

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE COLORAÇÃO DE SELLERS, IMUNOFLORESCÊNCIA DIRETA E INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS APLICADAS AO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA CANINA⁵

Pedro Manoel Leal GERMANO *
Omar MIGUEL **
Esther Luiza Bocatto CHAMELET ***
Luiza Terezinha M. de S. MORITA ***

RFMV-A/17

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, O.; CHAMELET, E.L.B.; MORITA, L.T.M.S. *Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 14(1):133-141, 1977.

RESUMO: *Procedeu-se ao estudo comparativo das técnicas de Coloração de Sellers, Imunofluorescência Direta e Inoculação em Camundongos, utilizadas na rotina de diagnóstico laboratorial da raiva e praticadas sobre 2.242 amostras de cérebro de cães, enviadas ao Instituto Pasteur de São Paulo durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976. As técnicas de Inoculação em Camundongos e de Imunofluorescência Direta foram as que apresentaram maior grau de Sensibilidade, sendo essa associação a que forneceu maior Concordância e valor significativo mais alto para o X^2 (Qui quadrado). A técnica de Coloração de Sellers foi a que apresentou menor grau de Sensibilidade e sua associação com as técnicas de Imunofluorescência Direta e de Inoculação em Camundongos forneceu resultados de Concordância e X^2 (Qui quadrado) inferiores aos obtidos pela associação destas duas técnicas.*

UNITERMOS: *Raiva, diagnóstico *; Coloração, técnica de Sellers *; Imunofluorescência *; Camundongos; Raiva, vírus; Inoculação.*

INTRODUÇÃO

Na epidemiologia da raiva urbana o cão representa a principal fonte de infecção para o homem^{2,7} sendo extraordinariamente grande em nosso meio o número de casos de exposição humana ao risco da infecção^{2,0}.

Poucas doenças causam tanta preocupação quanto a raiva; isto se aplica tanto aos indivíduos expostos, como às autoridades sanitárias responsáveis pela sua prevenção e controle⁸, razão esta que se prende ao fato da raiva ser quase sempre fatal^{3,10,24}

⁵ Tese apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública.

* Médico Veterinário. Chefe Substituto do Ambulatório do Serviço Médico Cirúrgico e Hospitalar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

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

*** Médica Veterinária. Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

O diagnóstico puramente clínico da doença é difícil, em razão da diversidade de sintomas que o animal infectado pode apresentar³⁰, além de que, muitas vezes é difícil estabelecer um diagnóstico diferencial preciso com outras enfermidades que também apresentam manifestações nervosas, tais como Cinomose, Hepatite Infecciosa Canina, Doença de Aujeszky e Toxoplasmose.

A utilização de técnicas laboratoriais sensíveis e específicas, permitem diagnosticar de modo claro e inequívoco a raiva, baseando-se sob os seus resultados a decisão de submeter ou não os indivíduos expostos a longos tratamentos, bem como a decisão de instituir medidas para o controle de uma epidemia numa comunidade^{8,14,22}. No entanto a instituição de medidas terapêuticas em indivíduos expostos como é recomendada pela Organização Mundial da Saúde³⁴, nunca deve aguardar os resultados do diagnóstico laboratorial, uma vez que o mesmo poderá ser demorado em função de várias razões e o tratamento precoce, tanto local como sistêmico pode ser um fator crítico para salvar a vida de um paciente⁸; portanto um diagnóstico laboratorial rápido e preciso é fator primordial para o tratamento e controle da raiva²². Em função dos resultados obtidos, suspender-se-á ou não o tratamento dos indivíduos expostos⁸.

Muitas são as técnicas laboratoriais descritas, aplicadas ao diagnóstico da raiva canina^{1,21,23}, porém, a utilização de qualquer uma delas deverá obedecer a três exigências fundamentais, quais sejam, sensibilidade, rapidez e especificidade⁷, o que nem sempre é possível reunir em uma mesma técnica. Desta forma, o que se utiliza na prática laboratorial é a associação de duas ou mais técnicas^{1,13,16,17,21,31,33}, onde estas exigências se complementam, aumentando a precisão de diagnóstico^{6,7,12,14}.

