. n° 23, 1973, p. 271-275.
43. HABEL, K. & WRIGHT, J.T. - Some factors influencing the mouse potency test for rabies vaccine. Public Health Rep., 63: 44-45, 1948.
44. HRONOVSKY, V. & BENDA, R. - Kinetics of reaction of rabies virus with specific antibodies in conditions of in viro virus neutralization test. Acta virol., 14:209-216, 1970.
45. HUMPHREY, G. L. - Comments on use of rabies vaccine. J. Am. Vet. Med. Assoc., 156: 1801-1806, 1970.
46. HUYGELEN, C. - Antirabic immunity in guinea-pigs induced by high egg passage Flury virus. The influence of the route of administration on the resistance to cerebral and extraneural challenge. J. Hyg., London, 58:187-191, 1960.
47. HUYGELEN, C. - Étude comparative, chez le lapin et la souris, de l'immunité vis-à-vis d'une inoculation d'épreuve intracérébral de virus rabique fixe. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 40: 361-367, 1960 a.
48. HUYGELEN, C. & MORTELMANS, J. - Attempts to immunise guinea-pigs with Flury vaccines and subsequent challenge with fixed rabies virus. Am. J. Vet. Res., 20: 145-147, 1959.
49. ILYASOVA, R. S. & KLUYEVA, E. V. - Comparative titrations of street rabies virus according to the cytopathic effect and by immunofluorescence in tissue cultures and - in mice. Acta. Virol., 13: 156, 1969.

50. IRAIROZ-LABARTA, A. - Estudios experimentales sobre el empleo de virus fijo (Cepa P.V. 1) para la determinación de la capacidad inmunizante en cobaya de las vacunas antirrábicas cultivadas en embrión de pollo (Cepa Flury L.E.P.). Bull. Off. int. Épiz., 67: 419-438, 1967.
51. JAEGER, O. & BARTH, R. - Das Verhalten der Tollwut-Vaccine nach Hempt im Habel-Test. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig., 204: 452-459, 1967.
52. JENTZSCH, K. D. & WINKLER, C. - Antikorpertiter und Fluoreszenzeignung con Tollwut-immunseren. Z. Immunitaetsforsch., 132: 47-61, 1967.
53. JOHNSON, H. N. - Rabies. In: RIVERS, T. M. & HORSFALL, F. L., ed., Viral and Rickettsial infections of man. 3<sup>rd</sup> ed., Philadelphia-Montreal, J.B. Lippincot, 1959, p.417.
54. KAPLAN; M. M. - Potency-test requirements of the United States National Institutes of Health. In: Laboratory Techniques in Rabies. Geneva. WHO Monogr. ser., n° 23, 1954, p. 121-129.
55. KAPLAN, M. M. - Innocuité, pouvoir immunizant et emploi de produits biologiques pour la prévention de la rage chez les animaux domestiques. Bull. Off. int. Épiz., 46: 441-459, 1956.
56. KAPLAN, M. M. - The laboratory in the diagnosis and prevention of rabies. In: Laboratory Techniques in Rabies. 2<sup>nd</sup> ed., Geneva, WHO Monogr. ser., n° 23, 1966, p. 12.13.
57. KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. - Laboratory Techniques in Rabies. 3<sup>rd</sup> ed., Geneva, WHO Monogr. ser., n° 23, 1973.

58. KING, D. A.; CROGHAN, D. L. & SHAW, E. L. - A rapid quantitative "in vitro" serum neutralization test for rabies antibody. Can. Vet. J., 6: 187-193, 1965.
59. KOMAROV, A. - Chicken-embryo vaccine. In: Laboratory techniques in Rabies. Geneva, WHO Monogr. ser., n° 23, 1954, p. 99-105.
60. KOMAROV, A. & HORESTEIN, K. - Studies on the pathogenicity of an avianized street rabies virus. Cornell Vet., 43: 344-361, 1953.
61. KOPROWSKI, H. - Guinea-pig test for chicken-embryo vaccine. In: Laboratory Techniques in Rabies. Geneva, WHO Monogr. ser., n° 23, 1954, p. 113-137.
62. KOPROWSKI, H. - Chicken-embryo vaccine. In: Laboratory Techniques in Rabies. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, WHO Monogr. ser., n° 23, 1966, p. 124-131.
63. KOPROWSKI, H. - Guinea-pig test for chicken-embryo vaccine. In: Laboratory Techniques in Rabies. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, WHO Monogr. ser., n° 23, 1966 a, p. 152-156.
64. KOPROWSKI, H. & BLACK, J. - Studies on chick-embryo adapted rabies virus. II. Pathogenicity for dogs and use of egg-adapted strain for vaccination purpose. J. Immunol., 64: 185-196, 1950.
65. KOPROWSKI, H. & BLACK, J. - Studies on chick-embryo adapted rabies virus. III. Duration of immunity in vaccinated dogs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80: 410-415, 1952.
66. KOPROWSKI, H. & BLACK, J. - Studies on chick-embryo adapted rabies virus. IV. Immunization of guinea-pigs and description of a potency control test. J. Immunol., 72: 79-84, 1954.

67. KOPROWSKI, H. & BLACK, J. - Studies on chick-embryo- adapted rabies virus. VII. Immunological responses of animals to vaccination with high egg passage Flury strain. J. Immunol., 72: 503-510, 1954 a.
68. KOPROWSKI, H. & COX, H. R. - Studies on chick-embryo adapted rabies virus. I. Culture characteristics and pathogenicity. J. Immunol., 60: 533-554, 1948.
69. KOPROWSKI, H. ; BLACK, J. & NELSEN, D.J. - Studies on chick-embryo-adapted rabies virus. VI. Further changes in pathogenic properties following prolonged cultivation in the developing chick embryo. J. Immunol., 72: 94-106, 1954.
70. KRAUSE, W. W. - Kritische experimentelle Studien über die Prüfung von Tollwutimpfstoffen, die Pathogenese der Lyssa und das Geschehen in der Inkubationsperiode. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig., 167: 458-480, 1967.
71. KUBES, V. - Precipitación en gelosa como método para valorar la potencia de vacunas antirrábicas de embrión de pollo (LEP). Rev. Fac. Med. Vet. y Zoot., Guatemala, 1: 14-17, 1965.
72. KUBES, V. & GALLIA, F. - Estudios inmunológicos sobre la pluralidad de los virus rábicos en Venezuela. Bol.Inst. Invest. Veterinarias, Venezuela, 1: 3-45, 1942.
73. MARKSON, L. M.; UPCOTT, D. H. & HERBERT, C. N. - A biological test for rabies using sucking mice. Trop. Anim. Hlth. Prod., 3: 89-92, 1971.
74. MATEWA, V. - Titrierung von Phenol-Tollwutimpfstoffen nach den Methoden von Habel und Krause. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig., 175: 55-58, 1959.

75. MATEWA, V. Titrierung des mit dem Stamm Flury hergestellten Tollwutimpfstoffen. Zentralbl. Bakterirol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig., 175: 59-62, 1959,
76. MERED, B. & GLEBEL, J. - A propos de la préparation d'un vaccin antirabique avec la souche Flury LEP. Arch.Inst. Pasteur Algérie, 47: 118-127, 1969.
77. MOHAMED, A.A.; HUSSEIN, N. A.; ANIS, A.O. & HABASHI, Y. Z. - Correlation between the mice titre and the results of the guinea pig potency test in the L.E.P. rabies vaccine. Jour. Egyptian Vet. Med. Assoc., 29: 111-120, 1969.
78. MÜLLER, R. H. - Formidogel - uma nova vacina anti-rábica. (nota prévia). Bol. Diret. Prod. Animal, 13: 30-34, 1956.
79. NAZAROW, V. P. - Méthode de titrage des vaccins antirabiques. Veterinarija, 33: 75-77, 1956. In: Bull.Signalétique, 18: 1905, 1956.
80. NICOLAU, S. S. & DRAGANESCU, N. - Recherche sur le vaccin antirabique argenté. In: REGAMEY, R. H. et al., ed. International Symposium on Rabies. Talloires (France), May 27-30, 1965. Symp. Series immunobiol. Standard. vol. I, Karger, Basel/New York, 1966, p. 397-406.
81. NIKOLITCH, M. - Préparation et contrôle du vaccin antirabique. Bull. Off. int. Épiz., 48: 137-147, 1957.
82. NILSSON, M.R. - Vacinas avianizadas contra a raiva. Biológico, 34: 29-32, 1968.
83. NILSSON, M. R. & SUGAY, W. & CARVALHO, C. L. - Considerações sobre um vírus rábico de curto período de incubação, isolado de bovino. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 31: 113-118, 1964.

84. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - Laboratory Techniques in Rabies. Geneva, Monogr. ser., n° 23, 1954.
85. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - Comité de expertos en Rabia. 3º informe. Org. Mund. Salud Ser. Inf. técn., n° 121, 1957.
86. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - Comité de expertos en Rabia. 4º informe. Org. Mund. Salud Ser. Inf. técn., n° 201, 1960.
87. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - Comité de expertos en Rabia. 5º informe. Org. Mund. Salud Ser. Inf. técn., n° 321, 1966.
88. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - Comité de expertos en Rabia. 6º informe. Org. Mund. Salud Ser. Inf. técn., n° 523, 1973.
89. OTT, G. L. & CARLSON, W. E. - Potency testing of live modified rabies vaccine. Vet. Med., U.S.A., 55: 45-47, 1960.
90. PASTEUR, L.; CHAMBERLAND, C. & ROUX, E. - Nouvelle communication sur la rage. C. R. Acad. Sci., Paris, 98: 457-463, 1884.
91. PASTEUR, L.; CHAMBERLAND, C. & ROUX, E. - Sur la rage. C. R. Acad. Sci., 98: 1229-1231, 1884.
92. PHILLIPS, C. E. - Evaluation of rabies vaccines of chicken embryo origin. J. Am. Vet. Med. Ass., 144: 276-280, 1964.
93. PILO-MORON, E.; VINCENT, J.; SUREAU, P. & NÉEL, R. - Diagnostic rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous-maxillaire aux souris et par l'immunofluorescence. Arch. Inst. Pasteur Algérie, 45: 5-10, 1967.

