PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

A Evolução das vacinas anti-rábicas na Medicina Veterinária

João Marcelo Azevedo de Paula Antunes¹, Susan Dora Allendorf², Camila Michele Appolinário², Marina Gea Peres³, Acácia Ferreira Vicente³, Clóvis Reynaldo Silva Fonseca⁴, Larissa de Castro Demoner² e Jane Megid⁵

¹Médico Veterinário, Ph.D.

²Médicas Veterinárias, M.Sc.

³Médicas Veterinárias

⁴Técnico de Laboratório

⁵Ph.D. Professora Titular Doenças Infecciosas UNESP - Botucatu e autora para correspondência

Resumo

A raiva é uma doença zoonótica que se caracteriza por encefalite progressiva de caráter fatal, encontrada mundialmente, com exceção da Antártica. Poucas doenças, como a raiva, têm sido objeto de tantas tentativas terapêuticas visando a cura. A vacinação é considerada o método mais eficiente para o controle e prevenção das doenças infecciosas no homem e nos animais. O objetivo deste trabalho foi demonstrar o crescente desenvolvimento das vacinas antirrábicas na Veterinária.

Palavras-chave: Raiva; vacina; animais.

The Evolution of anti-rabies vaccines in veterinary medicine

Abstract

Rabies is a zoonotic disease that is characterized by progressive character fatal encephalitis, found worldwide, except Antarctica. Few diseases such as rabies, have been the subject of many therapeutic attempts aimed at cure. Vaccination is considered the most efficient method for the control and prevention of infectious diseases in humans and animals. The objective of this study was to demonstrate the increasing development of rabies vaccines in Veterinary.

Keywords: Rabies, vaccine; animals.

1 Introdução

Entre as doenças que fascinam continuamente a humanidade, a raiva ocupa uma posição privilegiada, que se mantém da antigüidade até os tempos atuais. O medo excepcional da raiva é um fenômeno histórico, que não se justifica atualmente por sua incidência ou por sua letalidade, mas se explica, nas áreas onde a enfermidade é freqüente, pela imagem do animal com raiva furiosa preparado a morder qualquer objeto ou pessoa em seu caminho. Esta imagem é reforçada pela descrição do desenvolvimento de fúria, pânico e terror em vítimas humanas que apresentam manifestações clínicas da enfermidade (Tsiang, 1993).

A raiva é uma doença zoonótica que se caracteriza por encefalite progressiva de caráter fatal, encontrada mundialmente, com exceção da Antártica. Seu agente etiológico é um RNA vírus (genótipo 1), da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, que acomete todos os mamíferos, sendo os carnívoros os mais atingidos (Cleaveland et al. 2006; Kuzmin et al. 2006; Nel, 2005). Poucas doenças, como a raiva, têm sido objeto de tantas tentativas terapêuticas visando a cura. Mais de um século, porém, após o sucesso obtido por Pasteur

(1822-1895) no tratamento pós-expositivo da raiva, (Luttkicken et al. 2007) é estimado que a raiva cause 55.000 mortes em todo o mundo (WHO, 2008).

A vacinação tem sido considerada nos últimos 100 anos o método mais eficiente para o controle das doenças infecciosas no homem e nos animais (Hagiwara & Megid, 2004). As primeiras vacinas veterinárias foram desenvolvidas por Louis Pasteur em 1880, após o estabelecimento do processo vacinal de Jenner (1798). Já em 1923, Gaston Ramon, descobriu o princípio de fabricação de anatoxinas e adjuvantes. O objetivo das vacinas é reduzir perdas econômicas, produzir anticorpos e células de memória, bem como não transmitir a doença propriamente dita (Hagiwara & Megid, 2004). A vacinação de animais é relativamente fácil, o que ajuda a manter o bem-estar animal, a prevenir surtos de doenças em humanos e animais (Morton, 2007), e controlar diversas zoonoses como a Raiva (McCallum & Hocking, 2005). Atualmente 75% das doenças infecciosas reemergentes são consideradas zoonoses, o que caracteriza a importância da vacinação para o controle destas enfermidades em animais (Luttkicken et al. 2007). . O desenvolvimento de estratégias de vacinação contra doenças zoonóticas necessita uma colaboração entre vacinologistas que associando os progressos da Biologia Molecular e da Imunologia possam desenvolver vacinas específicas (Luttkicken et al. 2007). Segundo Bunn (1991) a vacinação dos animais é a forma mais efetiva para a redução de casos de raiva em humanos.

