

ÉLVIO CARLOS MOREIRA

PESQUISA DO VÍRUS DA RAIVA NO HUMOR AQUOSO, SALIVA,  
GLÂNDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR E CÔRNEA DE BEZERROS  
INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE

*Tese apresentada ao Departamento  
de Medicina Veterinária Preven-  
tiva da Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre  
em Medicina Veterinária.*

*Belo Horizonte*  
*Minas Gerais - BRASIL*  
*1973*

*Tese aprovada em 21.12.1973*

*BANCA EXAMINADORA:*

---

*Professor RONALDO REIS*

---

*Professor JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO*

---

*Professor MOACIR GOMES DE FREITAS*

*AGRADECIMENTOS*

*Este trabalho deve sua realização ao estímulo recebido de algumas pessoas, que com sua colaboração orientadora, oferecida em sugestões e debates, incitaram o autor a levá-lo adiante. E ao apoio encontrado na dedicação de outras, que também tornaram-no possível. O autor registra aqui os nomes dessas pessoas, estendendo a todas o mesmo sincero agradecimento.*

*RONALDO REIS - Professor Adjunto - Orientador  
MÁRIO BARBOSA - Professor Titular e Diretor  
da Escola de Veterinária da  
U.F.M.G.*

*JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO - Professor Titular e  
Chefe do Departamento de Medi-  
cina Veterinária Preventiva da  
Escola de Veterinária da  
U.F.M.G.*

*JOSÉ OSWALDO COSTA - Professor Assistente do  
Instituto de Ciências Biológicas  
da U.F.M.G.*

*MÁRIO JOSÉ DE PAULA - Laboratorista*

*MARÍLIA DA CONCEIÇÃO NOGUEIRA - Laboratorista*

*SÍLVIO MIGUEL - Laboratorista*

\*ALCINDO LUIZ MARCO CANESSO - *Laboratorista*

\*BENJAMIN MOREIRA - *Laboratorista*

ALCIDES FÉLIX PINTO - *Servente*

PAULO TEIXEIRA DE ANDRADE - *Servente*

RIMA NAMY ABUIHID - *Secretária*

---

\* In Memoriam

O presente trabalho teve apoio financeiro das seguintes Instituições:

FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA  
Belo Horizonte, Minas Gerais

CONSELHO DE PESQUISAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Belo Horizonte, Minas Gerais

LABORATÓRIO FAMA LTDA.  
Belo Horizonte, Minas Gerais

Agradecemos à CARL ZEISS, Oberkochen, W.G., a impressão da presente tese.

	<i>Página</i>
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	8
3.1. Bezerros .....	9
3.2. Preparação do vírus fixo .....	10
3.3. Preparação do vírus de rua .....	11
3.4. Colheita, imunofluorescência e inoculação do humor aquoso .....	11
3.5. Colheita, imunofluorescência e inoculação da glândula salivar submandibular .....	12
3.6. Colheita, imunofluorescência e inoculação da saliva .....	12
3.7. Impressões de córnea .....	13
3.8. Colheita e exame dos materiais após a morte .....	13
4. RESULTADOS .....	16
5. DISCUSSÃO .....	25
6. CONCLUSÕES .....	31
7. RESUMO .....	34
8. SUMMARY .....	37
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40



## 1. INTRODUÇÃO

2

Durante muitos anos a raiva clinicamente declarada foi considerada doença sempre fatal.

PASTEUR & cols. (1882), no entanto, relataram à Academia de Ciências de Paris um caso de cura espontânea em cão. Este fato foi observado após a inoculação de três cães, dois dos quais morreram rapidamente de raiva e o outro, depois de manifestar os primeiros sintomas, recuperou-se completamente. Reinoculado um ano depois, o cão não apresentou raiva.

NILSSON (1969/70), revendo a literatura sobre a raiva abortiva e a existência de portadores, do tempo de Pasteur aos nossos dias, concluiu que existem evidências suficientes para aceitar a possibilidade de recuperação espontânea de pacientes com raiva.

A probabilidade dessa ocorrência tem motivado novas pesquisas que tentam comprovar a sobrevivência à infecção rábica, através do desenvolvimento de métodos sensíveis de diagnóstico, aplicados aos casos humanos e animais - diagnóstico *in vivo* - que receberam ou não tratamento anti-rábico pós exposição.

O estudo experimental da raiva abortiva, que segundo BELL (1964) é uma ocorrência comum, reprodutível e previsível, necessita de um método de diagnóstico de certeza *in vivo*, a fim de possibilitar melhor investigação do fenômeno. Este método provavelmente fornecerá elementos técnicos para comprovação final do problema da recu-



peração da raiva experimental ou natural e criará condições de pesquisa sobre o tratamento após a manifestação da doença.

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar os aspectos relacionados com a precocidade do aparecimento do vírus da raiva, fixo e de rua, na saliva, glândula salivar submandibular, córnea e humor aquoso de bezerros inoculados experimentalmente, visando ao diagnóstico ante-mortem.

COURMONT & NICOLAS (1903) demonstraram, em coelhos, a presença do vírus fixo no humor aquoso de coelhos mortos de raiva, utilizados na preparação de vacinas.

REMLINGER (1907) comprovou, em cobaias, a infecciosidade da saliva de um cão, cinco dias depois de recuperado de raiva natural.

KONRADI (1916) verificou que um cão foi capaz de transmitir a raiva por mordedura a outro cão jovem, 11 dias antes da manifestação dos primeiros sintomas.

HALAZS (1934), *in* NILSSON (1969), descreveu um caso de recuperação em bovino. A infecção rábica foi demonstrada através da reprodução da doença em coelhos inoculados com saliva, que foi infecciosa até oito dias depois da recuperação.