As associações mais frequentemente utilizadas nos laboratórios de diagnóstico da raiva são a Coloração de Sellers, a Imunofluorescência Direta e a Inoculação em camundongos^{17,18,19,26,30,34}. Os exames histopatológicos, em alguns laboratórios, são realizados em associação com as três técnicas precedentes^{13,14,31} ou então, em lugar da Coloração de Sellers^{1,4,6,7}. Também, a

técnica de coloração de Faraco tem sido utilizada, seja em associação com essas três técnicas²¹, seja em substituição à Coloração de Sellers²⁹. Outros preferem associar apenas a Imunofluorescência Direta com a Inoculação em Camundongos^{12,28}.

As discordâncias de resultados obtidos por diferentes técnicas sobre uma mesma amostra, observadas muitas vezes na prática de diagnóstico laboratorial não podem ser atribuídas somente à imprecisão das técnicas, mas também, em muito ao estado de conservação da amostra e em menor grau às reações individuais à doença, período de incubação e evolução seja para a morte natural ou sacrifício precoce³¹.

Diante destas considerações, propusemo-nos, no presente trabalho a estudar comparativamente a Sensibilidade e a Concorância das seguintes técnicas laboratoriais aplicadas ao diagnóstico da raiva canina: Coloração de Sellers, Imunofluorescência Direta e Inoculação em Camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1 Animais

1.1.1 Cães

Utilizamos amostras de cérebros coletados de 2.242 cães que foram submetidos às técnicas laboratoriais de diagnóstico da raiva, no Instituto Pasteur, da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

1.1.2. Camundongos

Foram utilizados camundongos albinos suíços, pertencentes à criação do Instituto Pasteur, da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, com 21 dias de idade e peso variando entre 12 e 15 g, distribuídos em lotes de 6 a 8 indivíduos, conforme a disponibilidade do laboratório para cada animal examinado.

1.2. Vírus

O vírus empregado constituiu-se de uma suspensão a 20% de cérebro de camundongos infectados com vírus rábico fixo amostra CVS (Challenge Virus Standard) com título superior a 10^5 .

1.3. Diluente

Para o preparo de suspensões de CVS e CN (Cérebro Normal) utilizamos água destilada estéril, contendo 2% de soro de equino normal, inativado convenientemente, adicionado 2,4 mg de cloridrato monohidratado de lincomicina por mililitro.

2. Métodos

2.1 Coloração de Sellers

A pesquisa de Corpúsculo de Negri utilizando-se a técnica de Coloração de Sellers foi realizada de acordo com as normas da Organização Mundial da Saúde³².

2.2. Imunofluorescência Direta

Realizada conforme a técnica preconizada por GOLDWASSER & KISSLING⁵, utilizando-se Fotomicroscópio binocular, marca Nikkon, modelo FL, com lâmpada Osram HBO 200, filtro excitador VO, filtros barreiras Emplý O e Wrathen 2B e condensador de campo escuro.

2.3. Inoculação em Camundongos

O teste biológico obedeceu à técnica descrita por KOPROWSKI⁹.

2.4. Método estatístico

Utilização do Teste de X^2 (Qui quadrado) ao nível de rejeição de 5%, segundo MARASCUILLO¹⁵.

