
**COMPARAÇÃO ENTRE CONJUGADOS *IN HOUSE*
E COMERCIAIS PELA TÉCNICA DE RÁPIDA INIBIÇÃO
DE FOCOS FLUORESCENTES (RFFIT)
NA AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS**

Wildeberg Cál Moreira,¹ Wlamir Correa de Moura,² Marlon Vicente da Silva³ e
Rugimar Marcovistz³

RESUMO

A raiva é uma zoonose letal transmitida ao homem pela inoculação do vírus rábico, principalmente pela mordedura de animais infectados. Em 2005, o Ministério da Saúde brasileiro gastou cerca de R\$66 milhões com ações de vigilância epidemiológica, empregados em campanhas de vacinação e na aquisição de imunobiológicos. O controle sorológico é exigência básica para a correta avaliação da pessoa vacinada. Neste trabalho, 91 soros de 34 indivíduos foram submetidos à titulação de anticorpos pela técnica de rápida inibição de focos fluorescentes, adaptada a microplacas de 96 poços, para comparar um conjugado produzido *in house* com outro comercial. Do total, 74 soros (82,2%) apresentaram título $\geq 0,5$ UI/mL e 12 soros (13,33%), título $< 0,5$ UI/mL. Estes resultados mostram que a rápida inibição de focos fluorescentes utilizando o conjugado produzido *in house* foi tão sensível quanto com o conjugado comercial. As diferenças entre os conjugados não foram significativas e os títulos de anticorpos apresentaram elevada correlação ($r = 0,94$).

DESCRITORES: Vírus da raiva. Testes sorológicos. Rápida inibição de focos fluorescentes. Conjugado antirrábico.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma encefalopatia zoonótica letal, progressiva e aguda, transmitida ao homem por meio da inoculação do vírus rábico, principalmente pela mordedura de animal infectado (Brasil, 2002). O vírus pertence à ordem

-
- 1 Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fiocruz, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. berg@fiocruz.br
 - 2 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ. wlamir.moura@incqs.fiocruz.br
 - 3 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ. marlonsilvavet@yahoo.com.br; rugimar@bio.fiocruz.br

Endereço para correspondência: Endereço para correspondência: Wildeberg Cál Moreira, Cecal/Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: berg@fiocruz.br

Recebido para publicação em: 19/1/2009. Revisto em: 8/6/2010. Aceito em: 11/8/2010.

Mononegavirales, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (Rupprecht et al., 2002). Possui a forma de *projétil* e seu genoma é constituído por ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, não segmentada e de polaridade negativa (Tordo, 1996). Apresenta cinco antígenos e, entre os dois principais, um é externo (glicoproteína G) e o outro, interno (nucleoproteína N) (Brasil, 2002).

No período de 1980 a abril de 2010, foram notificados 1.446 casos de raiva humana no Brasil (Brasil, 2006a; Brasil, 2006b; Brasil, 2010; OPAS, 2008). Entre 1997 e 2001, mais de 400 mil pessoas, ao ano, procuraram atendimento médico e 60% receberam algum tipo de indicação de tratamento profilático (Brasil, 2002). Em 2008, foram distribuídas 1.476.000 doses de vacina antirrábica, 136.925 ampolas de soro heterólogo e 14.045 ampolas de imunoglobulina antirrábica humana, sendo indicado o tratamento profilático para 182.651 pessoas (Brasil, 2009). Somente no município do Rio de Janeiro foram realizados 17.200 atendimentos antirrábicos (SMSDC, 2010). Apesar de as vacinas serem seguras e eficazes, o tratamento pós-exposição, incluindo a imunoglobulina antirrábica, somente é recomendado quando necessário para todos os casos de possível exposição (WHO, 2010). O Ministério da Saúde gastou cerca de R\$66 milhões com as ações de vigilância epidemiológica para raiva em 2005. Esses recursos foram aplicados em medidas como a realização de campanhas de vacinação e a aquisição de imunobiológicos (Brasil, 2006b).

Em virtude do impacto dos casos de raiva humana que ocorrem principalmente quando não há atenção profilática adequada às pessoas expostas, é imperioso capacitar os profissionais dos serviços de saúde para indicarem corretamente os tratamentos antirrábicos e para fazerem a busca ativa das pessoas que abandonam o tratamento (OPAS, 2001). A titulação de anticorpos permite verificar o grau de imunidade dos indivíduos que sofreram tratamento antirrábico ou os vacinados preventivamente. O título 0,5 UI/mL no teste de soroneutralização é considerado, pela WHO (1992), como o título mínimo requerido após a profilaxia.

