

VACINA ANTI-RÁBICA TIPO "FUENZALIDA" MODIFICADA

(Cinco anos de Produção e Observações)

Helio L. MARKUS ⁽¹⁾, Gilberto O. JOBIM ⁽²⁾ e Maria do Carmo Landell de MOURA ⁽³⁾

RESUMO

São apresentados os resultados, após 5 anos de produção e aplicação no homem, de uma vacina anti-rábica tipo "Fuenzalida" modificada, obtida de encéfalo de camundongos lactentes infetados por via cerebral com vírus fixo e inativado pela B-propiolactona.

a) Todas as 36 partidas, provadas mediante o teste de Habel, apresentaram índices de proteção que variavam de mais de 100.000 DL₅₀ a mais de 3.000.000 DL₅₀.

b) Não se registrou nenhum insucesso de vacinação entre as 53.715 pessoas que receberam 14 inoculações diárias de 1 ml por via subcutânea e doses de reforço no 10.º e 20.º dia após a série. Nenhuma destas pessoas recebeu soro anti-rábico.

c) Foram notificados três casos de acidentes pós-vacinais, todos de natureza leve.

d) Partidas experimentais de vacinas dessecadas com um diluente protetor à base de PBS, gelatina e sacarose, mantiveram-se estáveis à temperatura ambiente e a 5°C durante um período de, pelo menos, 4 anos e 5 meses.

e) Num estudo de vacinação preventiva, usando-se um esquema reduzido de 3-4 doses, verificou-se a formação de anticorpos contra o vírus da raiva em 100% dos 57 voluntários, já aos 30 dias após a primeira dose.

f) Os Autores concluem que se trata de uma vacina de alto poder antigênico, muito segura e de baixo custo, necessitando, tão somente, de uma purificação a fim de eliminar os riscos inerentes a todos os produtos biológicos produzidos *in vivo*.

INTRODUÇÃO

A vacina anti-rábica preparada com vírus fixo obtido de encéfalos de camundongos lactentes e inativada pela luz ultravioleta, introduzida em 1954 por FUENZALIDA & PALACIOS, em virtude de sua elevada potência antigênica, rendimento, baixo custo do método de elaboração e raramente causando

complicações neurológicas, vem sendo adotada pela maioria dos laboratórios oficiais e mesmo particulares da América Latina para a profilaxia da raiva humana ⁶.

O Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB) do Rio Grande do Sul, Brasil, responsável pela produção de vacina anti-rábica para uso

Trabalho realizado no IPB do Rio Grande do Sul, Brasil

- (1) Médico-Veterinário — Chefe dos Laboratórios de Produtos Biológicos do IPB e Prof. Titular de Histologia das Faculdades de Veterinária da UFRGS e Católica de Medicina de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
- (2) Médico-Veterinário — Laboratório de Raiva do IPB.
- (3) Farmacêutica — Laboratório de Raiva do IPB.

humano neste Estado, iniciou em julho de 1965, a fabricação de uma vacina tipo "Fuenzalida" porém inativada pela beta-propiolactona (BPL). Os resultados parciais obtidos com esta vacina, já foram publicados¹⁴.

O presente trabalho tem como objetivo apresentar as observações após 5 anos de produção e aplicação do citado produto no homem.

MATERIAL E MÉTODOS

Vacinas líquidas — As vacinas utilizadas, foram elaboradas segundo método já descrito¹⁴ e consistiam basicamente de uma suspensão a 2% de encéfalo de camundongo lactente inoculado por via cerebral com vírus fixo, em solução fisiológica, inativada pela BPL a 1:4.000 e adicionada de mertiolato a 1:10.000.

A partir de 1967, passou-se a usar uma suspensão de apenas 1% de substância encefálica.

Vacinas dessecadas — Experimentalmente, o IPB produziu algumas partidas de vacinas dessecadas. O método também já foi descrito anteriormente¹⁴ e consistiu basicamente na incorporação de um diluente protetor constituído de PBS a um pH de 7,2, sacarose e gelatina.

Dois partidas, a CL-6 liofilizada em 9.02.1966 e a CL-9 liofilizada em 14.06.1966, foram estocadas em diferentes condições de temperatura para avaliação de sua estabilidade. A primeira foi mantida a 5°C, 37°C e à temperatura ambiente e testada no próprio IPB. A partida CL-9, foi enviada ao Centro Panamericano de Zoonoses (OPS/OMS) para as provas de controle. O tipo da prova de potência utilizada foi o de Habel, sendo a vacina, após reconstituição com água destilada, diluída a 0,2% para a imunização dos camundongos.

