

ISOLAMENTO DE VÍRUS RÁBICO DO RIM, CORAÇÃO E CÉREBRO DE BOVINO NA DOENÇA NATURAL¹

RENATO AUGUSTO DA SILVA², ARY MOREIRA DE SOUZA³ e ALTAIR CORRÊA LIMA⁴

Sumário

De uma vaca mestiça zebu, acometida de raiva, no Município de São Fidelis no Estado do Rio de Janeiro, foi isolado vírus da raiva do rim, coração e cérebro, por inoculação intracerebral das emulsões destes tecidos, em camundongos lactentes (4 dias de idade) e adultos (21 dias de idade).

As amostras de vírus, isoladas dos diferentes tecidos, foram identificadas como vírus rábico pela formação de corpúsculos de Negri no citoplasma das células nervosas dos cérebros dos camundongos inoculados e pela prova de soro-neutralização, neutralizando-se para esta prova um soro anti-rábico de reconhecida capacidade neutralizante.

INTRODUÇÃO

A presença do vírus em tecidos não nervosos tem dado ensejo a diversos trabalhos por parte dos especialistas em raiva. Estes trabalhos têm sido orientados para determinados portadores naturais do vírus, principalmente, morcêgos e carnívoros silvestres. Assim, Johnson (1959), ao estudar casos naturais de raiva em doninha malhada (spotted skunk), isolou vírus rábico do tecido mamário e renal. Em morcêgos *Tadarida b. mexicana*, experimentalmente infectados, Sulkin *et al.* (1957) demonstraram o lipotropismo do vírus rábico isolando-o da glândula inter-escapular (brown fat) e Villa *et al.* (1963) isolaram vírus rábico das mesmas glândulas de morcêgos aparentemente sadios.

O vírus rábico tem sido isolado de pulmão e outros tecidos de morcêgos, conforme demonstraram claramente os trabalhos de Bell *et al.* (1962) que obtiveram o vírus do coração, rins, pulmão e baço de morcêgos insetívoros *Eptesicus fuscus* e posteriormente, Girard *et al.* (1965) reportaram-se ao isolamento

do vírus rábico dos rins, cérebro e glândulas inter-escapulares (brown fat), de morcêgos *Eptesicus fuscus* e *Myotis lucifugus*. No Brasil, a primeira notificação sobre o assunto resultou dos trabalhos de Silva e Souza (1966) quando isolaram vírus rábico de pulmão, coração, rins, bexiga e outros diferentes tecidos de morcêgos *Desmodus rotundus*.

Decorrentes dos trabalhos citados, orientamos as nossas pesquisas para diferentes tecidos de bovinos, em casos naturais de infecção rábica. Recentemente, relatamos o isolamento do vírus rábico do rim, coração e cérebro de uma vaca acometida de raiva em condições naturais, sendo o propósito da presente publicação descrever com mais detalhes os trabalhos de isolamento e identificação do vírus rábico isolado de rim, coração e cérebro de bovino naturalmente infectado.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais que deram origem ao presente trabalho foram obtidos de uma vaca mestiça Zebu, de aproximadamente 4 anos de idade, pertencente a uma fazenda do Município de São Fidélis (21° 38' 48" de latitude Sul, 41° 44' 44" de longitude Oeste de Greenwich e 24 metros de altitude), no Estado do Rio de Janeiro, sacrificada na manhã do dia 20 de julho de 1966.

O animal apresentava sintomas de raiva, e o que mais nos chamou atenção foi o fato de estar há 3 dias sem poder levantar-se, no entanto o seu psiquismo parecia normal, comendo a vegetação em redor. Era o único caso de raiva observado no plantel de mais de 300 cabeças. O rebanho da fazenda estava

¹ Apresentada comunicação à Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária em Sessão Ordinária de 22 de agosto de 1966. Trabalho desenvolvido na Seção de Vírus do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), DPEA, Min. Agricultura. Constitui o Boletim Técnico n.º 43 do IPEACS.

² Veterinário, Chefe da Seção de Vírus do IPEACS e Assistente da Escola de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26.

³ Veterinário da Seção de Vírus do IPEACS.

⁴ Veterinário e Chefe do Posto de Vigilância Sanitária Animal do Serviço de Defesa Sanitária Animal, Campos, Estado do Rio de Janeiro.

vacinado contra a raiva e esta vaca havia sido comprada há cerca de 3 meses não tendo sido vacinada no local de origem.

