

ISOLAMENTO DE VÍRUS RÁBICO DE PULMÃO, CORAÇÃO, RINS, BEXIGA E OUTROS DIFERENTES TECIDOS DE MORCEGOS HEMATÓFAGOS DA ESPÉCIE *Desmodus rotundus*¹

RENATO AUGUSTO DA SILVA² e ARY MOREIRA DE SOUZA³

Sinopse

De morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, capturados em pleno dia nos Municípios de Campos e Bom Jesus de Itabapoana, no Estado do Rio de Janeiro e no Município de Bom Jesus do Norte, no Estado do Espírito Santo, isolou-se vírus rábico dos pulmões, coração, rins, bexiga, músculo escapular, traquéia, muco oral e faringeano, fígado, cérebro, glândulas submaxilares e parótidas. Foram inoculadas emulsões destes tecidos em camundongos de 4 dias de idade e 21 dias de idade, pela via intracerebral.

As amostras de vírus isoladas dos diferentes morcegos foram identificadas como vírus rábico, pela formação de corpúsculos de Negri no citoplasma das células nervosas dos cérebros dos camundongos inoculados e pelas provas de soro-neutralização realizadas, utilizando-se um soro anti-rábico de reconhecida propriedade neutralizante.

Foram também realizados estudos das propriedades patogênicas do vírus rábico isolado de morcego, para camundongos, cobaias, coelhos, cães e embrião de galinha.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de vírus rábico em morcegos e carnívoros silvestres relacionados com os focos de raiva tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores. A hipótese inicial de Carini (1911), levantada em 1911, de que os morcegos transmitiam a raiva aos bovinos e eqüinos do Estado de Santa Catarina foi confirmada em 1916 por Haupt e Rehaag (1925), ao inocularem em coelho e cobaias emulsão de bulbo de morcego por eles classificado como *Phyllostoma superciliatum*. Posteriormente, Hurst e Pawan (1936), relataram um surto de raiva na espécie humana na Ilha de Trinidad, isolando vírus de morcego da espécie *Artibeus planirostris trinitatis* e sugeriram o morcego como transmissor da raiva ao homem e ao bovino. Estes mesmos pesquisadores (Hurst & Pawan 1936) assinalaram o isolamento de vírus rábico nas espécies *Artibeus planirostris trini-*

tatis, *Hemiderma* e *Diclidurus albus*. Tôrres e Lima (1935) concluíram que "nos focos de raiva epizootica e fora deles são encontrados morcegos hematófagos portadores de vírus rábico".

Baseados nos trabalhos clássicos do genial Pasteur e seus colaboradores, os estudiosos em raiva no morcego procuravam isolar o vírus rábico do cérebro e glândulas submaxilares. Atualmente, a pesquisa deste vírus nos portadores naturais (morcegos e carnívoros silvestres), foi orientada para outros tecidos, além do cérebro e glândulas submaxilares decorrentes dos trabalhos que provaram não ser o vírus rábico estritamente um vírus neurotrópico. Assim, Sulkin *et al.* (1957) conseguiram experimentalmente demonstrar o lipotropismo do vírus rábico na glândula inter-escapular (brown fat), de morcegos insetívoros da espécie *Tadarida b. mexicana*. Johnson (1959) isolou vírus rábico da glândula mamária e dos rins de uma doninha malhada (spotted skunk) naturalmente infectada e Villa *et al.* (1963) isolaram o mesmo vírus da glândula inter-escapular, de morcegos aparentemente sadios.

O vírus da raiva tem sido isolado de pulmão e outros tecidos de morcegos naturalmente portadores, conforme demonstraram claramente os trabalhos de Bell *et al.* (1962), quando no ano de 1962, em Montana, USA, obtiveram o vírus do coração, rins, pulmão e baço de morcegos insetívoros *Eptesicus fuscus* e posteriormente, Girard *et al.* (1965) em New-England, também nos USA, reportaram-se ao

¹ Recebido para publicação em 8 de junho de 1967. Boletim Técnico n.º 54 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS). Apresentado ao V Congresso Panamericano de Medicina Veterinária e Zootecnia (Seção VI: Saúde Pública, Tema n.º 1: raiva), Caracas, Venezuela, set. 1966.

² Chefe da Seção de Zoonoses por Vírus do IPEACS, e Prof. Adjunto da Cadeira de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26.

³ Veterinário da Seção de Zoonoses por Vírus do IPEACS, Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26.

isolamento do vírus da raiva dos rins, cérebro e glândulas inter-escapulares (brown fat), de morcegos *Eptesicus fuscus* e *Myotis lucifugus*.

A presença do vírus da raiva em diferentes tecidos foi demonstrada por técnicas de imunofluorescência por Villa e Álvares (1963), nos rins, cérebro, glândulas salivares e inter-escapulares de morcegos da espécie *Desmodus rotundus* e por Girard *et al.* (1965), na urina, cérebro, glândula salivar, supra-renal, rins e fígado de morcêgo *Eptesicus fuscus* (big brown bat).