MANQUÊLIAN (1935), em valiosa contribuição, verificou em cães, na doença natural ou experimental, a infecciosidade da glândula salivar e da saliva, de dois a quatro dias antes do aparecimento dos sintomas em 80% de 12 casos estudados.

LEVADITI & SCHOEN (1935) encontraram pequenos corpúsculos de Negri no citoplasma das células epiteliais da córnea de camundongos e coelhos inoculados com vírus de rua. Todas as córneas de cobaias, gatos, cães e macacos inoculados com vírus fixo foram negativas para presença de corpúsculos de Negri. A inoculação em camundon-

gos, somente a córnea de um macaco apresentou resultado positivo.

SCHNEIDER & HAMAN (1969) estudando a disseminação centrífuga do vírus rábico, amostra de rua, em camundongos, chegaram às seguintes conclusões: após multiplicação no sistema nervoso central, há generalização do vírus em todo organismo. A generalização não ocorre por via sanguínea, mas através das células de Schwann dos nervos periféricos. A infecção ocorre regularmente nos olhos, glândula salivar, gordura interescapular, pulmão, intestino, rins e supra renais. Frequentemente é observada no coração, fígado, útero e músculos esqueléticos. A multiplicação nos órgãos não pertencentes ao sistema nervoso ocorre nas células ganglionares, fibras nervosas e no plexo dos nervos. A multiplicação extra neural é observada no tecido epitelial das glândulas salivares, gordura interescapular e na córnea quando se infectavam precocemente durante a generalização do vírus. A multiplicação nos nervos periféricos e nos tecidos extra neurais não determina, histologicamente, lesões visíveis.

SCHNEIDER (1969) descreveu um teste de diagnóstico da raiva *in vivo*, em camundongos e raposas, através da demonstração do antígeno rábico nas impressões de córnea, coradas por imunofluorescência direta.

BENIGNOS (1970), *in* MARTELL & ALDASORO (1972), conseguiu isolar o vírus rábico da glândula lacrimal e da secreção, humor aquoso e humor vítreo de bovinos inoculados experimentalmente.

REIS & cols. (1971) estudaram impressões de córnea, realizadas *in vivo*, de casos naturais de raiva em três homens, quatro cães e um bovino que resultaram negativas à imunofluorescência direta. Das impressões de córnea feitas após a morte, somente a de um cão e de um bo-

vino revelaram fluorescência específica para raiva. Os autores pesquisaram também a presença do vírus fixo no humor aquoso e na córnea, obtidos da necrópsia de 15 bovinos inoculados, através de impressões e esfregaços corados por imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos lactentes. Todas as impressões e esfregaços foram negativos à imunofluorescência. Entretanto, à inoculação intracerebral em camundongos lactentes, à exceção de um humor aquoso, todos os outros foram positivos. Diante deste fato, os autores sugerem a punção in vivo do humor aquoso como método provavelmente eficiente de diagnóstico precoce da raiva.



3.1. Bezerros

Os bezerros utilizados foram divididos em três grupos.

Grupo I

Foram utilizados 30 bezerros, mestiços holandês-zebu, machos, com idade variando entre quatro a 15 dias, inoculados com vírus fixo - amostra CVS-27/CPZ (Challenge Virus Standard) - clássico vírus fixo de Pasteur, cedido pelo Centro Panamericano de Zoonoses, Argentina.

Por sangria total. na fase final do curso da doença, os bezerros foram sacrificados e, imediatamente, colhidas amostras de glândulas salivares submandibulares, humor aquoso, hipocampo e cerebelo. (Tabela I).

Grupo II

Outros 15 bezerros similares aos do grupo anterior foram inoculados com a mesma amostra de vírus rábico.

Entre o quinto e oitavo dia após a inoculação, durante a fase clínica da raiva, foram colhidas amostras de humor aquoso e glândula salivar submandibular desses animais. Após a morte, colheu-se amostras de hipocampo e cerebelo para confirmação de diagnóstico. (Tabela I).

### Grupo III

Foram utilizados quatro bezerros mestiços holandês-zebu, de ambos sexos, na faixa etária de sete a 90 dias, inoculados com vírus rábico, amostra de rua, rotulado como Araxá Gl./72. Este vírus foi isolado pelo autor, por inoculação intracerebral em camundongos lactentes, a partir da glândula salivar submandibular, colhida in vivo, aproximadamente 48 horas antes da morte, de bovino com doença natural. A identificação do vírus foi feita através da imunofluorescência direta e da presença dos corpúsculos de Negri no hipocampo dos camundongos inoculados.

#### 3.2. Preparação do vírus rábico CVS-27/CPZ

Para preparo da suspensão usaram-se cérebros de 100 camundongos "Swiss", linhagem Random CF-CPZ, de três a quatro semanas de idade, inoculados por via intracerebral, com 0,03 ml, na diluição de  $10^{-4}$  do vírus CVS-27/CPZ. Os cérebros foram colhidos, assepticamente, dos camundongos que apresentaram paralisia típica a partir do quinto dia da inoculação. Em seguida foi preparada uma suspensão a 20% (peso/volume) de cérebros em diluente, constituído de água destilada contendo 2% de soro equino normal e penicilina g-potássica cristalina e estreptomina na dose de 500 U.I. e 3 mg/ml, respectivamente. O pH dessa solução foi ajustado com tampão fosfato para 7,4.