2 As origens da vacinação na veterinária

Tanto a vacinação humana como a veterinária tiveram certamente a mesma fonte de inspiração, que foi nos procedimentos empíricos tradicionais, onde os fazendeiros usavam fluídos de animais doentes para protegerem seus rebanhos (Lombard et al. 2007).

Já em 1853, o médico belga Willems inoculava material infectado em animais, o que levou estes estudos a serem cruciais para a vacinologia contemporânea. O melhor exemplo documentado entre vacinação humana e animal certamente

é a história das sucessivas vacinas contra a varíola. Edward Jenner (1749-1823), um médico inglês através da técnica de variolação inoculava material de varíola bovina em humanos em 1798, o que levou o procedimento de vacinação de Jenner no início do século 19 a se disseminar rapidamente ao redor do mundo. Porém esta vacinação realizada a partir de animais encontrou problemas socio-culturais, como por exemplo na Índia onde os bovinos são sagrados (Bhattacharya & Jackson, 2005).

3 As vacinas veterinárias na era Pasteuriana

Nas origens da vacinação moderna é inevitável de se confrontar com Louis Pasteur (1822-1895) (**Figura 1**), que obtinha informações com práticos veterinários, agrônomos, fazendeiros e pastores de rebanho para obter subsídios para suas pesquisas, que se iniciaram em 1880 com as vacinas rábicas (Geison, 1996). Em 1881, num discurso para Academia Francesa de Ciência, ele introduziu o termo "*virus-vaccin*" (sinônimo de micróbio atenuado), que ele mesmo abreviou para "*vaccin*". Na Escola de Veterinária em Lyon, Jean-Baptiste Chauveau (1825-1917) e Edmond Nocard (1850-1903), levaram Henri Bouley (1814-1885), diretor da Escola de Veterinária de Maisons-Alfort em 1877 que mantinha correspondência com Louis Pasteur a escreverem os aspectos da "*vaccination*" para humanos e animais (Nicol, 1974). A palavra "*vaccine*" entrou em uso na comunidade científica internacional por volta de 1880 e, anteriormente a esta data, no dicionário francês. Então com a importância desta enfermidade, Louis Pasteur, em 1879 deixou de lado a cólera aviária, anthrax, e a erisipela suína para se concentrar numa rara e invariável doença fatal, a raiva (Lombard et al. 2007).

4 História da vacinação contra a Raiva

O alicerce da ciência Pasteuriana foi a vacina contra raiva, onde a presença dos veterinários foi crucial. Os veterinários monitoravam a doença procurando lesões "*post-mortem*" em cães suspeitos de morderem humanos. Foi o veterinário Pierre-Victor Galtier (1846-1908), em 1879, um pupilo de

Chauveau da Escola de Veterinária de Lyon que demonstrou que a raiva causava uma lesão de sistema nervoso, com período de incubação variável; este mesmo veterinário também teve a idéia de substituir os cães pelos camundongos nos laboratórios (Lombard et al. 2007). Em 1881 e 1882, Louis Pasteur e seus pupilos Charles Chamberland, Emile Roux and Louis Thuillier modificaram a técnica de Galtier pela inoculação de material rábico de sistema nervoso de cães em sucessivas passagens em outros cachorros. Após esta passagem era necessário atenuar o vírus em coelhos, o que foi feito por Roux (Lombard et al. 2007) e em seguida selecionado o vírus mais atenuado para ser utilizado na vacina (Théodoridès, 1986).

Figura 1- Louis Pasteur (1822-1895) em 1865

Pasteur, então, percebeu que inoculações seriais intracerebrais em macacos com vírus rábico canino, aumentava o período de incubação, enquanto que a virulência diminuía (Bunn, 1991). Assim Pasteur começou a testar inoculações em cães, para verificar se estes poderiam então ficar expostos ao vírus das ruas. Estes protocolos que Pasteur, em 6 de julho de 1885, inoculou em Joseph Meister (21/02/1876-16/06/1940) que foi a primeira pessoa a ser inoculada e tratada com o vírus da raiva. Em 1885, o garoto de nove anos de idade, Meister foi mordido por um cão raivoso e Pauster decidiu tratar o menino com vírus rábico crescido e atenuado em coelhos. O tratamento foi um

sucesso e o garoto não desenvolveu a doença. O menino então se tornou um garoto propaganada para o Instituto Pasteur(Bunn, 1991).