Testes de soroneutralização são utilizados para quantificar os anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva (Smith, 1991; WHO, 1992; Cliquet et al., 1998). O teste de neutralização em camundongo (TNC) foi o primeiro a ser desenvolvido (Atanasiu, 1996; Webster & Dawson, 1935) e, durante muito tempo, foi considerado como a prova de referência, mas, por utilizar animais, tem custo elevado (Rizzo, 1983) e também as questões éticas e de bem estar-animal. A rápida inibição de focos fluorescentes (RFFIT) foi desenvolvida originalmente por Smith et al. (1973). Zalan et al. (1979) foram os primeiros a adaptar a técnica em microplacas de 96 poços. Esta técnica revela a presença ou ausência de infecção viral em cultura de células após 24 horas, avaliada pela imunofluorescência direta (Smith et al., 1996). Vem sendo utilizada como a técnica de escolha (Smith et al., 1973; Smith et al., 1996; Simani et al., 1999; Khawplod et al., 2005) por sua boa correlação com o TNC (Guillemin et al., 1981a, 1981b; Louie et al., 1975; Smith, 1991).

Para evitar erros nos resultados obtidos por vários processos metodológicos, é inevitável a utilização de padrões de referência caracterizados e reagentes de

boa qualidade (Briggs et al., 1998). A produção de conjugados utilizando soro hiperimune de coelhos é viável para a maioria dos laboratórios pela facilidade de se obter volume proporcionalmente maior que em *hamsters* e também pela dificuldade da manutenção de cabras ou cavalos que poderiam ser a alternativa (Trimarchi & Debbie, 1974). A sensibilidade e a especificidade do teste de imunofluorescência dependem, além da perícia do examinador e do microscópio, da qualidade do conjugado antirrábico. Por este motivo, os conjugados devem ser de elevada qualidade e a adequada diluição de trabalho deve ser determinada por titulação (WHO, 2004). O conjugado antirrábico é utilizado para a detecção *in vitro* (cultura de célula) do antígeno da raiva por imunofluorescência. Entre suas aplicações, destina-se à detecção de antígeno viral no controle de infecção em cultura de célula para a produção de antígeno, a titulação de suspensões virais em células e à dosagem de anticorpos por meio de técnicas de neutralização do vírus.

Em virtude da complexidade tecnológica e do custo relativamente elevado na padronização de uma técnica capaz de produzir conjugados antirrábicos de boa qualidade, são necessários estudos comparativos entre conjugados *in house* e conjugados comerciais (Pagano & Gauvreau, 2004; Khawplod et al., 2005). Além disso, a raiva humana continua sendo um problema de saúde pública com letalidade de quase 100%. A vacinação antirrábica constitui a ação de maior eficácia na prevenção e controle dessa doença no ciclo urbano e o controle sorológico, a exigência básica para a correta avaliação da pessoa vacinada (WHO, 2007; Brasil, 2002). O objetivo deste estudo foi comparar o conjugado antirrábico produzido *in house* com um conjugado comercial, por meio da avaliação do título de anticorpos antirrábicos de soro de 34 indivíduos, empregando a RFFIT adaptada a microplacas de 96 poços com cultura de células BHK-21.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, foram selecionadas 91 amostras de soro de 34 indivíduos que apresentaram resposta $<0,5$ UI/mL ao serem avaliados pela contraímunoeletroforese. Do total de indivíduos, 27 receberam a vacina de cultivo celular (vacina de células Vero, Aventis Pasteur, Paris, França), 6 receberam vacina Fuenzalida & Palácios (Tecpar, Paraná, Brasil) e 1 recebeu vacina de célula diploide humana (Imovax® Rabies, Aventis Pasteur, Paris, França) e vacina Fuenzalida & Palácios. Foram utilizadas diluições do soro em uma progressão geométrica ($q=2$) de 1:4 até 1:256 (CNS, 2005). Os tratamentos variaram de 1 a 24 doses de vacina. O levantamento foi realizado no período de 2000 a 2006, no Setor de Sorologia Específica do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IMMVJV), Rio de Janeiro, Brasil. Os soros foram numerados, assegurando o sigilo de identidade dos indivíduos vacinados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.