Vacinação preventiva no homem com a vacina líquida do IPB

Cincoenta e sete voluntários, estudantes da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), fo-

ram divididos em 6 grupos, a fim de se estudarem as respostas sorológicas após a aplicação de diferentes esquemas de vacinação.

Grupo 1 — Consistiu de 18 indivíduos que receberam 4 doses de vacina, 1 ml, por via subcutânea, com inoculações nos dias 1, 2, 3 e 9.

Grupo 2 — Consistiu de 13 indivíduos, vacinados com 3 doses nos dias 1, 2 e 3.

Grupo 3 — Consistiu de 11 indivíduos, vacinados com 3 doses nos dias 1, 3 e 5.

Grupo 4 — Consistiu de 9 indivíduos, vacinados com 3 doses nos dias 1, 7 e 14.

Grupo 5 — Consistiu de 4 indivíduos, vacinados com 3 doses nos dias 1, 7 e 14 e uma dose de reforço no 45.º dia.

Grupo 6 — Consistiu de 12 indivíduos que receberam 4 doses de vacina nos dias 1, 3, 5 e 12.

Nenhum dos indivíduos tinha história de vacinação anti-rábica prévia. A partida da vacina usada foi a de n.º 27, após 5 meses de estocagem a 5°C e com uma potência antigênica, pelo teste de Habel, superior a 320.000 DL₅₀ ao ser liberada.

Soros — Amostras de sangue foram colhidas em torno do 30.º dia após a primeira dose de vacina de todos os pacientes com exceção do Grupo 5, dos quais foi retirada uma amostra somente no 60.º dia após a 1.ª dose. Após separação e inativação a 56°C durante 30 minutos, os soros foram estocados a -30°C até serem testados.

Soro-neutralização — Foi usada a técnica descrita em Laboratory Techniques in Rabies¹. Os soros dos grupos 2, 3, 4 e 5 foram diluídos de modo a obter-se, após a adição de partes iguais de vírus CVS, uma diluição de 1:2 (teste qualitativo). Com o soro de 5 indivíduos do Grupo 1, escolhidos ao acaso e de 5 indivíduos do Grupo 6, também tomados ao acaso, foi feita uma prova quantitativa, diluindo-se os soros de maneira a obter-se, após a adição de partes iguais de vírus CVS, diluições de 1:5 até 1:625. O vírus foi diluído de maneira a obterem-se no final 25 DL₅₀ teóricas.

RESULTADOS

Vacina líquida: a) Foram produzidas até o presente cerca de 860.000 doses de 1 ml de vacina líquida, num total de 36 partidas; b) Quanto à potência antigênica proporcionada por todas as partidas de vacina, quando provadas em camundongos mediante o teste de Habel apresentaram elas índices de proteção que variavam de mais de 100.000 DL₅₀ a mais de 3.000.000 DL₅₀; c) Submeteram-se ao tratamento anti-rábico com esta vacina até a presente data, 53.715 pessoas, que receberam 14 inoculações diárias de 1 ml por via subcutânea e doses de refôço no 10.º e 20.º dia após a série; d) Nenhuma dessas pessoas recebeu sôro anti-rábico; e) Não houve registro de nenhuma morte entre os indivíduos vacinados e que pudesse ser atribuída à uma falha de vacinação; f) Tomamos conhecimento de três casos de acidentes pós-vacinais de ordem neurológica e as curas, após tratamento, processaram-se sem seqüelas.

Vacinas dessecadas (teste de potência) — A partida CL-6, após sua liofilização, apresentou um índice de proteção no teste de Habel superior a 970.000 DL₅₀. O título do vírus CVS de confrontação dos camundongos vacinados foi de 10^{-6,94} DL₅₀, quando calculado pelo método de Reed e Muench.

Em 15.05.70, foi colhida ao acaso uma amostra da partida CL-6, mantida à temperatura ambiente, mostrando uma potência pelo teste de Habel superior a 1.600.000 DL₅₀. O título do vírus CVS usado para a agressão foi de 10^{-7,20} DL₅₀.