94. REED, L. J. & MUENCH, R. - A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., 27: 493-497, 1938.
95. SCHAAL, E. & KLEIKAMP, I. - Evolution morphologique du virus fixe et du virus de Flury après inoculation intracérébrale à la souris. Informations Méd. Vét., 4: 371-387, 1967.
96. SCHNEIDER, W. - Influence of the mode of immunization on the evaluation of rabies vaccines in the mouse test. In: REGAMEY, R. N. et al., ed. International Symposium on Rabies. Talloires (France), May 27-30, 1965. Symp. Series immunobiol. Standard., vol. 1, Karger, Basel/ New York, 1966, p. 407-410.
97. SELIGNAN Jr., E. B. - Potency test requirements of the United States National Institutes of Health (NIH). In: Laboratory Techniques in Rabies. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, WHO Monogr. Ser., n° 23, 1966, p. 145-151.
98. SELIGNAN Jr., E. B. - The NIH test for potency. In: KAPLAN, M. M. & KOPROWSKI, H. - Laboratory techniques in Rabies. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva, WHO Monogr. Ser., n° 23, 1973, p. 279-286.
99. SELIMOV, M. A. & AKSENOVA, T. A. - Tissue culture antirabic vaccine for human use. In: REGAMEY, R. H. et al., ed., International Symposium on Rabies. Talloires (France), May 27-30, 1965, Symp. Series immunobiol. Standard., vol. 1, Karger, Basel/New York, 1966, p. 377-380.
100. SELLERS, T. F. - A new method for staining Negri bodies of rabies. Am. J. Pub. Health, 17: 1080-1081, 1927.
101. SIKES, R. K.; PEACOCK, G. V.; ACHA, P.; ARKO, R. J. & DIERKS, R. - Rabies vaccines: Duration - of - immunity study in dogs. J. Am. Vet. Med. Ass., 159: 1491-1499, 1971.

102. SOULEBOT, J. P.; LANG, R.; BRANCHE, R. & PETERMANN, H. G.  
- Étude comparative des methodes de contrôle des -  
vaccins antirabiques inactivés. Table ronde sur la Rage,  
Lyon, 15 juillet 1967, Animal Compagnie, 1968, p. 165-  
180.
103. STECK, K. - Zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpfstoffen.  
4. Mitteilung: Der Mäuseschutzversuch mit zweimaliger  
Immunisierung. Z. Immunitätsforsch, 125: 30-36, 1963.
104. STECK, K. & SCHNEIDER, W. - Zur Wirksamkeitsprüfung von  
Tollwutimpfstoffen. 3. Mitteilung: Der Mäuseschutzversuch  
mit einmaliger Immunisierung. Z. Immunitätsforsch, 125:  
17-29, 1963.
105. SWEET, B. H. - Discussion on "New developments in preven  
tion and treatment of rabies". In: REGAMEY, R. H. et.al.,  
ed. International Symposium on Rabies. Talloires (France),  
May 27-30, 1965. Symp. Series immunobiol. Standard., vol.  
1, Karger, Basel/New York, 1966, p. 426.
106. TENBROECK, C. - A test for the antigenicity of rabies vac  
cine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73: 297-301, 1950.
107. THOMPSON, W. R. - An alternative evaluation system for ra  
bies vaccine protection tests. Appendix 1. In: DEAN, D.  
J. & SHERMAN, I. - Potency testing of low egg passage  
modified live-virus rabies vaccines. Am. J. Vet. Res.,  
22: 647-649, 1961.
108. TIGNOR, G. H. & SHOPE, R. E. - Vaccination and challenge -  
of mice with viruses of the rabies serogroup. J. Inf.  
Dis., 125: 322-324, 1961.
109. TORLONE, V.; FLORES, J. & TITOLI, F. - Produzione, control  
lo ed impiego del vaccino antirrabico vivo ceppo Flury  
(HEP). Vet. Ital., 14: 3-13, 1963.

110. TURNER, G. S. - Vacunas antirrâbicas. Bol. Ofic. Sanit. Pa  
namer., 74: 510-523, 1973.
111. VALDES-ORNELAS, O. & ROLDAN DE GORDON, M. - Estudio compa  
rativo de las pruebas de viabilidad y antigenicidad en  
la titulación de vacunas antirrâbicas cepa Flury. Bull.  
Off. int. Épiz., 64: 709-718, 1965.
112. VEERARAGHAVAN, N. - Preparation of lyophilized rabies  
street virus material from infective submaxillary  
glands for challenge purposes. Bull. Org. mond. Santé,  
17: 937-942, 1957.
113. VEERARAGHAVAN, N. & GAJANANA, A. - Antigen adsorption  
test: a new test to evaluate the potency of antirabies  
vaccine. The Pasteur Institute Sowthern India. Coonoor,  
Scientific Report (1971): 100-103, 1972.
114. VEERARAGHAVAN, N. & GAJANANA, A. - Antigen adsorption  
test: a new test to evaluate the potency of antirabies  
vaccine. The Pasteur Institute Sowthern India, Coonoor,  
Scientific Report (1972): 51-53, 1973.
115. VEERARAGHAVAN, N. & GAJANANA, A. - Intrasciatic nerve  
challenge test - a modified post-infection guinea-pig  
protection test. The Pasteur Institute Sowthern India,  
Coonoor, Scientific Report (1972): 54-56, 1973 a.
116. VEERARAGHAVAN, N.; GAJANANA, A.; SARASWATHI, K. C. DAVA  
RAJ, R.; BELLIS, Y. N. & GASS, M. E. - Studies on ina  
tivated rabies vaccines. Comparison of the antigenic -  
values of sheep brain vaccines inactivated with BPL  
and phenol. The Pasteur Institute Sowthern India, Coonoor,  
Scientific Report (1970) : 56-57, 1971.
117. WEBSTER, L. T. - Diagnostic and immunological tests of ra  
bies in mice. Amer. Jour. Pub. Health, 26: 1207-1210-  
1936.

118. WEBSTER, L. T. - The immunizing potency of antirabies vaccines. A critical review. Am. J. Hyg., 30: 113-134, 1939.
119. WEBSTER, L. T. - A mouse test for measuring the immunizing potency of antirabies vaccines. J. Esp. Med., 70: 87-106, 1939 a.
120. WEBSTER, L. T. - Rabies. New York, MacMillan, 1942, 168 p.
121. WEBSTER, L. T. & CASALS, J. - A dog test for measuring the immunizing potency of antirabies vaccines. J. Exp. Med., 71: 719-730, 1940.
122. WYCKOFF, R. W. G. & BECK, C. E. - The potency of anti-rabic vaccines. J. Immunol., 39: 17-23, 1940.
123. WYCKOFF, R. W. G. & TESAR, W. C. - The potencies of commercial antirabic vaccines. J. Immunol., 40: 383-390, 1941.

## "ADENDUM"

Nosso trabalho já estava em impressão, quando percebemos que havíamos omitido em nossa literatura, dois importantes trabalhos de dois insígnies pesquisadores brasileiros, Drs. Renato Augusto da Silva e Raymundo G. Cunha, referentes a vacinas anti-rábica e respectivos testes de potência.

Esta ressalva, mesmo inadequadamente colocada, se impõe, não só pelos próprios trabalhos em si, mas principalmente porque não nos cabia o direito de cometer tal omissão, visto sermos discípulo direto do primeiro e indireto do segundo.

SILVA (1965) comparou o comportamento de vacina anti-rábica Flury HEP em testes de potência em cobaias e bovinos, paralelamente, encontrando resultados favoráveis em ambos os testes, com proteção total dos bovinos aos 40 dias contra mortalidade de todos os testemunhos. Provas de soroneutralização revelaram altos títulos em anticorpos nos soros dos bovinos vacinados.

SILVA & CUNHA (1973) demonstraram que: 1) a vacina "Formidogel" não protege camundongos no teste de Habel, apesar da prova em cobaia ser satisfatória; 2) vacinas de cérebro, inativadas pela betapropiolactona e adsorvidas em hidróxido de alumínio demonstraram proteger camundongos vacinados pela via intraperitoneal no teste de Habel e cobaias imunizadas pela via subcutânea e 3) vacinas inativadas pela betapropiolactona e adicionadas ao hidróxido de alumínio mostraram poder imunizante satisfatório em camundongos vacinados pela via subcutânea, prova esta criada pelos autores.

REFERÊNCIAS.

SILVA, R. A. - Imunologia da raiva. In: II Simpósio Brasileiro de Raiva. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária e Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro, Guanabara, 6 a 11 de setembro de 1965, p. 53-58.

SILVA, R. A. & CUNHA, R. G. - Vacinas anti-rábicas com hidróxido de alumínio e provas para controle de sua eficiência. Rev.Brasil.Biol., 33 : 127-134, 1973.

**TABELA I - Provas de infecciosidade em camundongos lactentes e de potência em co-  
baías, de vacinas anti-rábica Flury HEP. São Paulo, março de 1960 a  
novembro de 1972.**

