

ISOLAMENTO DE VÍRUS RÁBICO DE CÃES, APARENTEMENTE NORMAIS, INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE §

José de Angelis CÔRTEZ *
Moacyr R. NILSSON **

RFMV-A/20

CÔRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. — *Isolamento de vírus rábico de cães, aparentemente normais, inoculados experimentalmente.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 12:223-8, 1975.

RESUMO: *Três cães infectados com vírus rábico de origem morcego (IPEACS 661 — D.R.) eliminaram vírus pela saliva algumas vezes e em dois deles o exame da córnea revelou-se positivo à imunofluorescência em duas ocasiões.*

Os isolamentos de vírus em camundongos ocorreram entre o 17.º e o 27.º dias depois da inoculação, enquanto que os exames da córnea foram positivos apenas nos 27.º dias da inoculação.

Os três animais mantiveram-se, aparentemente sadios durante todo o período experimental.

Os soros dos animais no 36.º dia da inoculação apresentaram títulos de anticorpos maiores do que 1:125, frente a 316 DL₅₀ do vírus CVS.

UNITERMOS: *Cães*; Raiva, vírus*; Isolamento*.*

INTRODUÇÃO

A presença do vírus da raiva na saliva do cão tem sido demonstrada já aos 2 ou 3 dias que antecedem o aparecimento da sintomatologia clínica¹⁸. Apesar da inconsistência desta observação^{14, 18, 21}, tal fato tem sido verificado inclusive em cães aparentemente sadios^{1, 6, 22}. Informações de tal natureza contribuem para explicar o aparecimento de casos de raiva em humanos mordidos por animais em aparente es-

tado hígido^{3, 4, 5, 11, 12, 19, 20} bem como para esclarecer determinadas observações de natureza epidemiológica registradas em estudos feitos sobre populações de animais selvagens^{5, 10, 11, 12, 15, 23, 24}

No presente estudo registramos a presença do vírus da raiva na saliva de cães inoculados experimentalmente com este agente.

§ Nota prévia à XXVI Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo, setembro de 1971.

* Professor Assistente Doutor.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da U.S.P.

** Médico Veterinário Pesquisador Científico.
Seção de Raiva e Encefalomielite do Instituto Biológico de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

1.1 Cães — Foram utilizados quatro exemplares do sexo feminino, sem raça, definida, com três anos de idade, aproximadamente, selecionados previamente através prova de soroneutralização e identificação pelos números 039, 040, 041 e 042.

1.2 Camundongos — Utilizamos camundongos suíços albinos, adulto-jovens, pesando 11 a 15 gramas e lactentes de 2 a 7 dias de idade, distribuídos em grupos de 8 indivíduos.

2. Virus

2.1 Amostra IPEACS 1661-DR-origi-nária de morcegos¹⁷ e utilizada para a inoculação dos cães, sob a forma de suspensão a 10% de cérebros de camundongos infectados. O título infectante desta suspensão em camundongos adulto-jovens, via intracerebral, foi de $10^{5,82}$ /0.03 ml.

2.2 Amostra C.V.S. (Challenge Virus Standard) — empregada para as provas de soroneutralização e imunofluorescência, sob a forma de uma suspensão a 20% de cérebro de camundongos infectados.

3. Diluente

Água destilada contendo 2% de soro de equino normal, inativado convenientemente, adicionada de 1.000 unidades de penicilina e 1,25 miligramas de estreptomina por mililitro.

4. Inoculação dos cães

Os animais foram inoculados pela via intramuscular, na região da espádua, com uma dose de 5 mililitro da suspensão virulenta por animal e mantidos em observação durante 6 meses.

5. Tomadas de amostras

Diariamente, a partir do 13.^o ao 30.^o dia da inoculação, procedemos, paralelamente, à colheita de amostras de saliva e córnea.

A saliva foi recolhida em placas de Petri, com o animal mantido com os maxilares afastados e imobilizados com aparelho próprio (fig. 1).

