

INFLUÊNCIA DA DOSE DE VÍRUS SOBRE O RESULTADO DA PROVA DE SORONEUTRALIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS, OBJETIVANDO A DETERMINAÇÃO DA TAXA DE ANTICORPOS ANTI-RÁBICOS §

J. de Angelis CORTES *
M. R. NILSSON **

RFMV-A/10

CORTES, J. de A. & NILSSON, M. R. — *Influência da dose de vírus sobre o resultado da prova de soroneutralização em camundongos, objetivando a determinação da taxa de anticorpos anti-rábicos.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 11:95-106, 1974.

RESUMO: Os resultados do presente estudo permitem concluir-se que:

A variação na quantidade de vírus empregada nas provas de soroneutralização para a dosagem de anticorpos anti-rábicos, influencia os resultados da prova.

Há uma relação negativa entre a quantidade de vírus empregada e o título de anticorpos neutralizantes.

A diversidade na relação negativa existente entre a quantidade de vírus e o título de anticorpos neutralizantes do soro existe independentemente do teor de anticorpos do soro, dentro de amplitude de variação observada.

UNITERMOS: Vírus*; Raiva*; Anticorpos*; Soroneutralização*; Camundongos*.

1. INTRODUÇÃO

O anticorpo circulante tem sido considerado como indicador importante da condição de imunidade, relativamente a numerosas doenças BURNET¹ (1955).

Em raiva, a despeito de algumas opiniões divergentes^{24, 25, 30}, a presença, no soro, de anticorpos específicos, acima de certos níveis, traduz um estado de imunidade, embora não se constitua no único parâmetro para julgar essa condição^{1, 1-10, 12, 13, 16-19}.

Inúmeras técnicas tem sido idealizadas para medir a imunidade; a mais direta e biologicamente significativa utilizada em relação às infecções virais, fundamenta-se na capacidade de um soro em prevenir ou impedir a infectividade de uma preparação de vírus¹¹. Deste modo, conhecendo-se o título de um vírus, podemos encontrar pelo menos duas maneiras para estimar diretamente o poder específico de neutralização de um soro: seja misturando

§ Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da USP pelo Prof. J. de Angelis Cortes para obtenção do título de Doutor.

* Professor Assistente Doutor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

** Chefe da Seção de Raiva e Encefalomielite do Instituto Biológico de São Paulo.

quantidade fixa de vírus, previamente conhecida com diferentes diluições do soro; seja trabalhando com quantidade constante de soro, usualmente não diluído, associada a igual volume de uma série de diluições do vírus. Esta última, que leva à obtenção do índice de neutralização¹¹, foi inicialmente desenvolvida em raiva por KOPROWSKI & JOHNSON²² em 1956, com vistas à identificação do vírus, utilizando como sistema biológico o camundongo "adulto-jovem" pela via intracerebral.

Embora oferecendo a vantagem de possibilitar uma comparação quantitativa mais efetiva entre a atividade de diferentes soros¹¹, esta técnica encontra na prática severas limitações em função de sua maior complexidade e do elevado número de camundongos necessários ao estudo de cada soro, especialmente quanto atentamos para o numeroso efetivo de soros a examinar em levantamentos epidemiológicos, por exemplo.

O outro procedimento, representado pela técnica que utiliza vírus em dose constante, geralmente 100 DL₅₀, e soro diluído, tem sido de real valor na determinação do título ou potência relativa das amostras de soros. Em virtude de sua praticabilidade e maior sensibilidade, tem encontrado maior aplicação como método padrão de laboratório²².

Independentemente da sistemática a ser adotada, qualquer sistema biológico passível de ser utilizado na titulação de um vírus, pode também ser empregado para aferir a capacidade de proteção específica de um soro, de vez que a questão básica a ser respondida em todos os casos é: em que grau o título infeccioso do vírus ficará diminuído, se ao invés de juntarmos um diluente inerte, a ele adicionarmos um soro imune¹¹?

Embora existam diferentes sistemas, como, por exemplo, o representado por cul-

tivos celulares HROVSKY & BENDA²⁰ (1970) e KING et al.²¹ (1965), ou por ovos embrionados YOSHINO et al.³¹ (1956), é, sem dúvida, o que emprega o camundongo inoculado pela via intracerebral, o mais largamente usado no estudo da imunidade anti-rábica nas diferentes espécies^{1-9, 13, 14, 16, 17, 20-24, 26, 27, 29}. Nesse sistema prevalece a técnica de manter fixa a dose de vírus e utilizar diluição do soro. Tal procedimento, quando aplicado a inquéritos epidemiológicos, difere ligeiramente visando a racionalização do trabalho; procede-se inicialmente a uma triagem para afastar os soros sem anticorpos específicos, titulando-se então os demais. ATANASIU et al.⁵⁻⁷ (1956-1957-1961) e ATANASIU³ (1967).