As células BHK-21 clone 13 linhagem certificada (*certified cell line - CCL*) de rim de *hamsters* recém-nascidos (*baby hamster kidney*), foram obtidas da coleção americana de culturas e depósitos (ATCC, 1961). As células descongeladas foram mantidas a 37°C e cultivadas em garrafas de polietileno de 25cm² ou 75cm², em meio mínimo essencial de Glasgow, suplementado com penicilina a 50 UI/mL e estreptomicina a 0,05 mg/mL, anfotericina B a 0,42 mg/L, glutamina a 0,3 mg/mL e 10% de soro fetal bovino. As células foram utilizadas por até dez passagens.

Para os testes de RFFIT, foram utilizadas cepas de vírus da raiva *Challenge Virus Standard-11* (CVS-11), obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz, e CVS-38 para a produção do conjugado antirrábico, obtido do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, Rio de Janeiro, Brasil.

As células BHK-21 foram cultivadas em microplacas de fundo plano de 96 poços. O soro de referência internacional (International Standard for Anti-rabies Immunoglobulin Human – RAI, lote 2nd, National Institute for Biological Standards and Control - NIBSC) foi diluído para conter 1,0 UI/mL. Dois poços foram utilizados para o controle negativo e outros dois, para o controle de células. Nos demais foram titulados os soros de cada indivíduo em duplicata. As microplacas foram examinadas segundo a RFFIT modificada descrita por Moura et al. (2008), visualizadas em microscópio invertido de imunofluorescência (Olympus CK 40), com objetiva 20x ou 40x. Foi empregado um conjugado produzido *in house* (Trimarchi & Debbie, 1974), comparado com um conjugado comercial (Liquid Rabies Antinucleocapsid Conjugate – Sanofi Diagnostic Pasteur, Paris, França) (Figura 1) (Trimarchi et al., 1996). A leitura dos campos foi realizada de acordo com a descrição de Zalan et al. (1979).

O conjugado antirrábico foi produzido com anticorpos obtidos de sangue de coelhos adultos da raça Nova Zelândia. O soro recolhido foi centrifugado por 30 minutos (1.500 x g) a 4° C e filtrado com membrana de 0,22 µm; testada a esterilidade, foi estocado a –70° C (Trimarchi & Debbie, 1974). O soro hiperimune foi precipitado três vezes com sulfato de amônia saturada por 16 a 18 horas, sob agitação, e centrifugado por 30 minutos (1400 x g) entre cada precipitação. Após a última centrifugação, o precipitado foi ressuspenso e as proteínas, dosadas por espectrofotometria. O isotiociano de fluoresceína foi dissolvido em tampão carbonado pH 9,0 e adicionado por gotejamento à imunoglobulina sob agitação, na proporção de 1,0 mg de fluoresceína para 100 mg de Imunoglobulina. Em seguida, o pH foi ajustado para 9,0 e a mistura foi mantida sob agitação *overnight* 4°C (Perrin, 1996). O conjugado foi dialisado em membrana de 100 kDa e concentrado pelo método de ultrafiltração em *stirred cell*, como descrito por Akita e Nakai (1992), aliquotado, liofilizado e estocado a –20°C.

O conjugado antirrábico fluorescente foi titulado em microplaca de 96 poços incubada por um período de 22 horas, a 35°C com 3% de CO₂. Foi preparada uma diluição seriada dos conjugados (*in house* e comercial) de 1:10 a 1:320 (q= 2). A diluição de conjugado que demonstrou máxima coloração

específica e pouco ou nenhum fundo verde foi escolhida como a diluição de trabalho (Smith et al., 1996).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson, o teste *t*-Student e a análise da variância, para comparar a relação entre os títulos dos soros obtidos com os conjugados *in house* e comercial (Pagano & Gauvreau, 2004). Avaliou-se também a sensibilidade e a especificidade dos conjugados segundo a fórmula proposta por Medronho & Perez (2004) e o Microsoft® Office Excell 2003 foi utilizado para realização dos cálculos.