As amostras de córnea foram constituídas por impressões feitas em dois campos de cada uma das quatro lâminas utilizadas para cada globo ocular (fig. 2).

6. Tentativas de isolamento de virus

6.1 Exame da saliva — à saliva coletada foi adicionado igual volume de diluente, mantendo-se a mistura em contato durante 30 a 40 minutos, em banho de gelo. A seguir realizamos inoculação, pela via intracerebral, em um grupo de camundongos adulto-jovens na dose de 0,03 ml e outro camundongos lactentes na dose de 0,01 ml. Estes animais foram observados por 30 dias, submetendo-se aos exames específicos (Sellers, Imunofluorescência e, eventualmente, subpassagem em camundongos), os cérebros dos animais que apresentassem qualquer anormalidade ou que viessem a sucumbir a partir do 5.^o dia da inoculação.

6.2 Exames da córnea — Os decalques de córnea, após fixação em acetona a -20°C, durante 24 horas, foram submetidos à prova de imunofluorescência direta, adotando-se como critérios de interpretação aqueles utilizados por SCHNEIDER¹⁶ para o diagnóstico da raiva em camundongos.

7. Técnicas

7.1 Imunofluorescência — Foi utilizada a técnica recomendada pelo Centro Panamericano de Zoonoses⁷ e as leituras efetuadas em microscópio Zeiss com lâmpada HBO-200 e filtros adequados.

7.2 Soroneutralização — Seguimos a técnica de ATANASIU², empregando-se 5 camundongos por diluição do soro e 10 camundongos para cada diluição do virus na determinação do título, calculado pelo método de REED & MUENCH¹³.

RESULTADOS

O cão 039 eliminou vírus pela saliva uma única vez, na 9.^a colheita, 21 dias depois da inoculação. Comprovamos a eliminação somente em dois do grupo de camundongos adultos inoculados. Do grupo lactente inoculado com a mesma amostra resultaram negativos os exames dos cérebros dos 6 animais que sucumbiram. Foram igualmente negativos, os exames de córnea deste cão.

Foi possível demonstrar o vírus da raiva na saliva do cão 040 em três oportunidades, ou seja, aos 17.^o, 19.^o e 27.^o dias da inoculação. Os isolamentos correspondentes as amostras dos 17.^o e 19.^o dias ocorreram somente em camundongos lactentes, com 7/8 e 8/8 (mortos/inoculados), respectivamente. Já a amostra correspondente ao 27.^o dia revelou-se infectante apenas para camundongos adultos e somente dois deste grupo apresentaram diagnóstico positivo para raiva.

Revelaram-se positivos os exames da córnea deste animal, realizados nos dias 27 e 28 após a inoculação.

O vírus foi isolado da saliva do cão 041 apenas na 11.^a extração, isto é, aos 23 dias da inoculação. Inoculamos esta amostra somente no grupo de camundongos adultos, morrendo cinco deles.

Por duas vezes o exame da córnea revelou-se positivo aos 27 e 28 dias da inoculação.

O animal de número 042 apresentou sintomas de raiva, sendo eliminado do experimento. Os demais, cujos resultados descrevemos, permaneceram em aparente estado de higidez durante todo o período experimental.

A soroneutralização efetuada com os soros dos três cães, aos 36 dias após a inoculação, indicou títulos superiores a 1:125, contra 316 DL₅₀ do vírus C.V.S.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos corroboram à observação de que o vírus da raiva pode ser eliminado, embora de maneira inconstante, pela saliva de cães expostos à infecção, ainda que estes animais se encontrem aparentemente sadios.

Das 54 amostras de saliva examinadas, o vírus foi isolado em cinco oportunidades, enquanto que das correspondentes 54 amostras de córnea foram obtidos quatro resultados positivos, havendo coincidência de resultados positivos para saliva e córnea uma única vez, nas amostras colhidas 27 dias após a inoculação do cão 040.