Apesar de amplamente difundida, esta técnica apresenta limitações, mormente quando se pretende comparar resultados obtidos em diferentes oportunidades.

Uma limitação importante resulta do fato de não se conseguir, na prática, trabalhar sempre com a mesma quantidade de vírus, ou seja, mesmo quando se parte de fonte única de vírus empregando-se igual volume, a quantidade de vírus com que efetivamente se trabalha, em ocasiões distintas, flutua marcadamente, evidenciada pela determinação da sua DL₅₀.

Essa variação, que se observa de uma prova para outra deve, provavelmente, influenciar os resultados das provas de soroneutralização, dificultando sua comparação e interpretação. Evidências sugestivas relativamente a esse aspecto tem sido apontadas no sistema que utiliza camundongos^{5-7, 29} e, também, quando a soroneutralização é praticada empregando-se cultivos celulares^{20, 21}.

Resolvemos, portanto, no presente trabalho, estudar o efeito da variação na quantidade de vírus sobre os resultados das provas de soroneutralização realizadas em camundongos.

Nosso experimento visou basicamente testar a hipótese de nulidade, segundo a qual a variação na quantidade de vírus rábico não exerce qualquer interferência no resultado da prova de soroneutralização, realizada em camundongos.

Considerada verdadeira tal hipótese, poderíamos esperar que ao submetermos um mesmo soro a diversas provas de soroneutralização paralelas frente a diferentes quantidades de vírus, o seu título neutralizante não diferisse significativamente.

A hipótese alternativa previa, entretanto, relação negativa entre a quantidade de vírus e o título neutralizante do soro, ou seja, que quando se empregam quantidades diferentes de vírus, os títulos neutralizantes do soro diferem significativamente, sendo menores quando as quantidades de vírus são maiores.

Como o efeito da variação na quantidade de vírus sobre os resultados das provas de soroneutralização pode, eventualmente, manifestar-se diferentemente na dependência do teor de anticorpos no soro, resolvemos, também, num sendo passo, levar em conta a possível influência desta variável.

Desenvolvemos, pois, o experimento em duas fases, de modo a contemplar os aspectos propostos.

Na primeira fase, utilizamos um único soro, com o qual foram realizadas várias séries de provas frente a mesma amostra de vírus, cuja quantidade variou de uma série para outra, visando obter-se diferentes níveis quantitativos. Em cada série foi empregada uma quantidade fixa de vírus, frente à qual o soro em apreço foi submetido, repetidamente, a numerosas provas.

Na segunda fase, três soros, escolhidos por apresentarem diferentes concentrações em anticorpos, foram testados paralelamente, frente a quantidades definidas do vírus empregado, em quatro níveis distintos.

Fixamos como nível de rejeição da nossa hipótese de nulidade o valor 0,05.

2. MATERIAL

2.1. Animais

Utilizamos em nosso experimento, camundongos suíços albinos, pesando de 13 a 17 gramas, procedentes de colônia cuidadosamente controlada.

2.2. Vírus

O vírus empregado constitui-se de uma suspensão a 20% de cérebro de camundongos infectados com vírus rábico fixo amostra C.V.S. (Challenge Virus Standard), de preparação recente e mantida à temperatura de -20°C até o momento do uso.

2.3. Soros

Foram utilizados no presente estudo soros de cães previamente selecionados, colhidos em condições de cuidadosa assepsia, inativados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos e mantidos à temperatura de -20°C até o momento do uso. Igual tratamento foi dispensado aos soros normais de equino e de canino.

O soro número I, usado na fase preliminar do trabalho, possuía elevado teor de anticorpos neutralizantes. Os soros II, III e IV, usados na etapa complementar, foram escolhidos tendo em vista a conveniência de se ter amplitude de variação suficiente da concentração de anticorpos, definindo-se, arbitrariamente, três níveis distintos: baixo, médio e elevado, respectivamente.

2.4. Diluente

As diluições, tanto do vírus como dos soros, foram efetuadas em água destilada

contendo 2% de soro de equino normal, adicionada de 1.000 unidades de penicilina e 1,25 miligramas de estreptomicina por mililitro.

3. TÉCNICA

Os testes de soroneutralização realizaram-se segundo a técnica desenvolvida por ATANASIU et al.⁵ (1956) para a titulação de anticorpos rábicos em soros humanos.

As amostras de soro foram submetidas a diluições em progressão geométrica de razão cinco e misturadas com quantidades iguais de uma suspensão de vírus previamente preparada, de sorte a obter-se na diluição final a dose de vírus pretendida.