Em 12.06.70, foram colhidas ao acaso uma amostra da mesma vacina mantida a 5°C e a 37°C. Os índices de proteção observados no mesmo teste já indicado foram respectivamente de: superior a 320.000 DL₅₀ para a amostra mantida a 5°C e de 11.000 DL₅₀ para a amostra mantida a 37°C. O vírus CVS de confrontação tinha um título de 10^{-6,50} DL₅₀.

A partida CL-9, testada em 14.07.70 pelo Centro Panamericano de Zoonoses, conferia uma proteção superior a 3.091.000 DL₅₀ quando confrontados os camundongos vacinados com 10^{-7,49} DL₅₀ de vírus CVS.

Em comunicação posterior, recebida do mesmo Centro, mostrou que a mesma partida manteve seu título praticamente inalterado quando conservada na estufa a 37°C até 10 meses.

Vacinação preventiva — Na dosagem qualitativa efetuada com os soros dos indivíduos vacinados dos grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, verificou-se a presença de anticorpos neutralizantes contra o vírus rábico em todos os indivíduos de todos os grupos, isto é, em todos os 57 voluntários, com títulos iguais ou superiores a 1:2.

A dosagem quantitativa de 5 soros do Grupo 1, indicou:

I.M.S.	1:125
G.F. maior do que	1:625
L.A.R.	1:53
Z.J.M.	1:53
A.J.P.A.	1:53

Média: maior do que 1:181

A dosagem quantitativa de 5 soros do Grupo 6, mostrou:

R.K.	1:45
E.K. maior do que	1:625
Y.R.L.	1:270
Q.C.	1:125
C.M.O.	1:125

Média: maior do que 1:238

DISCUSSÃO

Os participantes do "1.º Seminário Internacional sobre Raiva para as Américas", realizado em setembro de 1967, na cidade de Buenos Aires, Argentina, no seu Informe Final, chegaram à seguinte conclusão com referência às vacinas para uso humano — "O consenso dos participantes é o de que no momento atual, a vacina que melhor cumpre com os requisitos de segurança, potência e baixo custo, é a vacina de camundongo lactente inativada com raios ultravioleta (Fuenzalida e Palacios). Espera-se que os métodos de purificação em desenvolvimento, permitirão reduzir ainda mais os possíveis riscos da mesma".

Segundo KAPLAN⁹, a seleção de um tipo particular de vacina para uso e produção muitas vezes oferece um dilema. Isto porém, pode ser facilmente resolvido se considerarmos que o principal objetivo da vacina anti-rábica é o de proteger contra a raiva. Todas as outras considerações são secundárias, embora o problema dos acidentes paralíticos, por exemplo, deva ser considerado como importante. Continua dizendo: "O primeiro princípio consiste em jamais admitir-se vacinas de baixa potência, em detrimento de outras virtudes como a estabilidade e ausência de fator paralítico. O laboratório deverá ter como alvo, produzir o maior conteúdo antigênico na menor quantidade possível de proteína estranha".

Ora, os resultados obtidos após 5 anos de produção e aplicação de vacina de camundongo lactente inativada pela BPL, permitem afirmar que esta preenche perfeitamente os requisitos de segurança, potência e baixo custo da vacina original de Fuenzalida e Palacios, além de constituir-se num produto do maior conteúdo antigênico aliado à menor quantidade de material estranho que se pode obter com vacinas não purificadas.

A beta-propiolactona (BPL) usada na vacina como agente inativante, já vem sendo usada desde 1956 na elaboração da vacina de ovo embrionado de pata¹¹ e como bem mostraram FAYET & col.⁴, trabalhando com vírus da febre aftosa, a BPL é agente destituído de qualquer risco pois não provoca qualquer reação no organismo que recebe a vacina, em virtude da substância química de inativação desaparecer totalmente do meio. Verificaram, ainda, estes Autores que a BPL não possui ação sobre o vírus já inativado, que a reação de inativação é irreversível e, finalmente, que a ação da substância parece exercer-se sobre o RNA do vírus.

GODOY, cit. p.⁶, em ensaios de vacinação realizados em voluntários do Centro Panamericano de Zoonoses, mediante o uso da vacina de Fuenzalida e Palacios e com esquemas reduzidos de 3-5 doses, verificou a formação de uma alta taxa de anticorpos em 100% dos indivíduos já aos 21 dias após a 1.^a dose de vacina.