Anteriormente, Silva (1965) relatou o isolamento de vírus rábico do pulmão, coração e outros diferentes tecidos de *Desmodus rotundus*, referentes aos morcegos de números 1 e 2, sendo o propósito da presente publicação o de relatar com mais detalhe os trabalhos de isolamento de vírus rábico do pulmão, coração, rins, bexiga e de outros tecidos de morcegos da espécie *D. rotundus* e aspectos da patogenicidade do vírus para animais de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais que deram origem ao presente trabalho foram coletados de quatro morcegos hematófagos, pertencentes à espécie *Desmodus rotundus*, capturados em pleno dia, nos focos ativos de raiva que estão sendo estudados nos Municípios de Campos e Bom Jesus de Itabapoana, ambos no Estado do Rio de Janeiro, e no Município de Bom Jesus do Norte, no Estado do Espírito Santo. Estes municípios apresentam as seguintes posições geográficas: Campos: 21° 45' 23" de latitude sul e 41° 19' 40"

de longitude oeste de Greenwich (altitude 14 metros); Bom Jesus de Itabapoana: 21° 08' 09" de latitude sul e 41° 40' 48" de longitude oeste de Greenwich (altitude 118 metros) e Bom Jesus do Norte: 21° 08' 09" de latitude sul e 41° 40' 48" de longitude oeste de Greenwich (altitude 118 metros).

Pelo Quadro 1, verifica-se o número de casos positivos de raiva por nós diagnosticados no decorrer dos anos de 1964 e 1965, naqueles municípios e em alguns municípios limítrofes.

Morcêgo n.º 1. Registrado na Seção de Vírus do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), sob o n.º 3.087, pertencente ao sexo masculino, capturado às 11 horas do dia 21-8-65, sugando um bezerro, no Município de Campos, Estado do Rio de Janeiro, pelo Dr. Altair Corrêa Lima, Veterinário do Serviço de Defesa Sanitária Animal e Chefe do POVIG, Posto de Vigilância, neste município (Fig. 1). O morcêgo veio acondicionado em uma lata e já apresentava sinais de decomposição, quando chegou ao nosso laboratório dois dias após a captura.

Inicialmente, foram retirados deste morcêgo o cérebro, as glândulas submaxilares, os pulmões e os rins para os trabalhos de inoculação em camundongos. Após a retirada destes órgãos, o morcêgo foi colocado na temperatura de menos 20°C, para utilização posterior.

Decorridos 35 dias da congelação do morcêgo, procedemos sua descongelação e outros órgãos como a glândula inter-escapular, as glândulas parótidas, coração, baço, fígado, bexiga, músculo escapular e intestinos foram retirados para as inoculações experimentais. A bexiga estava livre de urina.



FIG. 1. Morcêgo n.º 1, *Desmodus rotundus*, capturado no Município de Campos, Estado do Rio de Janeiro. (Material 3.087)

Morcêgo n.º 2. Registrado na Seção de Vírus do IPEACS, sob o n.º 3.088, do sexo masculino, capturado na manhã do dia 22-8-65, sugando um bovino, no Município de Bom Jesus do Norte, Estado do Espírito Santo, pelo Dr. Ildefonso Bastos Borges, Veterinário do Serviço de Defesa Sanitária Animal e Chefe do POVIG naquele município.

O morcêgo veio acondicionado em saco plástico contendo gelo e chegou ao nosso laboratório em ótimas condições de conservação. Dêste morcêgo, foram retirados o cérebro, os rins, os pulmões, as glândulas submaxilares e parótidas.

O bovino apresentou sintomas de raiva 60 dias após ser sugado por êste morcêgo, coletando-se o cérebro para confirmação do diagnóstico.

Morcêgo n.º 3. Registrado na Seção de Vírus do IPEACS, sob o n.º 3.120, do sexo masculino, capturado em pleno dia, no Município de Campos, Estado do Rio de Janeiro, no dia 24-9-65, pelo Dr. Altair Corrêa Lima, sendo coletado o cérebro, pulmão e coração, pelo próprio remetente, que conservou êstes órgãos em glicerina neutra e, posteriormente, remeteu ao nosso laboratório.

Morcêgo n.º 4. Registrado na Seção de Vírus do IPEACS, sob o n.º 3.141, do sexo masculino, capturado às 7 horas da manhã do dia 20-10-65, no Município de Bom Jesus de Itabapoana, Estado do Rio de Janeiro, pelo Dr. Ildefonso Bastos Borges.

O morcêgo veio acondicionado em marmita térmica refrigerada, chegando ao nosso laboratório em ótimas condições de conservação. Dêste morcêgo foram coletados o cérebro, as glândulas submaxilares e parótidas, fígado, baço, rins, traquéia, músculo escapular, intestino, glândulas inter-escapulares (gordura marrom), muco oral e faringeano e a bexiga, que estava retraída, sem conter urina.

O muco oral e faringeano foi obtido por fricção da região oral e farineana com estilete envolvido em algodão esterilizado.

Antes de prepararmos as emulsões, lavamos os órgãos com solução fisiológica estéril a 8,5 por mil, pelo menos três vezes para retirada do sangue. O al-

godão, contendo a mucosidade da região ora de faringeana, foi macerado em geral, adicionando-se salina.

ISOLAMENTO DE VIRUS

Preparo dos inocula. Emulsões individuais de cada tecido correspondentes aos morcegos de números 1, 2, 3, e 4, foram realizadas em soro fisiológico estéril a 8,5 por mil, adicionando-se 1.000 U.I. de penicilina potássica e um miligrama de di-hidro estreptomicina por mililitro. As emulsões assim preparadas eram centrifugadas por 10 minutos a 2.500 rpm. Após esta operação, as emulsões ficaram incubadas 30 minutos na temperatura de 4°C. Para cada emulsão, inocuávamos grupos de 8 camundongos adultos e lactentes (camundongos de 4 dias de idade), pela via intracraniana, na dose de 0,03 ml. Observávamos diariamente os animais por um período de 30 ou 60 dias.

Com os cérebros dos camundongos que morriam com sintomas de raiva ou sem apresentarem êstes sintomas, realizávamos segunda passagem em camundongos adultos e lactentes, conforme exemplificamos com as fichas 5064, 5162, 5069, 5160, 5284 e 5358 (F'g. 2 a 7).