As misturas vírus-soro assim obtidas foram colocadas em banho-maria a 37°C, durante 90 minutos e, a seguir, cada uma delas, inoculadas pela via intracraniana, na dose de 0,03 ml por animal, em cinco camundongos. Durante o período de inoculação, as referidas misturas permaneciam em condições de refrigeração.

A sistemática adotada para o controle do vírus foi análoga à dispensada ao soro. Aqui, a suspensão de vírus foi submetida a diluições decimais, misturando-se a seguir, com igual quantidade de soro normal, empregado na menor diluição que correspondia ao soro em teste. Após o necessário período de incubação cada diluição foi inoculada em dez camundongos, na mesma dose e via apontadas.

Os animais inoculados foram observados diariamente durante vinte e um dias, sendo registradas, para fins de interpretação das provas, as mortes ocorridas a partir do sexto dia, precedidas da sintomatologia característica. Os títulos dos soros e do vírus foram calculados empregando-se o método de REED & MUENCH²⁸ (1938).

4. TRATAMENTOS

Na primeira fase deste estudo procuramos conhecer, de um lado, a precisão da técnica, mantidas constantes, tanto quanto possível, as condições experimentais e, de outro, se a variação da dose de vírus seria capaz de influenciar o resultado da prova.

Com esse fito, organizamos quatro tratamentos, simbolizados pelas letras A, B, C e D, que visavam testar o soro número I, repetidamente, frente a doses definidas de uma mesma amostra de vírus, em níveis quantitativos distintos.

Cada tratamento consistiu de oito repetições da prova de soroneutralização, frente a uma quantidade fixa de vírus rábico, preparada de acordo com o recomendado por ATANASIU³ (1967), titulando se o vírus em presença de soro canino normal inativado, a cada duas provas. Esta titulação em quadruplicata objetivou reduzir a influência da variabilidade do sistema biológico empregado, posto que o valor da média aritmética apresenta, seguramente, maior estabilidade do que os valores individuais.

As doses de vírus usadas nos diferentes tratamentos, calculadas com base nas médias aritméticas dos valores obtidos em cada uma das quatro titulações, resultaram ser 6, 49, 153 e 306 DL₅₀, respectivamente.

Na segunda fase um terceiro aspecto deveria ser considerado — a influência que poderia exercer a diversidade da dose de vírus no resultado da prova, quando se fizesse variar o teor de anticorpos do soro.

Para tanto, valemo-nos de três soros designados pelos algarismos II, III e IV, que apresentavam, respectivamente, títulos neutralizantes baixo, médio e elevado.

Segundo a mesma orientação da fase inicial, foram instituídos quatro tratamentos, cada um deles correspondendo a uma determinada dose de vírus, simbolizados

pelas letras E, F, G e H, e que revelaram, respectivamente, os valores de DL_{50} iguais a 24, 96, 202 e 404.

Nesta fase os três soros foram testados paralelamente frente a cada uma das quatro doses de vírus, não havendo, entretanto, replicações do tratamento.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos figuram nas tabelas e gráficos que se seguem.

Na tabela I aparecem os títulos de anticorpos neutralizantes do mesmo soro, expressos em logaritmo de base 10, segundo a dose de vírus representada pelas DL_{50} empregadas em cada um dos tratamentos A, B, C e D. Para cada tratamento figuram, também, os valores da média aritmética, do desvio padrão, do coeficiente de variabilidade de Pearson e do erro padrão da média.

O gráfico I, construído com base nos dados apresentados na tabela I, ilustra como se comportaram os títulos de anticor-

TABELA I

Títulos de anticorpos neutralizantes (log 10) do soro I, segundo o tratamento adotado. São Paulo, 1972.

	Tratamentos e correspondentes DL_{50}			
	A (6)	B (49)	C (153)	D (306)
	2,273	2,273	1,746	1,397
	2,532	1,746	1,746	1,397
	2,450	1,746	1,658	1,746
	2,450	1,978	1,746	1,513
	2,357	2,212	1,658	1,397
	2,352	2,352	1,746	1,397
	2,460	1,978	1,746	1,746
	2,795	1,748	1,746	1,746
Média aritmética	2,458	2,004	1,724	1,542
Desvio padrão	0,148	0,233	0,038	0,162
Coeficiente de variabilidade de Pearson (%)	6,0	11,6	2,2	10,5
Erro padrão da média	0,057	0,090	0,015	0,061

