

EVALUACION DE LA TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS PARA DETERMINAR LA POTENCIA ANTIGENICA DE LAS VACUNAS ANTIRRABICAS

Graciela MICELI (1), Jorge E. TORROBA (2) & Ana María DIAZ (2)

RESUMEN

El método recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la prueba de potencia de vacunas antirrábicas como producto final es la prueba NIH. Algunas técnicas *in vitro* se han propuesto para el control durante el proceso de producción y complementan el ensayo *in vivo* antes mencionado.

Este trabajo presenta los resultados obtenidos cuando se utilizó la técnica de contraimmunoelectroforesis (CIE) para determinar el contenido de antígenos en muestras de 84 y 40 lotes de vacunas antirrábicas producidas en tejido nervioso de cerebro de ratón lactante mediante cultivo de tejidos, respectivamente.

La evaluación de las muestras en, y en torno de, las 0.3 UI por ambos métodos muestran que, en la práctica, un título CIE de 1:4 cumpliría con un mínimo de potencia de la prueba NIH. Un bajo grado de variabilidad de la prueba CIE fue observada en nuestro laboratorio cuando dos lotes de vacunas de referencia de trabajo y 7 lotes de vacunas antirrábicas, de diferente origen y actividad, fueron ensayadas en cinco pruebas independientes. Todos los títulos se ubicaron dentro de una dilución doble, lo que es indicativo de su reproducibilidad.

Se observó buena sensibilidad para detectar el deterioro del antígeno en el ensayo de degradación térmica, cuando muestras de 3 lotes de vacuna líquida de cerebro de ratón lactante fueron mantenidas a 4 y 37°C cada una, por 28 días. Se evaluaron semanalmente por los ensayos de CIE y NIH. Finalmente, se observó que el ensayo de CIE podría ser utilizado por los productores para estimar el punto final de los procesos de concentración para que se corresponda con un valor antigénico deseado en la prueba de potencia NIH.

UNITERMOS: Rabia; Vacunas; Control de potencia "in vitro"

INTRODUCCION

El método que recomienda actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) para evaluar la potencia de las vacunas antirrábicas de uso humano y animal es la prueba de potencia en ratones desarrollada en los Institutos Nacionales de Salud de EUA, conocida como prueba NIH²². Requiere de un elevado número de

ratones y sus resultados presentan considerables variaciones, por ello se han desarrollado métodos alternativos *in vivo*, como las pruebas de unión antígeno-anticuerpo (UAA) y de inducción de anticuerpos (seroneutralización) e *in vitro*, como una prueba modificada de unión antígeno-anticuerpo, las técnicas de

⁽¹⁾ Cátedra de Inmunología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. 60 y 118 - (1900) La Plata - Buenos Aires - Argentina.

⁽²⁾ Instituto Panamericano para la Protección de Alimentos y Zoonosis (PAHO/WHO) - Talcahuano 1660 - (1640) Martínez - Buenos Aires - Argentina.

inmunodifusión radial (IDR), de ELISA y de contraimmunoelectroforesis (CIE)^{2,4,8,11,13,15,17}.

Los métodos *in vitro* se utilizan con fines experimentales en distintos laboratorios del mundo²⁷. Puesto que estas técnicas miden el contenido antigénico de las vacunas antirrábicas y no su inmunogenicidad, se las puede emplear con buenos resultados como pruebas de control durante el proceso de producción y para complementar la prueba *in vivo* NIH en la evaluación del producto final.

La prueba de contraimmunoelectroforesis para la serología de la rabia se empleaba en forma habitual tanto en el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) y actualmente en el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (OPS/OMS) como en varios países de América Latina. Este método ha sido adaptado para detectar los antígenos presentes en las vacunas antirrábicas. Cuando se evaluaron distintos tipos de estas vacunas, se comprobó una buena correlación entre los resultados obtenidos con las pruebas CIE y NIH^{6,8}.

En este trabajo se presentan nuevos datos referentes al título mínimo que deben tener las vacunas en la prueba de CIE para que cumplan con los requisitos de la prueba de potencia NIH; a la reproductibilidad de los resultados de la CIE y a las posibilidades de utilizar esta técnica para evaluar la estabilidad de las vacunas antirrábicas producidas en cerebro de ratón lactante (CRL) y en células BHK (BHK-PV-BEI), de uso muy difundido en América Latina y en la región del Caribe.