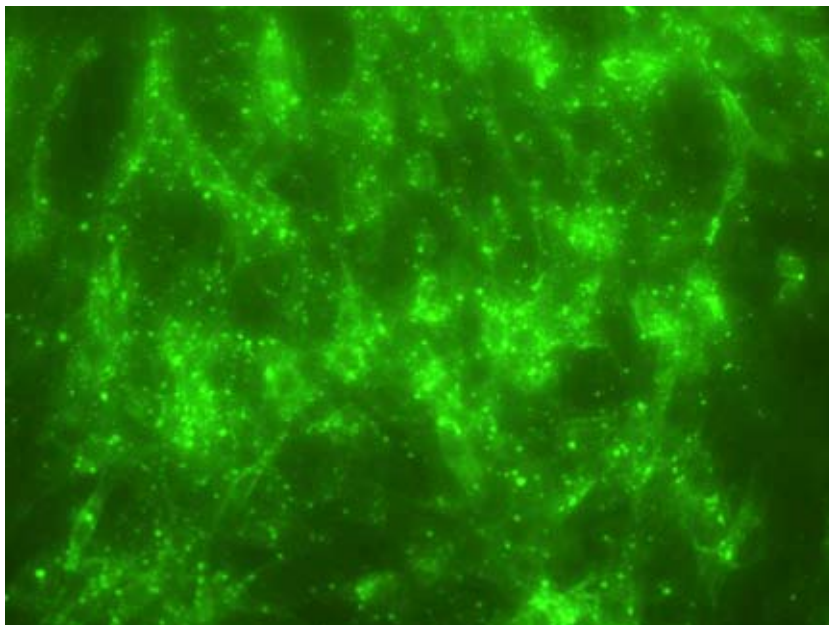


Figura 1. Imunofluorescência direta, técnica de rápida inibição de focos fluorescentes. Células BHK-21 infectadas com cepa CVS-11. 20x

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Várias publicações têm demonstrado boa correlação entre RFFIT e TNC (Smith et al., 1973; Smith, 1991; Smith et al., 1996; Simani et al., 1999; Khawplod et al., 2005). Segundo Simani et al. (1999), a RFFIT pode substituir o TNC como técnica padrão, além de possuir maior sensibilidade e ser executada em menor tempo (24 horas contra 21 dias)(Smith et al., 1996), o que é de grande relevância uma vez que a presença de anticorpos é requisito básico após a imunização antirrábica. Quando os títulos de anticorpos neutralizantes não forem adequados (<0,5UI/mL), é indicada a administração de uma dose de reforço da vacina, repetindo-se a sorologia

após 14 dias aproximadamente, como é recomendado pela Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano (Brasil, 2002; François, 2006).

O esquema profilático é de suma importância e, segundo Fishbein et al. (1993), o número de pessoas submetidas a tratamento que desenvolvem reações alérgicas pode ser diminuído pela administração de vacina somente quando for estritamente indicada. A detecção precoce de anticorpos, após o início do tratamento, é fundamental para os esquemas de pré ou pós-exposição (Cortés et al., 2004). Neste trabalho, apenas três soros de primeira coleta exibiram títulos inferiores a 0,5UI/mL na RFFIT. Isso demonstrou que, se esses soros fossem titulados logo no início pela RFFIT, não haveria necessidade de reforços vacinais nem de novas coletas de sangue e titulações posteriores. Desse modo, evitar-se-iam desconforto para as pessoas em tratamento, gastos públicos desnecessários e talvez até problemas de ordem imunológica causados pelo excesso de exposição do sistema imunológico aos antígenos vacinais (Tizard, 1995).

A especificidade e sensibilidade são parâmetros indicados pela WHO (1997), para avaliar os procedimentos de titulação de anticorpos. Ao comparar os métodos sorológicos utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas, é importante avaliar, particularmente, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (Briggs et al., 1998). Na RFFIT, o conjugado produzido *in house* teve elevada sensibilidade (96%) e especificidade (92%) ao ser comparado com o conjugado comercial (Tabela 1).

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade do conjugado *in house*

| Conjugado | Título ¹ | | N títulos coincidentes | | Sensibilidade | | Especificidade | |
|-----------------|---------------------|-----------|------------------------|-----------|---------------|------|----------------|------|
| | >0,5 UI/mL | <0,5UI/mL | >0,5 UI/mL | <0,5UI/mL | N/total | % | N/total | % |
| <i>in house</i> | 75 | 15 | 74 | 12 | 74/77 | 0,96 | 12/13 | 0,92 |
| Comercial | 77 | 13 | | | | | | |

Fonte: Medronho & Perez (2004).