Em anos seguintes no livro de Patologia, Friedberger & Frohner (1904), relatam estudos de Hogyes e Protopopoff para melhorar a segurança e eficácia da vacina anti rábica em cães. Em 1927, na 1ª Conferência Internacional de Raiva, ficou definido que o vírus para a vacina canina deveria ser inativado ou atenuado e não causava a doença se inoculado por via intramuscular/subcutânea (Schoeing, 1930). As vacinas originadas de tecido nervoso (OTN) inativadas pelo fenol foram usadas nas próximas décadas, e elas frequentemente causavam reações nervosas pós-vacinais, inclusive a morte do animal vacinado, o que levou a estudos para desenvolverem melhores vacinas (Briggs et al. 2002). Desta forma foram desenvolvidas as vacinas *low-egg-passage*” (LEP), que eram constituídas por vírus de baixa passagem (136 passagens) em ovos embrionados de galinhas ou *“chick-embryo-origin”* (CEO) utilizando para passagens seriadas a cepa Flury (vírus rábico humano) até a década 50 (Koprowski & Cox, 1948). As vacinas LEP, ocasionalmente causavam raiva em filhotes de cães e gatos, o que levou ao desenvolvimento das vacinas *“high-egg-passage”* (HEP) ou de muitas passagens (205 passagens) em ovos embrionados, sendo esta segura para uso em filhotes de cães com 3 meses de idade, bovinos e gatos (Briggs et al. 2002). A mesma vacina foi por muito tempo usada para proteger tanto humanos e animais. O sucesso da vacinação anti-rábica levou à fundação do instituto Pasteur, que atualmente é um instituto reconhecido internacionalmente. Durante todos estes experimentos com raiva, sempre houve colaboração de veterinários e médicos o que levou a estabelecer o nome de raiva animal como a pedra fundamental dos programas de controle da raiva em humanos.

As vacinas foram com o decorrer do tempo sendo aperfeiçoadas visando segurança e eficácia. Inicialmente vacinas de cérebro de camundongo ou de

carneiro eram usadas, mas causavam reações que limitaram o seu uso, o que levou o desenvolvimento de vacinas de cultura a base de rins de filhotes de hamster ou "*Baby Hamster Kidney*" (BHK), que diminuiu a exposição do vírus em seres humanos. Atualmente, estão sendo adicionadas, além das vacinas parenterais, as vacinas orais (WHO, 2008).

5 Vacinas de vírus vivo modificado (MLV)

As MLV atualmente são produzidas em diferentes tipos celulares como CEO, BHK e células de rins de porco ou "porcine kidney cells" (PKC) utilizando as cepas de vírus humanos, Flury e Kelev, Street Alabama Dufferin (SAD) e Evelyn-Rokitnicki-Abelseth (ERA). As cepas SAD e ERA estão sendo adaptadas para serem usadas na Ásia, África e parte da Europa para imunização oral em cães e gatos (Blancou & Meslin, 1996). As MLV originadas de "Tissue Cells" (TC) produzem poucas reações alérgicas se comparadas com as de CEO, mas a World Health Organization (WHO) não recomenda o uso destas MLV em animais por via parenteral (WHO, 2004). Mesmo que as MLV tenham provado o seu valor e apesar de ser proibida nos EUA, o uso de vacinas inativadas está crescendo onde as MLV eram usadas (Briggs et al. 2002).

5.1 Vacinas orais modificadas

As vacinas orais rábicas (ORV) começaram na Suíça, com o uso de iscas para raposas contendo vírus atenuado e atualmente é utilizada por muitos países da Europa (Steck et al. 1982). A vacinação oral é sem dúvida o método mais simples e eficaz para combater a raiva em cães de rua, especialmente depois da implementação da tecnologia do DNA recombinante, que permitiu vacinas mais seguras e eficazes (Dietzschold et al. 2004). Na década de 90, a cepa ERA foi trocada pelas cepas (SAD-Avirulent-Gif, SAG-1 e SAG-2) para o desenvolvimento de vacinas. A SAG 2, que é a cepa de escolha, é uma cepa mutante isolada da cepa SAD Berne após seleção de anticorpos monoclonais; onde a amostra vacinal é avirulenta se inoculada intracerebral em

camundongos imunocomprometidos e também os protege quando desafiados (Lafay et al. 1994).