Após centrifugação a  $400 \times g$  (1.500 rpm), durante 15 minutos, o sobrenadante foi distribuído em frascos, em porções de 0,5 ml e estocados a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Retirou-se, ao acaso, um frasco para titulação, por via intracerebral, em camundongos "Swiss", de três a quatro semanas de idade. O título encontrado foi de  $10^{6,7}/0,03$  ml, ou seja, de 158.500.000/DL50 para 1ml, segundo o método de REED & MUENCH (1938).

Os bezerros dos grupos I e II foram inoculados, por via intracerebral, com 0,5 ml dessa suspensão, na diluição de 1:200, contendo aproximadamente 396.250 DL50.

### 3.3. Preparação do vírus rábico - Araxá GL/72

Utilizou-se a mesma técnica e métodos anteriormente descritos para a preparação da suspensão de vírus fixo. A titulação revelou  $10^{2,852}$ /0,03 ml, ou seja, de 22.500 DL50 para 1 ml, segundo o método de REED & MUENCH (1939).

Os bezerros do grupo III foram inoculados segundo a técnica de DI VESTEVA & ZAGARI (1889), via intramuscular profunda, na região glútea, próxima ao ciático esquerdo, com 5 ml de suspensão virulenta a 20% (peso/volume), contendo aproximadamente 22.500 DL50.

### 3.4. Colheita, imunofluorescência e inoculação do humor aquoso

Os humores aquosos dos bezerros dos grupos I, II e III foram colhidos bilateralmente, por punção, usando-se seringa com agulha de 10 x 5. Retiraram-se, em média, 0,5 ml de cada olho. Em seguida, o humor aquoso puncionado foi transferido para um tubo de vidro, esterilizado, colocado em gelo e levado ao laboratório.

De cada humor aquoso foram feitas duas preparações em lâminas, com auxílio de pipeta Pasteur e coradas por imunofluorescência direta (IF), de acordo com a técnica de GOLDWASSER & KISSLING (1958). A leitura das preparações foram realizadas em microscópio binocular "standar - WL", objetiva de imersão 40x provida de diafragma, ocular 10x, condensador de campo escuro a óleo, iluminação com lâmpada de ultravioleta HBO-200 O S R A M, utilizando-se o UG-2 como filtro de excitação e o 0/41



como filtro de barreira<sup>(\*)</sup>. O material restante de cada amostra foi inoculado, por via intracerebral (IC), em camundongos lactentes de 4 a 8 dias de idade, e observados por 21 dias conforme técnica descrita por KOPROWSKI (1967).

Nos bezerros do grupo III, o humor aquoso foi colhido diariamente após o início dos sintomas, até a data da morte. A coloração por imunofluorescência direta e a inoculação intracerebral em camundongos foi idêntica à utilizada para os grupos I e II.

### 3.5. Colheita, imunofluorescência e inoculação da glândula salivar submandibular

As glândulas salivares submandibulares dos bezerros dos grupos I e III foram colhidos assepticamente, após a morte, usando-se a técnica recomendada por TIERKEL (1967). Dos bezerros do grupo II foram colhidas *in vivo*, através da incisão de aproximadamente 15 cm na região imediatamente ventral ao ângulo da mandíbula. Cada amostra compreendia fragmento de mais ou menos 3 cm<sup>2</sup>, que foram acondicionados em frascos estéreis, mantidas em gelo e levadas ao laboratório.

Para detecção do vírus rábico nas glândulas salivares, as amostras foram processadas em cortes por congelação, espessura de 2 a 4 micra, de acordo com a técnica descrita por KUNDIN & cols. (1966) e coradas por imunofluorescência direta. O material restante de cada amostra foi preparado e inoculado em camundongos lactentes, segundo a técnica de KOPROWSKI (1967).

### 3.6. Colheita, imunofluorescência e inoculação da saliva

As salivas dos bezerros do grupo III, durante a fase clínica da raiva, foram colhidas diariamente,

---

(\*) CARL ZEISS Companhia Ótica e Mecânica - OBERKOCHEN-WG

usando-se algodão estéril nas dimensões de 20 x 20 x 3mm, deixado sob a língua por 5 minutos, aproximadamente. Em seguida era transferido para frasco contendo 2 ml do mesmo diluente usado anteriormente para preparo das suspensões de vírus rábico.

Extraía-se a saliva por compressão do algodão embebido em em seguida, procedia-se à centrifugação a 400 g (1.500 rpm), durante 15 minutos. Do sedimento foram feitas duas preparações que foram coradas por imunofluorescência direta. O sobrenadante foi inoculado em camundongos lactentes, por via IC.

### 3.7. Impressões de córnea

Dos bezerros do grupo III foram feitas diariamente, após início dos sintomas, impressões de ambas as córneas, por compressão da lâmina sobre o globo ocular, conforme técnica descrita por SCHNEIDER (1969). As lâminas foram coradas por imunofluorescência direta.

### 3.8. Colheita e exame dos materiais após a morte dos bezerros

Imediatamente após a morte dos bezerros, utilizou-se instrumental cirúrgico individual para cada um dos materiais, que foram colhidos na seguinte sequência: glândulas salivares submandibulares, olhos e, finalmente, o hipocampo e cerebelo. Desses materiais faziam-se impressões ou preparações da córnea, humor aquoso, hipocampo e cerebelo e cortes de congelação das glândulas salivares submandibulares, para coloração por imunofluorescência direta. Suspensão 1:10 (peso/volume) do hipocampo, cerebelo e glândula salivar submandibular e humor aquoso não diluído foram inoculados por via IC em camundongos lactentes, na dose de 0,03 ml e observados por 21 dias. Para pesquisa dos corpúsculos de Negri, o hipocampo e ce-

rebelo foram cortados em micrótomo de congelação, espessura de 2 a 4 micra, e corados pela técnica de tricômico de Shorr, segundo LUNA (1968).