MATERIALES Y METODOS

Vacunas

Se preparó un lote de vacuna CRL liofilizada, que se inactivó con beta-propiolactona según el método ya descrito y se evaluó mediante la prueba de potencia NIH (DE50 promedio =1:64; Valor Antigénico =0.8 UI) y la técnica de CIE (título promedio =1:92, intervalo 1:64 - 1:128). Esta vacuna se empleó como referencia homóloga de trabajo (CRL-R) para evaluar las vacunas CRL⁷.

Se elaboró un lote de vacuna antirrábica BHK-PV-BEI liofilizada, la que se evaluó por la prueba de potencia NIH (promedio de la DE50 =1:14; Valor Antigénico =1.0 UI) y por la técnica de CIE (título promedio =1:6; intervalo 1:4 - 1:8). Esta vacuna se usó como referencia homóloga de trabajo (BHK-R) para evaluar las vacunas antirrábicas BHK¹⁸.

Se utilizaron muestras de 44 lotes de vacuna CRL a granel, 40 de vacuna CRL producto final, 40 de BHK-PV-BEI producto final, así como 7 muestras de un lote de vacuna antirrábica BHK-PV-BEI a diferentes niveles de concentración (5.0x, 10.0x, 20.0x, 40.0x, 80.0x, 160.0x). La mayoría de las muestras procedían de distintos laboratorios de países latinoamericanos y otras habían sido producidas en CEPANZO.

Antisueros

Se propagaron las cepas de virus rábicos estándar de desafío (CVS) y Pasteur (PV) en células BHK, las que se purificaron según la técnica de Schneider e inactivaron con beta-propiolactona²³. Se adsorbieron cada uno de estos antígenos con adjuvante completo de Freund y se inmunizaron conejos con una dosis de 1.0 ml administrada por vía intramuscular los días 0,3 y 6 (un total de tres dosis); transcurridos 7 días se les administraron dos dosis de refuerzo con un intervalo de una semana. Se tomaron muestras de suero y se determinaron los niveles de anticuerpos mediante la técnica de CIE (título promedio 1:1280) y la prueba de neutralización en ratón (título promedio 1:19 000)⁵.

Estos sueros hiperinmunes se utilizaron como indicadores en la prueba de CIE. Para determinar la dilución óptima que permitiría obtener una banda de precipitación nítida, se efectuó una titulación en bloque haciendo reaccionar diluciones de cada suero indicador (1:4; 1:6; 1:8; ..., 1:16; 1:18) con diluciones seriadas (1:2; 1:4; ..., 1:16; 1:32) de la vacuna de referencia homóloga. Las diluciones se prepararon con solución salina amortiguada con fosfatos (SAF) 0.01M (pH = 7.2).

Prueba de NIH

La prueba NIH se realizó según la técnica de Scligman²². Las DE50 de la vacuna de referencia y de la vacuna en estudio se calcularon con el método de Reed y Muench. Se utilizó la vacuna de referencia CPZ/26, DE50 promedio 1:53, Valor Antigénico: 0.8 UI.

Prueba de CIE

La prueba de CIE se efectuó de la siguiente manera: Se cubrieron láminas portaobjetos de 75 x 50 mm con 8 ml de agarosa al 0.9% (Seakem Biomedical, Rockland, Maine, EUA) en solución amortiguada con veronal 0.05M (pH =8.2), las que se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Seguidamente, se colocaron las láminas en cajas de Petri y se las mantuvo a 4°C durante 10 min.