IDENTIFICAÇÃO DO VIRUS

Na identificação das amostras de vírus isoladas, utilizamos: a) exames histopatológicos e b) prova de soro-neutralização.

Exame histopatológico

Consistiu em fazermos esfregaços em lâminas dos cérebros dos camundongos adultos e lactentes que exibiam sintomas de raiva. Sacrificávamos os animais na fase paralítica e submetíamos os seus cérebros à técnica de Faraco (Bier 1961), para evidenciação dos corpúsculos de Negri.

QUADRO 1. Número de materiais nervosos de bovinos recebidos e porcentagem de positivos nos anos de 1964 e 1965

Municípios	Estado	Materiais recebidos		Porcentagem positivos	
		1964	1965	1964	1965
Campos.....	Rio de Janeiro	8	20	50%	50%
Bom Jesus de Itabapoana.....	Rio de Janeiro	5	40	60%	85%
Mimico do Sul.....	Espírito Santo	10	8	70%	62,5%
Apiaçá.....	Espírito Santo	12	11	41,6%	81,8%
Bom Jesus do Norte.....	Espírito Santo	—	16	—	87,5%

Material nº 3087 - Morcêgo hematófago - pulmão

Ficha 5064

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
10																					
9																					
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	M					
7																M					
6																M					
5																	/	/	/	/	/
4																					
3																					
2																					
1																					

23.8.65: Inoc. i.c. com emulsão tratada por antibióticos (pen. estrept.) em camundongos adultos.

/ - Camundongo normal; M - Morto.

Material nº 3087 - Morcêgo hematófago - pulmão - 2ª passagem

Ficha 5162

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	D	D										
9										D	D										
8											M	S									
7											M	S									
6												D	M								
5												D	M								
4												D	M								
3														P	P	S					
2														P	P	S					
1														P	P	S					

9.9.65: Inoc. i.c. com emulsão do cérebro do camundongo 5064, tratada pelo éter, em camundongos adultos.

/ - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

Material nº 3087 - Morcêgo hematófago - rim

Ficha 5069

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
10																					
9																					
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	M							
7													M								
6														P	S						
5															/	/	/	/	/	/	/
4																					
3																					
2																					
1																					

23.8.65: Inoc. i.c. de emulsão de rim tratada por antibióticos (penic. estrept.), em camundongos de 4 dias de idade.

/ - Camundongo normal; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificada

FIG. 2 a 4. Fichas (n.º 5064, 5162 e 5069) de inoculação em camundongos.

Material nº 3087 - Morcêgo hematófago - rim - 2ª passagem Ficha 5160

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
10																					
9																					
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	P	M										
7										D	Ps										
6										D	Ps										
5										D	Ps										
4										D	Ps										
3										D	D	P	M								
2										D	D	M									
1										D	M										

9.9.65 inoc. i.c. com emulsão do cérebro do camundongo 5069, tratada pelo éter, em camundongos de 4 dias de idade.

/ - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; M - Morto; S - Sacrificado

Material nº 3087 - Morcêgo hematófago - músculo escapular Ficha 5284

	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	M								
7												M	/	/	/	/	/	/	/	/	/
6																					
5																					
4																					
3																					
2																					
1																					

27.9.65: inoc. i.c. com emulsão de músculo escapular tratada por antibióticos (penic. estrep.), em camundongos de 4 dias de idade

/ - Camundongo normal; D - Doente; M - Morto

Material nº 3087 - músculo escapular - 2ª passagem Ficha 5358

	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	D	D	S												
7					D	D	D	D	S												
6					D	D	D	D	S												
5									D	S											
4									D	S											
3									D	D	P	S									
2									D	P	S										
1									D	P	S										

11.10.65: inoc. i.c. com emulsão do cérebro do camundongo 5284 tratada por antibióticos (penic. estrep.), em camundongos de 4 dias de idade.

/ - Camundongo normal; D - Doente; P - Paralítico; S - Sacrificado

FIG. 5 a 7. Fichas (n.º 5160, 5284 e 5358) de inoculação em camundongos.

Prova de soro-neutralização

Amostras de vírus. Utilizamos as amostras de vírus correspondentes aos cérebros dos morcegos de nos. 1, 2, 3 e 4, designadas sob os números de registro na Seção de Vírus, como amostras 3.087, 3.088, 3.120 e 3.141, respectivamente, e mantidas em cérebros de camundongos.

Soro. Foram usados um soro imune, com alto teor em anticorpos para o vírus da raiva, proveniente do Instituto Oswaldo Cruz, e um soro normal de carneiro.

Técnica. A prova de soro-neutralização consistiu em se colocarem partes iguais das diluições de vírus, que variaram de 10^{-5} a 10^{-1} para o soro de carneiro e de 10^{-5} a 10^{-1} para o soro padrão. Em seguida, agitávamos bem os tubos, permanecendo as misturas em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após este período os tubos contendo as misturas eram transferidos para um banho de gelo, procedendo-se a inoculações intracranianas nos camundongos de 21 dias de idade na dose de 0,03 ml. Para cada diluição usávamos um lote de 6 camundongos.

Para o 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).

TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VÍRUS ISOLADAS DE MORCEGOS

Utilizamos, para a titulação, amostras de vírus com três passagens em cérebro de camundongos adultos, oriundas dos cérebros dos morcegos de n.º 1, 2, 3 e 4. Pesamos, inicialmente, 1 g de tecido nervoso correspondente a cada amostra, macerando-a em gral. Adicionamos 9 ml de soro fisiológico, a fim de obtermos a diluição a 1:10. Diluições múltiplas de 10 foram realizadas até alcançarmos a diluição de 10^{-6} . Inoculamos grupos de 4 camundongos para cada diluição, que variou de 10^{-1} a 10^{-6} , pela via intracraniana, na dose de 0,03 ml. Os animais foram observados pelo período de 15 dias, calculando-se os 50% de letalidade pelo método de Reed e Muench (1938).