Sacrificamos o animal por choupeamento e sangria total. Coletamos fragmentos de cérebro, cerebelo, bulbo, fígado, coração, pulmão e o rim direito. Sangue periférico foi coletado, adicionando-se glicerina em partes iguais. A urina foi pipetada e colocada em frasco esterilizado.

Os materiais assim coletados foram devidamente acondicionados em saco plástico e colocados em marmita térmica refrigerada e trazidos no mesmo dia ao laboratório, quando foram guardados em temperatura de menos de 20°C.

Procedemos inicialmente a técnica de Faraco (Bier 1961) nos fragmentos de Corno de Ammon da vaca sacrificada.

Isolamento do vírus

Preparamos emulsões individuais a 20% de cérebro, rim, pulmão, coração e fígado. Estes tecidos foram pesados, após prévia lavagem em soro fisiológico estéril para eliminação do sangue. O rim foi destituído de sua camada gordurosa e cápsula, sendo finamente macerado em liquidificador. Dêste tecido obtivemos um volume de 400 ml de emulsão.

A urina foi medida e tratada por antibióticos e, após centrifugação, inoculada em camundongos.

O sangue coagulado foi pesado e macerado em grau, adicionando-se soro fisiológico para se obter a concentração de 20%.

Da emulsão de rim tomou-se 10 ml, tratando-se por 1000 U.I. de penicilina potássica e 1 mg de di-hidro estreptomina para cada mililitro. As demais emulsões foram também tratadas pelos antibióticos citados. Centrifugamos as emulsões obtidas a 2500 rpm durante 10 minutos, separando-se os sobrenadantes dos sedimentos. Após esta operação incubamos as emulsões por 30 minutos em temperatura de 4°C. Contrôles bacteriológico em caldo simples e agar sangue de cada emulsão foi realizado antes de procedermos as inoculações intracerebrais nos camundongos.

Os resultados destas inoculações expressamos no Quadro 1.

Decorridos 12 dias, descongelamos a emulsão de rim a 20% com cerca de 400 ml, dividindo-a em duas partes. Centrifugamos novamente, inoculamos para cada parte, camundongos de 4 dias de idade, cujos resultados estão demonstrados nas fichas 7083 e 7084 (Figs. 1 e 2).

As emulsões foram inoculadas em camundongos de 4 dias de idade por via intracraniana na dose de 0,03 ml.

A seguir congelamos as diferentes emulsões em temperatura de menos 20°C., para serem utilizadas de acordo com as necessidades do desenvolvimento do trabalho.

Identificação do vírus

Para a identificação das amostras do vírus isoladas do rim, coração e cérebro realizamos os seguintes exames:

a) *exame histopatológico* que consistiu em fazeremos esfregaços em lâminas dos cérebros dos camundongos adultos e lactentes, sacrificados após os sintomas da doença, utilizando-se para tal fim, a técnica de Faraco (Bier 1961).

b) *prova de soro neutralização*, utilizando-se as amostras de vírus isoladas do bovino sacrificado. Estas amostras correspondiam a 1.^a, 2.^a e 3.^a passagens, respectivamente para cérebro, rim e coração, em camundongos.

Utilizamos um soro imune com alto teor em anticorpos para o vírus rábico, proveniente do Instituto Oswaldo Cruz e um soro normal de cavalo.

A prova consistiu em se colocar partes iguais das diluições de vírus, que variaram de 10⁻⁶ a 10⁻¹ para o soro normal de cavalo e de 10⁻⁶ a 10⁻¹ para o soro padrão. Agitávamos bem os tubos, permanecendo as misturas sôros mais vírus, em banho-maria a 37°C por uma hora. Após este período, os tubos contendo as misturas eram transferidos para o banho de gelo, procedendo-se às inoculações intracranianas nos camundongos de 21 dias de idade, na dose de 0,03 ml. Para cada diluição usávamos um lote de 6 camundongos observando-se êsses animais por um período de 21 dias.

No cálculo do título do vírus e das doses neutralizantes, baseamo-nos no método de Reed e Muench (1938) e consideramos a neutralização de 100 DL₅₀ suficiente para estabelecer a identidade do vírus (World Health Organization 1954).

RESULTADOS

As diferentes emulsões não revelaram microorganismos nos meios de caldo simples e agar sangue.

Os resultados das inoculações das diversas emulsões em camundongos estão sumariados no Quadro 1.

