

## OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA RAIVA EM PULMÃO, RINS, BEXIGA E OUTROS TECIDOS DE GATO DOMÉSTICO NATURALMENTE INFECTADO<sup>1</sup>

RENATO AUGUSTO DA SILVA<sup>2</sup>, ARY MOREIRA DE SOUZA<sup>3</sup> e CARLOS ALBERTO FERREIRA ANDRÉ<sup>4</sup>

### Sinopse

Na presente publicação relata-se o isolamento de vírus rábico por inoculação intracerebral em camundongos de 5 dias de idade, do cérebro, pulmões, língua, bexiga, rins, glândulas submaxilares e parótidas de gato doméstico naturalmente infectado.

As amostras de vírus isoladas dos tecidos acima mencionados foram identificadas como vírus rábico, pela formação de corpúsculos de Negri no citoplasma das células nervosas dos camundongos inoculados e por prova de soro neutralização das amostras isoladas do cérebro e pulmão.

A riqueza em vírus dos tecidos foi medida pela prova de titulação em camundongos lactentes. Os tecidos mais ricos em vírus foram as glândulas submaxilares, com títulos de  $10^{4.0}$  e a língua, com título de  $10^{3.50}$ . O cérebro, glândulas parótidas, pulmões e rins, apresentaram títulos mais baixos.

### INTRODUÇÃO

Vários pesquisadores têm realizado trabalhos sobre a presença do vírus da raiva em diferentes tecidos de diversas espécies de animais, objetivando, principalmente, os tecidos não nervosos. Entre alguns estudos desta natureza destacamos o isolamento do vírus rábico dos rins de uma criança por Cajdusek e Sabin (1955) enquanto Johnson (1959) descreve o isolamento do vírus da raiva da glândula mamária e dos rins de uma doninha malhada (spotted skunk).

Em condições experimentais Sulkin *et al* (1957) isolaram vírus rábico da glândula inter-escapular de morcegos da espécie *Tadarida b. mexicana*, marcando com êsses achados uma nova etapa de

estudos sobre a patogenia e a epizootiologia da raiva.

Com o mesmo objetivo e a fim de darmos alguma contribuição a êsses estudos, iniciamos uma série de trabalhos, os quais nos permitiram isolar vírus rábico de diferentes tecidos não nervosos de morcego hematófago (*Desmodus rotundus*), bovino e canino (Silva *et al.* 1966, Silva & Souza 1966, 1967). É propósito da atual publicação relatar o isolamento de vírus rábico de diversos tecidos de gato doméstico na infecção natural.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais que deram origem ao presente trabalho de pesquisa de vírus rábico em diferentes tecidos de gato doméstico foram obtidos de uma gata de 6 meses de idade, que dera entrada no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária, no dia 24.5.1967. O animal apresentou sintomas característicos de raiva, traduzidos por fortes excitabilidade e paralisia dos membros posteriores.

A fim de coletar o sangue diretamente do coração, anestesiámos o animal com éter e com seringa e agulha apropriadas retiramos 13 ml de sangue. Em seguida, sacrificamos a gata para a retirada do cérebro, língua, pulmões, coração, fígado, baço, bexiga, rins, glândulas parótidas e submaxilares. Êstes tecidos foram registrados no livro da Seção

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 4 de janeiro de 1968.

Boletim Técnico n.º 68 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 do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal Rural 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.

<sup>4</sup> Chefe do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Campo Grande, GB. ZC-26.

de Vírus do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS) sob o número 3.740.

Para o isolamento de vírus preparamos emulsões a 20% em soro fisiológico estéril de cérebro, glândulas parótidas, glândulas submaxilares, pulmões, rins, bexiga, fígado, baço, coração e língua. Cada tecido foi previamente lavado em soro fisiológico estéril pelo menos três vezes com o propósito de eliminarmos o sangue enquanto os rins foram destituídos de sua cápsula antes de serem submetidos à lavagem.

As diferentes emulsões foram tratadas por 1.000 U.I. de penicilina potássica e um miligrama de di-hidro estreptomicina sódica por mililitro, centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos, separando-se o sobrenadante do sedimento. Antes da inoculação em camundongos, realizamos o controle bacteriológico de cada emulsão em caldo simples e agar sangue, observando-se por um período de 7 dias.