PATOGENICIDADE DO VÍRUS PARA COBAIOS, COELHOS, CÃES E EMBRIÃO DE GALINHA

A amostra de vírus rábico, designada amostra 3.087, isolada de um dos morcegos proveniente do Município de Campos, foi inoculada em:

Cobaios. Inoculamos cobaios de 300 g, com a amostra de vírus contendo três passagens em cérebro

de camundongos, na diluição 1:1 000, por via intramuscular, na dose de 0,2 ml.

De um dos cobaios mortos sob a ação do vírus, retiramos diferentes órgãos (cérebro, pulmão, coração, rim, fígado, baço, vesícula biliar, músculo da perna, nervo ciático correspondente à perna inoculada e bexiga) para pesquisa da distribuição do vírus na infecção experimental. Emulsões a 10% em soro fisiológico foram realizadas para cada tecido, procedendo-se à inoculação em camundongos adultos e lactentes.

Coelhos. Inoculamos coelho adulto, com diluição de vírus a 1:10, na terceira passagem em cérebro de camundongo, por via intramuscular, na dose de 0,2 ml.

Cães. Inoculamos 2 ml da diluição a 1:10 da amostra 3.087, na terceira passagem em cérebro de camundongos, por via intramuscular em dois cães de 3 meses de idade, que não haviam sido vacinados contra a raiva.

Embrião de galinha. Embriões de 7 dias de idade foram inoculados com a amostra 3.087 e 3.088, nas diluições a 1:10, correspondentes às segundas passagens destas amostras de vírus em cérebro de camundongos. A via utilizada foi a do saco da gema, sendo a dose de 0,2 ml para cada embrião (Camargo *et al.* 1953).

RESULTADOS

Isolamento do vírus

A leitura do Quadro 2, correspondente ao morcão hematófago registrado sob o n.º 3.087, oferece os resultados que se seguem:

Emulsão de pulmão. Decorridos 16 dias da inoculação desta emulsão em camundongos adultos, morreram 3 sem apresentarem sintomas. No 13.º dia de inoculação 5 camundongos lactentes morreram sem também apresentarem sintomas de doença. Os cérebros destes animais foram coletados e os demais camundongos inoculados permaneceram aparentemente normais por um período de observação de 60 dias.

Emulsão de rim. Um camundongo adulto apresentou-se doente no 14.º dia de inoculação, sendo sacrificado já na fase paralítica, no dia seguinte. Um outro camundongo morreu no 17.º dia e um outro no 28.º dia de inoculação sem apresentarem sintomas da doença.

A emulsão de rim, inoculada em camundongos lactentes, causou a morte em 2 camundongos que não apresentaram sinais de doença no 13.º dia de inoculação. Um 3.º camundongo apresentou-se paralítico no 14.º dia. Decorridos 24 dias de inoculação morreu um camundongo sem apresentação de sintomas e

QUADRO 2. *Morcêgo n.º 1 (material 3.087, Desmodus rotundus) capturado no Município de Campos, Estado do Rio de Janeiro*

Tecidos inoculados	Data da inoculação	Dose	Via	Incubação		Relação de inoculados/mortos		% de mortes		Pesquisa de corpúsculos de Negri
				Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	
Cérebro	23/8/65	0,03	i.cer.	8-11 dias	9-10 dias	8/8	8/8	100	100	positivo
Glândula submaxilar	23/8/65	0,03	i.cer.	8-9 dias	5-10 dias	4/4	8/8	100	100	positivo
Pulmão	23/8/65	0,03	i.cer.	13 dias*	16 dias*	5/8	3/8	62,5	37,5	não pesquisado
Rim	23/8/65	0,03	i.cer.	13-24 dias	14-28 dias	5/8	3/8	62,5	37,5	positivo
Glândula inter-escapular (gordura (mar-ron)	27/9/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/8	—	—	—
Parótida	27/9/65	0,03	i.cer.	5-10 dias	7-9 dias	8/8	8/8	100	100	positivo
Coração	27/9/65	0,03	i.cer.	11-12 dias	14-17 dias	7/8	4/8	87,7	50	positivo
Baço	27/9/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/8	—	—	—
Bexiga	27/9/65	0,03	i.cer.	—	12 dias	0/8	1/7	—	14,3	positivo
Músculo escapular	27/9/65	0,03	i.cer.	11 dias	—	2/8	0/8	—	—	não pesquisado
Intestino	27/9/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/8	—	—	—
Fígado	27/9/65	0,03	i.cer.	9-10 dias	—	8/8	0/7	100	—	positivo

* Morte dos camundongos sem apresentar sintomas.

outro foi sacrificado após mostrar-se doente. Inúmeros corpúsculos de Negri foram observados nas células nervosas do cérebro deste camundongo.

Os demais camundongos adultos e lactentes, permaneceram aparentemente normais pelo período de observação de 60 dias.

Emulsão de bexiga. Esta emulsão foi patogênica para camundongos adultos. Com 12 dias de incubação, um camundongo mostrou-se paralítico, permanecendo 24 horas nesta fase, quando foi sacrificado e seu cérebro coletado para passagem posterior, com resultado 100% letal para os camundongos inoculados.

Emulsão de músculo escapular. A emulsão de músculo foi letal somente para camundongos lactentes. Com 11 dias de inoculação amanheceu doente um camundongo que, no dia seguinte, foi encontrado morto, juntamente com mais um camundongo. Os cérebros foram coletados, fazendo-se segunda passagem em camundongos lactentes.

