

## A OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA RAIVA NO ÚTERO, FETO, TESTÍCULOS E OUTROS ÓRGÃOS DE MORCEGOS HEMATÓFAGOS, *Desmodus rotundus* NA INFECÇÃO NATURAL<sup>1</sup>

RENATO AUGUSTO DA SILVA<sup>2</sup> e ARY MOREIRA DE SOUZA<sup>3</sup>

### Sinopse

Isolou-se o vírus da raiva dos testículos, útero e feto, glândulas salivares e inter-escapulares, língua, músculo peitoral, baço, rins, coração, pulmões, bexiga e cérebro de morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus*, naturalmente infectados, inoculando camundongos adultos e lactentes por via intracerebral.

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.

### INTRODUÇÃO

Em continuação aos trabalhos de pesquisa do vírus da raiva na ordem *Chiroptera*, descrevemos na presente publicação as recentes pesquisas realizadas com três exemplares *Desmodus rotundus*, em condições naturais de infecção rábica. Os isolamentos de vírus do útero, feto e testículos constituem em nosso meio e mesmo na América do Sul, até onde sabemos, as primeiras observações sobre o assunto, fato êste de grande importância na epidemiologia da raiva, pois demonstra a infecção transplacentária e outras vias de transmissão da doença.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os três morcegos da espécie *Desmodus rotundus*, que serviram de base às nossas investigações, foram capturados nos Municípios de Pirapetinga e Recreio, ambos no Estado de Minas Gerais e no Município de São Fidélis, Estado do Rio de Janeiro, pelo Dr. Odon Antão de Alencar, Veterinário da Campanha de

Combate à Raiva dos Herbívoros, do Serviço de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura.

1.º caso. Refere-se ao *Desmodus rotundus*, do sexo masculino, capturado na manhã do dia 18-4-1967, às 6 horas da manhã, quando sugava uma vaca, no Município de Pirapetinga, Estado de Minas Gerais. Dêste morcego, coletamos o cérebro, as glândulas parótidas, as submaxilares, sublinguais, inter-escapulares, os pulmões, rins, músculo peitoral, baço, coração, língua, fígado, testículos e finalmente, a bexiga que se encontrava livre de urina. Os diversos materiais receberam o número 3.666 no livro de registro da Seção de Zoonoses por Vírus do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

2.º caso. Refere-se a outro *Desmodus rotundus*, do sexo masculino, capturado no Município de Recreio, Estado de Minas Gerais. Coletamos dêste animal, os seguintes tecidos: cérebro, glândulas parótidas, submaxilares, inter-escapulares, língua, coração, fígado, pulmão, rins, baço, bexiga e testículos, sendo êstes materiais registrados sob o número 3.679 na Seção de Zoonoses por Vírus do IPEACS.

3.º caso. Relaciona-se a um *Desmodus rotundus*, do sexo feminino, capturado no interior de uma fuma no Município de São Fidélis, Estado do Rio de Janeiro, no dia 24-5-67. Nesta morcega em gestação, apenas encontramos um único embrião em fase bem adiantada de desenvolvimento. Retiramos dêste animal, as glândulas submaxilares, parótidas, inter-escapulares, sublinguais e ainda, os pulmões, coração, rins, baço, fígado, músculo escapular, a bexiga (livre de urina) músculo peitoral, o útero e o feto. Os diversos materiais receberam o número 3.754 em nosso livro de registro na Seção de Zoonoses por Vírus.

Para o isolamento de vírus, preparamos emulsões a 10% em sôro fisiológico de cada tecido, lavando-os

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 4 de janeiro de 1968. Boletim Técnico n.º 69 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

<sup>2</sup> Chefe da Seção de Zoonoses por Vírus do IPEACS e Professor Adjunto da Cadeira de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26.

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

préviamente em salina, para a retirada do sangue. A seguir cada emulsão foi tratada por uma mistura de antibióticos (1.000 U.I. de penicilina potássica e um miligrama de estreptomicina sódica, por mililitro de emulsão). Após centrifugação de 10 minutos, a 2.500 rpm, separamos os sobrenadantes dos sedimentos, semeando-os em caldo simples e agar sangue. Utilizamos camundongos de 5 dias de idade para as emulsões correspondentes ao morcêgo do 1.º caso, com exceção da emulsão de cérebro, que foi inoculada em camundongos adultos, de 21 dias de idade. As emulsões do material 3.754 foram inoculadas ora em camundongos de 21 dias de idade, ora em camundongos de 5 dias de idade, pois não dispúnhamos de número suficiente de animais na mesma idade para a realização do trabalho. Assim, as emulsões de glândulas submaxilares, parótidas, inter-escapulares, sublinguais, músculo escapular, bexiga, músculo peitoral, útero e feto, foram inoculadas em camundongos de 21 dias de idade. As emulsões de pulmão, coração, rins e baço, foram inoculadas em camundongos de 5 dias de idade.