QUADRO 1. Material n.º 3 399: bovino sacrificado na fase paralítica no Município de São Fidélis, Estado do Rio de Janeiro

| Tecidos inoculados | Data da inoculação | Dose em ml | Via | Incubação | | Relação de inoculados/mortes | | Pesquisa de corpúsculos de Negri |
|--------------------|--------------------|------------|---------|-----------|--------|------------------------------|--------|----------------------------------|
| | | | | Lactente | Adulto | Lactente | Adulto | |
| Cérebro..... | 21-7-66 | 0.03 | I. Cer. | — | 7 dias | — | 9/9 | Positivo |
| Coração..... | 25-7-66 | 0.03 | I. Cer. | 14 dias | — | 1/4 ^a | 0/7 | Positivo |
| Rim..... | 21-7-66 | 0.03 | I. Cer. | 8-21 dias | — | 3/8 ^b | 0/7 | Positivo |
| Pulmão..... | 25-7-66 | 0.03 | I. Cer. | — | — | 0/5 | 0/8 | — |
| Fígado..... | 27-7-66 | 0.03 | I. Cer. | — | — | 0/9 | — | — |
| Urina..... | 21-7-66 | 0.03 | I. Cer. | — | — | 0/8 | 0/7 | — |
| Sangue..... | 1-8-66 | 0.03 | I. Cer. | — | — | 0/8 | 0/9 | — |

^a Realizada segunda passagem ficha n.º 7 118.

^b Realizada segunda passagem ficha n.º 7 123.

Emulsão de cérebro

Os camundongos adultos com 7 dias de inoculados, apresentaram sintomas de raiva, sendo sacrificados e seus cérebros coletados para a pesquisa de corpúsculos de Negri e passagens posteriores em camundongos.

Emulsão de rim

A inoculação da emulsão de rim em camundongos de 4 dias, determinou o aparecimento de sintomas de raiva no 8.º dia em dois camundongos. Sacrificamos um deles, submetendo o cérebro ao Faraco e à novas inoculações (Ficha 7123, Fig. 3). O outro camundongo doente foi também sacrificado, coletando-se o cérebro para pesquisa de corpúsculos de Negri e trabalhos posteriores.

Um terceiro camundongo adoeceu após 21 dias de inoculado, sendo o cérebro coletado para a pesquisa de corpúsculos de Negri e novas passagens.

Os camundongos adultos inoculados com a emulsão de rim antes da congelação, nada digno de nota apresentaram, durante o período de observação de 30 dias.

Da emulsão de rim descongelada, após 12 dias de permanência a menos 20°C, obtivemos o seguinte resultado:

Porção I, decorridos 11 dias da inoculação nos camundongos lactentes, um deles adoeceu, sendo sacrificado. Parte do cérebro foi submetida ao Faraco e a outra transformada em emulsão para a inoculação em camundongos lactentes (Ficha 7150, Fig. 4).

| Material nº 3399 - Bovino - Emulsão de rim (vidro nº 1) | | | | | | | | | | | | | | | | | Ficha 7083 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | ... | 11 | ... | 17 | 18 | ... | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | / | / | / | / | / | / | / | / | Ds | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | / | / | M | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | / | / | D | M | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | D | M | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | D | D | M | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | D | M | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | / | / | / | |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2/8/66 - Inoc. i.c. com emulsão tratada por antibióticos (pen. estrept.) em camundongos lactentes
 / - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

FIG. 1. Inoculação intra-craniana da emulsão de rim de bovino em camundongos lactentes (Vidro n.º 1).

| Material nº 3399 - Bovino - Emulsão de rim (vidro nº 2) Ficha 7084 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | Ds | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | / | / | / | / | / | / | / | / | / | Ds |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2/8/66 - Inoc. i.c. da emulsão tratada por antibióticos (pen. estrep.) em camundongos lactentes
 / - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

FIG. 2. Inoculação intra-craniana da emulsão de rim de bovino em camundongos lactentes (Vidro n.º 2).

| Material nº 3399 - Bovino - Emulsão de rim - 2ª passagem Ficha 7123 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | / | / | / | / | / | / | / | / | M | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | D | P | M | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | D | P | M | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | D | D | M | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | D | D | M | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | D | D | Ps | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | D | D | Ps | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | D | D | Ps | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | | D | D | Ps | | | | | | | | | | |

8/8/66 - Inoc. i.c. da emulsão do cérebro do camundongo 7043, tratada com antibióticos (pen. estrep.) em camundongos adultos.
 / - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

FIG. 3. Inoculação intra-craniana da emulsão de rim de bovino em camundongos lactentes (2.ª passagem).