Emulsão de fígado. A inoculação desta emulsão em camundongos adultos e lactentes resultou patogênica para camundongos lactentes no período de incubação de 9 a 10 dias.

As demais emulsões correspondentes ao cérebro, coração, glândulas submaxilares e parótidas, deram resultados letais acima de 50% para camundongos adultos e lactentes e estes animais mostravam sempre sintomas definidos de raiva, sendo desnecessária uma segunda passagem para melhor elucidação.

Obtivemos resultados negativos com a inoculação das emulsões de glândulas inter-escapulares, baço e intestinos.

Corpúsculos de Negri estavam presentes nas células nervosas dos cérebros dos camundongos sacrificados correspondentes às várias emulsões, em primeira ou em segunda passagem.

O Quadro 3, referente ao morcêgo registrado sob o n.º 3.088, oferece a seguinte leitura:

Emulsão de pulmão. A emulsão de pulmão inoculada em camundongos adultos e lactentes apenas produziu doença nos lactentes. Com 13 dias de inoculação, um camundongo adoeceu e no dia seguinte amanheceu paralítico, sendo sacrificado. O cérebro foi coletado e passado em outro lote de camundongos.

A segunda passagem de cérebro de camundongos lactentes reproduziu o quadro de raiva tanto em camundongos adultos como em lactentes, obtendo-se 100% de letalidade.

As emulsões de cérebro, glândulas submaxilares e parótidas resultaram positivas nas inoculações em camundongos adultos e lactentes. A emulsão de rim deu resultados negativos.

A emulsão do cérebro do bovino, determinou a morte de 8 camundongos inoculados os quais apresentaram sintomas de raiva. Corpúsculos de Negri, estavam presentes nas células nervosas dos cérebros destes camundongos.

O Quadro 4 representa as inoculações de alguns órgãos do morcêgo registrado sob o n.º 3.120. A interpretação é a seguinte:

Emulsão de pulmão. Esta emulsão foi patogênica para camundongos adultos e lactentes. Com 15 dias adoeceu um camundongo adulto, morrendo 2 dias após. Com 21 dias de inoculação, adoeceram mais

QUADRO 3. *Morcêgo n.º 2 (material 3.088, Desmodus rotundus) capturado no Município de Bom Jesus do Norte, Estado do Espírito Santo*

Tecido inoculado	Data da inoculação	Dose	Via	Incubação		Relação de inoculados/mortos		% de mortes		Pesquisa de corpúsculos de Negri
				Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	
Cérebro	23/8/65	0,03	i.cer.	9-10 dias	10-11 dias	8/8	8/8	100	100	positivo
Pulmão	23/8/65	0,03	i.cer.	13 dias	—	1/8*	0/8	12,5	—	positivo
Glândula submaxilar	23/8/65	0,03	i.cer.	11 dias	8-10 dias	8/8	8/8	100	100	positivo
Rim	23/8/65	0,03	i.cer.	—	—	0/6	0/8	—	—	—
Parótida	21/9/65	0,03	i.cer.	5-10 dias	8-11 dias	8/8	10/10	100	100	positivo

* Passados em camundongos adultos e lactentes, reproduzindo a raiva dentro do período de 8 a 11 dias para os adultos e 5 a 10 para os lactentes.

2 camundongos, que morreram no dia seguinte. Os demais camundongos foram observados por um período de 30 dias. Dos camundongos lactentes, 5 adoeceram com 14 dias, morrendo no dia seguinte. Sobreviveram 2 camundongos no período de observação de 30 dias.

Emulsão de coração. Com 11 dias de inoculação, adoeceu um camundongo adulto, permanecendo doente por 2 dias e finalmente parализando no 4.º dia de doença. Outro camundongo adoeceu no 15.º dia e um terceiro, no 18.º dia. Esta emulsão não foi inoculada em camundongos lactentes.

Emulsão de cérebro. Esta emulsão foi patogênica para camundongos adultos e lactentes, observando-se os períodos de incubação de 8 a 10 dias e 11 a 12 dias, respectivamente. Todos os camundongos morreram com sintomas definidos de raiva.

O Quadro 5 representa as inoculações dos órgãos do morcêgo registrado sob o n.º 3.141. Verifica-se que as emulsões de cérebro, glândulas submaxilares, glândula parótida, pulmão, coração e traquéia deram resultados 100% letais para os camundongos adultos e lactentes, no período de 6 a 14 dias de inoculação. A emulsão de rim apenas foi patogênica para camundongos lactentes apresentando período de incubação de 8 a 10 dias. A emulsão de muco oral e faringeano foi 100% letal para camundongos

lactentes, no período de 10 a 12 dias de incubação matando 37,5% dos camundongos adultos, no período de 14 a 16 dias.

A pesquisa de corpúsculos de Negri resultou positiva nos cérebros dos camundongos inoculados com as diferentes emulsões.

Resumindo os resultados obtidos com as inoculações das diferentes emulsões, temos:

Morcêgo número 1 (material 3.087). Isolamos vírus rábico do cérebro, glândulas submaxilares, pulmão, rins, glândulas parótidas, coração, bexiga, músculo-escapular e fígado. Obtivemos resultados negativos com as emulsões de glândula inter-escapular, baço e intestino.

Morcêgo número 2 (material 3.088). Dêste morcêgo, isolamos vírus rábico das emulsões de cérebro, pulmão, glândulas submaxilares e parótidas. Resultou negativa a inoculação da emulsão de rins.

Morcêgo número 3 (material 3.120). Isolamos vírus rábico do cérebro, pulmão e coração.