As emulsões dos materiais correspondentes ao 2.º caso (material 3.679), foram somente inoculadas em camundongos de 21 dias de idade.

A pesquisa de corpúsculos de Negri foi realizada nos cérebros dos camundongos que apresentaram sintomas de raiva e também nos cérebros dos camundongos que não apresentaram sintomas, utilizando-se para tal fim a técnica de Faraco (Bier 1961).

Passagens subsequentes das amostras de vírus isoladas dos diferentes tecidos foram realizadas em camundongos, objetivando a manutenção das amostras de vírus.

## RESULTADOS

As emulsões correspondentes aos materiais de números 3.666, 3.679 e 3.754, não determinaram crescimento nos meios de caldo simples e agar sangue.

Nos Quadros 1, 2 e 3 expressamos os resultados das inoculações em camundongos e as suas leituras nos dão as seguintes interpretações:

1.º caso, material 3.666. As emulsões de cérebro, glândulas parótidas, submaxilares, inter-escapulares, sublinguais, pulmões, rins, músculo peitoral, baço, coração, língua, testículos e bexiga determinaram o aparecimento de sintomas de raiva nos camundongos inoculados. A emulsão de fígado resultou negativa.

2.º caso, material 3.679. As emulsões de cérebro, glândulas inter-escapulares, parótidas, submaxilares,

língua, coração e pulmões foram positivas nas inoculações em camundongos. As emulsões de fígado, rins, baço, bexiga e testículos foram negativas em camundongos.

3.º caso, material 3.754. As emulsões de glândulas submaxilares, parótidas, sublinguais, coração, rins, bexiga, útero e feto, resultaram positivas para a raiva nas inoculações em camundongos, enquanto que as emulsões de glândula inter-escapular, pulmões, baço, fígado, músculo escapular e músculo peitoral, resultaram negativas.

Os cérebros dos camundongos sacrificados na fase paralítica da doença apresentaram típicos corpúsculos de Negri. Semelhantes achados foram obtidos nos cérebros dos camundongos que não apresentaram sintomas, os quais foram sacrificados no período final de observação, isto é, com 30 dias após inoculados e correspondente ao grupo dos camundongos que apresentaram sintomas de raiva. Já os cérebros dos camundongos inoculados com as emulsões consideradas negativas, não apresentaram nenhuma formação que lembrasse o corpúsculo de Negri.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Ao analisarmos os resultados dos trabalhos sobre o comportamento do vírus rábico na infecção natural em morcêgo *Desmodus rotundus*, é lógico concluir que o vírus da raiva nesta espécie animal se distribui em diferentes tecidos, independente da forma clínica com que se evidencia a doença. Assim é que, durante nossas pesquisas, isolamos vírus rábico do cérebro, pulmões, coração, língua, baço, rins, bexiga, glândulas salivares, músculo peitoral, testículos e glândulas inter-escapulares de morcegos capturados durante o dia; da mesma forma, conseguimos isolar vírus das glândulas salivares, coração, rins, bexiga, útero e feto de um exemplar *Desmodus rotundus*, capturado em seu "habitat" natural, ou seja, no interior de uma fuma onde fazia parte de uma colônia, não apresentando sintomas clínicos de enfermidades, o que também foi observado com relação aos demais componentes do grupo. Trabalhos de pesquisadores da América do Norte e dos presentes autores reforçam a afirmativa, quando evidenciaram o vírus rábico por isolamento em camundongos ou detectaram antígeno viral por imunofluorescência em diferentes tecidos de morcegos doentes e de morcegos aparentemente saudáveis (Bell *et al.* 1962, Girard *et al.* 1965, Silva & Souza 1966, Villa *et al.* 1963).

Acreditamos que a presença do vírus rábico em diferentes tecidos se verifique por via sanguínea, pois em condições experimentais este fato já foi

QUADRO 1. *Material n.º 3.666, Desmodus rotundus (macho) capturado durante o dia no Município de Pirapetinga, Estado de Minas Gerais*