RESULTADOS

Os resultados obtidos figuram nas Tabelas que se seguem:

TABELA 1 - Resultados obtidos com material coletado de animais da espécie canina submetidos às diferentes provas laboratoriais de diagnóstico da raiva, no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

| Resultados | | | Frequência | Porcentagem (%) |
|------------|--------|--------|------------|-----------------|
| S^- | IF^- | IN^- | 1.168 * | 52,10 |
| S^+ | IF^+ | IN^+ | 859 | 38,32 |
| S^- | IF^+ | IN^+ | 156 | 6,96 |
| S^- | IF^- | IN^+ | 51 | 2,27 |
| S^+ | IF^+ | IN^- | 6 | 0,27 |
| S^- | IF^+ | IN^* | 1 | 0,04 |
| S^+ | IF^- | IN^- | 1 | 0,04 |
| S^+ | IF^- | IN^+ | 0 | 0,00 |
| Total | | | 2.242 | 100,00 |

S = Coloração de Sellers

IF = Imunofluorescência Direta

IN = Inoculação em Camundongos

+ = Positivo

- = Negativo

* = Amostra enviada ao laboratório, conservada em formol, não tendo, por isso, sido submetida à prova.

TABELA 2 – Resultados dos exames laboratoriais para o diagnóstico da raiva, com material coletado de animais da espécie canina, segundo a técnica e respectiva sensibilidade, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

| Técnica | Resultados | Sensibilidade (%) |
|---------------------------|--------------|-------------------|
| Coloração de Sellers | 866/1074 | 80,63 |
| Imunofluorescência Direta | 1.022/1074 | 95,15 |
| Inoculação em Camundongos | 1.066/1073 * | 99,34 |

* Apenas uma amostra não pôde ser submetida à Inoculação em Camundongo, por ter sido enviada ao laboratório conservada em formol.

TABELA 3 – Resultados obtidos com as técnicas de Coloração de Sellers (S) e Imunofluorescência Direta (IF), para o diagnóstico laboratorial da raiva com material coletado de animais da espécie canina, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

| Coloração de Sellers / Imunofluorescência Direta | Positivos | Porcentagem (%) | Negativos | Porcentagem (%) | Total | Porcentagem (%) |
|--|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-------|-----------------|
| Positivos | 865 | 84,64 | 157 | 15,36 | 1.022 | 100,00 |
| Negativos | 1 | 0,08 | 1.219 | 99,92 | 1.220 | 100,00 |
| Total | 866 | — | 1.376 | — | 2.242 | — |

TABELA 4 – Resultados obtidos com as técnicas de Coloração de Sellers (S) e Inoculação em Camundongos (IN) para o diagnóstico laboratorial da raiva com material coletado de animais da espécie canina, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

| Coloração de Sellers / Inoculação em camundongos | Positivos | Porcentagem (%) | Negativos | Porcentagem (%) | Total | Porcentagem (%) |
|--|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-------|-----------------|
| Positivos | 859 | 80,58 | 207 | 19,42 | 1.066 | 100,00 |
| Negativos | 7 | 0,60 | 1.168 | 99,40 | 1.175 | 100,00 |
| Total | 866 | — | 1.375 | — | 2.241 | — |

TABELA 5 – Resultados obtidos com as técnicas de Imunofluorescência Direta (IF) e Inoculação em Camundongos (IN), para o diagnóstico laboratorial da raiva com material coletado de animais da espécie canina, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

| Imunofluorescência Direta / Inoculação em Camundongos | Positivos | Porcentagem (%) | Negativos | Porcentagem (%) | Total | Porcentagem (%) |
|---|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-------|-----------------|
| Positivos | 1.015 | 95,21 | 51 | 4,79 | 1.066 | 100,00 |
| Negativos | 6 | 0,51 | 1.169 | 99,49 | 1.175 | 100,00 |
| Total | 1.021 | – | 1.220 | – | 2.241 | – |

TABELA 6 – Resultados dos cálculos de Concordância, Coeficiente de Associação de Yule e Teste de X^2 (Qui quadrado), para as relações entre as diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial da raiva, realizadas no Instituto Pasteur de São Paulo, durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976.

| Resultados / Relações | Concordância (%) | Coeficiente de Associação de Yule | Valor de X^2 |
|-----------------------|------------------|-----------------------------------|----------------|
| S/IF | 92,95 | 0,99 | 1.675,48 |
| S/IN | 90,45 | 0,99 | 1.507,73 |
| IF/IN | 97,46 | 0,99 | 2.018,60 |