Morcêgo número 4 (material 3.141). Isolamos vírus rábico do cérebro, glândulas submaxilares e parótidas, pulmões, coração, rins, traquéia e muco oral e faringeano. Resultaram negativas as inoculações das emulsões de glândulas inter-escapulares, fígado, baço, bexiga, músculo escapular e intestinos.

QUADRO 4. *Morcêgo n.º 3 (material 3.120, Desmodus rotundus) capturado no Município de Campos, Estado do Rio de Janeiro*

Tecido inoculado	Data da inoculação	Dose	Via	Incubação		Relação dos inoculados/mortos		% de mortes		Pesquisa de corpúsculos de Negri
				Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	
Cérebro	28/9/65	0,03	i.cer.	11-12 dias	8-10 dias	8/8	7/7	100	100	positivo
Pulmão	28/9/65	0,03	i.cer.	14 dias	15-21 dias	5/7	3/7	71,4	37,5	positivo
Coração	28/9/65	0,03	i.cer.	—	11-18 dias	—	3/6	—	50	positivo

QUADRO 5. *Morcego n.º 4 (material 3.141, Desmodus rotundus) capturado no Município de Bom Jesus de Itabapoana, Estado do Rio de Janeiro*

Tecidos inoculados	Data da inoculação	Dose	Via	Incubação		Relação de inoculados/mortos		% de mortes		Pesquisa de corpúsculos de Negri
				Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	
Cérebro	26/10/65	0,03	i.cer.	8-10 dias	8-10 dias	8/8	10/10	100	100	positivo
Glândula submaxilar	26/10/65	0,03	i.cer.	8-10 dias	8-10 dias	8/8	8/8	100	100	positivo
Parótida	26/10/65	0,03	i.cer.	8-10 dias	6-8 dias	8/8	9/9	100	100	positivo
Glândula inter-escapular (gordura marrom)	26/10/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/8	—	—	—
Pulmão	26/10/65	0,03	i.cer.	11-12 dias	12-14 dias	7/7	10/10	100	100	positivo
Coração	26/10/65	0,03	i.cer.	8-11 dias	13-14 dias	8/8	10/10	100	100	positivo
Fígado	26/10/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/10	—	—	—
Baço	26/10/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/10	—	—	—
Bexiga	26/10/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/8	—	—	—
Rim	26/10/65	0,03	i.cer.	8-10 dias	—	8/8	0/9	100	—	positivo
Músculo escapular	26/10/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/8	—	—	—
Intestino	26/10/65	0,03	i.cer.	—	—	0/8	0/8	—	—	—
Traquéia	26/10/65	0,03	i.cer.	8-11 dias	10-12 dias	8/8	10/10	100	100	positivo
Muco oral e faríngeo	26/10/65	0,03	i.cer.	10-12 dias	14-16 dias	8/8	3/8	100	37,5	positivo

Identificação do vírus

Exame histopatológico. O exame dos esfregaços correspondentes aos cérebros dos camundongos sacrificados na fase parolítica, revelou a presença de numerosos corpúsculos de Negri no citoplasma das células nervosas.

Prova de soro-neutralização. O Quadro 6 demonstra os resultados obtidos nesta prova. O soro imune do Instituto Oswaldo Cruz apresentou índice de neutralização de 1,0 para as amostras de vírus 3.087, 3.088, 3.120 e 3.141.

O título das amostras de vírus foi dado pela mistura das diluições de vírus mais soro normal de carneiro. No Quadro 6, estão expressos os títulos de cada amostra, sendo de $10^{-3,20}$ a amostra 3087; $10^{-3,24}$ para a amostra 3.088; $10^{-4,12}$ para a amostra 3.120 e finalmente, $10^{-4,60}$ para a amostra 3.141.

As amostras de vírus isoladas neutralizaram 316, 173, 1.319 e 3.163 DL₅₀, respectivamente para as amostras designadas 3.087, 3.088, 3.120 e 3.141.

As amostras de vírus isoladas foram neutralizadas pelo soro possuidor de anticorpos para o vírus da raiva.

Titulação das amostras de vírus isoladas de morcegos

Obtivemos os seguintes resultados com as titulações das amostras 3.087, 3.088, 3.120 e 3.141 em camundongos adultos e lactentes:

amostra de vírus 3.087, em camundongos adultos: $10^{-4,47}$; em camundongos lactentes: $10^{-5,33}$;

amostra de vírus 3.088, em camundongos adultos: $10^{-4,22}$; em camundongos lactentes: $10^{-5,72}$;

amostra de vírus 3.120, em camundongos adultos: $10^{-4,60}$; em camundongos lactentes: $10^{-5,19}$;

amostra de vírus 3.141, em camundongos adultos: $10^{-3,60}$; em camundongos lactentes: $10^{-3,60}$.

Patogenicidade do vírus para cobaias, coelhos, cães e embrião de galinhas

O período de incubação do vírus para o cobaio foi de 12 a 13 dias. Os animais apresentavam-se parolíticos e permaneciam nesta fase por dois dias.

Das emulsões dos órgãos de um dos cobaios inoculados em camundongos adultos e lactentes, isolamos vírus do cérebro, coração, nervo ciático, músculo da perna e da bexiga. As demais emulsões deram resultados negativos.

A amostra de vírus 3.087, inoculada no coelho, apresentou período de incubação de 16 dias, permanecendo este animal na fase parolítica pelo período de 8 dias. Do cérebro deste coelho, não recuperamos vírus rábico nas inoculações em camundongos.

Os cães inoculados com o vírus rábico (amostra 3.087), nada digno de nota apresentaram no período de observação de 90 dias, quando foram eliminados.