Para as inoculações por via intracraniana, na dose de 0,03 ml, utilizamos camundongos de 5 dias de idade.

Os 13 ml de sangue coletados foram imediatamente inoculados em coelho adulto por via intramuscular.

Os fragmentos de corno de Ammon foram submetidos à técnica de Faraco (Bier 1961), seguindo-se o mesmo procedimento com os cérebros dos camundongos inoculados com as diferentes emulsões e que eram sacrificados, após mostrarem sintomas de raiva.

*Prova de soro-neutralização.* Para uma melhor identificação das amostras de vírus isoladas, tomamos os cérebros dos camundongos correspondentes à emulsões de cérebro e pulmões (amostras de vírus em segunda passagem), submetendo-as a uma neutralização com um soro anti-rábico padrão. Seguimos a técnica descrita em trabalho anterior (Silva & Souza 1966). Para o cálculo das doses neutralizantes baseamos-nos no método de Reed e Muench (1938) e consideramos a neutralização de 100 DL<sub>50</sub> suficiente para estabelecer a identidade do vírus (World Health Organization 1954).

*Prova da titulação de vírus nos diferentes tecidos.* A fim de verificarmos a riqueza em vírus do cérebro, das glândulas submaxilares, dos pulmões, das glândulas parótidas, da língua, dos rins e da bexiga, descongelamos estas emulsões que estavam há 20 dias guardadas em temperaturas de menos 20° C. Preparamos diluições múltiplas de dez que variaram de 10<sup>-1.0</sup> a 10<sup>-4.0</sup>, inoculando-as em lote de seis

camundongos de 5 dias de idade por via intracraniana, na dose de 0,03 ml. Para o cálculo dos títulos de cada emulsão, utilizamos o método de Reed e Muench (1938).

## RESULTADOS

As diferentes emulsões semeadas em caldo simples e agar sangue não determinaram crescimento nesses meios.

A leitura do Quadro 2, correspondente a diferentes emulsões do tecido da gata, nos dá as seguintes interpretações:

*Emulsão de cérebro.* Após 9 dias da inoculação os camundongos inoculados apresentaram sintomas de raiva.

*Emulsão de glândulas submaxilares.* Decorridos 7 dias da inoculação, dois camundongos adoeceram e com 9 dias de incubação, adoeceram os restantes.

*Emulsão de glândulas parótidas.* Ao transcurso do 7.º dia após inoculação, adoeceram dois camundongos dos quatro inoculados, restando dois aparentemente normais que foram observados por um período de 30 dias.

*Emulsão de pulmões.* Adoeceram todos os camundongos inoculados no período de incubação de 11 dias.

*Emulsão de rins.* Quatro camundongos inoculados adoeceram no período de 12 dias de incubação. Um outro adoeceu no 17.º dia e finalmente o último foi sacrificado no 30.º dia após inoculação para pesquisa de corpúsculos de Negri.

*Emulsão de bexiga.* Com 12 dias de inoculados adoeceu um camundongo; no dia seguinte amanheceu um paralítico e mais dois doentes. Resultaram três camundongos aparentemente normais pelo período de observação de 30 dias, os quais foram sacrificados para a pesquisa de corpúsculos de Negri.

*Emulsão de língua.* Decorridos 11 dias de inoculação todos os camundongos adoeceram com sintomas de raiva.

As demais emulsões, correspondentes ao coração, fígado e baço resultaram negativas nas inoculações em camundongos por um período de observação de 30 dias.

*Sangue.* O coelho inoculado com o sangue está aparentemente normal e será observado por 90 dias.

A pesquisa de corpúsculos de Negri nos fragmentos de corno de Ammon da gata sacrificada e dos

cérebros dos camundongos que apresentaram sintomas, inoculados com as emulsões de cérebro, glândulas submaxilares, parótidas, pulmões, rins, bexiga e língua, revelou sempre a presença de inúmeros corpúsculos de Negri.

Os resultados da prova de titulação de vírus contido nos diferentes tecidos bem como os resultados da neutralização estão sumariados respectivamente nos Quadros 1 e 3.