Ao 18.º dia de inoculação morreu um camundongo; no 25.º dia, morreram dois e finalmente, no 27.º dia mais outros dois, após apresentarem sintomas da doença.

Porção 2, com 11 dias de inoculação em camundongos lactentes, amanheceu um doente, sendo sacrificado e seu cérebro submetido ao Faraco. No 21.º dia após a inoculação um outro adoeceu, sendo sacrificado para estudos posteriores.

As porções 1 e 2 correspondentes a emulsão de rim após congelação foram inoculadas somente em camundongos lactentes.

As Fichas 7150 e 7076 (Figs. 4 e 5) representam as segundas passagens do vírus contido na emulsão de rim do bovino sacrificado, em camundongos lactentes. Estes camundongos adoeciam em um período de incubação de 7 a 9 dias.

| Material nº 3399 - Bovino - Emulsão de rim (vidro nº 1) - 2ª passagem | | | | | | | | | | | | | | | | | | Ficha 7150 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|------------|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | / | / | / | / | / | D | D | P | M | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | D | D | P | M | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | D | D | P | M | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | D | P | M | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | D | D | P | M | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | D | P | M | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | D | P | M | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | D | P | M | | | | | | | | | | | |

12/8/66 - Inoc. i.c. da emulsão do cérebro do camundongo 7083, tratada com antibióticos (pen. estrep.) em camundongos lactentes.
 I - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

FIG. 4. Inoculação intra-craniana da emulsão de rim de bovino em camundongos lactentes (Vidro n.º 1, 2.ª passagem).

| Material nº 3399 - Bovino - Rim - 2ª passagem | | | | | | | | | | | | | | | | | | Ficha 7076 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|------------|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | / | / | / | / | / | / | Ps | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | P | Ps | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | P | Ps | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | P | Ps | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | D | Ps | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | D | Ps | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | D | Ps | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | D | Ps | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | D | Ps | | | | | | | | | | | | | |

29/7/66 - Inoc. i.c. da emulsão do cérebro do camundongo 7043, tratada com antibióticos (pen. estrep.) em camundongos adultos.
 I - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

FIG. 5. Inoculação intra-craniana da emulsão de rim de bovino em camundongos lactentes (2.ª passagem).

Emulsão de coração

A leitura da Ficha 7055 (Fig. 6), correspondente a inoculação em camundongos de 4 dias de idade, da emulsão de coração, nos dá a seguinte interpretação: no 7.º dia de inoculação, adoeceu um camundongo, que foi sacrificado e seu cérebro emulsionado para nova inoculação, o que foi feito com resultado negativo. No 11.º dia morreu um camundongo sem apresentar sintomas, sendo desprezado. No 14.º dia de

inoculação, morreu outro camundongo, sem apresentação de sintomas, sendo o cérebro coletado para passagens e evidenciação de corpúsculos de Negri. No período de 30 dias de observação não houve mais nenhuma morte.

A Ficha 7118 (Fig. 7) relativa a inoculação do cérebro do camundongo morto no 14.º dia em camundongos de 21 dias de idade, não nos deixa dúvida quanto ao isolamento do vírus. No período de incuba-

| Material nº 3399 - Bovino - Emulsão de coração | | | | | | | | | | | | | | | | | Ficha 7055 | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|----|---|---|----|----|----|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | / | / | / | / | / | / | Ds | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | / | / | / | M | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | / | / | M | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | / | / | / | / | / | / | / |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

25/7/66 - Inoc. i.c. da emulsão tratada por antibióticos (pen. estrep.) em camundongos lactentes
 / - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

FIG. 6. Inoculação intra-craniana da emulsão de coração de bovino em camundongos lactentes.

| Material nº 3399 - Bovino - Coração - 2ª passagem | | | | | | | | | | | | | | | | | Ficha 7118 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | / | / | / | / | / | / | / | M | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | M | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | P | M | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | P | M | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | D | M | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | D | D | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | D | D | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

8/8/66 - Inoc. i.c. da emulsão do cérebro do camundongo 7055, tratadas com antibióticos (pen. estrep.) em camundongos adultos.
 / - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

FIG. 7. Inoculação intra-craniana da emulsão de coração de bovino em camundongos lactentes (2.ª passagem).

ção de 8 a 11 dias adoeceram e morreram a maioria dos camundongos com sintomas de raiva. Os cérebros foram coletados para Faraco e novas passagens.

A urina e as demais emulsões, representadas pelo sangue, pulmão e fígado, resultaram negativas nas inoculações em camundongos.