En cada una de dos filas paralelas se marcaron, a

una distancia de 8mm, 5 cavidades de 3mm de diámetro. Las vacunas de cultivo celular se sometieron durante 30 min., a temperatura ambiente, a la acción de Emulphogene BC-720 en una relación vacuna/detergente 9:1, agitándola periódicamente para liberar la glicoproteína. Las vacunas CRL se concentraron con polietilenglicol (PEG 20.000) hasta una concentración final de tejido del 20%. Se trataron entonces con Tritón X-100 (diluído al 4% en SAF) en una relación vacuna/detergente 1:1 durante 2 horas a 56°C y luego se centrifugaron 10 min. a 17 000g. Se colocó la dilución óptima del suero indicador homólogo en las cavidades de la placa de agarosa correspondientes al ánodo de la cuba de electroforesis y se corrió durante 45 min. a 2mA por cada cm de lámina. Se retiró la agarosa de las cavidades correspondientes al cátodo y se las cargó con el sobrenadante de las vacunas diluido en SAF en una relación de 1:2 a 1:32 o más, según fue necesario. Se conectó nuevamente el paso de la corriente eléctrica durante un período adicional de 120 min. Los geles se mantuvieron sumergidos en solución salina amortiguada durante la noche, se lavaron dos horas en agua destilada y se colocaron sobre un soporte hidrofílico (Gel Bond Marine Collids Inc., Rockland, Maine, EUA) o sobre láminas de vidrio. Se cubrieron con papel de filtro húmedo y se secaron a 35°C bajo ventilación constante.

Una vez secas las láminas de gel, se tiñeron con Commassie Blue al 2% durante 10 min. La mayor dilución de la vacuna que produjo una banda de precipitación se consideró como el punto final de la reacción, o sea, el título de la vacuna por la técnica de CIE.

Reproducibilidad de la CIE

Para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos por la CIE, se estudiaron muestras de 7 lotes de vacunas antirrábicas de distinto origen y actividad, así como las dos vacunas de referencia (CRL-R y BHK-R) en 5 pruebas independientes.

Prueba de estabilidad

Se estudió la estabilidad de 3 lotes de vacuna antirrábica CRL líquida mediante la prueba de degradación térmica acelerada, de acuerdo con la recomendación del Comité de Expertos de la OMS en Estandarización de Biológicos²⁶. Se mantuvieron muestras de las vacunas a 4°C y 37°C durante 28 días. Se determinó semanalmente la potencia de las vacunas mediante las pruebas de NIH y CIE.

La disminución de la potencia de las vacunas

almacenadas a 37°C se evaluó mediante regresiones lineales.

Análisis de datos

Se analizaron los datos comparando las DE50 de las pruebas NIH con los títulos obtenidos por la CIE para cada tipo de vacuna a fin de determinar la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación. Sobre la base de los resultados obtenidos por la CIE se estimaron las DE50 que teóricamente hubieran tenido las vacunas en la prueba NIH, se las denominó DE50 estimadas (DE50-E)⁸.

La potencia relativa (RP) se calculó como la relación entre DE50-E de la vacuna en estudio y la DE50 de la vacuna homóloga de referencia determinada en la prueba NIH *in vivo*⁶.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan las ecuaciones de regresión lineal y los coeficientes de correlación que se obtuvieron al comparar la DE50 (prueba de NIH) con los títulos de la CIE correspondientes a las muestras de 84 lotes de vacuna antirrábica CRL y 40 lotes de vacuna antirrábica BHK-PV-BEI.

En la Tabla 2 se presentan las DE50-E y las PR de las vacunas antirrábicas CRL y BHK-PV-BEI, calculadas sobre la base de los resultados obtenidos por la prueba CIE. Se comprobó que existe una relación lineal satisfactoria entre los títulos de las vacunas determinado por CIE y las PR, como lo demuestra el ensayo estadístico de correlación entre las variables que resulta significativo a un nivel del 1%²⁴.

Se observó una mejor relación lineal para la regresión de los títulos de CIE vs. las PR que para las DE50 NIH (*in vivo*) vs. títulos de CIE de acuerdo al ensayo estadístico efectuado²⁴. Esto se cumplió para ambos tipos de vacunas.

TABLA 1
Regresiones lineales de los valores obtenidos cuando se controlaron 124 lotes de vacunas antirrábicas mediante las pruebas de potencia NIH y CIE.