Tecidos inoculados	Dia da inoculação	Dose em ml	Via	Incubação		Relação de inoculados mortos		Pesquisa de corpúsculos de Negri
				Lactentes	Adultos	Lactentes	Adultos	
Cérebro	18/4/67	0,03	I.cer.	—	8 dias	—	6/8	Positivo
Parótida	18/4/67	0,03	I.cer.	10 dias	—	8/8	—	Positivo
Submaxilar	18/4/67	0,03	I.cer.	8 dias	—	8/8	—	Positivo
Sublingual	18/4/67	0,03	I.cer.	11 dias	—	8/8	—	Positivo
Pulmão	18/4/67	0,03	I.cer.	11 dias	—	8/8	—	Positivo
Coração	18/4/67	0,03	I.cer.	10 dias	—	5/8 <sup>a</sup>	—	Positivo
Baço	18/4/67	0,03	I.cer.	9 dias	—	5/8 <sup>a</sup>	—	Positivo
Rim	18/4/67	0,03	I.cer.	10 dias	—	7/8	—	Positivo
Fígado	18/4/67	0,03	I.cer.	—	—	0/7	0/5	—
Bexiga	18/4/67	0,03	I.cer.	—	12 dias	—	5/7 <sup>a</sup>	Positivo
Língua	24/4/67	0,03	I.cer.	10 dias	—	5/5	—	Positivo
Músc. Peitoral	18/4/67	0,03	I.cer.	11 dias	—	7/8 <sup>b</sup>	—	Positivo
Testículo	18/4/67	0,03	I.cer.	—	12 dias	—	3/5 <sup>a</sup>	Positivo

<sup>a</sup> Após 30 dias de observação os camundongos sobreviventes foram sacrificados e a pesquisa de corpúsculos de Negri positiva.

<sup>b</sup> Após 30 dias de observação os camundongos sobreviventes foram sacrificados e a pesquisa de corpúsculos de Negri negativa.

QUADRO 2. *Material n.º 3.679, Desmodus rotundus (macho) capturado em uma furna no Município de Recreio, Estado de Minas Gerais*

Tecidos inoculados	Dia da inoculação	Dose em ml	Via	Incubação		Relação de inoculados mortos		Pesquisa de corpúsculos de Negri
				Lactentes	Adultos	Lactentes	Adultos	
Cérebro	10/5/67	0,03	I.cer.	—	9 dias	—	8/8	Positivo
Parótida	30/5/67	0,03	I.cer.	—	6 dias	—	8/8	Positivo
Submaxilar	30/5/67	0,03	I.cer.	—	10 dias	—	8/8	Positivo
Inter-escapular	12/5/67	0,03	I.cer.	—	11 dias	—	5/7	Positivo
Língua	30/5/67	0,03	I.cer.	—	13 dias	—	4/8	Positivo
Coração	30/5/67	0,03	I.cer.	—	14 dias	—	1/8	Positivo
Fígado	30/5/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/8	—
Pulmão	30/5/67	0,03	I.cer.	—	13 dias	—	4/8	Positivo
Rim	30/5/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/8	—
Baço	30/5/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/8	—
Bexiga	30/5/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/8	—
Testículo	30/5/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/8	—

QUADRO 3. *Material n.º 3.754, Desmodus rotundus (fêmea) capturado em uma furna no Município de São Fidélis, Estado do Rio de Janeiro*

Tecidos inoculados	Dia da inoculação	Dosagem ml	Via	Incubação		Relação de inoculados mortos		Pesquisa de corpúsculos de Negri
				Lactentes	Adultos	Lactentes	Adultos	
Parótida	27/6/67	0,03	I.cer.	—	7 dias	—	8/8	Positivo
Submaxilar	27/6/67	0,03	I.cer.	—	7 dias	—	8/8	Positivo
Sublingual	27/6/67	0,03	I.cer.	—	14 dias	—	6/6	Positivo
Inter-escapular	27/6/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/6	—
Pulmão	27/6/67	0,03	I.cer.	—	—	0/6	—	—
Coração	27/6/67	0,03	I.cer.	9 dias	—	3/6	—	Positivo
Baço	10/7/67	0,03	I.cer.	—	—	0/8	—	—
Rim	27/6/67	0,03	I.cer.	12 dias	—	7/7	—	Positivo
Fígado	30/6/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/8	—
Bexiga	30/6/67	0,03	I.cer.	—	17 dias	—	2/8	Positivo
Músc. peitoral	30/6/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/7	—
Músc. escapular	30/6/67	0,03	I.cer.	—	—	—	0/8	—
Útero	30/6/67	0,03	I.cer.	—	12 dias	—	1/8	Positivo
Feto	30/6/67	0,03	I.cer.	—	12 dias	—	1/8	Positivo

demonstrado várias vezes. Reagan *et al.* (1955), inoculando amostras de vírus rábico por via intraperitoneal em morcegos, observaram a infecciosidade do sangue nas primeiras 48 horas. Pacheco e Proença (1936), demonstraram a presença de vírus rábico no sangue circulante de coelhos inoculados por diferentes vias, enquanto que no embrião de galinha, Koprowski e Cox (1948), inoculando a amostra "Flury", via saco da gema, recuperaram o vírus do sangue no 3.º e 15.º dias, após inoculação por passagens intracerebrais em camundongos.