| VACINAS |          | PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS   |     |                                     |     |         |           |
|---------|----------|--------------------------------|-----|-------------------------------------|-----|---------|-----------|
| Nº      | Título + | Vacinadas<br>M/I ** Proteção % |     | Testemunhas<br>M/I ** Mortalidade % |     | Vírus   | Resultado |
| 001     | 1,39     | 6/10                           | 40  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 002     | 2,00     | 4/8                            | 50  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 003     | 2,00     | 7/10                           | 30  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 004     | 2,00     | 9/10                           | 10  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 005     | 2,00     | 0/10                           | 100 | 1/5                                 | 20  | M.95/60 | ?         |
| 006     | 2,00     | 8/10                           | 20  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 007     | 2,00     | 14/14                          | 0   | 10/10                               | 100 | CVS     | R         |
| 008     | 2,12     | 9/10                           | 10  | 4/5                                 | 80  | CVS     | R         |
| 009     | 2,13     | 2/10                           | 80  | 0/5                                 | 0   | CVS     | ?         |
| 010     | 2,23     | 9/13                           | 31  | 5/10                                | 50  | CVS     | ?         |
| 011     | 2,36     | 7/9                            | 22  | 3/6                                 | 50  | CVS     | ?         |
| 012     | 2,39     | 5/10                           | 50  | 5/7                                 | 71  | CVS     | ?         |
| 013     | 2,40     | 10/10                          | 0   | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 014     | 2,50     | 7/9                            | 22  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 015     | 2,50     | 3/9                            | 66  | 5/7                                 | 71  | CVS     | ?         |
| 016     | 2,57     | 4/9                            | 55  | 5/7                                 | 71  | CVS     | ?         |
| 017     | 2,58     | 10/10                          | 0   | 9/10                                | 90  | CVS     | R         |
| 018     | 2,58     | 2/9                            | 77  | 3/6                                 | 50  | M.95/60 | ?         |
| 019     | 2,59     | 8/10                           | 20  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 020     | 2,68     | 10/10                          | 0   | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 021     | 2,68     | 15/15                          | 0   | 8/8                                 | 100 | CVS     | R         |
| 022     | 2,74     | 5/10                           | 50  | 4/6                                 | 66  | M.95/60 | ?         |
| 023     | 2,74     | 4/10                           | 60  | 3/6                                 | 50  | CVS     | ?         |
| 024     | 2,86     | 6/10                           | 40  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 025     | 2,86     | 6/10                           | 40  | 4/6                                 | 66  | M.95/60 | ?         |
| 026     | 2,87     | 6/8                            | 25  | 9/10                                | 90  | M.95/60 | R         |
| 027     | 2,89     | 5/10                           | 50  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 028     | 3,00     | 7/9                            | 22  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 029     | 3,00     | 6/10                           | 40  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 030     | 3,00     | 10/10                          | 0   | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 031     | 3,00     | 4/9                            | 55  | 5/10                                | 50  | M.95/60 | ?         |
| 032     | 3,01     | 4/10                           | 60  | 8/10                                | 80  | M.37/60 | R         |
| 033     | 3,10     | 7/10                           | 30  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 034     | 3,10     | 6/8                            | 25  | 9/10                                | 90  | CVS     | R         |
| 035     | 3,14     | 0/10                           | 100 | 1/5                                 | 20  | M.95/60 | ?         |
| 036     | 3,17     | 9/10                           | 10  | 3/6                                 | 50  | CVS     | ?         |
| 037     | 3,17     | 7/9                            | 23  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 038     | 3,18     | 3/9                            | 66  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 039     | 3,18     | 5/7                            | 28  | 9/10                                | 90  | CVS     | R         |
| 040     | 3,23     | 6/10                           | 40  | 3/6                                 | 50  | M.95/60 | ?         |
| 041     | 3,24     | 6/10                           | 40  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 042     | 3,24     | 1/15                           | 93  | 4/10                                | 40  | CVS     | ?         |
| 043     | 3,24     | 4/8                            | 50  | 5/7                                 | 71  | CVS     | ?         |
| 044     | 3,24     | 9/15                           | 40  | 9/10                                | 90  | CVS     | R         |
| 045     | 3,26     | 7/7                            | 0   | 11/11                               | 100 | CVS     | R         |
| 046     | 3,27     | 7/10                           | 30  | 10/10                               | 100 | M.95/60 | R         |
| 047     | 3,28     | 3/8                            | 62  | 8/8                                 | 100 | CVS     | R         |
| 048     | 3,28     | 5/11                           | 54  | 7/10                                | 70  | M.95/60 | ?         |
| 049     | 3,29     | 7/10                           | 30  | 2/5                                 | 40  | M.95/60 | ?         |
| 050     | 3,30     | 4/9                            | 55  | 6/9                                 | 66  | M.95/60 | ?         |
| 051     | 3,30     | 2/10                           | 80  | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 052     | 3,31     | 8/12                           | 35  | 11/11                               | 100 | CVS     | R         |
| 053     | 3,33     | 6/10                           | 40  | 4/6                                 | 66  | M.95/60 | ?         |
| 054     | 3,33     | 5/9                            | 44  | 5/7                                 | 71  | CVS     | ?         |
| 055     | 3,33     | 10/11                          | 9   | 10/10                               | 100 | CVS     | R         |
| 056     | 3,35     | 10/10                          | 0   | 11/11                               | 100 | CVS     | R         |
| 057     | 3,37     | 4/10                           | 60  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 058     | 3,38     | 5/9                            | 44  | 4/5                                 | 80  | CVS     | R         |
|         |          | 0,8                            | 100 | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 059     | 3,39     | 8/12                           | 34  | 9/10                                | 90  | CVS     | R         |
| 060     | 3,40     | 3/10                           | 70  | 3/6                                 | 50  | CVS     | ?         |
| 061     | 3,42     | 10/15                          | 33  | 8/8                                 | 100 | CVS     | R         |
| 062     | 3,42     | 0/10                           | 100 | 0/5                                 | 0   | CVS     | ?         |
| 063     | 3,42     | 0/10                           | 100 | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 064     | 3,47     | 1/9                            | 89  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 065     | 3,47     | 2/10                           | 80  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 066     | 3,48     | 8/10                           | 20  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 067     | 3,48     | 3/10                           | 70  | 10/10                               | 100 | CVS     | Ap.       |
| 068     | 3,50     | 0/10                           | 100 | 0/5                                 | 0   | CVS     | ?         |
| 069     | 3,50     | 2/10                           | 80  | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 070     | 3,50     | 4/10                           | 60  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 071     | 3,50     | 2/10                           | 80  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 072     | 3,50     | 2/12                           | 84  | 5/8                                 | 62  | CVS     | ?         |
| 073     | 3,50     | 0/10                           | 100 | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 074     | 3,50     | 0/10                           | 100 | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 075     | 3,50     | 1/10                           | 90  | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 076     | 3,50     | 4/10                           | 60  | 10/10                               | 100 | M.95/60 | R         |
| 077     | 3,50     | 0/10                           | 100 | 2/5                                 | 40  | M.95/60 | ?         |

**TABELA I - Provas de infecciosidade em camundongos lactentes e de potência em co-  
baías, de vacinas anti-rábica Flury HEP. São Paulo, março de 1960 a  
novembro de 1972. (continuação)**

| VACINAS |         | PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS   |     |                                     |     |         |           |
|---------|---------|--------------------------------|-----|-------------------------------------|-----|---------|-----------|
| Nº      | Título* | Vacinadas<br>M/I ** Proteção % |     | Testemunhas<br>M/I ** Mortalidade % |     | Vírus   | Resultado |
| 078     | 3,54    | 0/10                           | 100 | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 079     | 3,56    | 1/10                           | 90  | 1/5                                 | 20  | CVS     | ?         |
| 080     | 3,56    | 0/10                           | 100 | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 081     | 3,57    | 3/9                            | 66  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 082     | 3,57    | 0/10                           | 100 | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 083     | 3,57    | 0/10                           | 100 | 3/10                                | 30  | M.95/60 | ?         |
| 084     | 3,58    | 0/10                           | 100 | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 085     | 3,60    | 4/10                           | 60  | 9/10                                | 90  | CVS     | R         |
| 086     | 3,61    | 3/10                           | 70  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 087     | 3,62    | 0/10                           | 100 | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 088     | 3,62    | 0/10                           | 100 | 4/10                                | 40  | CVS     | ?         |
| 089     | 3,62    | 1/15                           | 93  | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 090     | 3,66    | 2/10                           | 80  | 9/10                                | 90  | CVS     | Ap.       |
| 091     | 3,66    | 2/12                           | 84  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 092     | 3,66    | 3/10                           | 70  | 2/5                                 | 40  | CVS     | ?         |
| 093     | 3,66    | 4/10                           | 60  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 094     | 3,69    | 5/10                           | 50  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | R         |
| 095     | 3,69    | 2/10                           | 80  | 1/5                                 | 20  | CVS     | ?         |
| 096     | 3,69    | 2/10                           | 80  | 4/10                                | 40  | CVS     | ?         |
| 097     | 3,69    | 1/10                           | 90  | 0/5                                 | 0   | M.95/60 | ?         |
| 098     | 3,70    | 0/10                           | 100 | 9/9                                 | 100 | M.37/60 | Ap.       |
| 099     | 3,70    | 0/10                           | 100 | 1/5                                 | 20  | M.95/60 | ?         |
| 100     | 3,71    | 0/10                           | 100 | 4/10                                | 40  | M.37/60 | ?         |
| 101     | 3,71    | 3/10                           | 70  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 102     | 3,75    | 0/12                           | 100 | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 103     | 3,79    | 1/12                           | 91  | 1/10                                | 10  | CVS     | ?         |
| 104     | 3,79    | 3/11                           | 72  | 1/10                                | 10  | CVS     | ?         |
| 105     | 3,80    | 2/12                           | 83  | 5/10                                | 50  | M.95/60 | ?         |
| 106     | 3,80    | 0/10                           | 100 | 3/10                                | 30  | M.95/60 | ?         |
| 107     | 3,80    | 1/10                           | 90  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 108     | 3,82    | 2/10                           | 80  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 109     | 3,83    | 1/10                           | 90  | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 110     | 3,86    | 0/9                            | 100 | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 111     | 3,87    | 3/12                           | 75  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 112     | 3,87    | 0/10                           | 100 | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 113     | 3,88    | 3/10                           | 70  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 114     | 3,89    | 0/10                           | 100 | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 115     | 3,89    | 1/10                           | 90  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 116     | 3,89    | 1/10                           | 90  | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 117     | 3,89    | 2/10                           | 80  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 118     | 3,90    | 4/9                            | 56  | 10/10                               | 100 | M.37/60 | R         |
| 119     | 4,00    | 3/10                           | 70  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 120     | 4,00    | 0/10                           | 100 | 1/5                                 | 20  | M.95/60 | ?         |
| 121     | 4,00    | 4/10                           | 60  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 122     | 4,00    | 2/10                           | 80  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 123     | 4,00    | 2/10                           | 80  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 124     | 4,00    | 2/10                           | 80  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 125     | 4,00    | 0/10                           | 100 | 1/5                                 | 20  | M.95/60 | ?         |
| 126     | 4,00    | 3/10                           | 70  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 127     | 4,00    | 0/10                           | 100 | 0/5                                 | 0   | M.95/60 | ?         |
|         |         | 0/10                           | 100 | 2/5                                 | 40  | CVS     | ?         |
| 128     | 4,00    | 3/10                           | 70  | 9/10                                | 90  | CVS     | Ap.       |
| 129     | 4,01    | 0/10                           | 100 | 7/9                                 | 77  | M.37/60 | ?         |
| 130     | 4,01    | 0/10                           | 100 | 5/5                                 | 100 | M.37/60 | Ap.       |
| 131     | 4,01    | 0/10                           | 100 | 3/10                                | 30  | M.95/60 | ?         |
| 132     | 4,03    | 0/10                           | 100 | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 133     | 4,10    | 2/11                           | 81  | 9/10                                | 90  | CVS     | Ap.       |
| 134     | 4,11    | 0/15                           | 100 | 0/10                                | 0   | CVS     | ?         |
| 135     | 4,12    | 0/10                           | 100 | 0/5                                 | 0   | CVS     | ?         |
| 136     | 4,14    | 3/14                           | 78  | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 137     | 4,15    | 2/11                           | 81  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 138     | 4,18    | 2/10                           | 80  | 9/10                                | 90  | M.37/60 | Ap.       |
| 139     | 4,19    | 2/10                           | 80  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 140     | 4,19    | 4/10                           | 60  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 141     | 4,19    | 0/10                           | 100 | 2/5                                 | 40  | CVS     | ?         |
| 142     | 4,19    | 0/10                           | 100 | 2/5                                 | 40  | CVS     | ?         |
| 143     | 4,19    | 2/10                           | 80  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 144     | 4,19    | 3/9                            | 66  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 145     | 4,20    | 0/10                           | 100 | 3/10                                | 30  | M.95/60 | ?         |
| 146     | 4,22    | 0/12                           | 100 | 3/7                                 | 42  | CVS     | ?         |
| 147     | 4,24    | 1/8                            | 87  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 148     | 4,24    | 0/10                           | 100 | 1/5                                 | 20  | M.95/60 | ?         |
| 149     | 4,24    | 0/9                            | 100 | 1/5                                 | 20  | M.95/60 | ?         |
| 150     | 4,24    | 3/10                           | 70  | 5/5                                 | 100 | CVS     | Ap.       |
| 151     | 4,24    | 1/10                           | 90  | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 152     | 4,24    | 3/12                           | 75  | 5/5                                 | 100 | CVS     | Ap.       |
| 153     | 4,32    | 0/10                           | 100 | 5/5                                 | 100 | CVS     | ?         |