S = Coloração de Sellers

IF = Imunofluorescência Direta

IN = Inoculação em Camundongos

Para o nível de rejeição (α) \rightarrow de 5%, $X^2 \alpha = 3,84$

DISCUSSÃO

A TABELA 1 apresenta os resultados obtidos simultaneamente com as técnicas de Coloração de Sellers, Imunofluorescência Direta e Inoculação em Camundongos, realizadas em 2.242 amostras de cérebros de cães na rotina do laboratório de diagnóstico da raiva do Instituto Pasteur de São Paulo. Pela análise desta tabela, podemos observar que do total de amostras examinadas, 1.074 se revelaram positivas por uma ou mais técnicas; calculando-se o quociente entre o número de amostras positivas simultaneamente

com as três técnicas (859) e o número total de positivos, (1074) encontramos um valor igual a 79,98%.

A TABELA 2 mostra a Sensibilidade de cada uma das técnicas. Constatamos como mais sensível a técnica de Inoculação em Camundongos, seguida da de Imunofluorescência Direta e, com menor Sensibilidade, a de Coloração de Sellers.

AS TABELAS 3, 4 e 5 apresentam os resultados da comparação das técnicas de Coloração de Sellers com Imunofluorescência Direta, Coloração de Sellers com Inoculação em Camundongos e Imunofluorescência

Direta com Inoculação em Camundongos respectivamente. Com os resultados destas tabelas, construímos a TABELA 6, onde estão apresentados os resultados dos cálculos de Concordância das diferentes relações entre as técnicas, Coeficiente de Associação de Yule e Teste de Associação (X^2), realizado ao nível de rejeição de 5%. A análise desta última tabela nos mostra que a Concordância maior ocorreu com a relação Imunofluorescência Direta-Inoculação em Camundongos, seguida pela relação Coloração de Sellers-Imunofluorescência Direta e a menor Concordância foi registrada com relação Co-

locação de Sellers-Inoculação em Camundongos. O Coeficiente de Associação de Yule foi o mesmo para as três relações e o Teste de Associação forneceu valores de X^2 (Qui quadrado), que comparados ao valor de $X^2_{\alpha} = 3,84$, para o nível de rejeição de 5%, foram altamente significantes para as três relações citadas, sendo de maior intensidade para a relação Imunofluorescência Direta Inoculação em Camundongos, seguindo-se em ordem decrescente o valor do X^2 (Qui quadrado) para as relações Coloração de Sellers-Imunofluorescência Direta e Coloração de Sellers-Inoculação em Camundongos.

TABELA 7 — Resultados obtidos em amostras de cérebro de animais da espécie canina, submetidos às técnicas de Coloração de Sellers (S), Imunofluorescência Direta (IF) e Inoculação em Camundongos (IN), para diagnóstico da raiva, segundo diversos autores.

| Autor | Ano | Total de Amostras | Positivos | RESULTADOS | | | SENSIBILIDADE (%) | | |
|--------------|------|-------------------|-----------|----------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | | | Coloração de Sellers | Imunofluorescência Direta | Inoculação em camundongo | Coloração de Sellers | Imunofluorescência Direta | Inoculação em Camundongo |
| MCQUEEN | 1960 | 244 | 35 | 35/35 | 35/35 | 35/35 | 94,28 | 100,00 | 100,00 |
| PILO MORON | 1967 | 13 | 13 | 7/13 | 7/10 | 13/13 | 53,85 | 70,00 | 100,00 |
| RICHTER | 1969 | 34 | 19 | — | 19/19 | 19/19 | — | 100,00 | 100,00 |
| CAILLON | 1970 | 77 | 5 | — | 5/5 | 5/5 | — | 100,00 | 100,00 |
| MOGGIA | 1970 | 86 | 57 | 48/57 | 57/57 | 57/57 | 84,21 | 100,00 | 100,00 |
| LUCAS | 1971 | 295 | 15 | 9/11 | 16/17 | 12/17 | 81,82 | 70,60 | 94,12 |
| SUBRAHMANYAM | 1971 | 37 | 23 | 16/23 | 23/23 | 23/23 | 69,56 | 100,00 | 100,00 |
| SILVA | 1972 | 301 | 64 | — | 64/64 | 64/64 | — | 100,00 | 100,00 |

^s Valores calculados teoricamente a partir de dados fornecidos pelos diversos autores.