Tipo de vacuna	Número de lotes	Regresión Lineal a + bx	Coefficiente de Correlación r
CRL	84	1.501 + 0.257 x	0.700 p<0.01
BHK-PV-BEI	40	1.571 + 0.396 x	0.861 p<0.01

TABLA 2

Dosis efectivas estimadas (DE50-E) y potencia relativa (PR) de las vacunas antirrábicas CRL BIK calculadas sobre la base de los resultados de la prueba de CIE

Títulos de CIE	Vacunas CRL		Vacunas BIK-PV-BEI	
	NIH DE50-E	Potencia Relativa (PR)	NIH DE50-E	Potencia # Relativa (PR)
1:2	1:16	0.2	1:24	0.4
1:4	1:28	0.4	1:49	0.7
1:8	1:43	0.7	1:85	1.3
1:16	1:65	1.0	1:160	2.5
1:32	1:98	1.5	-	-
1:64	1:148	2.3	-	-
Regresión título CIE vs. PR	y= 0.340 +0.032 x; r=0.983 p<0.01		y=0.100+0.150x; r=0.999 p<0.01	
Regresión DE50-NIH vs. CIE (*)	y= 1.505 +0.256 x; r=0.700 p<0.01		y= 1.571+0.396x; r=0.861 p<0.01	
DE50-NIH de vacuna CIE-R*	1:64		1:65	

Potencia Relativa (PR) : DE50-E vacuna en estudio /DE50-vacuna de CIE-R en la prueba NIH.

(*) Datos tomados del Cuadro 1.

* CIE-R: vacuna de referencia para la prueba de CIE.

En la Tabla 3 se observan los resultados de CIE obtenidos con muestras de 15 lotes de vacunas antirrábicas que no cumplieron los requisitos mínimos de la prueba NIH. La media geométrica de los títulos por CIE fue 1:3 y la desviación estándar 0.168.

La Tabla 4 muestra los resultados de las pruebas NIH y CIE correspondientes a una vacuna antirrábica BHK-PV-BEI concentrada entre 5 y 160 veces. La ecuación de regresión lineal fue $y = 0.825 + 1.173x$, $r = 0.936$ ($p < 0.01$).

En la Tabla 5 se muestra la variabilidad observada en los títulos de CIE obtenidos en 5 estudios

independientes. Todos los títulos se mantuvieron dentro de los límites de una dilución doble; la desviación estándar varió entre 0.000 y 0.300.

En las Figuras 1 y 2 se incluyen los resultados de degradación térmica acelerada correspondientes a la vacuna 3 cuando se la estudió mediante las pruebas de NIH y CIE. Las pendientes de estas rectas representan la velocidad de pérdida de actividad de la vacuna en función del tiempo cuando se mantuvieron a 4°C y 37°C, durante 4 semanas. En la Tabla 6 se muestran los valores de las pendientes de las rectas de regresión de los tres lotes de vacunas estudiadas y se incluyen los valores de la constante de degradación k que se obtiene al dividir la pendiente de la recta a 37°C por la pendiente de la recta a 4°C correspondientes a cada prueba - NIH o CIE

TABLA 3

Resultados de las pruebas de potencia NIH y CIE obtenidas cuando se controlaron quince lotes de vacunas antirrábicas cuyos valores antigenicos fueron inferiores a 0.3 UI.

	Pruebas de Potencia	
	DE50 en NIH	Título por CIE
Número de lotes	15	15
Media geométrica	1:13	1:3
Desviación estándar (DE)	0.186	0.168
Límites de 1 DE	1:10-1:19	1:2-1:4
Límites de 2 DE	1:6- 1:29	1:1-1:6

* En el grupo se incluyeron muestras de 10 lotes de vacuna antirrábica CRL y 5 de vacuna antirrábica BHK-PV-BEI.

TABLA 4

Resultados de las pruebas de potencia NIH y CIE obtenidos cuando se controlaron siete muestras de un lote de vacuna antirrábica BHK-PV-BEI a distintos niveles de concentración.

Parámetros de la prueba	Concentración de La Vacuna (x veces)					
	5	10	20	40	80	160
DE50-NIH	1:10	1:59	1:97	1:180	1:743	1:1380
Título CIE	1:2	1:8	1:16	1:32	1:32	1:64

$y = 0.825 + 1.173 x$; $r = 0.936$ $p < 0.01$

TABLA 5

Resultados de reproducibilidad de la técnica de CIE obtenidos cuando se controlaron nueve lotes de vacunas antirrábicas en cinco pruebas independientes.