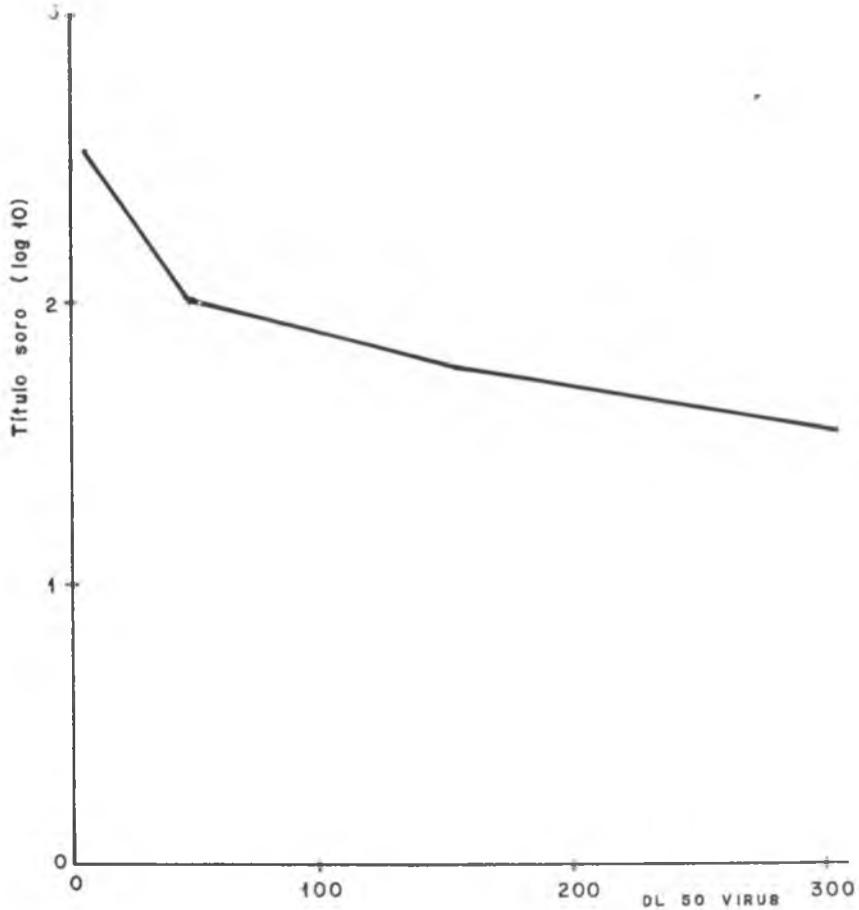
pos neutralizantes do mesmo soro, frente às diferentes doses de vírus empregadas.

A poligonal foi construída representando-se no eixo das ordenadas as médias aritméticas dos títulos de anticorpos neutralizantes correspondentes a cada um dos tratamentos e em abscissas, os valores das DL_{50} de vírus empregadas em cada caso.

O tratamento estatístico dos resultados foi desenvolvido conforme os princípios recomendados por GOLDSTEIN¹⁵ (1965).

A regressão linear calculada para os dados da tabela I, levou à obtenção dos valores 2,279 e $-0,0027$, respectivamente, para os parâmetros a e b , dando origem assim

Gráfico I — Anticorpos neutralizantes segundo a média dos títulos do soro, expressa em logaritmo de base 10 e o número de DL₅₀ do vírus, empregadas em cada caso. São Paulo, 1972.



à equação da reta, expressa por $\hat{y} = 2,279 - 0,0027 x$.

No prosseguimento da análise obtivemos para r o valor igual a $-0,82$, que revelou estreita relação negativa entre as duas variáveis, ou seja, na medida que crescem os valores de DL₅₀ do vírus na prova de soroneutralização, decrescem os resultados do título do soro.

O valor t calculado, igual a 7,84, mostrou ser significativo ao nível de rejeição adotado, igual a 5%.

No gráfico II figura a reta de regressão calculada com base nos dados da tabela I e os correspondentes limites de confiança de 95%, representados, respectivamente, pelos valores $\pm 0,17$; $\pm 0,14$; $\pm 0,12$ e $\pm 0,22$, para os tratamentos A, B, C e D; e $\pm 0,12$ para a média \bar{x} , \bar{y} .

Na tabela II encontram-se os títulos neutralizantes, expressos em logaritmo de base 10, dos soros II, III e IV, segundo a dose de vírus empregada, correspondente, respectivamente, aos tratamentos E, F, G

Gráfico II — Reta de regressão e correspondentes limites de confiança de 95%, calculados com base nos dados da tabela I. São Paulo, 1972.