Os estudos por nós realizados, com 57 voluntários, estudantes de Medicina-Veterinária,

embora ainda não completos, confirmam estes resultados, pois obtivemos resposta de anticorpos em 100% dos indivíduos vacinados, sendo que os títulos encontrados nos soros dos Grupos 1 e 6, foram semelhantes aos obtidos com a vacina usada por Godoy.

É necessário assinalar que estes resultados oferecidos por vacinas de encéfalo de camundongos lactentes na vacinação preventiva do homem, usando-se esquemas reduzidos e sem doses de reforço, não se obtiveram com outras vacinas para uso humano existentes no mercado¹⁶.

SELIMOV & col. cit. p.¹⁷ em 1959, relataram que as propriedades imunogênicas de vacinas fenoladas podiam ser preservadas pela liofilização. VEERARAGHAVEN & SUBRAMANYAN¹⁷ em 1961, verificaram que as vacinas contendo um aditivo de gelatina e sacarose em solução tamponada com fosfatos a um pH 7,2, quando liofilizadas, possuíam elevados valores antigênicos e retinham sua antigenicidade melhor do que as vacinas líquidas estocadas nas mesmas condições.

ATANASIU & col.², compararam três vacinas liofilizadas, com respeito à formação de anticorpos neutralizantes em cobaias. A primeira, era uma vacina tipo Fermi obtida de encéfalo de carneiro infetado. A segunda e a terceira foram elaboradas a partir de encéfalos de camundongos lactentes e inativadas pela beta-propiolactona. A última, foi liofilizada com um diluente protetor à base de gelatina e sacarose. Os Autores concluíram que esta se mostrou mais antigênica.

Como podemos notar, as vacinas experimentais dessecadas, elaboradas pelo IPB, são justamente vacinas do tipo das testadas pelos Autores acima citados, isto é, obtidas de encéfalo de camundongos lactentes infetados com vírus fixo, inativadas pela BPL e liofilizadas com um diluente protetor à base de PBS, sacarose e gelatina.

Quanto à estabilidade que apresentam as vacinas deste tipo, bem dizem os testes realizados, pois amostras estocadas em diferentes condições de temperatura, mostraram-se estáveis após um período de 4 anos e 5 meses, notando-se uma queda no título somente na amostra da vacina mantida a 37°C.

Já em 1947, KABAT & col., THOMAZ & col. e outros, *cits.* p. ¹⁴ provaram que as substâncias responsáveis pela encefalomielite alérgica experimental (EAE) e presumivelmente pelos acidentes pós-vacinais do homem, não existem no tecido nervoso de embriões ou mamíferos recém-nascidos.

SVET-MOLDAVSHIJ & col. *cits.* p. ¹³ em 1965, comprovaram que o encéfalo de camundongo lactente não possui o fator encefalitogênico antes dos 12 dias após o nascimento; enquanto que coelhos, carneiros e coibais já apresentam o fator dentro de 2 dias após o nascimento.

No atual estágio de conhecimento, sabe-se que este fator encefalitogênico é constituído pela mielina que é injetada juntamente com o antígeno desejado (vírus fixo inativado). É justamente por esta razão que surgiram as vacinas de ovo embrionado de pata e de Fuenzalida e Palacios, a primeira utilizando-se de embriões de aves e a última de encéfalo de camundongo lactente, ambas, teoricamente, livres de mielina no momento da sua utilização para a elaboração do produto imunizante.

GIBBS & col. ⁸, demonstraram ser a eletroencefalografia a maneira mais precisa e sensível de detectar as alterações neurológicas produzidas por um processo de auto-agressão, uma vez que a pessoa esteja sensibilizada pela mielina contida na vacina.

FRANCISCONI ⁵, utilizando o método de Gibbs, realizou um estudo em 21 pessoas vacinadas com a vacina do IPB; em uma delas, surgiu um foco paroxístico de descarga neuronal, revelado unicamente através do EEG de controle. Este achado, não pôde porém, ser considerado estatisticamente significativo.

Como poderíamos então explicar a notificação de três casos de acidentes pós-vacinais ocasionados pela nossa vacina?