A descrição estatística dos dados obtidos foi feita através das percentagens encontradas para cada material e método de diagnóstico. A análise estatística compreendeu o estudo das diferenças nas proporções de positivos para cada material e método, de acordo com o teste do qui-quadrado, *in* SNEDECOR (1970). Fixou-se, para aceitação da existência de diferença de positividade entre os materiais e métodos, o risco de erro menor do que 5%.

TABELA I

Número de bezerros, amostra de vírus, vias de inoculação e tipo de material colhido ante-mortem e post-mortem para diagnóstico da raiva

Grupos	Quantidade de Bezerros	Amostra de Vírus	Via de Inoculação	M A T E R I A L		E S T U D A D O	
				Ante-mortem	Nº	Post-mortem	Nº
I	30	CVS-27/CPZ 396.250DL50	Intra Cerebral	-		Glândula salivar submandibular	30
						Humor aquoso	30
						Hipocampo	30
						Cerebello	30
II	15	CVS-27/CPZ 396.250DL50	Intra Cerebral			Hipocampo	15
						Cerebello	15
III	4	Rua Arará GL/72 22.500DL50	Intra Muscular			Glândula salivar submandibular	4
						Córnea	4
						Humor aquoso	15
						Córnea	15
						Humor aquoso	4
						Hipocampo	4
						Cerebello	4



A Tabela 2 mostra os resultados obtidos no grupo I. As percentagens de positividade dos humores aquosos e glândulas salivares submandibulares de 30 bezerros com raiva experimental por vírus fixo, confirmada post-mortem pelo exame do hipocampo e cerebelo, foram as seguintes: humor aquoso por imunofluorescência direta, 20 e por inoculação intracerebral em camundongos lactentes, 100; glândula salivar submandibular por imunofluorescência direta e inoculação, 23,3 em ambos. As percentagens de concordância entre os dois métodos de diagnóstico, para cada material, foram as seguintes: humor aquoso, 20 (6/30); glândula salivar submandibular, 42,8 (3/7); e hipocampo e cerebelo, de 100 (30/30).

No grupo II, a percentagem de positividade do vírus rábico fixo no humor aquoso e glândula salivar submandibular, colhidos ante-mortem, de 15 bezerros com raiva clínica, posteriormente confirmada pela imunofluorescência direta e inoculação da suspensão de hipocampo e cerebelo em camundongos lactentes, foi a seguinte: humor aquoso por imunofluorescência, 20 (3/15) e por inoculação intracerebral em camundongos lactentes, 33,3 (5/15); glândula salivar submandibular por imunofluorescência, 6,6 (1/15) e por inoculação, 0 (0/15). As percentagens de concordância entre os métodos de diagnóstico na revelação de positivos, para cada material, à exceção da glândula

salivar submandibular, que não apresentou concordância, foram as seguintes: humor aquoso, 60 (3/5); hipocampo e cerebelo, 100 (15/15). (Tabela III).

A Tabela IV mostra a frequência de humores aquosos positivos quando colhidos ante-mortem e post-mortem. A imunofluorescência foi positiva em 20% dos humores aquosos colhidos ante-mortem e post-mortem, enquanto a inoculação foi positiva em 33,3% para os colhidos ante-mortem e 100% para os colhidos post-mortem.

A Tabela 5 mostra a frequência de glândulas salivares submandibulares, colhidas ante-mortem e post-mortem, positivas à imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos lactentes. A biópsia de 15 glândulas salivares submandibulares revelou o seguinte resultado: 6,7% de positivas à imunofluorescência direta e nenhuma positiva à inoculação intracerebral em camundongos lactentes. O exame post-mortem de 30 glândulas salivares submandibulares resultou em sete positivas à inoculação intracerebral em camundongos lactentes.

Os quatro bezerros do grupo III, inoculados com o vírus de rua, mostraram períodos de incubação de 26, 28, 70 e 95 dias, respectivamente. O curso clínico observado foi de 3 a 5 dias. Os exames realizados no hipocampo e cerebelo destes bezerros revelaram completa concordância entre a presença de corpúsculos de Negri, imunofluorescência e inoculação intracerebral em camundongos lactentes.

Na Tabela 6 são comparados, diariamente, para cada bezerro estudado, os resultados dos exames realizados ante-mortem e post-mortem, segundo os métodos de diagnóstico. A inoculação das salivas colhidas, diariamente, mostrou resultados positivos em todas as 15 colheitas nos quatro bezerros, enquanto a imunofluores-

*cência foi positiva somente em duas amostras de salivas, provenientes de dois bezerros.*

*As percentagens de mortalidade devida à raiva, períodos médio e mínimo de incubação em camundongos inoculados com a saliva colhida, diariamente, durante o curso clínico da doença nos quatro bezerros do grupo III, são apresentados na Tabela 7.*



TABELA 2

GRUPO I: Detecção do vírus fixo, através da IF e IC em camundongos lactentes, no humor aquoso e glândula salivar submandibular colhidas post-mortem, de bezerros com raiva experimental.