Vacuna	Número de Pruebas	Títulos por CIE					Media Geométrica	DE *
		1	2	3	4	5		
CRL - 1	4	1:2	1:2	1:2	1:2	ND	1:2	0.000
CRL - 2	5	1:4	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2.4	0.151
CRL - 3	5	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:3	0.165
BHK-PV-BEI	5	1:8	1:16	1:16	1:8	1:4	1:9	0.252
CRL - 4	5	1:16	1:18	1:16	1:16	1:16	1:16.4	0.022
CRL - 5	5	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16	1:18	0.135
NIL ₂ -PM	5	1:512	1:512	1:512	1:512	1:256	1:377	0.300
CRL - R	5	1:128	1:128	1:256	1:128	1:128	1:122	0.026
BHK - R	5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:5	0.135

* DE : Desviación estándar (log 10)

- para una misma vacuna. Esta constante representa al aumento de la pérdida de actividad de la vacuna a 37°C con respecto a la temperatura óptima de almacenamiento (4°C). Para los tres lotes de vacunas los valores de k en la prueba de CIE fueron mayores o iguales a los correspondientes en la prueba NIH.

DISCUSION

Los datos obtenidos en este estudio confirman que la técnica de CIE es una prueba *in vitro* práctica y confiable para evaluar el contenido de antígeno de las vacunas antirrábicas de cerebro de ratón lactante y cultivo celular.

La concentración de antígenos en las vacunas antirrábicas se ha expresado de distintos modos según la prueba *in vitro* utilizada. Así, la DE50 se emplea para la prueba de unión antígeno-anticuerpo; el contenido de glicoproteínas (µg/ml) se calcula por la prueba de

inmunodifusión radial y la determinación de la potencia relativa mediante la técnica de líneas paralelas en la prueba de ELISA^{3,19,25}. En este estudio la determinación de la potencia relativa, descrita en materiales y métodos, mostró una correlación altamente significativa con el título de las vacunas según la CIE. Esto indicaría la viabilidad de emplear este tipo de operaciones matemáticas para relacionar pruebas *in vitro* e *in vivo*⁶.

La buena correlación entre las pruebas de CIE y NIH se podría atribuir al uso de vacunas de referencia y sueros indicadores homólogos, preparados con cepas virales presentes en las vacunas a controlar. Se ha demostrado que los reactivos heterólogos pueden afectar la potencia obtenida en algunas pruebas *in vitro*^{12,19}.

El Comité de Expertos de la OMS en Rabia recomendó en su Séptimo Informe que se adoptara el valor antigénico mínimo de 1.3 UI para las vacunas antirrábicas de CRL de uso humano y 1.0 UI para las

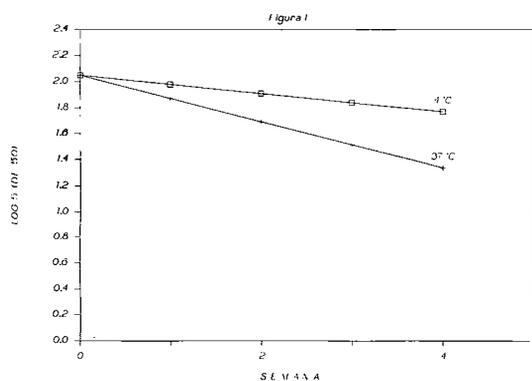


Fig. 1 - Ensayo de Degradación Térmica Acelerada Prueba NIH - Vacuna # 3

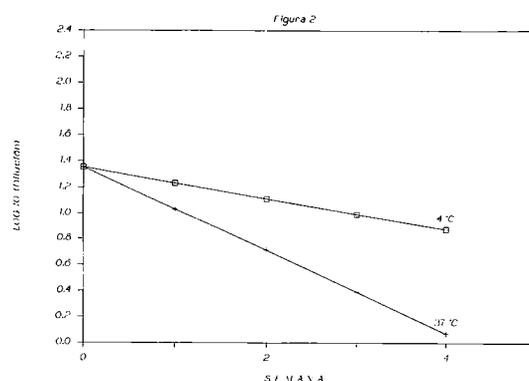


Fig. 2 - Ensayo de Degradación Térmica Acelerada Prueba CIE - Vacuna # 3

TABLA 6

Resultados de los Ensayos de Degradación Térmica de tres lotes de vacunas antirrábicas de Cerebro de Ratón Lactante. Regresión Lineal.