Estes dados não se afastam muito dos encontrados por VERARAGHAVAN et al.²², que obtiveram 14 isolamentos de vírus da raiva em 913 extrações de saliva de um cão portador assintomático, porém infectado em condições naturais.

O fato de termos usado uma amostra de vírus rábico isolada de morcegos poderia explicar os resultados obtidos face a sua baixa patogenicidade para a espécie animal utilizada no experimento, o que encontra apoio na literatura^{8,9}

A excessiva dose de vírus usada no presente estudo, em relação à infecção em condições naturais, justifica-se em virtude das afirmações de JOHNSON⁹ e CONSTANTINE⁸ sobre a maior resistência do cão ao vírus originário de morcegos.

Trabalhos da natureza do que realizamos seriam raramente concebíveis, salvo razões especiais, como no caso peculiar de VEERARAGHAVAN et al.²², que investigaram infecção rábica envolvendo o ser humano. Em nosso caso, o objetivo primário era estabelecer possível relação entre a eliminação do vírus pela saliva e seu aparecimento na córnea, a partir do período que antecede o quadro clínico até a fase final da doença.

A importância de tais achados aumenta quando consideramos o risco a que estariam expostos seres humanos, mas devemos convir que nos afastamos bastante das condições naturais, quando usamos vírus morcego em cães e inoculamos dose excessiva de vírus. Também não sabemos da patogenicidade da saliva se inoculada pela via intramuscular em espécies sensíveis, que, se conhecida, aumentaria ainda mais a importância de nossos achados¹².

AGRADECIMENTOS

A Dra. Tamara Nikitin pela valiosa colaboração prestada e ao Dr. Oscar Larghi, do Centro Panamericano de Zoonoses, pelo fornecimento de amostras de vírus e conjugado.

CÔRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. — Isolamento de vírus rábico de cães, aparentemente normais, inoculados experimentalmente. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12: 223-8, 1975.



Fig. 1 — Processo de retirada da saliva de cão, com a utilização de aparelho para manter aberta a boca do animal.



Fig. 2 — Detalhe da obtenção de decalques da córnea em lâmina.

CÓRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. — Isolamento de vírus rábico de cães, aparentemente normais, inoculados experimentalmente. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12: 223-8, 1975.

RFMV-A/20

CÓRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. — *Isolation of rabies virum from apparently health dogs experimently infected.* *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:223-8, 1975.

SUMMARY: *Three female adult dogs, experimentally infected with street rabies virus bat origin failed to develop clinical signs of rabies.*

Virus was isolated once from saliva of two of them at 21 and 23 days post inoculation (DPI). One of them also presented positive results for cornea test at 27 and 28 DPI.

From the other dog, the virus was found in saliva at 17, 19 and 27 DPI; and the cornea test was positive at 27 and 28 DPI.

The animals were observed for at least six months.