**TABELA I - Provas de infecciosidade em camundongos lactentes e de potência em cobaias, de vacinas anti-rábica Flury HEP, São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972. (continuação)**

| VACINAS |         | PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS   |     |                                     |     |         |           |
|---------|---------|--------------------------------|-----|-------------------------------------|-----|---------|-----------|
| Nº      | Título* | Vacinadas<br>M/I ** Proteção % |     | Testemunhas<br>M/I ** Mortalidade % |     | Vírus   | Resultado |
| 154     | 4,33    | 3/10                           | 70  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 155     | 4,35    | 1/10                           | 90  | 4/7                                 | 57  | M.95/60 | ?         |
| 156     | 4,37    | 2/10                           | 80  | 6/8                                 | 75  | M.95/60 | ?         |
| 157     | 4,37    | 0/10                           | 100 | 0/5                                 | 0   | M.95/60 | ?         |
| 158     | 4,39    | 1/10                           | 90  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 159     | 4,40    | 0/10                           | 100 | 0/5                                 | 0   | M.95/60 | ?         |
| 160     | 4,41    | 0/11                           | 100 | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 161     | 4,42    | 3/10                           | 70  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 162     | 4,42    | 0/10                           | 100 | 0/5                                 | 0   | M.95/60 | ?         |
|         |         | 0/10                           | 100 | 2/5                                 | 40  | CVS     | ?         |
| 163     | 4,42    | 5/10                           | 50  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 164     | 4,42    | 0/10                           | 100 | 5/5                                 | 100 | CVS     | Ap.       |
| 165     | 4,43    | 1/9                            | 88  | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 166     | 4,43    | 0/9                            | 100 | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 167     | 4,47    | 2/15                           | 86  | 8/10                                | 80  | CVS     | Ap.       |
| 168     | 4,47    | 1/15                           | 94  | 5/5                                 | 100 | CVS     | Ap.       |
| 169     | 4,49    | 3/15                           | 80  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 170     | 4,49    | 0/8                            | 100 | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 171     | 4,50    | 0/12                           | 100 | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 172     | 4,50    | 1/14                           | 92  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 173     | 4,50    | 0/10                           | 100 | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 174     | 4,50    | 0/9                            | 100 | 1/5                                 | 20  | M.95/60 | ?         |
| 175     | 4,50    | 4/10                           | 60  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | R         |
| 176     | 4,50    | 0/10                           | 100 | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 177     | 4,50    | 2/10                           | 80  | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 178     | 4,50    | 1/10                           | 90  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 179     | 4,50    | 4/10                           | 60  | 10/10                               | 100 | CVS     | R         |
| 180     | 4,50    | 1/10                           | 90  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 181     | 4,50    | 0/10                           | 100 | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 182     | 4,50    | 1/12                           | 96  | 4/5                                 | 80  | CVS     | Ap.       |
| 183     | 4,50    | 2/10                           | 80  | 3/5                                 | 60  | CVS     | ?         |
| 184     | 4,50    | 1/10                           | 90  | 1/5                                 | 20  | CVS     | ?         |
| 185     | 4,50    | 0/10                           | 100 | 3/5                                 | 60  | M.95/60 | ?         |
| 186     | 4,50    | 3/10                           | 70  | 5/5                                 | 100 | CVS     | Ap.       |
| 187     | 4,50    | 5/10                           | 50  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R.        |
| 188     | 4,50    | 0/13                           | 100 | 3/7                                 | 42  | CVS     | ?         |
| 189     | 4,51    | 0/10                           | 100 | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 190     | 4,59    | 3/9                            | 67  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 191     | 4,66    | 0/8                            | 100 | 0/5                                 | 0   | M.95/60 | ?         |
|         |         | 0/8                            | 100 | 2/5                                 | 40  | CVS     | ?         |
| 192     | 4,66    | 4/11                           | 63  | 5/5                                 | 100 | CVS     | R         |
| 193     | 4,68    | 0/8                            | 100 | 5/5                                 | 100 | M.95/60 | Ap.       |
| 194     | 4,83    | 0/10                           | 100 | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 195     | 4,85    | 1/10                           | 90  | 5/10                                | 50  | M.95/60 | ?         |
| 196     | 5,00    | 0/10                           | 100 | 4/7                                 | 57  | M.95/60 | ?         |
| 197     | 5,09    | 1/10                           | 90  | 4/5                                 | 80  | M.95/60 | Ap.       |
| 198     | 5,10    | 0/10                           | 100 | 0/5                                 | 0   | CVS     | ?         |

\* Expresso em log, base 10, da  $DL_{50}/0,01$  ml, intracerebral, camundongos lactentes, calculado pelo método de Reed & Muench.

\*\* M/I : Número de cobaias mortas/número de cobaias inoculadas.

R : Reprovada

Ap. : Aprovada

? : Resultado indefinido, porque não atendido o critério mínimo de 80% de morte das cobaias não vacinadas.

CVS : "challenge virus standard" - amostra de vírus fixo.

M.95/60 : Amostra de vírus isolada de bovino.

M.37/60 : Amostra de vírus isolada de cão.

**TABELA II - Vacinas anti-rábica Flury HEP: Títulos infectantes em camundongos lactentes e provas de potência em cobaias, cuja mortalidade no grupo testemunha situou-se entre 80-100%. São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972.**

| VACINAS |          | PROVA DE POTÊNCIA EM COBAIAS |                                 |           |
|---------|----------|------------------------------|---------------------------------|-----------|
| Nº      | Título * | Vacinadas<br>% de proteção   | Testemunhas<br>% de mortalidade | Resultado |
| 001     | 1,39     | 40                           | 80                              | R         |
| 003     | 2,00     | 30                           | 80                              | R         |
| 006     | 2,00     | 20                           | 80                              | R         |
| 008     | 2,12     | 10                           | 80                              | R         |
| 017     | 2,58     | 0                            | 90                              | R         |
| 024     | 2,86     | 40                           | 90                              | R         |
| 026     | 2,87     | 25                           | 90                              | R         |
| 028     | 3,00     | 22                           | 80                              | R         |
| 032     | 3,01     | 60                           | 80                              | R         |
| 034     | 3,10     | 25                           | 90                              | R         |
| 037     | 3,17     | 23                           | 80                              | R         |
| 039     | 3,18     | 28                           | 90                              | R         |
| 044     | 3,24     | 40                           | 90                              | R         |
| 057     | 3,37     | 60                           | 80                              | R         |
| 058     | 3,38     | 44                           | 80                              | R         |
| 059     | 3,39     | 34                           | 90                              | R         |
| 063     | 3,42     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 069     | 3,50     | 80                           | 80                              | Ap.       |
| 074     | 3,50     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 075     | 3,50     | 90                           | 80                              | Ap.       |
| 080     | 3,56     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 085     | 3,60     | 60                           | 90                              | R         |
| 089     | 3,62     | 93                           | 80                              | Ap.       |
| 090     | 3,66     | 80                           | 90                              | Ap.       |
| 101     | 3,71     | 70                           | 80                              | Ap.       |
| 108     | 3,82     | 80                           | 80                              | Ap.       |
| 110     | 3,86     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 113     | 3,88     | 70                           | 80                              | Ap.       |
| 117     | 3,89     | 80                           | 80                              | Ap.       |
| 121     | 4,00     | 60                           | 80                              | R         |
| 128     | 4,00     | 70                           | 90                              | Ap.       |
| 132     | 4,03     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 133     | 4,10     | 81                           | 90                              | Ap.       |
| 136     | 4,14     | 78                           | 80                              | Ap.       |
| 138     | 4,18     | 80                           | 90                              | Ap.       |
| 139     | 4,19     | 80                           | 80                              | Ap.       |
| 151     | 4,24     | 90                           | 80                              | Ap.       |
| 158     | 4,39     | 90                           | 80                              | Ap.       |
| 160     | 4,41     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 165     | 4,43     | 88                           | 80                              | Ap.       |
| 167     | 4,47     | 86                           | 80                              | Ap.       |
| 169     | 4,49     | 80                           | 80                              | Ap.       |
| 171     | 4,50     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 175     | 4,50     | 60                           | 80                              | R         |
| 178     | 4,50     | 90                           | 80                              | Ap.       |
| 181     | 4,50     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 182     | 4,50     | 96                           | 80                              | Ap.       |
| 189     | 4,51     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 194     | 4,83     | 100                          | 80                              | Ap.       |
| 197     | 5,09     | 90                           | 80                              | Ap.       |

\* Expresso em log, base 10, da  $DL_{50}/0,01$  ml, intracerebral, camundongos lactentes, calculado pelo método de Reed & Muench.