Vacunas	37° C		4° C		k	
	NIH	CIE	NIH	CIE	NIH	CIE
1	-0.379	-0.361	-0.262	-0.090	1.45	4.00
2	-0.558	-0.291	-0.341	-0.090	1.64	3.22
3	-0.178	-0.321	-0.070	-0.120	2.54	2.67

k: Cociente entre las pendientes de las rectas de regresión del Ensayo de Degradación Térmica a 37 y 4° C respectivamente.

vacunas de uso veterinario²⁰. Las autoridades nacionales de control de la mayoría de los países de América Latina y el Caribe utilizan la prueba de potencia de NIH y aún aceptan 0.3 UI como requisito mínimo de potencia para liberar las vacunas antirrábicas. La evaluación por las pruebas de CIE y NIH de 124 lotes con valores inferiores, idénticos o superiores a 0.3 UI demostró que las vacunas antirrábicas deberían tener como mínimo un título de 1:4 en la prueba de CIE para cumplir con el requisito de potencia de la prueba NIH. En este estudio las DE50-E calculadas sobre la base del título arriba mencionado oscilaron entre 1:20 y 1:39, valores semejantes a los que obtuvieron otros autores en la prueba NIH cuando evaluaron vacunas antirrábicas de distinto origen^{3,7,14}.

Se han utilizado diferentes métodos para producir vacunas antirrábicas concentradas en cultivo de tejido¹⁶. Nuestros resultados mostraron también que la prueba de potencia por CIE se puede utilizar con éxito para seguir el proceso de concentración de las vacunas y determinar un punto final que estuviera de acuerdo con el valor antigénico deseado en la prueba de potencia NIH, tal como lo sugiera BARTH et al. para la prueba de UAA modificada⁴.

En este trabajo, los títulos por CIE de las vacunas CRL, BIIK y CIE-R mostraron un bajo grado de variabilidad. Con la prueba de CIE se obtuvieron resultados más reproducibles que con la prueba de NIH, la que en nuestro laboratorio recientemente mostró un coeficiente de variación de 17,5%⁷.

La situación de la rabia en los países en desarrollo de las Américas y de otras partes del mundo hace que sea necesario disponer de vacunas estables, puesto que 94.2% de todos los tratamientos se administran en regiones de clima tropical¹.

Para demostrar la estabilidad de las vacunas antirrábicas liofilizadas la Organización Mundial de la Salud recomienda utilizar una prueba de degradación térmica acelerada²⁶. Tanto la vacuna CRL con un 2-3% de humedad residual, como distintos tipos de vacunas en cultivo de tejido conservaron, en estado liofilizado, su potencia antigénica a 37°C durante 24 meses y aun más. Sin embargo, por su menor costo, las vacunas líquidas siguen siendo ampliamente utilizadas a pesar de que a 4°C la potencia tiende a disminuir lentamente en el curso de su vida útil y a temperaturas más altas declina con rapidez^{9,21,25}.

La técnica de CIE así como otras pruebas *in vitro* ya mencionadas poseen sensibilidad suficiente para detectar el deterioro de los antígenos de las vacunas en pruebas de degradación térmica acelerada^{10,25}. Los datos de este trabajo demostraron que la prueba CIE tiene igual o mayor sensibilidad que la prueba de Potencia *in vivo* (NIH) para el estudio de la estabilidad de las vacunas antirrábicas líquidas de distinto origen.

Los resultados generales aquí presentados indican que la CIE es un método adecuado para el control de calidad durante el proceso de elaboración de distintos tipos de vacunas antirrábicas inactivadas.

SUMMARY

Evaluation of the Counterimmunoelectrophoresis technique to determine the antigenic potency of antirrabid vaccines

The method recommended by the World Health Organization (WHO) for the potency assay of human and animal rabies vaccines as final product is the NIH test. Some *in vitro* techniques have been proposed for in process testing and supplement the *in vivo* test mentioned above.