Vejamos algumas considerações acerca da formação da mielina: "Na ontogênese a mielina aparece relativamente tarde, e o processo de mielinização somente se completa algum tempo após o nascimento. Em geral, os estudos pela microscopia eletrônica, sustentaram a interpretação da organização molecular da mielina, mostrando, além disso, que as camadas alternadas de diferentes lipí-

deos e proteínas, são de fato camadas sucessivas da membrana plasmática da célula de Schwann que se enrola em torno do axônio"³. Existe menos acordo geral sobre os mecanismos de formação da mielina no sistema nervoso central (SNC). A célula implicada neste processo é o oligodendrócito das células neurogliais características do SNC. Os estudos atuais com a microscopia eletrônica, sugerem que a mielinização central parece ser basicamente similar à periférica, o que implica num movimento de rotação dos processos gliais ao redor do axônio central¹⁵. Nas aves, a mielina também já se forma no embrião, pois GEREN ⁷, mediante um estudo pelo microscópio eletrônico, mostrou que em embriões de galinha de 14-15 dias de incubação, já se encontram 2-12 camadas de membrana plasmática da célula de Schwann enroladas ao redor do axônio de determinadas fibras nervosas, enquanto que em embriões de 18 dias já se encontravam até 24 camadas. Como se verifica, a chamada mielina, que na realidade é constituída por camadas de membrana plasmática da célula de Schwann ou do oligodendrócito, conforme se trate do sistema nervoso central ou sistema nervoso periférico, existe já no embrião e no animal recém-nascido, muito embora em escala menor do que no animal mais idoso. É lícito pois, afirmar-se que as complicações neurológicas devem ser muito raras com o emprego de vacinas do tipo de embrião de ave (vacina de ovo embrionado de pata) e de camundongo lactente, mas que, por outro lado, estes acidentes jamais poderão ser eliminados totalmente. Uma mielite dorso-lombar sofrida por um paciente tratado com vacina de embrião de pato¹² e os três casos de acidentes relacionados com a nossa vacina, servem para ilustrar o que acima dissemos. Além disso, como diz FRANCISCONI ⁵ é lícito esperar-se em indivíduos que acumulem as condições de antecedentes alérgicos e de grandes "reatores" aos antígenos da vacina, a apresentação de reações imuno-alérgicas reveladas, às vezes, unicamente num nível subclínico e detectada então somente através do EEG de controle.

Finalmente, a título de comparação, e para que possamos aquilatar o que representam três casos de acidentes pós-vacinais de natureza leve em 53.000 pessoas tratadas com 16

doses de vacina tipo Fuenzalida modificada, necessário se torna dizer que somente na cidade de Buenos Aires, Argentina, entre os anos de 1961 e 1963, antes de iniciar-se o uso da vacina de Fuenzalida e Palacios, se produziu, em média, uma morte devida a acidentes pós-vacinais, em cada 2.000 pessoas vacinadas¹⁰. É recomendável, entretanto, que se prossigam com os estudos já iniciados por SIKES & LARGHI¹³ no sentido da obtenção de um método que possa ser usado em escala industrial para a purificação das vacinas do tipo de encéfalo de camundongo lactente.

SUMMARY

Modified antirabies vaccine of the "Fuenzalida" type

The Authors report their main findings over a period of five years of human vaccination with a modified antirabies vaccine of the "Fuenzalida" type. Fixed virus was grown in suckling mouse brain and inactivated by B-propionolactone treatment. Habel's test has shown that the protection afforded by the 36 batches of vaccine ranged from over 100 000 DL₅₀ to more than 3 000 000 DL₅₀. Not a single case of unsuccessful vaccination has been reported amongst the 53 715 subjects vaccinated by subcutaneous route with 1 ml daily doses for 14 days, followed by a booster dose on the 10th and again on the 20th day following the 14 day-vaccination schedule. None of the patients had ever received antirabies serum. Three cases of post-vaccinal accidents occurred, all of them of a rather benign character. Experimental batches of desiccated vaccine added of a protective diluent of PBS, gelatine and sucrose retained their full potency both when kept at room temperature and at 5°C over a minimal period of 4 years and 5 months. In a study of prophylactic vaccination with a reduced scheme of 4 to 5 doses, specific neutralizing antibodies could be demonstrated in 100 per cent of 57 subjects, 30 days after the first vaccine.