O vírus rábico foi ainda comprovado em morcegos recém-nascidos por Schneider *et al.* (1957) e segundo Constantine (1965), "cerca de 20% dos morcegos sem cauda possuem anticorpos para a raiva; fetos de fêmeas imunes são do mesmo modo imunes, indicando passagem transplacentária de anticorpos. O vírus, entretanto, não tem sido isolado de fetos. Morcegos lactentes sem cauda, muito jovens para voar, têm sido encontrados no interior de furnas. Estes morcegos lactentes, possivelmente, se infectaram por via aerógena; no entanto, morcegos amarelos também têm sido encontrados infectados na natureza e eles vivem como indivíduos ao ar livre nas folhas das árvores. Mordedura, lambadura materna, ou outros métodos de transmissão podem ocorrer nos jovens de uma ou ambas as espécies".

Na presente investigação, conseguimos isolar o vírus rábico dos testículos, útero e feto, além de outros órgãos de *Desmodus rotundus*, em condições naturais de infecção e com estes achados podemos admitir a possibilidade da existência de outras formas de disseminação e perpetuação da raiva na natureza.

A presença de corpúsculos de Negri foi sempre observada nas células nervosas dos cérebros dos camundongos que exibiam sintomas de raiva; todavia, destacamos o fato de constatar a ocorrência de tais corpúsculos nos cérebros dos camundongos que não apresentaram sinais visíveis de

doença, após 30 dias de inoculados e pertencentes ao mesmo lote de camundongos que apresentou sintomas definidos da infecção rábica, o que nos leva a pensar em uma forma subclínica da doença.

#### AGRADECIMENTOS

Expressamos a nossa gratidão ao Dr. Odon Antão de Alencar, Veterinário do Plano de Combate à Raiva dos Herbívoros, do Serviço de Defesa Sanitária Animal, pelo trabalho de captura e remessa dos morcegos, como também, aos laboratoristas Srs. Argemiro Lourenço e Adhemar Lourenço pela dedicação durante o desenvolvimento dos trabalhos.

#### REFERÊNCIAS

- Bell, J. F., Moore, G. T., 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, p. 821-822.
- Constantine, G. 1965. Recent advance in our knowledge of bat rabies. *Int. Symp. on Rabies, Talloires, France, Vol. I*, p. 251-254.
- Girard, K. F., Hitchcock, H. B., Edsall, G. & MacGready, R. A. 1965. Rabies in bats in southern New England. *New Engl. J. Med.* 272 (2): 75-80.
- Koprowski, H. & Cox, H. E. 1948. Occurrence of rabies virus in the blood of developing chick-embryos. *Proc. Soc. Expl. Biol. and Med.* 68: 612-615.
- Pacheco, G. & Proença, M. C. 1936. O vírus da raiva bovina no Brasil circula no sangue e se pode transmitir por via sanguínea. *Brasil Médico* 50 (31): 661.
- Reagan, L. R., Delaha, 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.
- Silva, R. A. da & Souza, A. M. de 1966. Aislamiento de vírus rábico de pulmón, corazón, riñón, vejiga y otros diferentes tejidos de murciélagos hematófagos de la especie *Desmodus rotundus*. V. Congr. Panam. Med. Vet. y Zoot., Caracas, Venezuela.
- Schneider, N. J., Scalterday, J. E. & Hardy, A. V. 1957. Rabies in bats in Florida. *Am. J. public Health* 47: 983-989.
- Villa, B. R., Alvarez, B. L. & Dominguez, C. C. 1963. Presencia y persistencia del virus de la rabia en la glandula interescapular de algunos murciélagos mejicanos. *Ciencia* 22 (5): 137-140.

#### THE OCCURRENCE OF RABIES VIRUS IN THE UTERUS, FETUS, TESTICLES AND OTHER ORGANS OF THE VAMPIRE BAT (*Desmodus rotundus*) IN NATURAL INFECTIONS

##### Abstract

Rabies virus was isolated from the testicles, uterus, fetus, salivary and inter-scapular glands, tongue, pectoral muscle, spleen, kidneys, heart, lungs, bladder, and brain of vampire bats, (*Desmodus rotundus*) that were naturally infected. The rabies determinations were verified through intra-cerebral inoculation of adult lactating mice.

The samples of virus isolated from the different bat tissues were identified as rabies virus by the formation of Negri bodies in the cytoplasm of the brain nerve cells of the inoculated mice.