UNITERMS: *Isolation*; Rabies virus*; Dog*.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRAL, L. & SÉRIÉ, C. — Études expérimentales sur la rage en Éthiopie. *Ann. Inst. Pasteur*, 93:475-488, 1957.
2. ATANASIU, P. — Titrage des anticorpe rabiques pratiqué sur les sérums humains. *Bull. Off. int. Épiz.*, 67:383-387, 1967.
3. BALASUBRAMANIAN, A. & GAJANANA, A. — Hydrophobia among persons following bite by apparently healthy dogs. *Scient. Rep. Pasteur Inst. sth. India* (1973):43-4, 1974.
4. BALASUBRAMANIAN, A.; GAJANANA, A.; MARIASUSAI, M.; SIVANANJAN, L.; DEVARAJAN, R.; GASS, M. E. — Studies on the salivary excretion of rabies virus in the dog "Andi" that bit case 12. *Scient. Rep. Pasteur Inst. sth. India* (1973):44, 1974.
5. BELL, J. F. — Chronic rabies infection. In; Proceedings of the National Rabies Symposium NCDC, Atlanta, Georgia, U.S.A., 1966, p. 17-21.
6. BINDRICH, H. & SCHMIDT, U. — Contribution to the study of virus excretion by healthy and immune dogs after experimental infection with rabies virus. *Arch. exp. Vet.-Med.*, 12: 202-215, 1958.
7. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS — Prueba de anticorpos fluorescentes para rabia. *Nota tec. Ramos Mejia*, Buenos Aires, (8):1-23, 1969.
8. CONSTANTINE, D. G. — Transmission Experiments with bat rabies isolates: Responses of certain carnivora to rabies virus isolated from animals infected by nonbite route. *Amer. J. Vet. Res.*, 27:13-5, 1966.
9. JOHNSON, H. N. — Derriengue: vampire bat rabies im Mexico. *Amer. J. Hyg.*, 47:189-204, 1948.
10. KOKLER, R. & WITTMANN, W. — Zur Frage der latenten Tollwut-infection bei Fuchsen. *Arch. exp. Vet. Med.*, 18: 1129-38, 1964.
11. MARTIN, L. A. — Inféction rabique et rage curable. *Marroc Med.*, 42:467-73, 1963.
12. NILSSON, M. R. — O problema do portador em raiva. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, 67:195-205, 1969.
13. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of setimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-97, 1938.

CÓRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. — Isolamento de vírus rábico de cães, aparentemente normais, inoculados experimentalmente. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12: 223-8, 1975.

14. RHODES, A. J. & VAN ROOYEN, C. E. — *Textbook of virology*, 3 ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1958, p. 477-99.
15. SANTOS, J. A. & PASSOS, W. — Um carnívoro selvagem (*Canis vetulus*), vetor e possível transmissor de raiva no Nordeste do Brasil. *Bol. Soc. Bras. Med. vet.*, 16:51-5, 1947.
16. SCHNEIDER, L. G. — The cornea test: a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. *Zbl. Vet. Med.*, 163:24-31, 1968.
17. SILVA, R. A. & CUNHA, R. G. — Vacinas anti-rábicas com hidróxido de alumínio e provas para controle de sua eficiência. *Rev. Bras. Biol.*, 33: 127-34, 1973.
18. VAUGHN, J. B.; GERHARDT, P.; NEWELL, K. W. — Excretion of street rabies virus in the saliva of dogs. *Jour. Amer. med. Assoc.*, 193: 365-368, 1965.
19. VEERARAGHAVAN, N. — Hydrophobia among persons bitten by apparently healthy animals. *Scient. Rep. Pasteur Inst. sth. India*, (1970):62, 1971.
20. VEERARAGHAVAN, N. & GAJANANA, A. — Studies on an apparently healthy dog suspected to be a carrier of rabies virus. *Scient. Rep. Pasteur. Inst. sth. India* (1971):68, 1972.
21. VEERARAGHAVAN, N.; BALASUBRAMANIAN, A.; RANGASURAMI, R. — Virus en el cerebro y glandulas submaxilares, y cuerpos de Negri, en animales sospechosos de haber muerti de rabia natural. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, 46:69-70, 1959.
22. VEERARAGHAVAN, N.; GAJANANA, A.; RANGASAMI, R.; OONNUNNI, P. T.; SARASWATHI, K. C.; DEVARAJ, R.; HALLAN, K. M. — Studies on the salivary excretion of rabies virus by the dog from Surandai. *Scient. Rep. Pasteur Inst. sth. India* (1969):69, 1970.
23. VILLA, L. J.; BLIND, C.; MORRIS, J. F.; MUNIZ-VEGA, A. E. — Aislamiento de virus rábico de zorros en la República Argentina. *Rev. Invest. Ganaderas*, 5:17-8, 1959.
24. WOOD, J. C. & DAVIS, D. F. — The prevalence of rabies in populations of foxes in the Southern States. *J. Amer. vet. Med. Assoc.*, 135:121-24, 1959.
- Recebido para publicação em 14-8-75
- Aprovado para publicação em 17-9-75