Bezerros	Humor Aquoso		Glândula Salivar	
	IF	IC	IF	IC
1	-	+	-	-
2	-	+	+	+
3	-	+	+	-
4	+	+	-	+
5	+	+	+	-
6	+	+	+	+
7	-	+	-	-
8	+	+	+	+
9	-	+	-	+
10	-	+	-	-
11	-	+	-	-
12	-	+	-	+
13	-	+	-	+
14	-	+	-	-
15	+	+	-	-
16	-	+	-	-
17	-	+	-	-
18	-	+	+	-
19	-	+	-	-
20	-	+	-	-
21	-	+	-	-
22	-	+	+	-
23	-	+	-	-
24	-	+	-	-
25	-	+	-	-
26	-	+	-	-
27	-	+	-	-
28	+	+	-	-
29	-	+	-	-
30	-	+	-	-
Total:	6/30	30/30	7/30	7/30

TABELA 3

GRUPO II: Detecção do vírus fixo, por IF e IC em camundongos lactentes, no humor aquoso e glândula salivar submandibular, colhidos ante-mortem, de bezerros com raiva experimental.

Bezerros	Humor Aquoso		Glândula Salivar	
	IF	IC	IF	IC
31	-	-	-	-
32	+	+	+	-
33	-	+	-	-
34	+	+	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	-	+	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	-	-	-	-
42	+	+	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	-	-	-	-
<b>Total:</b>	3/15	5/15	1/15	0/15

TABELA 4

Frequência do vírus rábico fixo no humor aquoso colhido ante-mortem e post-mortem de bovinos, segundo o método de diagnóstico

Métodos Fases	IMUNOFLUORESCÊNCIA				I N O C U L A Ç Ã O			
	Positivo		Negativo	Total	Positivo (1)		Negativo	Total
	Nº	%			Nº	%		
<u>Ante-mortem</u>	3	20	12	15	5	33,3	10	15
<u>Post-mortem</u>	6	20	24	30	30	100	0	30
Total:	9	20	36	45	35	77,8	10	45

(1) Prova de significância de qui-quadrado igual a 20,87 ( $p < 0,0001$ )

TABELA 5

Frequência do vírus rábico na glândula salivar submandibular de bezerros, colhida ante-mortem e post-mortem, segundo o método de diagnóstico

Métodos Fases	IMUNOFLUORESCÊNCIA				I N O C U L A Ç Ã O			
	Positivo		Negativo	Total	Positivo		Negativo	Total
	Nº	(1)%			Nº	(2)%		
<u>Ante-mortem</u>	1	6,7	14	15	0	0	15	15
<u>Post-mortem</u>	7	23,3	23	30	7	23,3	23	30
Total:	8	17,8	37	45	7	15,6	38	45

(1) Prova de significância de qui-quadrado igual a 0,92 ( $p < 0,500$ )

(2) Prova de significância de qui-quadrado igual a 2,71 ( $p < 0,250$ )

TABELA 6

Comparação entre a positividade pelos métodos de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos lactentes de materiais colhidos ante-mortem e post-mortem de quatro beserros com raiva experimental a vírus de rua

Identificação	Dias de Curso	A n t e - m o r t e m						P o s t - m o r t e m					
		H. aquoso		Saliva		Córnea		H. aquoso		Gl. salivar		Córnea	
		IF	IC	IF	IC	IF	IC	IF	IC	IF	IC	IF	IC
27	1º	-	-	-	+	-	-	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	2º	-	-	+	+	-	-	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	3º	-	-	-	+	-	-						
	4º	-	-	-	+	-	-						
Total	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4							
113	1º	-	-	-	+	-	-	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	2º	-	-	-	+	-	-						
	3º	-	-	+	+	-	-	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	4º	-	-	-	+	-	-						
	5º	-	-	-	+	-	-						
Total	0/5	0/5	1/5	5/5	0/5	0/5							
139	1º	-	-	-	+	-	-	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	2º	-	-	-	+	-	-						
	3º	-	-	-	+	-	-						
Total	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3							
187	1º	-	-	-	+	-	-	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	2º	-	-	-	+	-	-						
	3º	-	-	-	+	-	-						
Total	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3							
Total Geral:	0/15	0/15	2/15	13/15	0/15	0/15	0/4	0/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4

Numerador = Materiais positivos  
Denominador = Total estudado



TABELA 7

Mortalidade, período médio e mínimo de incubação da raiva em camundongos inoculados com salivas de quatro bezerros em raiva de rua experimental

Identificação	Nº de Salivas	Mortalidade		Período de incubação em dias	
		Nº	%	Médio	Mínimo
27	4	(1) 30/33	90	11	10
113	5	31/36	86	13	9
139	3	23/24	96	13	12
187	3	7/20	35	16	16
TOTAL	15	91/113	80	13	11

(1) Número de camundongos positivos para raiva confirmada pela IF

(2) Número de camundongos inoculados

Utilizando o teste de imunofluorescência direta, REIS & cols. (1971) investigaram a presença do vírus rábico no humor aquoso de cão, boi, gato e homem e encontraram um percentual de 64,8 de positividade. O mesmo material inoculado em camundongos revelou 72,5% de positividade. A concordância encontrada entre os dois métodos foi de 57,4%.

No presente experimento, os resultados encontrados na Tabela 2 mostram que foi possível detectar e comprovar a presença do vírus fixo no humor aquoso, por imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos lactentes. Entretanto, pode-se observar que a imunofluorescência revelou apenas 20% dos positivos, enquanto a inoculação mostrou que todos os humores aquosos estavam positivos. A concordância entre os dois métodos foi, portanto, de 20%. Esse fato ocorreu, provavelmente, devido a pequena quantidade de células existentes no humor aquoso e somente algumas permaneciam aderidas à lâmina após a preparação da impressão.