¹títulos de anticorpos neutralizantes obtidos pela RFFIT.

A Figura 2 ilustra a correlação entre os títulos de anticorpos neutralizantes dos 91 soros testados pela técnica de RFFIT com os conjugados *in house* e comercial. A equação da regressão linear obtida foi $y = 0,3641 + 0,8934x$ e o coeficiente de correlação de Pearson 0,94 ($p < 0,05$), sendo considerada uma correlação quase perfeita. Os resultados se mostraram altamente correlacionados em quase todos os soros (95,4%). A pequena variação entre os títulos dessas amostras pode ser aceitável porque, frequentemente, bioensaios apresentam elevada variabilidade, diferentemente do observado neste trabalho (Wood, 1981; WHO, 1997; Reed et al., 2002). A interpretação do coeficiente de correlação de Pearson permitiu quantificar o grau em que os títulos de anticorpos neutralizantes estavam correlacionados e ficou demonstrado que estes títulos eram muito semelhantes (Pagano & Gauvreau, 2004).

Para confirmar esta observação, os resultados foram submetidos aos testes *t*-Student e Anova. Ficou demonstrado que não havia diferença significativa entre os títulos dos soros analisados com ambos os conjugados, uma vez que a relação entre estes dois resultados também se mostrou altamente correlacionada (Tabela 2).

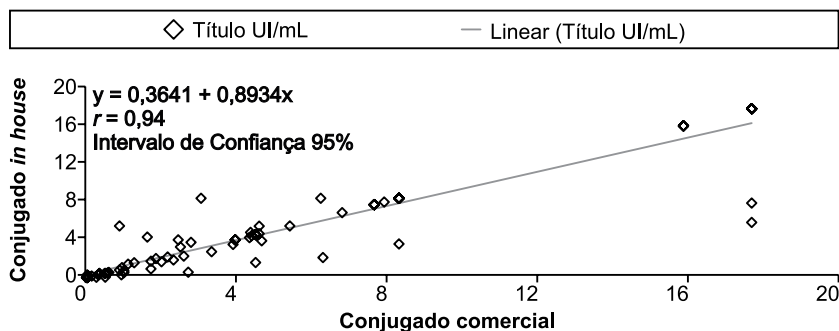


Figura 2. Correlação dos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos pela técnica de RFFIT com o conjugado produzido *in house* e o comercial.

Tabela 2. Análise da variância do modelo de regressão linear dos títulos de anticorpos neutralizantes para raiva, pela RFFIT¹, com o conjugado comercial e o produzido *in house*

| ANOVA ² | | | | | |
|--------------------|-----------------|----------------|------------------|-------|----------|
| Fonte | Soma quadrática | Grau liberdade | Média quadrática | F | <i>p</i> |
| Regressão | 2505,4 | 1 | 2505,4 | 622,4 | 0,0 |
| Residual | 354,2 | 88 | 4,0 | - | - |
| Total | 2859,7 | 89 | - | - | - |

¹Rápida inibição de focos fluorescentes.

²Análise da variância, variável dependente: título de anticorpos obtidos pela RFFIT com o conjugado *in house*.

Os resultados demonstraram a ótima qualidade do conjugado produzido *in house*, que poderia ser fornecido para um grande número de laboratórios. Além da qualidade, a diluição desse lote foi de 1/200 e a quantidade pode ser suficiente para que muitos exames sejam realizados com um único lote (Trimarchi & Debbie, 1974).

CONCLUSÃO

Em consequência do custo e da dificuldade de importação de conjugado antirrábico, tornou-se necessário produzir um conjugado *in house* com elevada especificidade e sensibilidade para os testes de sorologia antirrábica. No presente trabalho, a RIFFT adaptada em microplacas foi utilizada como técnica padrão para

serem comparados os conjugados *in house* e comercial, pelos resultados da titulação anticorpos antirrábicos de 91 soros de 34 indivíduos. O desempenho da RFFIT, adaptada a microplacas utilizando-se um conjugado produzido *in house*, foi tão eficiente quanto a técnica que utilizou o conjugado comercial.