Ap.: Aprovada

R.: Reprovada

**TABELA III - Títulos infectantes obtidos pela inoculação intracerebral em camundongos lactentes, de 2 vacinas anti-rábica Flury HEP, aleatoriamente escolhidas. São Paulo, 1973.**

|                                                                                                                                        | V A C I N A                                  |                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|
|                                                                                                                                        | A                                            | B                                      |
| Títulos infectantes em camundongos lactentes, expressos em log, base 10, da $DL_{50}/0,01$ ml, calculados pelo método de Reed & Muench | 2,63<br>3,00<br>3,19<br>2,62<br>3,00<br>2,71 | 3,33<br>2,89<br>3,19<br>3,13<br>-<br>- |
| Média aritmética                                                                                                                       | 2,858                                        | 3,135                                  |
| Desvio padrão                                                                                                                          | 0,237                                        | 0,18                                   |
| Coefficiente de variabilidade de Pearson (%)                                                                                           | 8,3                                          | 5,9                                    |
| Erro padrão da média                                                                                                                   | 0,097                                        | 0,09                                   |

**TABELA IV - Títulos infectantes em camundongos lactentes, de diferentes vacinas anti-rábica Flury HEP, segundo dois tratamentos: I- morte dos camundongos e II - Imunofluorescência dos cérebros de camundongos sacrificados. São Paulo, 1973.**

| V A C I N A      | T R A T A M E N T O |      |
|------------------|---------------------|------|
|                  | I                   | II   |
| A 1              | 3,9*                | 3,7* |
| A 2              | 3,6                 | 3,7  |
| A 3              | 3,6                 | 3,7  |
| A 4              | 3,5                 | 3,5  |
| A 5              | 3,5                 | 3,7  |
| A 6              | 3,5                 | 3,5  |
| A 7              | 3,5                 | 3,2  |
| A 8              | 3,4                 | 3,6  |
| A 9              | 3,4                 | 3,5  |
| A 10             | 3,4                 | 3,4  |
| A 11             | 3,4                 | 3,7  |
| A 12             | 3,3                 | 3,3  |
| A 13             | 3,1                 | 3,2  |
| A 14             | 3,0                 | 3,2  |
| A 15             | 3,0                 | 3,0  |
| A 16             | 2,8                 | 3,0  |
| A 17             | 2,8                 | 3,3  |
| A 18             | 2,7                 | 2,8  |
| A 19             | 2,7                 | 3,0  |
| A 20             | 2,6                 | 2,6  |
| A 21             | 2,5                 | 2,4  |
| A 22             | 2,5                 | 2,6  |
| A 23             | 2,3                 | 2,6  |
| A 24             | 2,2                 | 2,5  |
| A 25             | 2,0                 | 2,5  |
| Média aritmética | 3,05                | 3,17 |

\* Títulos infectantes, expressos em log, base 10, da  $DL_{50}/0,01$  ml, inoculação intracerebral em camundongos lactentes, calculados pelo método de Reed & Muench.

**TABELA V** - Títulos infectantes em camundongos lactentes, da mesma vacina anti-rábica Flury HEP em seis réplicas, segundo dois diferentes tratamentos: I - morte dos camundongos e II - imunofluorescência dos cérebros de camundongos sacrificados. São Paulo, 1974.

| R É P L I C A<br>Nº                          | T R A T A M E N T O |       |
|----------------------------------------------|---------------------|-------|
|                                              | I                   | II    |
| 1                                            | 4,66*               | 4,24* |
| 2                                            | 3,66                | 4,10  |
| 3                                            | 3,66                | 4,10  |
| 4                                            | 4,66                | 4,51  |
| 5                                            | 4,66                | 4,24  |
| 6                                            | 4,00                | 4,26  |
| Média aritmética                             | 4,21                | 4,24  |
| Desvio padrão                                | 0,50                | 0,149 |
| Coefficiente de variabilidade de Pearson (%) | 11,9                | 3,5   |
| Erro padrão da média                         | 0,223               | 0,067 |

\* Expresso em log, base 10, da  $DL_{50}/0,01$  ml, inoculação intracerebral em camundongos lactentes e calculado pelo método de Reed & Muench.

**TABELA VI** - Vacinas anti-rábica Flury HEP: condição de aprovação na prova de potência em cobaias, segundo os títulos infectantes em camundongos lactentes (frequências absolutas e acumuladas). São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972.

| T Í T U L O * | Frequências absolutas |            | Frequências acumuladas |            |
|---------------|-----------------------|------------|------------------------|------------|
|               | Aprovadas             | Reprovadas | Aprovadas              | Reprovadas |
| 1,30 — 1,60   | 0                     | 1          | 0                      | 19         |
| 1,60 — 1,90   | 0                     | 0          | 0                      | 18         |
| 1,90 — 2,20   | 0                     | 3          | 0                      | 18         |
| 2,20 — 2,50   | 0                     | 0          | 0                      | 15         |
| 2,50 — 2,80   | 0                     | 1          | 0                      | 15         |
| 2,80 — 3,10   | 0                     | 4          | 0                      | 14         |
| 3,10 — 3,40   | 0                     | 7          | 0                      | 10         |
| 3,40 — 3,70   | 7                     | 1          | 7                      | 3          |
| 3,70 — 4,00   | 5                     | 0          | 12                     | 2          |
| 4,00 — 4,30   | 7                     | 1          | 19                     | 2          |
| 4,30 — 4,60   | 10                    | 1          | 29                     | 1          |
| 4,60 — 4,90   | 1                     | 0          | 30                     | 0          |
| 4,90 — 5,20   | 1                     | 0          | 31                     | 0          |

\* Expresso em log, base 10, da  $DL_{50}/0,01$  ml, inoculação intracerebral em camundongos lactentes e calculado pelo método de Reed & Muench.

Obs.: Esta tabela foi construída com dados da tabela II.

TABELA VII - Vacinas anti-rábica Flury HEP, relacionadas na tabela I, segundo o título infectante em camundongos lactentes e a condição de aprovação na prova de potência em cobaias.

| Condição \ Título * | $\geq 3,5$ | $< 3,5$ | Total |
|---------------------|------------|---------|-------|
| Aprovadas           | 55         | 3       | 58    |
| Reprovadas          | 16         | 36      | 52    |
| Total               | 71         | 39      | 110   |

\* Expresso em log, base 10,  $DL_{50}/0,01$  ml, e resultante da inoculação intracerebral de camundongos lactentes, sendo o cálculo efetuado pelo método de Reed & Muench.

$$\chi^2 \text{ (qui-quadrado)} = 46,40$$

TABELA VIII - Vacinas anti-rábica Flury HEP, relacionadas na tabela II, segundo o título infectante em camundongos lactentes e a condição no teste de potência em cobaias.

| Condição \ Título * | $\geq 3,5$ | $< 3,5$ | Total |
|---------------------|------------|---------|-------|
| Aprovadas           | 30         | 1       | 31    |
| Reprovadas          | 3          | 16      | 19    |
| Total               | 33         | 17      | 50    |

\* Expresso em log, base 10,  $DL_{50}/0,01$  ml, e resultante da inoculação intracerebral de camundongos lactentes, sendo o cálculo efetuado pelo método de Reed & Muench.

$$\chi^2 \text{ (qui-quadrado)} = 30,91$$

TABELA IX - Vacinas anti-rábica Flury HEP, segundo o título infectante em camundongos lactentes e a condição de aprovação no teste de potência em cobaias, determinada pela diferença de 50% entre as mortalidades dos grupos controle e vacinado.

| Condição \ Título * | $\geq 3,5$ | $< 3,5$ | Total |
|---------------------|------------|---------|-------|
| Aprovadas           | 69         | 5       | 74    |
| Reprovadas          | 2          | 34      | 36    |
| Total               | 71         | 39      | 110   |

\* Expresso em log, base 10,  $DL_{50}/0,01$  ml, resultante da inoculação intracerebral de camundongos lactentes e calculado pelo método de Reed & Muench.

$$\chi^2 \text{ (qui-quadrado)} = 77,58$$

Obs.: Esta tabela foi elaborada com os dados da tabela I.

TABELA X - Vacinas anti-rábica Flury HEP: provas de infecciosidade em camundongos lactentes e de potência em cobaias e em camundongos adultos (K O P R O W S K I & BLACK, 1954 a). São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972.