Na Tabela 2 observa-se, ainda, que o número de glândulas salivares submandibulares positivas, colhidas post-mortem em ambos os métodos, foi de 23,3% e a concordância de 42,8%. O encontro de cinco glândulas salivares submandibulares, sendo quatro do grupo I e uma do grupo II, positivas à imunofluorescência direta e negativas à inoculação intracerebral em camundongos lactentes,



baseado em sua experiência, que mostrou em camundongos perfeita concordância entre córnea negativa e glândula negativa, córnea positiva e glândula positiva. Este fato é confirmado, em parte, pelo trabalho de MARTELL & ALDASORO (1972), que encontraram essa concordância em 12 bovinos com raiva natural. Entretanto, nessa mesma pesquisa, em dois bovinos inoculados experimentalmente essa concordância não ocorreu: um bovino apresentou córnea positiva e glândula negativa e o outro, com córnea negativa, a glândula foi positiva.

Por outro lado, REIS & cols. (1973) estudando casos de raiva humana, não encontraram esta concordância em seis pacientes que apresentaram as salivas positivas e o teste da córnea negativo.

No presente trabalho também não foi verificada a concordância sugerida por SCHNEIDER (1969). As impressões da córnea efetuadas ante-mortem e post-mortem foram negativas, enquanto todas as salivas e a glândula salivar submandibular, colhidas no mesmo período, foram negativas. Estes resultados demonstram que a distribuição centrífuga do vírus nos diversos órgãos e tecidos não pertencentes ao sistema nervoso central é extremamente variável.

O vírus rábico de rua foi detectado pela imunofluorescência na saliva de um bezerro, colhida no segundo dia de curso, e em outro bezerro na saliva colhida no terceiro dia. Todas as salivas foram positivas à inoculação intracerebral em camundongos lactentes e a mortalidade observada mostra que essas salivas continham concentração elevada de vírus. (Tabela 7).

A comparação entre os métodos e os materiais utilizados na tentativa do diagnóstico ante-mortem, nos bezerros do grupo III, mostra que a saliva e a inoculação intracerebral em camundongos lactentes foram os que apresentaram mais sensibilidade e maior especificidade.

No presente experimento a positividade de humores aquosos, colhidos post-mortem, foi de 100%, confirmando os dados de REIS & cols. (1971) e os de COURMONT & NICOLAS (1903), em coelhos, e BENIGNOS (1970) in MARTELL & ALDASORO (1972), em bovinos.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, verifica-se que a biópsia da glândula salivar submandibular é uma alternativa para o diagnóstico de certeza da raiva experimental a vírus fixo, apesar da frequência de positivas não ser tão elevada como a verificada por MANQUÊLIAN (1935); e estas nem tão precoces, como cita KONRADI (1916), em glândulas salivares de cão com raiva natural. A análise estatística desta Tabela revela que, ao nível de rejeição adotado, igual a 5%, a proporção de glândulas salivares submandibulares positivas entre as fases de colheita, não foi estatisticamente significativa.

A raiva observada nos bezerros do grupo III foi semelhante à natural, com um período de incubação variável (26 a 95 dias) e um curso rápido (3 a 5 dias). Os cortes histológicos de hipocampo e cerebelo desses animais, corados pelo método de Shorr, revelaram a presença de inúmeros corpúsculos de Negri. Esses elementos caracterizam a raiva causada pelo vírus de rua, segundo LEPINE (1969).

A Tabela 6 mostra que as pesquisas do vírus rábico no humor aquoso e córnea colhidos ante-mortem e post-mortem foram negativas, não confirmando os resultados verificados por LEVADITI & SCHOEN (1935) em coelhos e camundongos, SCHNEIDER (1969) em camundongos, ATANASIU & cols. (1970) em raposas, BENIGNOS (1970) in MARTELL & ALDASORO e REIS & cols. (1971) em bovinos.

SCHNEIDER (1969) sugeriu o teste da córnea como um método capaz de revelar a infecciosidade da saliva,



pode ser explicado pelo fato de a imunofluorescência direta revelar antígeno rábico, vivo ou morto, e a reprodução da doença em camundongos depender de uma dose mínima infectante; e também à distribuição desigual do vírus no tecido, como observaram MANQUÉLIAN (1935) e GOLDWASSER & cols. (1959).

As percentagens de humores aquosos positivos à imunofluorescência direta foi igual (20) após colheita ante-mortem e post-mortem, como pode ser observado na Tabela 4. À inoculação intracerebral em camundongos lactentes, a diferença de humores aquosos positivos, segundo a fase da colheita, foi acentuada. A análise estatística revelou para qui-quadrado valor igual a 20,87, que ultrapassa de muito o valor crítico desta estatística para dois graus de liberdade, ao nível de rejeição adotado de 5%. As frequências observadas de positivos, entre o humor aquoso colhido ante-mortem e inoculado por via intracerebral em camundongos lactentes, foi, portanto, significativamente menor do que a que seria esperada sob a hipótese de ser igual ao colhido post-mortem. Essa diferença, possivelmente, pode ser explicada porque a difusão centrífuga do vírus fixo se processe na fase final da doença. Neste aspecto, SCHNEIDER & HAMAN (1969) verificaram que o tempo e a intensidade da infecção de órgãos não pertencentes ao sistema nervoso central dependem da dose inoculada, distância da conexão nervosa com o sistema nervoso central e a abundância de nervos no órgão. Como na presente investigação a única variável diferente no estudo do humor aquoso dos bezerras dos grupos I e II foi a fase da colheita, reforça-se a hipótese da difusão do vírus fixo na fase final da doença.

REIS & cols. (1971) encontraram 94% de humores aquosos positivos em 15 bovinos inoculados com vírus fixo.