No embrião de galinha, as amostras de vírus 3.087, e 3.088, se cultivaram quando inoculada pelo saco da gema, demonstrando titulações irregulares em camundongos adultos e lactentes nas três primeiras gerações.

QUADRO 6. Soro-neutralização das amostras de vírus isoladas

Número do material	Título em DL ₅₀ /0,03 ml		DL ₅₀ Neutralizadas
	Vírus+Soro normal	Vírus+Soro padrão	
3087	10 ^{-3,50}	10 ^{-1,0}	316
3088	10 ^{-3,24}	10 ^{-1,0}	173
3120	10 ^{-4,12}	10 ^{-1,0}	1319
3141	10 ^{-4,60}	10 ^{-1,0}	3163

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O vírus da raiva foi por nós isolado de pulmão, coração, rins, bexiga, fígado, músculo escapular, traquéia, muco oral e faríngeo, cérebro e glândulas submaxilares e parótidas de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, capturados durante o dia, em plena fase de excitação, quando sugavam bovinos. No entanto, Bell *et al.* (1962), isolaram vírus rábico do coração, rins, pulmão e baço de morcegos *Eptesicus fuscus*, capturados sem sintomas de raiva e Villa *et al.* (1963) verificaram a presença de antígeno rábico viral nos rins, cérebro, glândulas salivares e inter-escapulares de morcegos *D. rotundus*, aparentemente sadios.

Em nossos experimentos não conseguimos evidenciar a presença de vírus na urina, pois os espécimes estudados praticamente apresentavam suas bexigas totalmente contraídas e, conseqüentemente, livres de urina. Pesquisa neste sentido foi orientada por Girard *et al.* (1965), que provaram por imunofluorescência a presença de vírus rábico na urina de morcego, da espécie *E. fuscus*, capturado após morder uma pessoa; entretanto, o isolamento de vírus rábico da bexiga do morcego número 1 (material 3.087) indica uma multiplicação de vírus neste tecido e, conseqüentemente, sua eliminação pela urina.

Observamos em nossas pesquisas que o vírus rábico esteve presente nos pulmões e coração dos 4 morcegos estudados. Em um caso (material 3.087), encontramos vírus rábico nos rins e na bexiga como se fazia esperar. Em outro caso (material 3.141), o vírus rábico foi isolado dos rins, não o sendo da bexiga.

A emulsão de fígado correspondente ao material 3.087 só demonstrou a presença de vírus nos camundongos lactentes. Os adultos não se mostraram sensíveis. Passagens subseqüentes do vírus em primeira passagem para camundongos adultos e lactentes resultaram negativas.

Chamamos a atenção para o fato de alguns camundongos morrerem sem sintomas definidos de raiva e,

no entanto, o vírus estar presente em seus cérebros. Assim é que passagens destes cérebros em camundongos resultaram positivas, como no caso de emulsão de pulmão, fichas nos. 5064 e 5162.

O vírus rábico, presente nas emulsões de pulmão, fígado, bexiga, rins, coração, muco oral e faríngeo e traquéia, determinou o aparecimento de corpúsculos de Negri no citoplasma das células nervosas dos cérebros dos camundongos em primeira passagem, contrariando o ponto-de-vista de Johnson (1959), que ao trabalhar com vírus rábico isolado de tecido mamário e dos rins de uma doninha malhada (spotted skunk), achou que a ausência destes corpúsculos nas células nervosas dos camundongos por ele inoculados se deve ao fato da falta de experiência do vírus com o tecido cerebral. Tais corpúsculos ocorriam em camundongos inoculados com tecido cerebral de camundongos de primeira passagem.

Não pesquisamos a presença de inclusões nas células pulmonares e células dos demais tecidos dos morcegos raivosos, o que pretendemos fazer em outra oportunidade. Esta verificação se faz necessária, tendo em vista que, em condições experimentais de cultivo, o vírus rábico se multiplica sem a presença de células nervosas, em cultivos de células do tumor de Pearce do coelho (Levaditi & Schoen 1936); em células BHK (Fenje 1960, Kissling 1958); em células BHK₂₁ C₁₃ (Atanasiu 1965a, Fernandes *et al.* 1963) e nas células de rim de suíno (Abelseth 1964), produzindo inclusões citoplasmáticas.

O vírus forma aerossóis, sendo o via aerógena uma fonte segura de infecção conforme demonstrou Constantine (1962), em condições naturais de contágio. Experimentalmente, Atanasiu (1965b), logrou infectar camundongos, hamsters e meriones, com amostras de vírus rábico por inoculação nasal e por meio de aerossóis, verificando que depois do cérebro, o órgão mais importante para a multiplicação do vírus é o pulmão.

Os trabalhos de Shen e Shumeikma (1959) e de Villa *et al.* (1963), mostram o papel da via digestiva na transmissibilidade da raiva. Johnson (1959) relata a transmissão de vírus rábico em condições naturais de uma doninha mãe a três filhas, com o prazo de incubação da doença bastante longo (116, 132 e 135 dias, respectivamente).

Observamos que nas condições naturais de contágio, o bovino sugado pelo morcego número 2 (material 3.088) apresentou sintomas de raiva no período de 60 dias de observação, o que foi confirmado pela inoculação em camundongos.

Concluimos, em face dos trabalhos realizados, que o vírus rábico foi isolado do pulmão, coração, rins, bexiga, músculo escapular, traquéia, muco oral

e faringeano, fígado, cérebro, glândulas submaxilares e parótidas, de morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus*.