The Authors conclude that the vaccine under consideration is of high antigenic potency, very reliable and of low cost. Its

further purification to eliminate the risks inherent to most biological therapeutics produced *in vivo*, is obviously desirable.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATANASIU, P. — Quantitative Assay and Potency Test of Antirabies Serum". In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Genebra, Organização Mundial de Saúde, 2.^a ed., pp. 167-172, 1966.
2. ATANASIU, P.; STASSINOPOULOS, I.; GAMET, A. & FAVRE, S. — Productions Comparée d'Anticorps Antirabiques Neutralisants Après Immunisation du Cobaye par Trois vaccins Lyophilisés Différents. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 116:827-832, 1969.
3. BLOOM, W. & FAWCETT, D. W. — *A Textbook of Histology*. Ninth ed., Philadelphia, W. B. Saunders, pp. 322 e 325, 1968.
4. FAYET, M. T.; PETERMANN, H. G.; FONTAINE, J.; TERRE, J. & ROUMIAN-TZEFF, M. — Utilization de la B-Propionolactone Comme Agent d'Inactivation Pour la Préparation de Vaccins Contre la Fièvre Aphteuse. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 112:65-76, 1967.
5. FRANCISCONI, C. R. M. — Contrôle electroencefalográfico da vacinação anti-rábica. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 67:486-492, 1969.
6. FUENZALIDA, E. — Estado Actual de Desarrollo de la Vacuna Antirrabica Preparada de Cerebros de Ratones Lactentes en Latinoamérica. In: *Primer Seminario Internacional Sobre Rabia Para Las Americas*. Centro Panamericano de Zoonoses (OPS/OMS). *Publicación Científica n.º 169*, pp. 276-281, 1967.
7. GEREN, B. B. — The formation from the Schwann cell surface of Myelin in the peripheral nerves of chick embryos. *Exp. Cell Res.* 7:558-562, 1954.
8. GIBBS, F. A.; GIBBS, E. L.; CARPENTER, P. R. & SPIES, H. W. — Comparison of rabies vaccines grown on duck embryo and on nervous tissues — An electroencephalographic study. *New Engl. J. Med.* 265:1002, 1961.
9. KAPLAN, M. M. — The Laboratory in the Diagnosis and Prevention of Rabies. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. 2.^a ed. Genebra, Organização Mundial de Saúde, pp. 14, 1967.
10. LARGHI, O. P. — Vacuna Antirrabica. Purificada. In: *Primer Seminario Internacional Sobre Rabia Para Las Americas*. Centro Panamericano de Zoonoses (OPS/OMS). *Publicación Científica n.º 169*, pp. 300-303, 1967.

MARKUS, H. L.; JOBIM, G. O. & MOURA, M. do C. L. de — Vacina anti-rábica tipo "Fuenzalida" modificada. (Cinco anos de produção e observações). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13: 114-120, 1971.

11. PECK, F. B.; POWELL, H. M. & CULBERTSON, C. G. — Duck-embryo rabies vaccine (Study of fixed virus vaccine grown in embryonated duck eggs killed with Beta-Propiolactone) (BPL). *JAMA* 8:1373-1376, 1956.
12. PRUSSIN, G. & KATABI, G. — DORSolumbar myelitis following antirabies vaccination with duck embryo vaccine. *Trop. Dis. Bull.* (London) 61:783, 1964.
13. SIKES, R. K. & LARGHI, O. P. — Purified rabies vaccine: Development and comparison of potency and safety with two human rabies vaccine. *J. Immun.* 99:545-553, 1967.
14. SILVA, N. N.; MARKUS, H. L. & PADILHA, A. A. — Vacina anti-rábica tipo "Fuenzalida" modificada. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 63: 223-226, 1967.
15. SINGER, M. & SALPETER, M. M. — Tejido Nervoso. In: *Histologia* — 2.^a ed. Roy O. Greep. Buenos Aires, El Ateneo, pp. 228, 1968.
16. SCHNURRENBERGER, P. R.; ANDERSON, G. R. & RUSSEL, J. H. — Rapidity and magnitude of antibody response to duck embryo rabies vaccine administered as a pre-exposure regimen. *Bull. W. H. O.* 37:547, 1967.
17. VEERARAGHAVEN, M. B. B. S. & SUBRAHMANYAN, M. Sc. — Antigenic value of phenolized antirabies vaccine. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 25:115-117, 1961.

Recebido para publicação em 19/8/1970.