A TABELA 7 resume os resultados obtidos, por diferentes autores para as três técnicas realizadas sobre amostras de cérebros de cães coletados em diferentes laboratórios de diagnóstico da raiva. Sua análise nos mostra que o cálculo da Sensibilidade para a técnica de Coloração de Sellers variou muito de um autor para o outro. Para a técnica de Imunofluorescência Direta, verificou-se um acordo maior entre os diferentes

autores, embora dois deles apresentem valores bastante afastados dos demais. Os resultados para a técnica de Inoculação em Camundongos foram os que apresentaram maior concordância, embora um dos valores apresente uma pequena variação em relação aos outros, devendo-se ressaltar que todos os autores, excetuando-se SILVA²⁹, trabalharam com camundongos adultos. Acreditamos que, se tivessem sido utilizados camundon-

gos lactentes, em razão de sua maior suscetibilidade^{2,25}, esse valor ligeiramente discrepante, talvez não aparecesse; isto explica também o porque de nós não termos obtido Sensibilidade para a Inoculação em Camundongos, igual a 100%.

Ainda pela análise desta tabela, podemos observar que os resultados dos cálculos da Sensibilidade, quando comparados aos nossos dados apresentados na Tabela 2, estão bem próximos dos valores obtidos pelos diferentes autores à exceção da técnica de Coloração de Sellers, onde se registrou maior discrepância. Devemos, no entanto, considerar que o número de amostras por nós utilizadas para o cálculo desses valores foi muito superior às dos demais, o que justifica plenamente as discrepâncias observadas. Por esta razão, calculamos o valor da Sensibilidade de cada uma das técnicas utilizando as somas dos valores fornecidos por todos os autores, visto que, todos empregaram sempre as mesmas técnicas sobre amostras de cérebros de cães. Assim, obtivemos 81,30% de Sensibilidade para a Coloração de Sellers, 96,52% para a Imunofluorescência Direta e 99,50% para a Inoculação em Camundongos. Esses valores teóricos, assim calculados, se aproximam muito mais daqueles por nós obtidos, conforme a TABELA 2, que aqueles obtidos individualmente pelos autores, onde as varia-

ções foram maiores, principalmente, no que concerne à técnica de Coloração de Sellers.

CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, analisados e discutidos no presente trabalho, parece lícito concluir que:

- 1 — na rotina de diagnóstico laboratorial da raiva, deve-se sempre utilizar a associação de duas ou mais técnicas, para maior precisão dos resultados;
- 2 — a técnica de Coloração de Sellers, quando comparada com as de Imunofluorescência Direta e Inoculação em Camundongos é a que apresenta menor grau de Sensibilidade;
- 3 — a técnica de Imunofluorescência Direta, apresenta elevado grau de Sensibilidade e foi da sua associação com outras técnicas, Inoculação em Camundongos e Coloração de Sellers, que se obtiveram os maiores valores para as Concordâncias e os valores significantes mais altos para o X^2 (Qui quadrado).
- 4 — a técnica de Inoculação em Camundongos é a que apresenta maior grau de Sensibilidade e sua associação com a Imunofluorescência Direta é a que fornece maior Concordância e valor significativo mais alto para o X^2 (Qui quadrado).

RFMV-A/17

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, O.; CHAMELET, E.L.B.; MORITA, L.T.M.S. *Comparative study among Sellers staining direct immunofluorescence and mice inoculation techniques applied in the laboratory diagnosis of canines rabies.* Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo, 14(1):133-141, 1977.