5.2 Vacinas vetorizadas recombinantes orais

Porém estas vacinas vivas orais para animais silvestres possuíam patogenicidade residual para certos roedores (Artois et al. 1992), o que levou ao desenvolvimento das novas vacinas de baixa virulência derivadas da cepa SAD-Berne com serina no lugar da arginina na posição 333 do envelope viral (Briggs et al. 2002). Esta geração de vacinas ainda apresentava segurança duvidosa para animais silvestres, o que levou ao desenvolvimento de vacinas orais vetorizadas em iscas, onde uma glicoproteína da cepa ERA foi inserida no genoma do vírus da vaccinia (Wiktor et al. 1984). Esta vacina de isca oral foi licenciada em 1995 nos EUA, pela Merial® (Raboral V-RG®) sendo utilizada para combater a raiva em guaxinins, para prevenir que cães mexicanos transmitissem raiva para coyotes do Texas e para praticamente eliminar a raiva em raposas vermelhas no Canadá e de cães no Texas (Dreesen, 2007).

5.3 Vacinas vivas recombinantes orais utilizadas via parenteral

A história destas vacinas começou com o desenvolvimento de uma tecnologia, onde houve a inserção da glicoproteína rábica em vírus da varíola do canário. Atualmente elas apenas são licenciadas para uso em gatos associados a outros agentes (Dreesen, 2007).

5.4 Vacinas de vírus inativadas (IVV)

As vacinas IVV por serem inativadas precisam de altas concentrações virais, que são obtidas pelo crescimento do vírus em tecido cerebral de coelhos, BHK, CEO, porquinho-da-índia, células Vero e camundongos neonatais que ainda não possuem a mielina. As vacinas produzidas em cérebro embora inativadas são responsáveis por encefalomielite em animais vacinados com culturas precoces de IVV e são autorizadas a serem utilizadas em animais de companhia com mínimo de 3 meses de idade (Reculard, 1996). O método mais

utilizado para inativação do vírus rábico é o que se baseia na β -propiolactona que uma vez inativado, adiciona-se a vacina os adjuvantes (hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e saponina para bovinos) que lhe permitem estabilidade e a combinação com outras vacinas e bacterinas (Precausta & Soulebot, 1991). Desde 1974, o National Institute of Health-EUA, quantifica a potência de todas as vacinas inativadas para raiva, desafiando os animais vacinados contra "challenge virus standard" (CVS), ou os vírus padrões derivados dos isolatos originais de Pasteur (Baer, 1997).

6 O futuro das vacinas, a nova geração de vacinas rábicas

O futuro das vacinas rábicas tem seu estudo focalizado nos animais de vida livre que são responsáveis em disseminar a raiva (Artois et al. 1992). Em cães as vacinas que utilizam o adenovírus recombinante como vetor precisam ser confirmados experimentalmente (Tims et al. 2000). As vacinas rábicas orais derivadas de plantas também serão uma possibilidade para cães, onde plantas expressarão antígenos rábicos (Modelska et al. 1998). As vacinas de DNA iniciaram-se com uma simples inoculação no plasmídio da glicoproteína da cepa ERA (Xiang et al. 1994), e atualmente um dos seus problemas é a demora na produção de anticorpos, o que vem sendo estudado em camundongos (Lodmell & Ewalt, 2001). As IVV possuem complicações pós-vacinais, como sarcomas, especialmente em gatos, o que levou a nova geração de vacinas recombinantes vetorizadas (autorizada a vacinação no animal com 2 meses de vida), como a vacina recombinante de avipoxvirus (glicoproteína recombinante rábica-vetorizada em vírus de canarypox) a ser autorizada o seu uso em gatos nos EUA, por produzir poucas reações alérgicas/neoplásicas (Greene et al. 1998).

A maioria das vacinas no mercado atualmente são vivas atenuadas ou inativadas. As vacinas vivas atenuadas induzem longa-duradoura imunidade mediada por células e por anticorpos, mas tem desvantagens quando usadas em animais prenhez e imunocomprometidos com potencial de reverter a