| VACINA |         | PROVAS DE POTÊNCIA      |                        |                           |                           |           |
|--------|---------|-------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| Nº     | Título* | COBAIAS                 |                        | CAMUNDONGOS               |                           |           |
|        |         | Vacinadas<br>Proteção % | Testemunhas<br>Morte % | Vírus (DL <sub>50</sub> ) | Log (DP <sub>50</sub> **) | Resultado |
| 006    | 2,00    | 20                      | 80                     | 19 960                    | 1,2                       | R         |
| 007    | 2,00    | 0                       | 100                    | 316                       | 1,0                       | R         |
| 009    | 2,13    | 80                      | 0                      | 1                         | 2,0                       | R         |
| 010    | 2,23    | 31                      | 50                     | 199                       | 1,1                       | R         |
| 011    | 2,36    | 22                      | 50                     | 100                       | 1,0                       | R         |
| 012    | 2,39    | 50                      | 71                     | 1 585                     | 2,0                       | R         |
| 015    | 2,50    | 66                      | 71                     | 1 585                     | 1,5                       | R         |
| 016    | 2,57    | 55                      | 71                     | 1 585                     | 1,6                       | R         |
| 017    | 2,58    | 0                       | 90                     | 100                       | 1,0                       | R         |
| 018    | 2,58    | 77                      | 50                     | 1 000                     | 2,3                       | R         |
| 021    | 2,68    | 0                       | 100                    | 100                       | 1,3                       | R         |
| 022    | 2,74    | 50                      | 66                     | 3 982                     | 1,2                       | R         |
| 023    | 2,74    | 60                      | 50                     | 100                       | 1,0                       | R         |
| 025    | 2,86    | 40                      | 66                     | 3 982                     | 2,3                       | R         |
| 033    | 3,10    | 30                      | 100                    | 316                       | 1,3                       | R         |
| 034    | 3,10    | 25                      | 90                     | 316                       | 1,9                       | R         |
| 036    | 3,17    | 10                      | 50                     | 100                       | 1,5                       | R         |
| 039    | 3,18    | 28                      | 90                     | 316                       | 1,3                       | R         |
| 041    | 3,24    | 33                      | 100                    | 39                        | 1,4                       | R         |
| 042    | 3,24    | 93                      | 40                     | 63                        | 1,2                       | R         |
| 043    | 3,24    | 50                      | 71                     | 1 585                     | 1,8                       | R         |
| 044    | 3,24    | 40                      | 90                     | 39                        | 1,2                       | R         |
| 045    | 3,26    | 0                       | 100                    | 63                        | 2,4                       | R         |
| 047    | 3,28    | 62                      | 100                    | 19                        | 3,0                       | Ap.       |
| 052    | 3,31    | 35                      | 100                    | 63                        | 2,2                       | R         |
| 053    | 3,33    | 40                      | 66                     | 3 982                     | 1,3                       | R         |
| 054    | 3,33    | 44                      | 71                     | 1 585                     | 1,0                       | R         |
| 055    | 3,33    | 9                       | 100                    | 1 000                     | 1,0                       | R         |
| 056    | 3,35    | 0                       | 100                    | 63                        | 2,2                       | R         |
| 059    | 3,39    | 34                      | 90                     | 8                         | 2,6                       | R         |
| 061    | 3,42    | 33                      | 100                    | 100                       | 2,2                       | R         |
| 062    | 3,42    | 100                     | 0                      | 15                        | 1,8                       | R         |
| 070    | 3,50    | 60                      | 100                    | 1 000                     | 2,6                       | R         |
| 071    | 3,50    | 80                      | 60                     | 83                        | 3,5                       | Ap.       |
| 072    | 3,50    | 84                      | 62                     | 419                       | 2,4                       | R         |
| 073    | 3,50    | 100                     | 60                     | 10                        | 3,0                       | Ap.       |
| 081    | 3,57    | 66                      | 100                    | 39                        | 3,2                       | Ap.       |
| 085    | 3,60    | 60                      | 90                     | 316                       | 2,4                       | R         |
| 086    | 3,61    | 70                      | 60                     | 125                       | 2,4                       | R         |
| 087    | 3,62    | 100                     | 60                     | 10                        | 2,9                       | R         |
| 088    | 3,62    | 100                     | 40                     | 63                        | 2,8                       | R         |
| 089    | 3,62    | 93                      | 80                     | 398                       | 2,6                       | R         |
| 090    | 3,66    | 80                      | 90                     | 31                        | 2,8                       | R         |
| 091    | 3,66    | 84                      | 60                     | 79                        | 3,5                       | Ap.       |
| 096    | 3,69    | 80                      | 40                     | 63                        | 2,5                       | R         |
| 103    | 3,79    | 91                      | 10                     | 125                       | 2,0                       | R         |
| 104    | 3,79    | 72                      | 10                     | 125                       | 2,8                       | R         |
| 109    | 3,83    | 90                      | 60                     | 3 163                     | 2,5                       | R         |
| 111    | 3,87    | 75                      | 60                     | 631                       | 2,3                       | R         |
| 114    | 3,89    | 100                     | 60                     | 10                        | 3,0                       | Ap.       |
| 115    | 3,89    | 90                      | 100                    | 316                       | 2,9                       | R         |
| 116    | 3,89    | 90                      | 60                     | 3 163                     | 2,6                       | R         |
| 123    | 4,00    | 80                      | 100                    | 31 630                    | 1,8                       | R         |
| 124    | 4,00    | 80                      | 100                    | 31 630                    | 2,3                       | R         |
| 126    | 4,00    | 70                      | 100                    | 316                       | 3,5                       | Ap.       |
| 127    | 4,00    | 100                     | 0                      | 100                       | 3,4                       | Ap.       |
| 128    | 4,00    | 70                      | 90                     | 63                        | 3,0                       | Ap.       |
| 132    | 4,03    | 100                     | 80                     | 31                        | 4,0                       | Ap.       |
| 133    | 4,10    | 81                      | 90                     | 31                        | 2,8                       | R         |
| 134    | 4,11    | 100                     | 0                      | 63                        | 3,3                       | Ap.       |
| 135    | 4,12    | 100                     | 0                      | 1                         | 3,8                       | Ap.       |
| 144    | 4,19    | 66                      | 100                    | 199                       | 2,8                       | R         |
| 146    | 4,22    | 100                     | 42                     | 31                        | 3,0                       | Ap.       |
| 149    | 4,24    | 100                     | 20                     | 10                        | 3,0                       | Ap.       |
| 150    | 4,24    | 70                      | 100                    | 316                       | 3,3                       | Ap.       |
| 151    | 4,24    | 90                      | 80                     | 31                        | 4,0                       | Ap.       |
| 152    | 4,24    | 75                      | 100                    | 398                       | 3,2                       | Ap.       |
| 157    | 4,37    | 100                     | 0                      | 125                       | 3,2                       | Ap.       |
| 159    | 4,40    | 100                     | 0                      | 15 820                    | 3,2                       | Ap.       |
| 160    | 4,41    | 80                      | 80                     | 50                        | 3,1                       | Ap.       |
| 161    | 4,42    | 70                      | 100                    | 316                       | 3,5                       | Ap.       |
| 162    | 4,42    | 100                     | 0                      | 100                       | 2,8                       | R         |
| 163    | 4,42    | 50                      | 100                    | 316                       | 2,8                       | R         |
| 164    | 4,42    | 100                     | 100                    | 100                       | 3,0                       | Ap.       |
| 165    | 4,43    | 88                      | 80                     | 31                        | 3,8                       | Ap.       |
| 166    | 4,43    | 100                     | 60                     | 10                        | 3,4                       | Ap.       |
| 167    | 4,47    | 86                      | 80                     | 316                       | 2,6                       | R         |
| 168    | 4,47    | 94                      | 100                    | 12                        | 3,3                       | Ap.       |
| 169    | 4,49    | 80                      | 80                     | 251                       | 3,0                       | Ap.       |

TABELA X - Vacinas anti-rábica Flury HEP: provas de infecciosidade em camundongos lactentes e de potência em cobaias e em camundongos adultos (K O P R O W S K I & BLACK, 1954 a). São Paulo, março de 1960 a novembro de 1972. (cont.)

| VACINA |         | PROVAS DE POTÊNCIA      |                        |                           |                           |           |
|--------|---------|-------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| Nº     | Título* | COBAIAS                 |                        | CAMUNDONGOS               |                           |           |
|        |         | Vacinadas<br>Proteção % | Testemunhas<br>Morte % | Vírus (DL <sub>50</sub> ) | Log (DP <sub>50</sub> **) | Resultado |
| 181    | 4,50    | 100                     | 80                     | 31                        | 3,3                       | Ap.       |
| 182    | 4,50    | 96                      | 80                     | 31                        | 3,3                       | Ap.       |
| 183    | 4,50    | 80                      | 60                     | 83                        | 4,0                       | Ap.       |
| 184    | 4,50    | 90                      | 20                     | 25                        | 3,0                       | Ap.       |
| 185    | 4,50    | 100                     | 60                     | 3 163                     | 2,4                       | R         |
| 186    | 4,50    | 70                      | 100                    | 1 585                     | 3,0                       | Ap.       |
| 187    | 4,50    | 50                      | 100                    | 1 585                     | 3,0                       | Ap.       |
| 191    | 4,66    | 100                     | 0                      | 100                       | 3,3                       | Ap.       |
| 192    | 4,66    | 63                      | 100                    | 39                        | 3,6                       | Ap.       |
| 195    | 4,85    | 90                      | 50                     | 10                        | 4,0                       | Ap.       |
| 198    | 5,10    | 100                     | 0                      | 125                       | 2,7                       | R         |

\* Expresso em log, base 10, DL<sub>50</sub>/0,01 ml, resultante da inoculação intracerebral em camundongos lactentes e calculado pelo método de Reed & Muench.

\*\* DP<sub>50</sub> = Dose de proteção 50% dos camundongos vacinados, via intracerebral; está representada pelo log<sub>10</sub> DL<sub>50</sub>/0,03 ml. Todos os títulos calculados pelo método de Reed & Muench.

R = Reprovadas

Ap. = Aprovadas

Nota: o requisito para aprovação é que a DP<sub>50</sub> seja igual ou maior do que 3,0, isto é, a vacina diluída a 10<sup>-3</sup> deve proteger 50% dos camundongos.

TABELA XI - Vacinas anti-rábica Flury HEP, relacionadas na tabela X, segundo o título infectante em camundongos lactentes e a condição de aprovação no teste de potência em camundongos adultos (KOPROWSKI & BLACK, 1954 a).

| Título *   | $\geq 3,5$ | $< 3,5$ | Total |
|------------|------------|---------|-------|
| Condição   |            |         |       |
| Aprovadas  | 34         | 1       | 35    |
| Reprovadas | 24         | 31      | 55    |
| Total      | 58         | 32      | 90    |

\* Representado pelo log, base 10,  $DL_{50}/0,01$  ml, resultante da inoculação intracerebral em camundongos lactentes e calculado pelo método de Reed & Muench.