This paper presents the results obtained when using a counterimmunoelectrophoresis (CIE) techniques to determine the antigens content in samples of 84 and 40 samples of lots of suckling mouse rabies and tissue culture rabies vaccines, respectively.

The evaluation of rabies vaccines under, at, near and up to 0.3 UI by the NIH and CIE tests showed that for practical use, a CIE titer of 1:4 would match the minimum of NIH potency test requirement. Low degree of CIE test variability within our laboratory was observed, when two working reference and 7 lots of

rabies vaccines from different origin and activity were tested in five independent assays. All titres fell within one double dilution what is an indication of its reproducibility.

Good sensitivity to detect antigen deterioration in thermal degradation test was observed when samples of 3 lots of liquid suckling mouse rabies vaccine were held stored at 4°C or at 37°C for 4 weeks and assays by CIE and NIH tests. Finally, CIE test could apply by manufactures to follow the concentration procedures to determine the final end point which could match a desired antigenic value in the NIH potency test.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Isabel N. de Kantor sus valiosas sugerencias en la preparación de este manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ACHA, P.N. & ARAMBULO, P.V. - Rabies in the tropics. History and current status. In: KUWERT, E., ed. *Rabies in the tropics*. Berlin, Springer Verlag, 1984. p. 343-359.
2. ARKO, R.J.; WIKTOR, T.J. & SIKES, R.K. - The antibody binding test for vaccine potency. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H., ed. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, World Health Organization, 1973. p. 292-294.
3. BARTH, R.; GROSS-ALBENHAUSEN, E.; JAEGER, O. & MILCKE, L. - The antibody-binding test, a useful method for quantitative determination of inactivated rabies virus antigen. *J. Biol. Stand.*, 9: 81-89, 1981.
4. BARTH, R.; GRUSCHKAN, H.; JAEGER, O. & MILCKE, L. - Concentration of rabies antigen and potency test. In: KUWERT, E.K.; WIKTOR, T.J. & KOPROWSKI, H., ed. *Cell culture rabies vaccines and their protective effect in man*. Geneva, International Green Cross, 1981. p. 60-63.
5. DIAZ, A.M.O. - Rabies neutralizing antibodies determination by the modified counterimmunoelectrophoresis test and the rapid fluorescent focus inhibition test. *Zbl. Bakt. Hyg. A.*, 256: 1-6, 1983.
6. DIAZ, A.M.O. - The counterimmunoelectrophoresis techniques for "in vitro" detection of antigens in rabies vaccines. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H., ed. *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed. Geneva, World Health Organization, 1992. (In press).
7. DIAZ, A.M.O.; ASSAD MILLER, R.; CORTES, M.A.; DELLEPIANE, N.; ELBERGER, D.; FABREGA, F.; MICELI, G.S.; MENDOZA, G.; OBARRIO, M.E.; OCHOA, M.T.; BECCO, O. & PERDOMO, G. - Rabies reference vaccine for use as regional standard for Latin America and the Caribbean Countries. *Biologicals*, 18: 281-287, 1990.
8. DIAZ, A.M.O.; NEBEL, A.E. & MICELI, G.S. - A counterimmunoelectrophoresis technique for in vitro detection of antigens in rabies vaccines. In: THRAENHART, O.; KOPROWSKI, H.; BOGEL, K. & SUREAU, P., ed. *Progress in rabies control*. England, Wells Medical, 1989. p. 305-310.
9. DIAZ, A.M.O.; PERDOMO, G. & BECCO, O. - Estabilidad de la vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante almacenada a distintas temperaturas. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 104: 261-271, 1988.
10. FERGUSON, M.; SEAGROATT, V. & SCHILD, G.C. - Single radial immunodiffusion assays for the standardization of the antigenic content of rabies vaccines. *Develop. Biol. Stand.*, 64: 81-86, 1986.
11. FERGUSON, M. & SCHILD, G.C. - A single-radial-immunodiffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: application for potency tests of vaccines against rabies. *J. gen. Virol.*, 59: 197-201, 1982.
12. FERGUSON, M.; WAXHIMANN, B.; NEEDY, C.F. & FITZGERALD, E.A. - The effect of strain difference on the assay of rabies virus glycoprotein by single radial immunodiffusion. *J. Biol. Stand.*, 5: 73-77, 1987.
13. FITZGERALD, E.A.; GALLAGHER, M.; HUNTER, W.S. & SELIGMAN Jr., E.B. - Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. In: HENNESSEN, W. & REGAMEY, R.H., ed. *Developments in biological standardization*. Basel, Karger, 1978. v.40, p. 183-186.
14. FITZGERALD, E.A.; GREEN, O.L. & SELIGMAN Jr., E.B. - Rabies vaccine potency testing: a comparison between the antibody binding test and the NIH test. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.*, 21: 300-307, 1974.
15. FITZGERALD, E.A. & NEEDY, C.F. - Use of the single-radial-immunodiffusion test as a replacement for the NIH mouse potency test for rabies vaccines. In: IABS SYMPOSIUM ON REDUCTION OF ANIMAL USAGE IN THE DEVELOPMENT AND CONTROL OF BIOLOGICAL PRODUCTS. London, 24-26 April 1985. *Develop. Biol. Stand.*, 64: 73-97, 1986.
16. KUWERT, E.K.; WERNER, J.; MARCUS, I. & SCHEIERMANN, N. - Introductory remarks: stumbles and heaps in rabies vaccination of man with special regard to the F.R. Germany. In: KUWERT, E.K.; WIKTOR, T.J. & KOPROWSKI, H., ed. *Cell culture rabies vaccines and their protective effect in man*. Geneva, International Green Cross, 1981. p. 31-51.
17. LAFON, M.; PERRIN, P. & SUREAU, P. - Enzyme-immunoassays (EIA) for potency control of rabies vaccines. In: THRAENHART, G.; KOPROWSKI, H.; BOGEL, K. & SUREAU, P., ed. *Progress in rabies control*. England, Wells Medical, 1989. p. 315-319.
18. LARGHII, O.P. & NEBEL, A.E. - Rabies virus inactivation by binary ethylenimine: new method for inactivated vaccine production. *J. clin. Microbiol.*, 11: 120-122, 1980.
19. MAYNER, R.E. & NEEDY, C.F. - Evaluation of the single radial immunodiffusion assay for measuring the glycoprotein content of rabies vaccines. *J. Biol. Stand.*, 15: 1-10, 1987.
20. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité de Expertos de la OMS en Rabia. 7º Informe. Ginebra, 1984. *Org. Mund. Salud Ser. Inf. Técn.*, (709), 1984.
21. ROUMIANTZEFF, M.; AJAN, N.; BRANCHE, R.; FOURNIER, P.; MONTAGNON, B.; TROTEMANN, P. & VINCENT-FALQUET,