Ficou demonstrada a boa qualidade do conjugado antirrábico *in house* produzido no IMMJVJ (Rio de Janeiro), o que sugere a possibilidade de seu uso na rotina laboratorial de titulação de anticorpos contra raiva em pessoas vacinadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à equipe da Seção de Virologia do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman, Rio de Janeiro, RJ, onde este trabalho foi realizado, e à Ms. Sheila de Matos Xavier.

ABSTRACT

Comparison of in house and commercial conjugates by rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) in rabies antibodies evaluation

Rabies is a lethal zoonosis that may be transmitted to man through virus inoculation, mainly by the bite of infected animals. In 2005, the Brazilian Ministry of Health spent about R\$ 66 millions in epidemiological surveillance actions, in order to carry out vaccination campaigns and acquisition of immunobiologicals. The serological evaluation is the basic requirement for surveillance of individuals vaccinated. Ninety one sera, from 34 vaccinees, were selected to evaluate the antibody titration by rapid fluorescent focus inhibition test adapted to 96-well microplates, to compare an in house produced conjugate and a commercial one. Seventy four sera (82.2%) had titers of ≥ 0.5 IU/mL and 12 sera (13.3%) had titers of < 0.5 IU/mL. These results showed that the rapid fluorescent focus inhibition test using the in house conjugate was as sensitive as the commercial one. The difference between the results using both conjugates was not significant; the antibody titers were highly correlated ($r = 0.94$).

KEY WORDS: Rabies virus. Serological tests. Rapid fluorescent focus inhibition test. Anti-rabies conjugate.

REFERÊNCIAS

1. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. *J Food Sci* 57: 629-634, 1992.
2. Atanasiu P. Quantitative assay and potency test of rabies serum and immunoglobulin. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, 1996. p.314-318.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Profilaxia

- da Raiva. *Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002. 54p.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Raiva Humana - *Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980 - 2005*. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva_2006.pdf. Acesso em 23/12/2006a.
 5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=25213. Acesso em 23/12/2006b.
 6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Zoonoses - Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. Boletim eletrônico epidemiológico 1: 1-17, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_epidemiologico_zoonoses_062009.pdf Acesso em 18/05/2010.
 7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Casos de raiva humana no Brasil, 1986-2010**. Disponível em: http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/canideos_felinos/Dados_de_raiva_humana_1986_2010.pdf. Acesso em 18/05/2010.
 8. Briggs DJ, Smith JS, Mueller FL, Schwenke J, Davis RD, Gordon CR, Schweitzer K, Orciari LA, Yager PA, Rupprecht CE. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals* 26: 347-355, 1998.
 9. Cliquet F, Aubert M, Sagne I. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralizing antibody. *J Immunol Methods* 212: 79-87, 1998.
 10. CNS. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 347, de 13 de janeiro de 2005. Regulamenta o armazenamento e a utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa. Brasília: Conselho Nacional de Saúde, 2005.
 11. Cortés MF, Yung VP, Roos KO, Rodríguez LA, Trujillo MR, Acevedo AA. Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida-Palacios (CRL) y de la vacuna antirrábica de cultivo celular (Verorab®) en personas con tratamiento preexposición. *Rev Med Chil* 132: 41-46, 2004.
 12. Fishbein DB, Yenne KM, Dreesen DW, Teplis CF, Mehta N, Briggs DJ. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: A nationwide prospective study. *Vaccine* 11: 1390-1394, 1993.
 13. François, MR. ed. *Rabies Prevention and Control in Florida*. Disponível em: <http://floridaanimalcontrol.org/resource/Rabies/PreventionandControl.pdf>. Acesso em 03/04/2006.
 14. Guillemain F, Tixier G, Soulebot JP, Chappuis G. Comparaison de deux méthodes de titrage des anticorps antirabiques neutralizants. *J Biol Stand* 9: 147-156, 1981a.
 15. Guillemain F, Tixier G, Soulebot JP, Chappuis G. Resultats compares des titrages des anticorps antirabiques par deux methodes utilisant l'immunofluorescence. *J Biol Stand* 9: 157-160, 1981b.
 16. Khawplod P, Inoue K-I, Shoji Y, Wilde H, Ubol S, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. A novel rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *J Virol Methods* 125: 35-40, 2005.
 17. Louie RE, Dobkin MB, Meyer P, Chin B, Roby RE, Hammar AH, Cabasso VJ. Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test with the rapid fluorescent focus inhibition test. *J Biol Stand* 3: 365-368, 1975.
 18. Medronho RA, Perez MA. Testes Diagnósticos. In Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL., *Epidemiologia*, Atheneu, Rio de Janeiro, 259-270, 2004.
 19. Moura WC, Gallina NM, Fuches RM, Romijn PC, Leite JP. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. *J Virol Methods* 54: 7-13, 2008.
 20. OPAS. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Unidad de Salud Pública Veterinaria. *Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas*. Vol. XXXII. Organización Pan-Americana da Saúde, Rio de Janeiro, 2001.
 21. OPAS. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Sistema de Informação Epidemiológica. *Raiva Humana 2008*. Disponível em: <http://siepi.panaftosa.org.br/Painel.aspx>. Acesso em 28/06/2008.