$\chi^2$  (qui-quadrado) = 24,38

TABELA XII - Títulos de proteção em camundongos adultos, expressos em  $log_{10}$ , de uma vacina anti-rábica Flury HEP, em seis réplicas, segundo quatro diferentes doses de vírus rábico, amostra CVS, inoculadas pela via intracerebral. São Paulo, 1973.

| R É P L I C A<br>Nº                          | D L <sub>50</sub> D O V Í R U S C V S |       |      |       |
|----------------------------------------------|---------------------------------------|-------|------|-------|
|                                              | 4                                     | 18    | 93   | 465   |
| 1                                            | 5,00                                  | 4,67  | 3,51 | 2,68  |
| 2                                            | 5,00                                  | 4,19  | 3,21 | 2,36  |
| 3                                            | 4,41                                  | 4,10  | 3,65 | 2,57  |
| 4                                            | 5,00                                  | 4,38  | 2,80 | 2,61  |
| 5                                            | 4,71                                  | 4,32  | 2,70 | 2,61  |
| 6                                            | 5,00                                  | 3,91  | 3,00 | 2,86  |
| Média aritmética                             | 4,85                                  | 4,26  | 3,15 | 2,62  |
| Desvio padrão                                | 0,22                                  | 0,237 | 0,35 | 0,147 |
| Coefficiente de variabilidade de Pearson (%) | 4,5                                   | 5,6   | 11,1 | 5,6   |
| Erro padrão da média                         | 0,09                                  | 0,09  | 0,14 | 0,06  |

Os títulos referem-se à  $DP_{50}$  de proteção/0,03 ml.

TABELA XIII - Índices de proteção, em 5 réplicas, de 5 diferentes vacinas anti-rábica Flury HEP, em relação às provas de infecciosidade em camundongos lactentes e de potência em cobaias e camundongos. São Paulo, 1974.

| Vacina<br>R é p l i c a                                                       |                               | B 1           | B 2           | B 3        | B 4        | B 5        |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------|---------------|------------|------------|------------|
| 1                                                                             |                               | 4,40 (25.120) | 4,19 (15.490) | 2,75 (562) | 2,94 (871) | 1,90 (79)  |
| 2                                                                             |                               | 4,47 (29.520) | 4,16 (14.460) | 2,79 (616) | 2,36 (229) | 1,96 (91)  |
| 3                                                                             |                               | 4,36 (22.910) | 4,06 (11.490) | 2,30 (199) | 2,29 (195) | 2,08 (120) |
| 4                                                                             |                               | 4,36 (22.910) | 3,89 ( 7.763) | 2,68 (478) | 2,18 (151) | 1,87 (74)  |
| 5                                                                             |                               | 4,36 (22.910) | 3,50 ( 3.163) | 2,52 (331) | 2,13 (134) | 1,65 (44)  |
| Média aritmética                                                              |                               | 4,39 (24.550) | 3,96 ( 9.121) | 2,61 (407) | 2,38 (239) | 1,89 (77)  |
| Desvio padrão                                                                 |                               | 0,048         | 0,283         | 0,2        | 0,326      | 0,157      |
| Coeficiente de variabilidade (%)                                              |                               | 1,09          | 7,13          | 7,7        | 13,7       | 8,33       |
| Erro padrão da média                                                          |                               | 0,024         | 0,141         | 0,1        | 0,163      | 0,079      |
| Prova de infecciosidade-Título (*)                                            |                               | 4,22          | 3,89          | 3,19       | 2,58       | 3,33       |
| Prova de potência em cobaias M/I (**)                                         | Vacinadas                     | 3/10          | 4/10          | 9/12       | 9/10       | 8/10       |
|                                                                               | Controles                     | 9/10          | 9/10          | 8/10       | 8/10       | 8/10       |
| Prova de potência em camundongos (KOPROWSKI & BLACK) Título de proteção (***) | Vírus CVS (DL <sub>50</sub> ) | 100           | 100           | 22         | 4          | 1.423      |
|                                                                               |                               | 3,2           | 2,8           | 2,2        | 2,1        | 1,0        |

(\*) Título infectante em camundongos lactentes, expresso em log, base 10, DL<sub>50</sub>/0,01 ml, IC.

(\*\*) M/I = número de cobaias mortas/nº de cobaias inoculadas.

(\*\*\*) Representado pelo log<sub>10</sub> DL<sub>50</sub>/0,03 ml = diluição da vacina que protegeu 50% dos camundongos vacinados.

Obs.: Os índices de proteção correspondem à diferença dos títulos infectantes entre camundongos testemunhos e vacinados, expressos em log<sub>10</sub> DL<sub>50</sub>/0,03 ml, IC.

**TABELA XIV - Vacinas anti-rábica Flury HEP: provas de infecciosidade em camundongos lactentes e de potência em cobaias e camundongos (testes Koprowski & Black e "Nylar"). São Paulo, abril de 1969 a novembro de 1972.**

| VACINA |               | PROVAS DE POTÊNCIA |           |                              |                           |                     |                       |                                |
|--------|---------------|--------------------|-----------|------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Nº     | Título<br>(+) | COBAIAS            |           | CAMUNDONGOS                  |                           |                     |                       | Título de proteção<br>50% (§§) |
|        |               | Vacinadas          | Controles | Teste Koprowski & Black      |                           | Teste "Nylar"       |                       |                                |
|        |               | M/I (++)           | M/I (++)  | Vírus<br>(DL <sub>50</sub> ) | DP <sub>50</sub><br>(+++) | Título vírus<br>(§) | Controles<br>M/I (++) |                                |
| 164    | 4,42          | 0/10               | 5/5       | 12                           | 3,0                       | 5,1                 | 10/10                 | 1 : 125                        |
| 089    | 3,62          | 1/15               | 4/5       | 398                          | 2,6                       | 5,4                 | 10/10                 | 1 : 97                         |
| 007    | 2,00          | 14/14              | 10/10     | 316                          | 1,0                       | 6,5                 | 10/10                 | 1 : 1                          |
| 146    | 4,22          | 0/12               | 3/7       | 31                           | 3,0                       | 6,5                 | 9/10                  | 1 : 125                        |
| 167    | 4,47          | 2/15               | 8/10      | 316                          | 2,6                       | 5,5                 | 9/10                  | 1 : 104                        |
| 199    | -             | 0/10               | 0/5       | 199                          | 3,3                       | 5,3                 | 9/10                  | 1 : 22                         |
| 045    | 3,26          | 7/7                | 11/11     | 63                           | 2,4                       | 5,8                 | 9/10                  | 1 : 15                         |
| 061    | 3,42          | 10/15              | 8/8       | 100                          | 2,2                       | 7,0                 | 9/10                  | 1 : 15                         |
| 056    | 3,35          | 10/10              | 11/11     | 63                           | 2,2                       | 5,8                 | 9/10                  | 1 : 13                         |
| 052    | 3,31          | 8/12               | 11/11     | 63                           | 2,2                       | 5,8                 | 9/10                  | 1 : 10                         |
| 010    | 2,23          | 9/13               | 5/10      | 199                          | 1,1                       | 5,3                 | 9/10                  | 1 : 10                         |
| 054    | 3,33          | 5/9                | 5/7       | 1 585                        | 1,0                       | 6,2                 | 9/10                  | 1 : 2                          |
| 008    | 2,12          | 9/10               | 4/5       | -                            | -                         | 6,0                 | 9/10                  | 1 : 1                          |
| 200    | 2,50          | 9/10               | 4/5       | -                            | -                         | 6,0                 | 9/10                  | 1 : 1                          |
| 201    | 2,50          | 6/10               | 9/10      | 100                          | 1,0                       | 6,0                 | 9/10                  | 1 : 1                          |
| 039    | 3,18          | 5/7                | 9/10      | 316                          | 1,6                       | 6,0                 | 9/10                  | 1 : 1                          |
| 202    | 3,50          | 7/10               | 5/10      | 199                          | 2,2                       | 6,3                 | 7/10                  | 1 : 90                         |
| 203    | 2,00          | 7/10               | 5/10      | 199                          | 1,3                       | 6,3                 | 7/10                  | 1 : 3                          |
| 055    | 3,33          | 10/11              | 10/10     | 1 000                        | 1,0                       | 7,0                 | 6/10                  | 1 : 125                        |
| 044    | 3,24          | 9/15               | 9/10      | 39                           | 1,2                       | 5,6                 | 6/10                  | 1 : 53                         |
| 204    | 3,60          | 4/15               | 3/6       | -                            | -                         | 5,5                 | 6/10                  | 1 : 46                         |
| 205    | 2,12          | 6/15               | 3/6       | -                            | -                         | 5,5                 | 6/10                  | 1 : 7                          |
| 206    | 2,59          | 5/10               | 8/10      | 2,5                          | 2,7                       | 6,2                 | 5/10                  | 1 : 92                         |
| 207    | 2,50          | 6/10               | 8/10      | 2,5                          | 1,9                       | 6,2                 | 5/10                  | 1 : 71                         |
| 208    | 2,00          | 9/9                | 8/8       | 316                          | 1,0                       | 7,0                 | 5/10                  | 1 : 12                         |
| 061    | 3,42          | 15/15              | 8/8       | 316                          | 1,3                       | 7,0                 | 5/10                  | 1 : 8                          |
| 021    | 2,68          | 10/15              | 8/8       | 316                          | 1,3                       | 7,0                 | 5/10                  | 1 : 4                          |
| 209    | 3,48          | 5/10               | 3/5       | 10                           | 2,6                       | 5,6                 | 5/12                  | 1 : 125                        |
| 210    | 3,60          | 2/15               | 4/10      | -                            | -                         | 4,0                 | 4/10                  | 1 : 67                         |
| 211    | 2,16          | 2/10               | 4/10      | -                            | -                         | 4,0                 | 4/10                  | 1 : 40                         |
| 011    | 2,36          | 7/9                | 3/6       | 100                          | 1,0                       | 6,4                 | 3/10                  | 1 : 125                        |
| 085    | 3,60          | 4/10               | 9/10      | 316                          | 2,4                       | 6,4                 | 3/10                  | 1 : 125                        |
| 036    | 3,17          | 9/10               | 3/6       | 100                          | 1,5                       | 6,4                 | 3/10                  | 1 : 125                        |
| 212    | 2,00          | 2/15               | 1/10      | 125                          | 1,0                       | 5,1                 | 2/10                  | 1 : 125                        |
| 213    | -             | 3/11               | 1/10      | 125                          | 1,8                       | 5,1                 | 2/10                  | 1 : 125                        |
| 103    | 3,79          | 1/12               | 1/10      | 125                          | 2,0                       | 5,1                 | 2/10                  | 1 : 109                        |
| 214    | 2,16          | 0/9                | 2/10      | -                            | -                         | 4,0                 | 1/10                  | 1 : 125                        |
| 215    | 3,60          | 3/10               | 2/10      | -                            | -                         | 4,0                 | 1/10                  | 1 : 125                        |
| 216    | -             | -                  | -         | 12                           | 2,0                       | 4,1                 | 0/10                  | 1 : 125                        |

(+) Log<sub>10</sub> DL<sub>50</sub>/0,01 ml, inoculação intracerebral camundongos lactentes.