SUMMARY: *A comparative study was made with three techniques: Sellers staining, direct immunofluorescence, and mice inoculation used in the laboratory of rabies diagnosis practice and applied on 2,242 samples of dog brains which were sent to the Pasteur Institute of São Paulo from January 1974 to April 1976. The mice inoculation and direct immunofluorescence techniques were the ones which presented higher degree of sensitivity; this association resulted in a greater rapport and a higher significative value for the X^2 (chi-square). The Sellers staining technique resulted in a lower degree of sensitivity, and its association with the direct immunofluorescence and mice inoculation techniques gave lower results of rapport and X^2 (chi-square) than those obtained by the association of the two latter techniques.*

UNITERMS: *Rabies, diagnosis *; Staining, Sellers' technique *; Immunofluorescence *; Mice inoculation.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ATANASIU, P.; GAMET, A.; GUILLO, J.C. Limites du diagnostic de la rage au laboratoire. *Rec. Méd. vét.*, 144(11):1083-8, 1968.
- 2 - BAGNAROLLI, R.A.; LARGHI, O.P.; MARCHEVSKY, N. Susceptibilidad de ratones lactantes y adultos al virus rabico demonstrada por inmunofluorescência. *Bol. Ofic sanit. panamer.*, 68(5):388-92, 1970.
- 3 - BELL, J.F. Abortive rabies infection: experimental production in white mice and general discussion. *J. infect. Dis.*, 114(3):249-57, 1964.
- 4 - CARSKI, T.R.; WILSNACK, R.E.; SIKES, R.K. Pathogenesis of rabies in wildlife. II. Fluorescent antibody studies. *Amer. J. vet. Res.*, 23(96):1048-52, 1962
- 5 - GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc Soc. exp. Biol.*, N.Y., 98(2):219,23, 1958
- 6 - GUILLO, J.C.; GAMET, A.; ATANASIU, P.; VALLÉE, A.; VIRAT, B. La rage dans l'est de la France. Enseignement tirés par le laboratoire. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 43(1):29-32, 1970.
- 7 - JOUBERT, L. & ANDRAL, L. Diagnostic biologique de la rage. *Bull. Soc. Sci. vét. Méd. comp. Lyon*, 76(1):37-46. 1974.
- 8 - KAPLAN, M.M. An assessment of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory techniques in rabies*. 3.ed., Geneva, 1973. p.19-25.
- 9 - KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory techniques in rabies*. 3.ed., Geneva, 1973. p.85-93.
- 10 - LODMELL, D.L.; BELL, J.F.; MOORE, G.J.; RAYMOND, G.H. Comparative study of abortive and nonabortive rabies in mice. *J. infect. Dis.*, 119(6):569-80, 1969.
- 11 - LOPEZ ROS, J. Técnicas actuales de detección de la rabia. *Gac. vet.*, B.Aires, 30(220):556-66, 1968.
- 12 - LUCAS, A.; CARNEIRO, R.; PICARD, M. Le diagnostic de la rage au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort en 1968. *Rec. Méd. vét.*, 145(4):353-60, 1969.
- 13 - LUCAS, A.; CARNEIRO, R.; PICARD, M.; COSTES, C.; LAHELLEC, M. Diagnostic de la rage. Observations faites au cours de l'examen de 1.000 prélèvements suspects. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 43(3):151-72, 1970.
- 14 - LUCAS, A.; CARNEIRO, R.; PICARD, M.; COSTES, C.; LAHELLEC, M. Sur le diagnostic experimental de la rage. Observation faites au cours de l'examen de 2.000 prélèvements suspects. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 44(7):317-38, 1971.
- 15 - MARASCULLO, L.A. *Statistical methods for behavioral science research*. New York, McGraw-Hill, 1971.
- 16 - MARTELL, D.M.A. & ALDASORO, M.A. Detección de virus rabico. *Bol. Ofic sanit. panamer.*, 73(2):117-23, 1972.
- 17 - MARTELL, D.M.A.; BATALLA, C.D.; BAER, J.M. Estudio de inmunofluorescencia de diferentes segmentos de encefalos de bovinos muertos de rabia paralitica e derriengue en forma natural e inoculados experimentalmente. *Téc. pecuár.*, Mexico, (12/13); 24-7, 1969.
- 18 - MCQUEEN, J.L. Rabies diagnosis: special application of fluorescent antibody techniques. In: MEETING OF THE UNITED STATES LIVESTOCK SANITARY ASSOCIATION, 63., San Francisco, 1959. *Proceedings*. p.356-63, apud *Vet. Bull.*, 30(11):625, 1960.
- 19 - MCQUEEN, J.L.; LEWIS, A.L.; SCHNEIDER, N.J. Rabies diagnosis by fluorescent antibody I. Its evaluation in a public health laboratory. *Amer. publ. Hlth.*, 50(11):1743-52, 1960.
- 20 - MIGUEL, O. Determinação da fração globulina "α 2" do soro sangüíneo de cães como elemento auxiliar no diag-