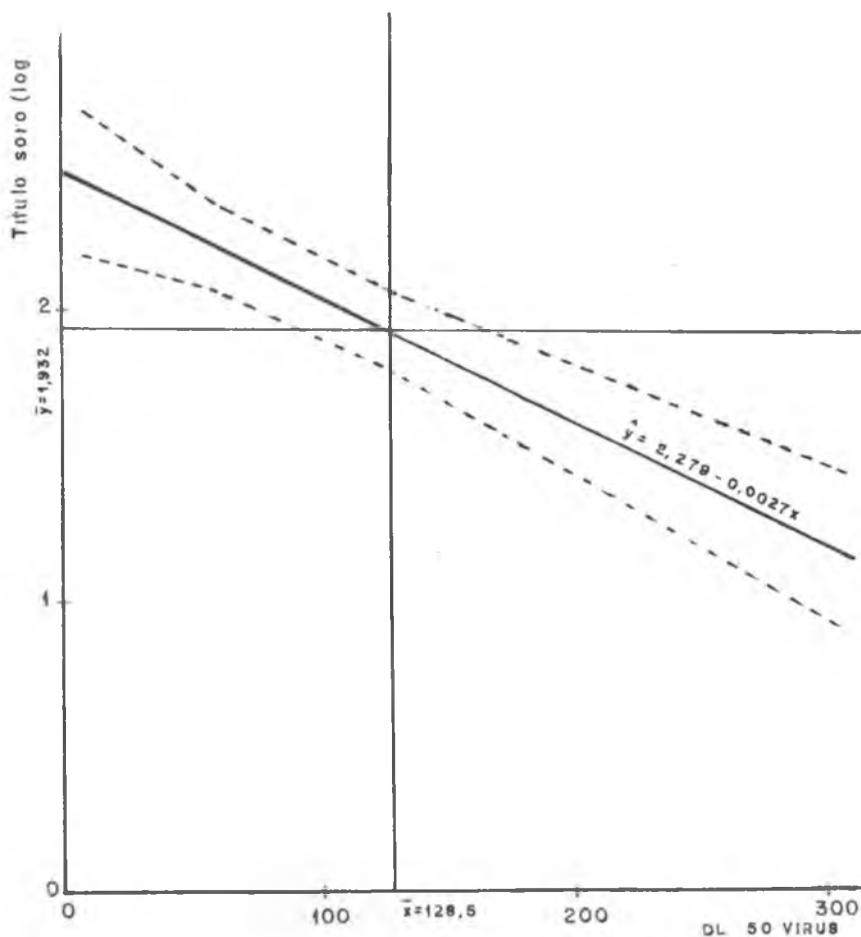


TABELA II

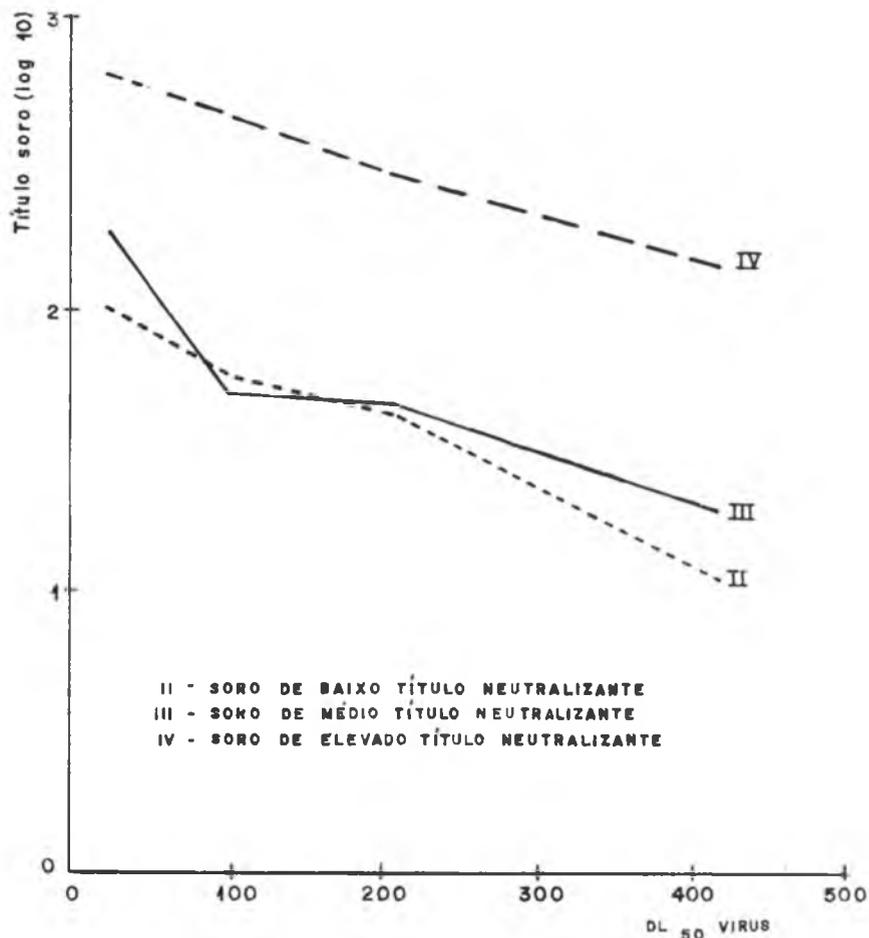
Títulos neutralizantes, expressos em logaritmo de base 10, segundo o soro de baixo, médio e elevado teor de anticorpos e as doses de vírus empregadas, expressas em DL_{50} , correspondentes, respectivamente, aos tratamentos E, F, G e H. São Paulo, 1972.