(++) M/I = Número de animais mortos/número de animais inoculados.

(+++) DP<sub>50</sub> = Diluição da vacina que protegeu 50% dos camundongos vacinados.

(§) Log<sub>10</sub> DL<sub>50</sub>/0,03 ml, inoculação intracerebral em camundongos adultos do vírus CVS.

(§§) Diluição da vacina que protegeu 50% dos camundongos inoculados com vírus CVS, via intramuscular.

# GRÁFICO I

Reta de regressão calculada com base nos dados da Tabela II.  
São Paulo, 1974.

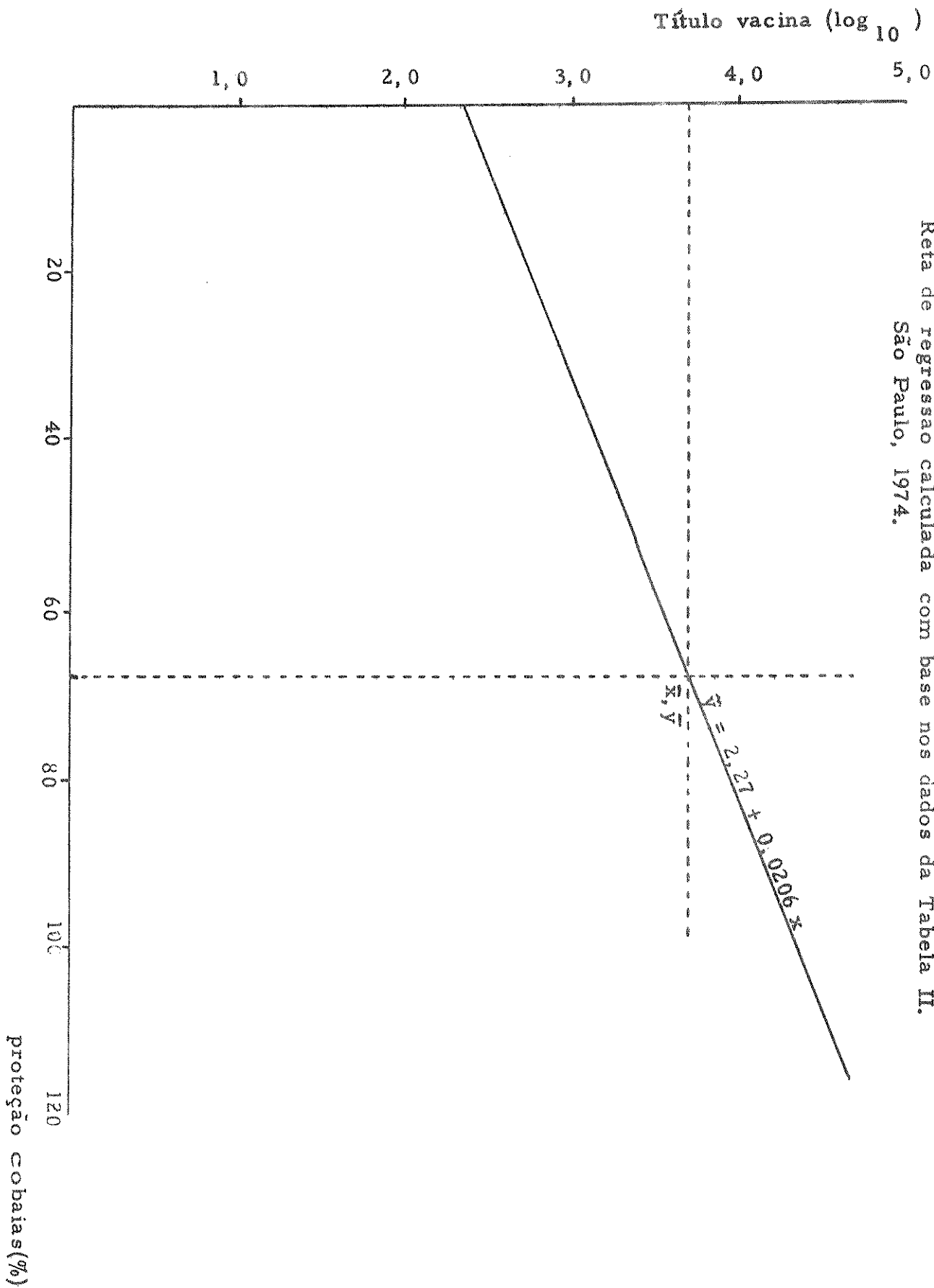
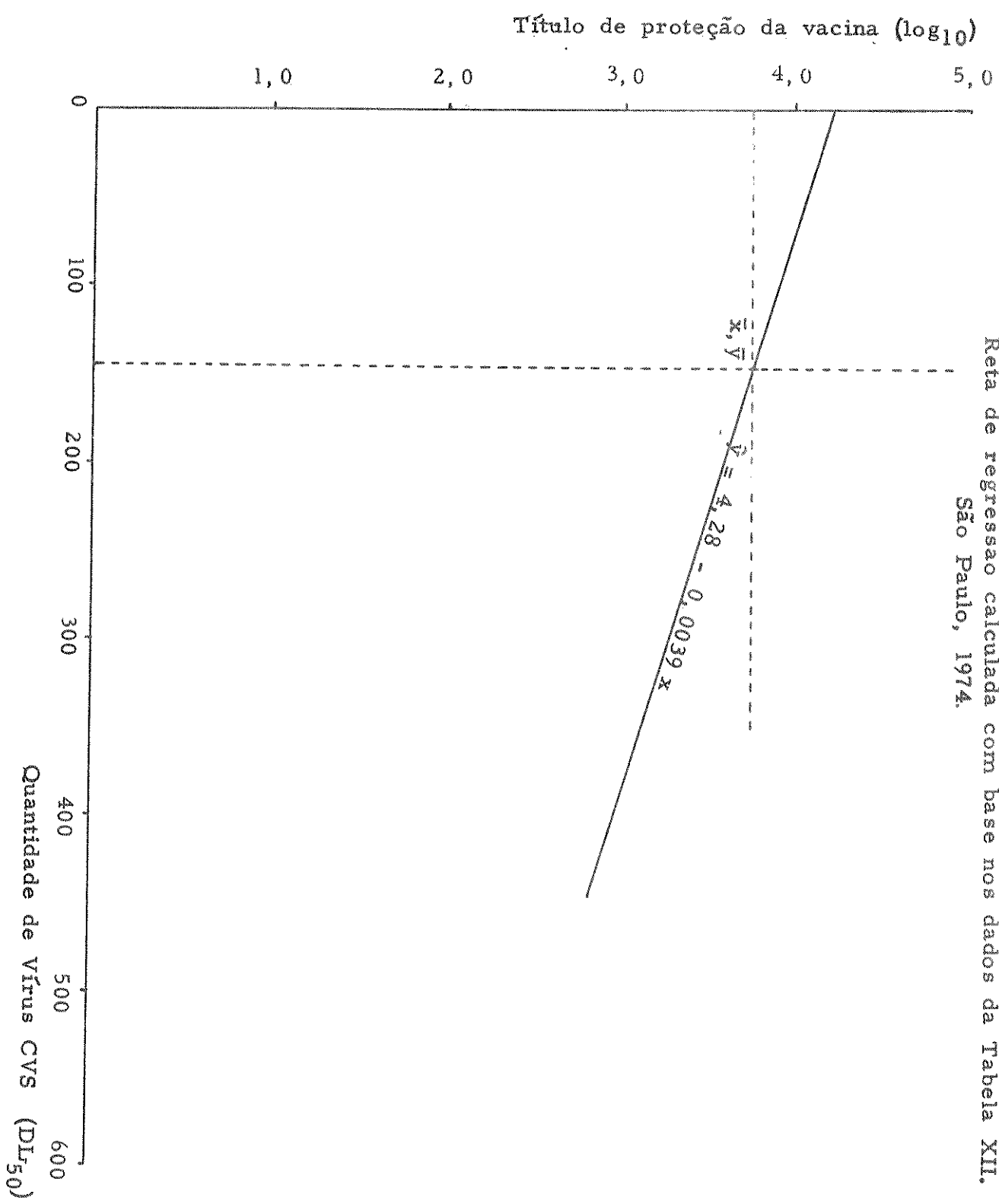


GRÁFICO II

Reta de regressão calculada com base nos dados da Tabela XII.  
São Paulo, 1974.



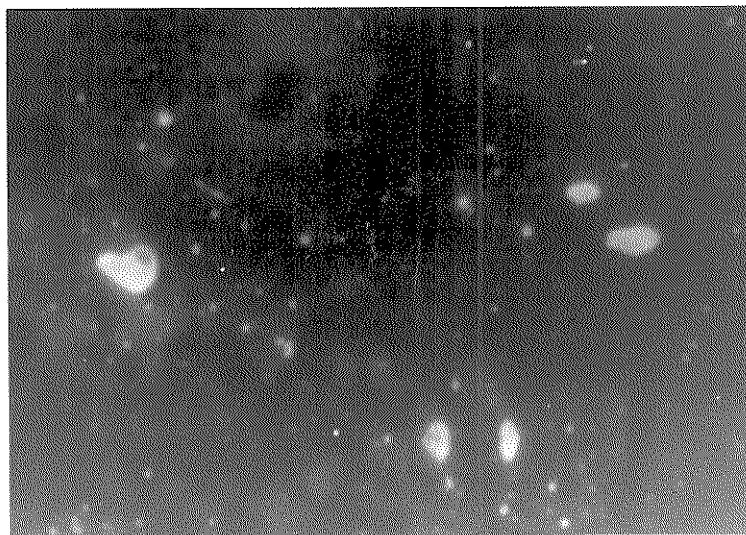


FIG. 1 - VÍRUS FLURY HEP: campo fortemente po  
sitivo, apresentando muitos corpúscu  
los grandes e pequenos, pleomórficos,  
identificado por +++. x 400



FIG. 2 - VÍRUS FLURY HEP: campo apresentando  
poucos e esparsos corpúsculos peque  
nos, identificado por +. x 420