- nóstico precoce da raiva. São Paulo, 1972. (Tese de doutoramento - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP).
- 21 - MOGGIA, J.B. Estudio comparativo de metodos en el diagnostico de la rabia. *Rev. ecuac. Hig.*, 27(2):111-15, 1970.
- 22 - MOSELEY, B.L.; MOREHOUSE, L.G., KINTNER, L.D. Responses in dogs exposed to attenuated rabies virus. *Amer. vet. Res.*, 29(11):2113-18, 1968.
- 23 - NILSSON, M.R. Diagnostico de laboratorio da raiva. *An. Microbiol.*, Rio de Janeiro 16:11-23, 1969.
- 24 - NILSSON, M.R. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 68(6):486-94, 1970.
- 25 - NILSSON, M.R.; SUGAY, W.; PASQUALIN, O.L.; MUELLER, S.B.K. Rabies diagnosis. Comparative study on susceptibility of adult and suckling mice. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 35(2):43-7, 1968.
- 26 - PILO MORON, E.P.; VICENT, J.; SUREAU, P.; NÉEL, R. Diagnostic rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous-maxillaire aux sourceaux et par l'immunofluorescence. *Arch. Inst. Pasteur Algér.*, 45:5-10, 1967.
- 27 - RIBEIRO NETTO, A. & MACHADO, C.G. Alguns aspectos epidemiológicos da exposição humana ao risco da infecção pelo vírus da raiva, na cidade de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 12(1):16-30, 1970.
- 28 - RICHTER, F.; DEL AGUILA, C.; KUBES, V. Uso del metodo de inmunofluorescencia en el diagnostico de la rabia. *Zoonosis.* Buenos Ayres, 11(2):83-5, 1969.
- 29 - SILVA, R.A.; SILVA, N.M.; GUIMARÃES, R.S. Utilização do método de imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímicos e biológico no diagnóstico da raiva. *Pesq. agropec. bras., Sér. vet.*, 8(6):1-4, 1973.
- 30 - SUBRAHMANYAM, B. & PATHAK, R.C. Diagnosis of rabies in dogs. Comparative study on microscopic, biological and fluorescent antibody tests for diagnosis. *Indian vet. J.*, 48(2):123-7, 1971.
- 31 - SYKES-ANDRAL, M. & ANDRAL, L. Centre d'études sur la rage a Nancy Malzeville bilan de seize mois d'activité de la section du diagnostic. *Rev. méd. Vét.*, 37(4):435-48, 1974.
- 32 - TIERKEL, E.S. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation on specimens for biological test. 3.ed., In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory techniques in rabies.* Geneva, 1973. p.41-55.
- 33 - WILSNACK, R.E. & PARKER, R.L. Pathogenesis of skunk rabies virus: rabies inhibiting substance as related to rabies diagnosis. *Amer. J. vet. Res.*, 27(116):39-43, 1966.
- 34 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Rabies. 6.ed., Geneva, 1972. Report. Geneva, 1973. (Technical Report Series, 523).
Recebido para publicação em 19-4-77
Aprovado para publicação em 3-8-77