		Soros		
		II	III	IV
Tratamentos				
E	(24)	1,978	2,265	2,795
F	(96)	1,751	1,746	2,677
G	(202)	1,625	1,658	2,445
H	(404)	1,052	1,287	2,212
Média aritmética		1,601	1,739	2,532
Desvio padrão		0,34	0,35	0,22
Coeficiente de variabilidade de Pearson (%)		21,2	20,1	8,7
Erro padrão da média		0,20	0,20	0,13

BIBLIOTECA

J.S.P.

Gráfico III — Anticorpos neutralizantes dos soros de baixo, médio e elevado teor de anticorpos, segundo o título expresso em logaritmo de base 10 e a dose de vírus empregada, expressa em DL_{50} . São Paulo, 1972.



e H, figurando também, para cada soro, os valores da média aritmética, do desvio padrão, do coeficiente de variabilidade de Pearson e do erro padrão média.

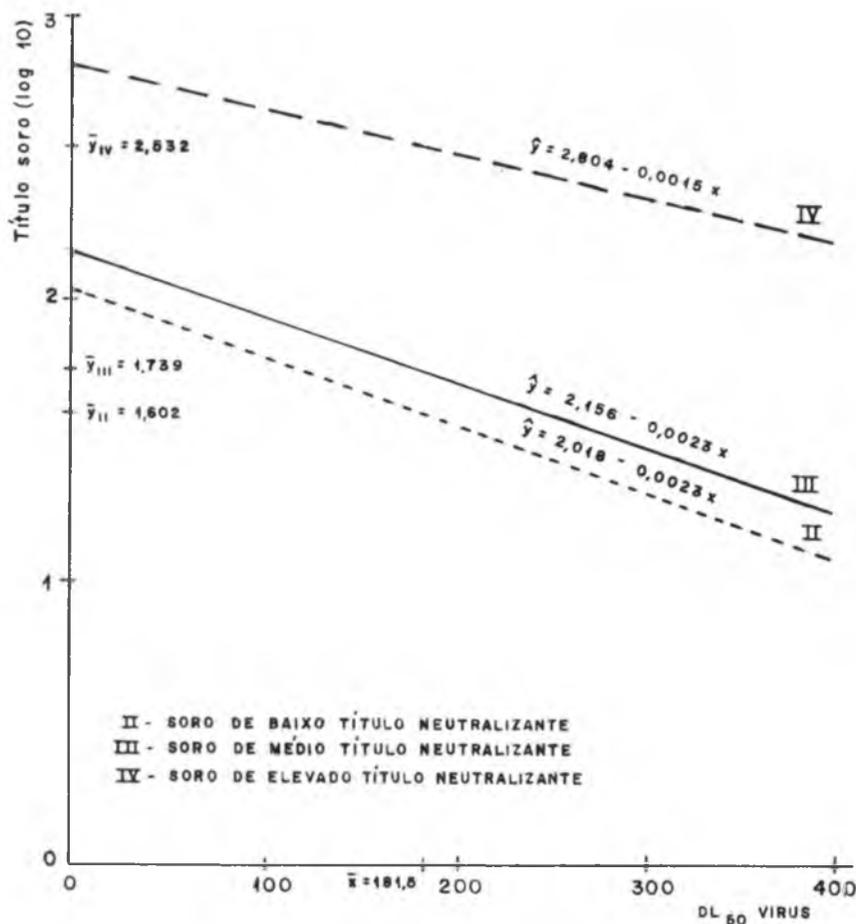
O gráfico III mostra as três poligonais correspondentes ao comportamento dos soros II, III e IV, frente às diferentes doses fixadas de vírus.

Este gráfico foi construído consoante a mesma orientação empregada para o gráfico número 1.

A regressão calculada para os soros II, III e IV forneceu para os parâmetros a e b , respectivamente, os seguintes valores: soro II, 2,018 e $-0,0023$; soro III, 2,156 e $0,0023$; e soro IV, 2,804 e $-0,0015$.