Constituem tais isolamentos de vírus rábico de tecidos não nervosos a primeira notificação no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Deixamos consignados no presente trabalho os nossos agradecimentos aos Drs. Altair Corrêa Lima e Ildelfonso Bastos Borges (Veterinários do Serviço de Defesa Sanitária Animal), pela captura dos morcegos e coleta dos materiais nervosos de bovinos dos focos de raiva. Igualmente, agradecemos ao Veterinário da República do Paraguai, Dr. Angel Adolfo Ayala Balmoris, pela colaboração prestada durante o desenvolvimento dos trabalhos, e ao Sr. Argemiro Lourenço, devotado Laboratorista da Seção de Vírus. Ao Dr. Joaquim Loures, Chefe do Laboratório de Raiva, do Instituto Oswaldo Cruz, pela doação do soro anti-rábico hiperimune.

Somos gratos ao Dr. Aurélio Malaga-Alba, Consultor em Raiva da Organização Mundial de Saúde, por nos ter sugerido trabalhar com pulmão de morcegos para isolar vírus rábico.

REFERÊNCIAS

- Abelseth, M. K. 1964. Propagation of rabies virus in pig kidney cell culture. *Can. vet. J.* 5: 4.
- Atanasiu, P. 1965a. El cultivo de virus rábico y su multiplicación en células B H K₁ C₁₈. *Bol. Oficina San. Panam.* 58 (4): 285-293.
- Atanasiu, P. 1965b. Transmisión de la rabia por las vías respiratorias a los animais de laboratorio. *Bol. inf. Centro Panam. Zoonosis* 7 (3): 13.
- Bell, J. F., Moore, G. Y., Raymond G. H. & Tibbs, C. E. 1962. Characteristics of rabies in bats in Montana. *Am. J. publ. Health* 52: 1293-1301.
- Bier, O. 1961. *Bacteriologia e imunologia*. 10.^a ed. Edições Melhoramentos, São Paulo, p. 821-822.
- Camargo, F. N., Velasquez, A., Vasquez, F. V., Giron A. T. & Flores, F. 1953. La vacunación contra el derriengue con el virus Flury avianizado. *Publ. Secret. Agric. y Ganadería, Mexico, D. F.*
- Carini, A. 1911. Sur une grande epizootie de rage. *Ann. Inst. Pasteur* 11: 843-846.
- Constantine, D. G. 1962. Rabies transmission by non-bite route. *U. S. publ. Health Rept.* 77 (4): 287-289.
- Fenje, P. 1960. A rabies vaccine from hamster kidney tissue culture: Preparation and evaluation in animals. *Can. J. Microbiol.* 6: 605-606.
- Fernandes, M. V., Wiktor, T. J. & Koprowski, H. 1963. Mechanism of the citopathic effect of rabies virus in tissue culture. *Virology* 21: 128-131.
- Girard, K. F., Hitchcock, H. B., Edsall, G. & Mac Creedy R. A. 1965. Rabies in bats in southern New England. *New England. J. Med.* 272 (2): 75-80.
- Haupt, H. & Rehaag, H. 1925. Raiva epizotica nos rebanhos de Santa Catarina (Sul do Brasil), transmitida por morcegos. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.* 2 (1-2): 17-47.
- Hurst, E. W. & Pawan, J. L. 1936. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat. *Ann. trop. Med. Parasitol.* 30: 101-130.
- Johnson, H. N. 1959. The role of the spotted skunk in rabies. *Proc. 63rd Ann. Meet. U. S. Livestock Sanit. Ass.*, p. 267-274.
- Kissling, R. E. 1958. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proc. expl. Biol.* 98: 223-225.
- Levaditi, C. & Schoen, R. 1936. Virus rabique et cellules neoplasiques. *C. R. Acad. Sci.* 202: 702-704.
- Reed, L. J. & Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end-points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- Shen, R. M. & Shumeikma, I. A. 1959. Susceptibility of white rats to oral infections with rabies strain of street virus. *Zurn. Obs. Biol.* n.º 65810.
- Silva, R. A. 1965. Sobre o isolamento de vírus rábico de pulmão, rins, cérebro, glândulas submaxilares e parótidas de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*. *Veterinária (Bol. inf. Soc. Bras. Med. Vet.)* 3: 12-13.
- 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.
- Tóres, S. & Lima, E. Q. 1935. A raiva e sua transmissão por morcegos hematófagos infectados naturalmente. *Rev. Dep. Nac. Prod. Anim., Rio de Janeiro*, 1 (1, 2 e 3): 1-66.
- Villa, B. R. & Alvarez, B. L. 1963. Rabies virus in kidney and other tissues of vampire bats in western Mexico. *Zoonosis Res.* 2 (2): 77-82.
- 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 mejicanos. *Ciencia* 22 (5): 137-140.
- World Health Organization 1954. *Laboratory Techniques in Rabies* 23: 69-74.

ISOLATION OF RABIES VIRUS FROM LUNGS, HEART, KIDNEYS, BLADDER AND OTHER TISSUES OF THE HEMATOFAGOUS BATS, *Desmodus rotundus*

Abstract

From hematofagous bats, *Desmodus rotundus*, captured during the day in the Municipalities of Campos and Bom Jesus of Itabapoana in the State of Rio de Janeiro and the Municipality of Bom Jesus do Norte in the State of Espírito Santo (Brazil), rabies virus were isolated from lungs, heart, kidneys, bladder, scapular muscle, trachea, mucus of the pharyngeal and oral cavities, liver, brain, sub-maxillar and parotide glands, by intracerebral inoculation in the 4-day and 21-day old mice.

The strains of virus isolated were identified as rabies virus, by presence of Negri bodies in the cytoplasm of the nerve cells following the microscopic examination of the brains of inoculated mice and by neutralization tests.