22. Pagano M, Gauvreau K. *Principios de bioestatística*. 2nd ed., Thompson, Brasil, 2004. 506 p.
23. Perrin P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4 ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 433-444.
24. Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of Coefficient of Variation in Assessing Variability of Quantitative Assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 1235-1239, 2002.
25. Rizzo LF. Imunoprofilaxia antirrábica humana com vacina de cérebro de ratón lactente usando esquemas reducidos de vacinação. *Rev Univer San Carlos* 11: 253-257, 1983.
26. Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis* 2: 327-343, 2002.
27. SMSDC. Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil. Subsecretaria de Promoção da Saúde, Atenção Primária e Vigilância em Saúde. Superintendência de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Gerência de Vigilância de Doenças e Agravos. Perfil do atendimento anti-rábico no Município do Rio de Janeiro. Seminário de Raiva Humana 2010. Disponível em: <http://www.sms.rio.rj.gov.br/coe/Apresenta%e7%f5es/Raiva%20Humana/Semin%e1rio%20de%20Raiva%20Humana%202010/perfil%20do%20atendimento%20anti-r%e1bico%20MRJ.pdf>. Acesso em 21/05/2010.
28. Simani S, Amirkhani A, Farahtaj F, Hooshmand B, Nadim A, Sharifian J, et al. Comparison of Three Serological Tests for Titration of Rabies Antibodies in Immunized Individuals. *Arch Iran Med* July 2: 125-127, 1999.
29. Smith JS. Rabies serology. In: Baer GM (ed) *The natural history of rabies*, 2nd edition, CRC Press, Boston, p.235-254, 1991.
30. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull World Health Organ* 48: 535-541, 1973.
31. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, *Laboratory techniques in rabies*, 4th ed., World Health Organization, Geneva, p. 181-192, 1996.
32. Tizard IR. *Immunology: an introduction*. 4th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia. 1995. 498 p.
33. Tordo N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H (eds) *Laboratory techniques in rabies*, 4th edition, World Health Organization, Geneva, p.28-51, 1996.
34. Trimarchi CV, Debbie JG. Production of rabies fluorescent conjugate by immunization of rabbits with purified rabies antigen. *Bull World Health Organ* 51: 447-449, 1974.
35. Trimarchi CV, Rudd RD, Safford Junior M. An in vitro virus neutralization test for rabies antibody. In Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed., World Health Organization, Geneva, p. 193-199. 1996.
36. Webster LT, Dawson JR. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc Soc Exp Biol Med* 32: 570-573, 1935.
37. WHO. Expert committee on rabies: eighth report. *Technical report series 824*. Geneva, WHO. 1992.
38. WHO. *Guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation*. Geneva, WHO. 1997.
39. WHO. Expert consultation on rabies: first report. *WHO Technical report series 931*. WHO, Geneva, 2004. p.121.
40. WHO. *Human and animal rabies; Rabies: A neglected zoonotic disease*. WHO, Geneva, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/>. Acesso em 23/03/2010.
41. WHO. *Weekly Epidemiological Record* 14(77): 109-120, Disponível em: <http://www.who.int/wer>. Acesso em 28/04/2010.
42. Wood RJ. Alternative ways of estimating serological titer reproducibility. *J Clin Microbiol* 13: 760-768, 1981.
43. Zalan E, Wilson C, Pukitis D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J Biol Stand* 7: 213-220, 1979.