Isto possibilitou, correspondentemente, o cálculo das equações de regressão $\hat{y} = 2,018 - 0,0023 x$; $\hat{y} = 2,156 - 0,0023 x$ e $\hat{y} = 2,804 - 0,0015 x$.

Gráfico IV — Retas de regressão calculadas com base nos dados da tabela II. São Paulo, 1972.



Os valores de r calculados para cada uma das três retas foram, na mesma seqüência, $-0,97$; $-0,94$ e $-0,98$.

O gráfico IV mostra as três retas de regressão calculadas com base nos dados da Tabela II.

6. DISCUSSÃO

Os dados obtidos e os resultados das análises estatísticas realizadas põem em evi-

dência alguns aspectos que convém discutir.

A prova de soroneutralização realizada segundo a técnica descrita por ATANASIU et al.⁵ (1956), apresenta boa reprodutibilidade desde que se trabalhe efetivamente com dose de vírus constante.

De fato, os valores de dispersão calculados para a distribuição de freqüência dos valores de cada um dos tratamentos

da tabela I indicam que é relativamente baixa a variabilidade dos resultados.

Os dados constantes dessa mesma tabela, põem em evidência, entretanto, a influência que exerce a diversidade da quantidade de vírus no resultado das provas de soroneutralização. Realmente, verifica-se que na medida em que crescem as quantidades de vírus empregadas, são menores, para um mesmo soro, os títulos de anticorpos neutralizantes.

HRONOVSKI & BENDA²⁰ (1970) e KING et al.²¹ (1965), realizando provas de soroneutralização em sistema biológico diferente, representado por cultivos celulares, constataram também que doses maiores de vírus determinam valores menores para os títulos de anticorpos neutralizantes do soro.

Os resultados constantes da tabela II mostram que a relação negativa existente entre a dose de vírus e o título de anticorpos neutralizantes está presente quer se trate de soros de concentração baixa, média ou elevada de anticorpos.

O conjunto dos resultados indica, portanto, que a quantidade de vírus empregada na prova de soroneutralização é uma variável capaz de influenciar significativamente os resultados desta, e deve, portanto, ser adequadamente controlada, mormente quando se pretende comparar resultados de diferentes provas, referentes ao mesmo grupo de animais em diferentes tempos ou entre grupos diferentes de animais.

A G R A D E C I M E N T O S

Para o planejamento e desenvolvimento desta tese contamos com a colaboração do Professor Doutor Adolpho Ribeiro Netto, à quem consignamos nosso reconhecimento e profunda gratidão.

Agradecemos ainda ao Dr. Ernani Ibirá Gonçalves e a Dna. Maria Luiza Rigo Pasquarelli, pela colaboração que nos prestaram durante a realização do presente trabalho.

RFMV-A/10

CORTES, J. de A. & NILSSON, M. R. — *Influence of the virus quantity on the results of the serum-neutralization test in mice for measuring the antirabic antibodies.* *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11: 95-106, 1974.

SUMMARY: *The results of this essay enable us to conclude that the variation in the quantity of virus used in the serum-neutralization tests for measuring antirabic antibodies has influence on the results of the test.*

A negative relationship between the virus quantity used and the neutralizing antibodies titer was observed.

Such a diversity still remains independently of the antibodies level of the serum within the values observed in this study.