Entretanto, como pode ser observado na Tabela 8, o tempo necessário para o diagnóstico, variou de 9 a 16 dias, com média de 11,75 dias. Resultados semelhantes foram encontrados, em casos de raiva humana, por REIS & cols. (1973) que isolaram o vírus na saliva de seis pacientes, sendo que em três pacientes esse isolamento foi feito três, quatro e 13 dias do óbito, nos outros três após a morte dos indivíduos. O tempo necessário para o diagnóstico variou de sete a 14 dias, com média de 9,2 dias.

A precocidade do diagnóstico da raiva a partir da saliva poderia, provavelmente ser conseguida de duas maneiras: primeiro utilizando a técnica descrita por BAGNAROLI & cols. (1970) que recomendam o sacrifício dos camundongos lactentes inoculados com material suspeito a partir do terceiro dia da inoculação e exame do cérebro pela imunofluorescência direta. Em segundo lugar, o desenvolvimento de um método de preparação das salivas capaz de aumentar a sensibilidade da imunofluorescência direta para revelar o antígeno rábico nas salivas positivas.

- 6.1. Foi encontrada uma frequência de 100% de vírus rábico fixo, no humor aquoso, colhido post-mortem, de bezerros inoculados experimentalmente;
- 6.2. foi verificada uma frequência de 33,3% de vírus rábico fixo no humor aquoso, colhido ante-mortem, de bezerros inoculados experimentalmente;
- 6.3. a difusão centrífuga do vírus fixo se processou na fase final da doença;
- 6.4. o vírus rábico fixo foi detectado, por inoculação intracerebral em camundongos lactentes, em 15,6% das glândulas salivares submandibulares dos bezerros inoculados experimentalmente;
- 6.5. o vírus de rua foi isolado da saliva, diariamente, durante a fase clínica da doença, de bezerros inoculados experimentalmente;
- 6.6. o método da inoculação intracerebral em camundongos lactentes foi mais sensível do que o método da imunofluorescência direta, na detecção do antígeno rábico no humor aquoso, na glândula salivar submandibular de bezerros inoculados experimentalmente com vírus fixo;
- 6.7. o método da imunofluorescência direta foi capaz de revelar o antígeno rábico na saliva de bezerros inoculados com vírus de rua;

- 6.8. o resultado negativo encontrado nos diagnósticos da córnea pelo método de imunofluorescência direta, nos casos de raiva experimental a vírus de rua, não significou necessariamente ausência de vírus na glândula salivar submandibular;
- 6.9. o método da inoculação intracerebral em camundongos lactentes mostrou-se bastante sensível para a detecção do antígeno rábico na saliva de bezerros inoculados com vírus de rua.



O vírus rábico foi pesquisado no humor aquoso, saliva, glândula salivar submandibular e córnea de bezerros inoculados com vírus fixo ou de rua. Os materiais foram colhidos ante-mortem e post-mortem e examinados pelos métodos imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos lactentes. Os seguintes resultados foram encontrados:

GRUPO I - De 30 humores aquosos e de 30 glândulas salivares submandibulares, colhidas imediatamente após a morte dos animais, conseguiu-se demonstrar pela imunofluorescência direta o vírus rábico fixo - amostra CVS-27/CPZ - em seis humores aquosos e em sete glândulas salivares submandibulares. À inoculação intracerebral em camundongos lactentes, 30 humores aquosos e sete glândulas foram positivas. A percentagem de positividade do hipocampo e cerebelo, em ambos os métodos, foi de 100.

GRUPO II - De 15 humores aquosos e 15 glândulas salivares submandibulares, colhidos ante-mortem, conseguiu-se detectar o vírus rábico fixo em três humores aquosos e em uma glândula salivar submandibular, através da imunofluorescência direta. À inoculação intracerebral em camundon-



gos lactentes, cinco humores aquosos foram positivos, enquanto todas as glândulas salivares submandibulares foram negativas. A percentagem de positividade do hipocampo e cerebelo, em ambos métodos, foi de 100.

GRUPO III- De quatro bezerros inoculados com vírus de rua, conseguiu-se detectar pela imunofluorescência direta o antígeno rábico na saliva de dois bezerros. As impressões de córnea e preparações de humor aquoso efetuadas durante a fase clínica e após a morte resultaram negativas. À inoculação intracerebral em camundongos lactentes, todas as salivas colhidas diariamente, ante-mortem, foram positivas. Todos os humores aquosos foram negativos em ambos os métodos de diagnóstico. As glândulas salivares submandibulares, hipocampo e cerebelo foram positivos à imunofluorescência direta e à inoculação intracerebral em camundongos lactentes. O exame histológico do hipocampo e cerebelo revelou, em todos, a presença de numerosos corpúsculos de Negri.

## 8. SUMMARY

38

The presence of the rabic virus was checked in aqueous humor (AH), saliva, submandibular salivary gland (SSG) and cornea of calves inoculated with fixed virus or street virus. Those materials were collected ante-mortem and post-mortem and were examined under fluorescent antibody technique (FAT) and intracerebral inoculation (IC) of suckling mice. The following results were found:

GROUP I - From 30 AH and 30 SSG collected immediatly after the sacrifice of the animals it was possible to demonstrate by FAT the fixed rabic virus (Strain CVS-27/CPZ) in six AH and in seven SSG. 30 AH and seven SSG were positive after inoculation in suckling mice. In both the diagnostic methods used, Ammon's horn and cerebellum were positive in all cases.

GROUP II - From 15 AH and 15 SSG, collected ante-mortem, fixed rabic virus was detected in three AH and in one SSG, through FAT. Five AH were positive after intracerebral inoculation of suckling mice, while all the SSG were negative. Again the positivity of Ammon's horn and cerebellum was 100%.