Identificação do vírus

a) *Exame histopatológico.* O exame microscópico dos esfregaços correspondentes aos cérebros da vaca

e cérebros dos camundongos inoculados com as diferentes emulsões revelou a presença de numerosos corpúsculos de Negri no citoplasma das células nervosas;

b) *Prova de soro-neutralização.* O Quadro 2, representativo dos resultados da prova de soro neutralização das diferentes amostras de vírus isoladas dos tecidos renal, cardíaco e nervoso, oferece as seguintes leituras: o título das amostras de vírus, foi dado pela mistura das diluições de vírus mais soro normal de

QUADRO 2. Soro-neutralização das amostras de vírus isoladas

| Órgãos | Título em DL ₅₀ /0,03 ml | | DL ₅₀ neutralizadas |
|--------------|-------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| | Vírus + soro padrão | Vírus + soro normal | |
| Cérebro..... | 10 ^{-2.54} | 10 ^{-5.44} | 794 |
| Rim..... | 10 ^{-1.00} | 10 ^{-3.50} | 316 |
| Coração..... | 10 ^{-1.53} | 10 ^{-3.50} | 100 |

cavalo, sendo de 10^{-3.50} para a amostra isolada do rim; de 10^{-3.50} para a amostra isolada de coração e finalmente de 10^{-5.44} para a amostra isolada de cérebro.

O soro imune do Instituto Oswaldo Cruz apresentou índices de neutralização de 10^{-1.0}, 10^{-1.50} e 10^{-2.54} para as amostras correspondentes ao rim, coração e cérebro, respectivamente.

As amostras de vírus isoladas do rim, coração e cérebro, neutralizaram 316, 100 e 794 DL₅₀ respectivamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Demonstramos no presente trabalho o isolamento de vírus rábico de tecido nervoso (cérebro) e tecidos não nervosos (rim e coração) de uma vaca naturalmente acometida de raiva, por inoculação em camundongos. Outros tecidos deste mesmo animal, como o sangue, pulmão e fígado deram resultados negativos. Trabalhamos neste caso com quantidade insuficiente de cada órgão. Achemos que o ideal seja o aproveitamento de todo o órgão e uma maior quantidade de sangue. Estranhamos que o vírus não tenha sido isolado da urina nas inoculações em camundongos, pelo fato de estar presente no tecido renal, conforme demonstramos no presente trabalho. Neste caso tornava-se necessária a aplicação da técnica de imunofluorescência para a evidenciação do vírus rábico na urina ou nos outros tecidos negativos à prova de inoculação em camundongos. Motivos independentes da nossa vontade impediram-nos de realizar esta técnica. A lógica permite-nos concluir por um escape de vírus rábico pela urina, quando este se encontra presente no rim. Decorrentes dos trabalhos de Girard *et al.* (1965), ficou demonstrada a presença de vírus rábico na urina de morcêgo portador de raiva, por técnica de imunofluorescência.

A bexiga não foi por nós utilizada neste experimento, devido ao resultado positivo obtido com o tecido renal, torna-se indispensável a sua utilização.

Verificamos que as amostras de vírus rábico isoladas de coração e rim revelaram em primeira passagem patogenicidade apenas para camundongos de 4 dias de idade. Passagens subseqüentes destas amostras, em camundongos adultos determinaram a morte de todos os animais. O grau de mortalidade observado foi de 37,5% e 25% para as emulsões de rim e coração, respectivamente. Já a amostra isolada de cérebro revelou-se 100% letal para os camundongos adultos inoculados.

No que se refere a produção de corpúsculos de Negri, as amostras de vírus rábico isoladas determinaram nas células nervosas dos cérebros dos camundongos inoculados a formação de inúmeros corpúsculos, observados tanto nas primeiras como nas segundas passagens. Estes achados, correspondentes as amostras de vírus isoladas de tecidos renal e cardiaco, em primeira passagem em cérebro de camundongo, contrariam o ponto de vista de Johnson (1959). Este autor ao trabalhar com uma amostra de vírus rábico isolada de tecido não nervoso de uma doninha malhada (spotted skunk), explica a ausência de corpúsculos de Negri nas células nervosas dos camundongos por êle inoculados, como sendo a falta de experiência do vírus ao tecido cerebral. Tais corpúsculos ocorriam em camundongos inoculados com tecido cerebral de camundongos de primeira passagem.