virulência. Já as vacinas inativadas não induzem uma imunidade duradoura mas não reverterem a patogenicidade. As vacinas hoje tem que seguir especificações como: que os antígenos usados para fazer uma vacina atenuada são livres de patógenos associados a toxinas e componentes imunossupressores e que são capazes de induzirem longa-duradoura imunidade. As vacinas recombinantes de DNA, com deleção de genes e as vacinas vírus-vetorizadas são hoje as vacinas que seguem estas especificações (Lubroth et al. 2007). As vacinas vivas induzem proteção sistêmica e de mucosas com baixa reatividade, são de baixo custo e não necessitam de adjuvantes. No casos da vacinas virais que são vírus mutantes atenuados (escolhidos por seleção clonal) que causam a infecção mas não a doença, esta atenuação mutacional é um processo incontrollável de se avaliar, com risco de reversão e disseminação do patógeno no ambiente (Lubroth et al. 2007). Mas isto é evitado com o uso da engenharia genética que identifica os genes associados a patogenicidade e os deleta ou os inativa. Mas para avaliar a efetividade dos programas de erradicação das doenças era necessário diferenciar animais vacinados dos infectados naturalmente, o que foi possível com vacinas que não possuem determinados antígenos ou que possuem antígenos extras para serem detectados na sorologia(Lubroth et al. 2007). O uso também de marcadores para diferenciar animais vacinados dos infectados naturalmente parece ser promissora. A mais nova tecnologia é a genética reversa onde cria sequências genéticas inteiras com controle dos processos de transcrição e tradução (Lubroth et al. 2007). Para vacinas inativadas a combinação entre genômica, bioinformática e tecnologia recombinante tem permitido o desenvolvimento de vacinas a partir de epítomos específicos (Reddy et al. 1998). As vacinas de DNA também serão promissoras onde um DNA plasmidial que codifica proteínas protetoras, são inoculados em células do animal, onde a transcrição e a tradução ocorrem, transformando o animal vacinado em um bioreator para a produção de suas próprias vacinas (Dunham, 2002). Uma outra possibilidade para animais selvagens seria a rota de aerossóis, através de sprays para uso em mucosas, o que levaria a um

indivíduo a disseminar a vacina através de seu convívio social (Almeida et al., 2005).

Ao contrário do que Pasteur pensava a raiva ainda permanece não erradicada e provavelmente não será tão cedo após a descoberta dos reservatórios selvagens.

7 Referências

- Almeida, M.F.; Martorelli, L.F., Aires, C.C.; Sallum, P.C.; Massad, E. Indirect oral immunisation of captive vampires, *Desmodus rotundus*. *Virus Res*, v.111, p.77-82., 2005.
- Artois, M.; Guittre, C.; Thomas, I.; Leblois, H.; Brochier, B.; Barrat, J. (1992). Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: A comparison. *Vaccine*, v.10, p.524-528, 1992.
- Baer, G. M. Evaluation of an animal rabies vaccine by use of two types of potency tests. *Am. J. Vet. Res*, v.58, p.837-840, 1997.
- Bhattacharya, S.; Jackson, M. Vaccination against smallpox in India. London: Wellcome Institute, 2005.
- Blancou, J.; Meslin, F. X. Modified live-virus rabies vaccination for oral immunizations of carnivores. In: Meslin, F.X.; Kaplan, M.M.; Koprowski, H. Laboratory Techniques in Rabies. Geneva: WHO, 1996. p.324-337.
- Briggs, D.J.; Dreesen, D. W.; Wunner, W. H. Vaccines. In: Jackson, A.C.; Wunner, W.H. Rabies. USA: Elsevier Science, 2002. p.371-400.
- Bunn, T. O. Canine and feline rabies vaccines, past and present. In: Baer, G.M. The Natural History of Rabies. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.415-425.
- Cleaveland, S.; Kaare, M.; Knobel, D.; Laurenson, M.K. Canine vaccination, providing broader benefits for disease control. *Vet. Microbiol*, v.117, p.43-50, 2006.
- Dietzschold, M.L.; Faber, M.; Mattis, J.A.; Pak, K.Y.; Schnell, M.J.; Dietzschold, B. In vitro growth and stability of recombinant rabies virus designed for vaccination of wildlife. *Vaccines*, v.23, p.518-524, 2004.
- Dreesen, D.W. Animal Vaccines. IN: Jackson, A.; Wunner, W. Rabies. USA: Elsevier, 2007. cap.14. p.517-530.
- Dunham, S. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res. vet. Sci*, v.73, p.9-16, 2002.
- Friedberger, E.; Frohner, E. (1904). Veterinary Pathology. London: Hurst and Blackett, 1904. 1v. p. 353.
- Geison, G. The private science of Louis Pasteur. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1996.
- Greene, C. E.; Dreesen, D. W. Rabies. In: Greene, C.E. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia: Saunders, 1998. p.114-126.

Hagiwara, M.K.; Megid, J. Imunização e vacinas. IN: Andrade, S.F. Manual de Terapêutica Veterinária. São Paulo: Roca, 2004. Cap.24.p.591-628.