*GROUP III- Using FAT it was possible to demonstrate the rabic virus in two saliva of four calves inoculated with street virus. Corneal imprints and AH smears made during the clinical phase and after death were negative. All the saliva collected daily during the clinical phase and inoculated intracerebrally in suckling mice were positive. In both diagnostic methods used, all the AH were negative. All the SSG, Ammon's horn and cerebellum were positive by FAT and IC in suckling mice. All the histological preparations of Ammon's horn and cerebellum showed many Negri's bodies.*

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

41

- ATANASIU, P., GUILLON, J.C., & VALLE, A., 1970. Contribution a l'étude de la rage experimentale de renard. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 119:260-269.
- BAGNAROLLI, R.A., LARGHI, O.P. & MARCHEVSKY, N., 1970. Susceptibilidad de ratones lactentes y adultos al virus rabico demostrada por inmunofluorescencia. Bol. Ofic. Sanit. Panamer., 59 (5):388-392.
- BELL, F.J., 1964. Abortive rabies infection. I. Experimental production in white mice and general discussion. J. Infect. Dis., 114:249-257.
- BENIGNOS, J., 1970. Estudio de patogenia del virus rabico en ganado inoculado experimentalmente. U.N.A.M., Tesis profesional. In Martell & Aldasoro (1972).
- COURMONT, J. & NICOLAS, J., 1903. Étude sur la virulence de l'humour aqueuse des lapins morts de la rage. C.R. Soc. Biol., Paris, 55:1595-1596.
- DI VESTEVA, A. & ZAGARI, G., 1889. Sur la transmission de la rage par voie nerveuse. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 3:237-248.
- GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.E., 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc. Soc. Exp. Biol., 98:211-223.
- GOLDWASSER, R.A., KISSLING, R.E., CARSKI, T.R. & HOSTY, T.S., 1959. Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. Bull. WHO, 20:579-588.



- HALAZS, 1934. Un cas de rage guéris chez un bovin. In Nilsson (1969).
- KONRADI, D., 1916. Hérité de la rage. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 30:33-48.
- KOPROWSKI, H., 1967. Capitulo VI. Épreuve d'inoculation a la souris. In La Rage Techniques de Laboratoire. Organization Mondiale de la Santé, 10<sup>a</sup> edição. Genève.
- KUNDIN, W.F., LIU, C. & RODINA, P., 1966. Pathogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. J. Immunol., 96:39-48.
- LEPINE, P. & GAMET, A., 1969. La Rage. L'Expansion Editeur, Paris, 140 pāgs.
- LEVADITI, C. & SCHOEN, R., 1935. Les corps de Negri dans le cytoplasme des épithéliens de la cornée. Ann. Inst. Pasteur, Paris, (Numéro commémoratif sur la rage). 55: 69-96.
- LUNA, L.G., 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraww Hill Book Company, 3th edition. New York.
- MARTELL, D. & ALDASORO, M., 1972. Deteccion de virus rabico. Bol. Ofic. Sanit. Panamer., 73 (2) :117-123.
- MANQUÉLIAN, Y., 1935. Le mecanisme de l'infection de la salive an cours de la rage. Ann. Inst. Pasteur, Paris, (Numéro commémoratif sur la rage). 55:97-107.
- NILSSON, M.R., 1969. O problema do portador da raiva. Bol. Ofic. Sanit. Panamer., 67 (3):195-205.
- NILLSON, M.R., 1970. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. Bol. Ofic. Sanit. Panamer., 68 (6):486-494.
- PASTEUR, L., CHAMBERLAND, ROUX & THUILLIER, 1882. Nouveaux faits pour servir à la connaissance de la rage. C.R. Acad. Sci., Paris, 95:1187-1192.

- REED, L.J. & MUENCH, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg., 27: 493-497.
- REIS, R., FIGUEIREDO, J.B., MOREIRA, E.C., NEVES, J., GONTIJO, M.T. & ORNELLAS-SANTOS, P.P., 1971. Presença do vírus rábico na córnea, humor aquoso e nervo óptico de humanos, bovinos, felinos e caninos com raiva. Arq. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte, 23:207-214.
- REIS, R., MOREIRA, E.C., NEVES, J., LOPEZ, M., TAFURI, W. L., PITTELLA, J.H.L., MARINHO, R.P., MARRA, U.D., ALVAREZ, J.M., DINIZ, I.D., SILVA, O.A., FOSCARINI, L. G., MARTINS, W.T., CAMPOS, G.B., RIBEIRO, M.B. & GONTIJO, M.T., 1973. Serological studies of seven cases of human rabies, and intra-vitam virus isolation. Rev. Inst. Med. Tropical, São Paulo, no prelo.
- REMLINGER, P., 1907. La guérison spontanée de la rage expérimentale du chien et la persistance du virus rabique dans la salive des animaux guéris. Réc. Med. Vét., 84:269-280.
- SCHNEIDER, L.G., 1969. The cornea test: a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. Zol. Vet. Med. B16, 24-31.
- SCHNEIDER, L.G. & HAMANN, I., 1969. Die pathogenese der tollwut bei der maus. III. Die zentrifugale virusausbreitung und die virusgeneralisierung in organismus. Zbl. Bakt. Parasit. Kde., I (212):13-41.
- SNEDECOR, G.W., 1970. Capitulo IX. Datos enumerados con mas de un grado de libertad. In Metodos Estadísticos Aplicados à la Investigación Agrícola e Biológica. Cia. Editorial Continental S.A. Mexico 22, 626 págs.
- TIERKEL, E., 1967. Capitulo II. Expedition des prélèvements préparation des tissus animaux. In La Rage Techniques de Laboratoire. Organization Mondiale de La Santé, 10<sup>a</sup> edição. Genève.