- J.C. - Rabies vaccine produced in cell culture: production, control and clinical results. In: KURSTAK, E., ed. *Applied virology*. New York, Academic Press, 1984. p. 241-296.
22. SELIGMAN, E.B. - The NIH test for potency. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H., ed. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, World Health Organization, 1973. p. 279-286.
23. SCHNEIDER, L. - Aluminium phosphate method for rabies virus purification. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H., ed. *Laboratory techniques in rabies*. 3. ed. Geneva, World Health Organization, 1973. v. 1b, p. 179-181.
24. SPIEGEL, M.R. - Teoría de la correlación. In: SPIEGEL, M.R., ed. *Estadística*. 5. ed. México, Mc Graw-Hill, 1969. p. 247-264.
25. THRAENIART, O. & RAMAKRISHNAN, K. - Standardization of an enzymed immunoassay for the in vitro potency assay of inactivated tissue cultures rabies vaccines: determination of the rabies virus glycoprotein with polyclonal antisera. *J. Biol. Stand.*, 17: 291-309, 1989.
26. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-first Report, 1981. *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.*, (658), 1981.
27. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Report on the inventory of techniques for potency testing of rabies vaccines. Geneva, 1991.
- Recebido para publicação em 01/12/1992
Aceito para publicação em 22/07/1993