UNITERMS: *Virus *; Rabies *; Antibodies *; Serum-neutralization *; Mice.*

CÓRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. — Influência da dose de vírus sobre o resultado da prova de soroneutralização em camundongos, objetivando a determinação da taxa de anticorpos anti-rábitos. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:95-106, 1974.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, P. A. & AGUIAR, A. A. — Soro-neutralização em vacinados do Instituto Pasteur de São Paulo. *Rev. Ass. med. bras.*, 15(11):451-6, 1959.
2. ATANASIU, P. — *Quantitative assay and potency test of antirabies serum. Laboratory techniques in rabies.* Genova, World Health Organization, 1966. p. 167-72.
3. ATANASIU, P. — Titragem dos anticorpos rábiticos praticada sobre os séruns humanos. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 67 (3/4):383-7, 1967.
4. ATANASIU, P. et al. — Étude sur l'immunité antirabique des bovins vaccinés. I. Comparaison des niveaux d'anticorps antirabiques neutralizants obtenus sur les bovins à l'aide de divers vaccins au cours d'une année. *Ann. Inst. Pasteur*, 114(3): 339-48, 1968.
5. ATANASIU, P. et al. — Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons. *Bull. Org. mond. Santé*, 14:593-611, 1956.
6. ATANASIU, P. et al. — Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons. Part II. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 17 (6):911-32, 1957.
7. ATANASIU, P. et al. — Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons. Part III. *Bull. Org. mond. Santé*, 25:103-14, 1961.
8. ATANASIU, P. et al. — Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons. Part IV. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 36: 361-5, 1967.
9. BAER, G. M. et al. — Títulos de suero-neutralización contra el derriengue producidos por una vacuna de alto pasaje y por una vacuna autógena. *Técnica pecuária*, 6:11-5, 1967.
10. BALTAZARD, M. & BAHMANYARD, M. — Essay pratique du serum antirabique chez les mordus par loups enragés. *Bull. Org. mond. Santé*, 13: 747-72, 1955.
11. BURNET, F. M. — *Principles of animal virology.* New York, Academic Press, 1955. p. 281-304.
12. CARNEIRO, V. et al. — Rabies in cattle. V. Immunization of cattle in Brazil against exposure to street virus of vampire bat origin. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 127:366-9, 1955.
13. DREESEN, D. W. et al. — Antibody response in cattle vaccinated with various rabies vaccines. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 157(6):826-30, 1970.
14. FABREGA, F. et al. — Estudio de los anticorpos neutralizantes en el suero sanguíneo de bovinos tratados con vacuna antirrábica. *Zootria*, 6(1/4):1-9, 1965.
15. GOLDSTEIN, A. — *Biostatistics: an introductory text.* 2nd ed. New York, McMillan, 1965.
16. GOMEZ, C. et al. — Rabies in cattle. III. Comparative studies on vaccination of cattle in Colombia with Fluoriv virus and chloroform inactivated vaccine. *J. Amer. vet. med., Ass.*, 127:360-3, 1965.
17. HABEL, K. — Effect on immunity to challenge and antibody response of variation in dosage schedule of rabies vaccine in mice. *Bull. Org. mond. Santé*, 14:613-6, 1956.
18. HABEL, K. — Seroprophylaxis in experimental rabies. *Publ. Hlth. Rep.*, 60(20):545-60, 1945.
19. HABEL, K. — Vaccination and serum prophylaxis of rabies in man. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RABIES, Talloire, 1965. *Proceedings.* 1967. v. 1, p. 293-305. [Series Immunobiol. Stand.]
20. HRONOVSKY, V. & BENDA, R. — Kinetics of reaction of rabies virus

CORTES, J. de A. & NILSSON, M. R. — Influência da dose de vírus sobre o resultado da prova de soroneutralização em camundongos, objetivando a determinação da taxa de anticorpos anti-rábicos. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:95-106, 1974.

- with specific antibodies in conditions of in vitro virus neutralization test. *Acta virol.*, 14(3):209-16, 1970.
21. KING, D. A. et al. — A rapid quantitative in vitro serum neutralization test for rabies antibody. *Canad. vet. J.*, 6(8):187-93, 1965.
22. KOPROWSKI, H. & JOHNSON, H. M. — *Prueba de neutralizacion suero virus. Tecnicas de laboratorio aplicadas a la rabia*. Washington, 1956. p. 70-5. [Organizacion Mundial de la Salud. Monografia, 23].
23. KOPROWSKI, H. et al. — Rabies in cattle. IV. Vaccination of cattle with egg-passage, chicken embryo-adapted rabies virus. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 127:363-6, 1955.
24. KUBES, V. & GALLIA, F. — Brain-tissue neutralization. A new biological and serum neutralization tests. *Canad. J. Comp. Med.*, 7(2):48-60, 1944.
25. ORNELAS, O. V. — Neutralization "in vitro" del virus rabico por tejidos de cuyes recuperados da infeccion rabica. *Gac. méd. Méx.*, 97(4):421-8, 1957.
26. PACHECO, G. A. & AGUIAR, A. — Comportamento das provas cutâneas com a vacina anti-rábica e da soroneutralização no decorrer da imunização. *Rev. paul. Med.*, 56:263-8, 1965.
27. PEREIRA, O. A. C. et al. — Complement fixation test in evaluation of immunity rabies. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 1(2):85-91, 1970.
28. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27(3):493-7, 1938.
29. SALIDO RENGELL, F. — Respuesta serológica en personas vacunadas contra la rabia com vacuna tipo Fuenzalida. *Salud públ. Méx.*, 11(3):317-21, 1969.
30. STUART, G. & KRICKORIAN, K. S. — The rabicidal antibody content of rabbit immune serum as an index of acquired resistance to rabies infection. *Jour. Hyg. (Lond.)*, 32:489-93, 1932.
31. YOSHINO, K. et al. — Infection of the one-day old fertile hen's egg with rabies virus. II. Application to rapid viral titration and neutralization test. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 9:273-82, 1956.
- Recebido para publicação em 28-8-74
Aprovado para publicação em 29-8-74