Não logramos êxito nas inoculações do sangue, mas acreditamos que o vírus esteja presente neste tecido. Os isolamentos obtidos de rim e coração, permitem esta afirmativa.

Em condições experimentais, Pacheco e Proença (1936) demonstraram a presença de vírus rábicos no sangue circulante de coelhos inoculados por diferentes vias. Reagan *et al.* (1955) inoculando amostra de vírus rábico pela via intraperitonal em morcêgos, observaram a infeciosidade do sangue nas primeiras 48 horas e Koprowski e Cox (1948), inoculando a amostra "Flury", via saco da gema no embrião de galinha de 7 dias de idade, recuperaram o vírus do

sangue no 3.^o e 15.^o dias, após inoculação, por passagens intracerebrais no camundongo.

As provas de sôro-neutralização realizadas para cada uma das amostras de vírus isoladas de rim, coração e cérebro demonstraram que estas amostras correspondiam ao vírus da raiva, pois neutralizaram respectivamente, 316, 100 e 794 DL₅₀.

Pelo exposto na presente investigação, concluímos pelo isolamento de vírus rábico de rim e do coração de bovino em condições naturais de infecção e até onde conhecemos, esta é a primeira vez que se isola vírus da raiva de tais órgãos de bovino.

AGRADECIMENTO

Somos gratos ao Dr. Joaquim Loures, Chefe do "Laboratório de Raiva do Instituto Oswaldo Cruz", pela doação do sôro anti-rábico hiperimune; aos dedicados laboratoristas da Seção de Vírus, Srs. Argemiro Lourenço e Adhemar Lourenço pela colaboração prestada no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Bell, J. F., Moore, G. J., Raymond, G. H. & Tibbs, C. E. 1962. Characteristics of rabies in bats in Montana. *Am. J. Public Health* 52:1293-1301.
- Bier, O. 1961. *Bacteriologia e imunologia*. 10.^a ed. Edições Melhoramentos, São Paulo, Brasil, p. 821-822.
- Girard, K. F., Hitchcock, H. B., Edsall, G. & MacCreedy, R. A. 1965. Rabies in bats in southern New-England. *New England J. Med.* 272(2):75-80.
- Johnson, H. N. 1959. The role of the spotted skunk in rabies. *Proc. 63rd. Annual Meeting U.S. Livestock Sanit. Ass.*, p. 267-274.
- Koprowski, H. & Cox, H. R. 1948. Occurrence of rabies virus in the blood of developing chick-embryos. *Proc. Soc. Biol.* 68:612-615.
- Pacheco, G. & Proença, M. C. 1936. O vírus da raiva bovina do Brasil circula no sangue e se pode transmitir por via sangüínea. *Brasil Médico* 31:661. (Nota prévia)
- Reagan, L. R., Delah, E. C., Rumbaugh, H. L. & Brueckner, A. L. 1955. Early appearance of rabies virus in the blood of cave bats exposed by intraperitoneal infection. *Cornell Vet.* 45:153-156.
- Reed, L. J. & Muench, R. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Silva, R. A. & Souza, A. M. 1966. Aislamento de virus rabico del pulmon, corazón, riñon, vejiga y otros diferentes tejidos de murciélagos hematofagos de la especie *Desmodus rotundus*. V Congr. Panam. Med. Vet. y Zootecnia, Caracas, Venezuela.
- Sulkin, S. E., Krutzsch, H. P., Wallis, C. & Allen, R. 1957. Role of brown-fat in pathogenesis of rabies in insectivorous bats (*Tadarida b. mexicana*). *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 96(2):461-464.
- Villa, B. R., Alvarez, B. L. & Dominguez, C. C. 1963. Presencia y persistencia del virus de la rabia en la glandula inter-escapular de algunos murciélagos mexicanos. *Ciencia, México*, 22(5):137-140.
- World Health Organization 1954. *Laboratory Techniques in rabies*. WHO, Scientific Publication, Washington, 23:69-74.

ISOLATION OF RABIES VIRUS FROM KIDNEY, HEART AND BRAIN OF A NATURALLY INFECTED COW

Abstract

Rabies virus was isolated by intracerebral inoculation of baby and adult mice by using emulsions from kidney, heart and brain tissues of a naturally infected cow in the County of São Fidelis, State of Rio de Janeiro, Brazil.

The virus strains isolated from different tissues were identified as rabies virus by microscopic examination of the brains of inoculated mice, revealing presence of Negri bodies in the cytoplasm of nervous cells and by serum neutralization tests using standardized rabies serum.