Koprowski, H.; Cox, H. R. Studies on chick embryo adapted rabies virus: I. Culture characteristics and pathogenicity. *Immunol*,v.60, p.533-536, 1948.

Kuzmin, I.V.; Hughes, G.J.; Botvinkin, A.D.; Orciari, L.A. Rupprecht C.E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the *Lyssavirus* genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res*, v.111, p.28-43, 2005.

Lafay, F.; Benejean, J.; Tuffereau, C.; Flamand, A; Coulon, P. Vaccination against rabies: construction and characterization of SAG2, a double avirulent derivative of SADBern. *Vaccine*,v.12, p.317-320, 1994.

Lodmell, D. L.; Ewalt, L. C. Post-exposure DNA vaccination protects mice against rabiesvirus. *Vaccine*, v.19, p.2468-2473, 2001.

Lombard, M.; Pastoret, P-P.; Moulin, A-M. A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech*, v.26, n.1, p.29-48, 2007.

Lubroth, J.; Rweyemamu, M.M.; Viljoen, G.; Diallo, A.; Dungu, B.; Amanfu, W. Veterinary vaccines and their use in developing countries. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*. v 26, n.1, p.179-201, 2007.

Lütticken, D.; Segers, R.P.A.M.; Visser, N. Veterinary vaccines for public health and prevention of viral and bacterial zoonotic diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, v.26, n.1, p.165-177, 2007.

McCallum, H.; Hocking, B.A. Reflecting on ethical and legal issues in wildlife disease. *Bioethics*, v.19, n.4, p.336-347, 2005.

Modelska, A.; Dietzschold, B.; Sleysh, N.; Fu, Z. F.; Steplewski, K.; Hooper, D. C.; Koprowski, H.; Yusibov, V. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc. Natl. Acad.Sci*, v.95, p.2481-2485, 1998.

Morton, D.B. Vaccines and animal welfare. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, v.26, n.1, p.157-163, 2007.

Nel, L.H. Vaccines for lyssaviruses other than rabies. *Expert Rev. Vaccines*, v.4, p.533-540, 2005.

Nicol, L. L' épopée pastorienne et la médecine vétérinaire. Garches, France: Nicol, 1974.

Precausta, P.; Soulebot, J.-P. Vaccines for domestic animals In: Baer, G.M. The Natural History of Rabies. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991. p.445-459.

Reculard, P. Cell-culture vaccines for veterinary use. In: Meslin, F.X.; Kaplan, M.M.; Koprowski, H. Laboratory Techniques in Rabies. Geneva: WHO, 1996. p.314-323.

Reddy, P.S.; Idamakanti, N.; Song, J.Y.; Lee, J.B.; Hyun, B.H.; Park, J.H.; Cha, S.H.; Tikoo; S.K.; Babiuk, L.A. Sequence and transcription map analysis of early region-1 of porcine adenovirus type-3. *Virus Res*, v.58, n.1-2, p.97-106, 1998.

Schoenig, H. W. Experimental studies with killed canine rabies vaccine. *J. Am. Vet. Med.Assoc*, v.76, p.25-27, 1930.

Steck, F.; Wandeler, A.; Bichsel, P.; Capt, S.; Hafliger, U.; Schneider L. Oral immunization of foxes against rabies. Laboratory and field studies. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis*, v.5, p.165-171, 1982.

Théodoridès, J. Histoire de la rage. Masson, Paris, 1986.

Tims, T.; Briggs, D. J.; Davis, R. D.; Moore, S. M.; Xiang, Z.; Ertl, H. C. J.; Fu, Z. F. Adult dogs receiving a rabies booster dose with a recombinant adenovirus expressing rabies virus glycoprotein develop high titer of neutralizing antibodies. *Vaccine*, v.18, p.2804-2807, 2000.

Tisang H. Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. *Adv. Virus. Res*, v.42, p.375-412, 1993.

Wiktor, T. J.; Macfarlan, R. I.; Reagan, K. J.; Dietzschold, B.; Curtis, P. J.; Wunner, W. H.; Kieny, M.-R.; Lathe, R.; Lecocq, J. P.; Mackett, M.; Moss, B.; Koprowski, H. Protection from rabies by a vaccinia recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.81, p.7194-7198, 1984.

WHO (2008). Expert consultation on Rabies. *Technical Report Series*, n.840. Geneva: World Health Organization.

Xiang, Z. Q.; Spitalnik, S.; Tran, M.; Wunner, W. H.; Cheng, J.; Ertl, H. C. J. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*, v.199, p.132-140, 1994.