QUADRO 1. *Título das emulsões dos tecidos de gata*

Tecidos	Via	Títulos em $DL_{50}/0,03$ ml
Cérebro	I.cer.	$10^{-2,50}$
Pulmão	I.cer.	$10^{-1,50}$
Língua	I.cer.	$10^{-3,50}$
Bexiga	I.cer.	$10^{-2,50}$
Glândula submaxilar	I.cer.	$10^{-4,00}$

QUADRO 2. *Material 3.740, emulsões dos tecidos inoculados em camundongos de 5 dias de idade*

Tecidos inoculados	Dia da inoculação	Via	Dose ml	Incubação	Relação de inoculados mortos	Pesquisas de corpúsculos de Negri
Cérebro	31-5-67	I.cer.	0,03	9 dias	8/8	Positivo
Pulmão	8-6-67	I.cer.	0,03	11 dias	6/6	Positivo
Língua	8-6-67	I.cer.	0,03	11 dias	3/3	Positivo
Bexiga	31-5-67	I.cer.	0,03	12 dias	5/8	Positivo
Glândula submaxilar	8-6-67	I.cer.	0,03	7 dias	8/8	Positivo
Parótida	31-5-67	I.cer.	0,03	7 dias	2/4	Positivo
Rim	31-5-67	I.cer.	0,03	12 dias	5/8	Positivo
Coração	31-5-67	I.cer.	0,03	—	0/4	—
Fígado	31-5-67	I.cer.	0,03	—	0/8	—
Baço	31-5-67	I.cer.	0,03	—	0/8	—

QUADRO 3. *Séro neutralização das amostras de cérebro e pulmão isoladas de gata doméstica*

Tecido	Título em $DL_{50}/0,03$ ml		$DL_{50}$ Neutralizadas
	Vírus + séro padrão	Vírus + séro normal	
Cérebro	$10^{-1,00}$	$10^{-3,50}$	316
Pulmão	$10^{-1,00}$	$10^{-3,24}$	173

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na presente investigação, demonstramos a presença de vírus rábico nos pulmões, rins, bexiga, língua, cérebro, glândulas submaxilares e parótidas de uma gata doméstica, naturalmente acometida de raiva. Este fato é digno de se realçar porque, ao que tudo indica, esta é a primeira vez que se isola desta espécie de mamífero, o vírus da raiva de tecidos diferentes do nervoso. Em outras oportunidades o vírus rábico tem sido isolado dos rins de uma criança (Baltazard *et al.* 1955); dos rins e do coração de bovino (Silva *et al.* 1966), vários tecidos de morcegos (Bell *et al.* 1962, Girard *et al.* 1965, Villa *et al.* 1963, Silva *et al.* 1966), de glân-

dula mamária e dos rins de doninha malhada (Johnson 1959).

A presença do vírus rábico na língua, na bexiga e outros tecidos musculares demonstra a capacidade de adaptação deste vírus, tido até bem pouco tempo como um vírus estritamente neurotrópico. No morcego, em condições naturais de infecção, o vírus foi isolado de músculo esquelético em algumas oportunidades (Constantine 1965, Silva & Souza 1966).

A riqueza em vírus dos tecidos de gato foi medida pela prova de titulação em camundongos lactentes, demonstrando que os tecidos mais ricos em vírus foram as glândulas submaxilares, com títulos de  $10^{-4,0}$  e a língua, com títulos de  $10^{-3,50}$ . O cérebro, glândulas parótidas, pulmões e rins, apresentaram títulos mais baixos conforme está especificado no capítulo de resultados. Em condições experimentais, Atanasiu (1965) 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. Em nossas pesquisas a partir de diferentes tecidos de gato em condições naturais de contágio, a glândula submaxilar e a língua, foram os tecidos mais ricos em vírus.

A prova de soro-neutralização das amostras isoladas do cérebro e dos pulmões demonstraram corresponder ao vírus rábico, pois neutralizaram respectivamente 316 e 173 DL<sub>50</sub>.

#### REFERÊNCIAS

- Atanasiu, P. 1965. Transmission de la rage par la voie respiratoire aux animaux de laboratoire. C. R. Acad. Sci. Paris 260: 277-279.
- Baltazard, M., Bahmanyar, M., Ghodssi, M., Sabeti, A., Gajdusek, C. & Rouzbehi, E. 1955. Essai pratique du sérum antirabique chez les mordus par loupes enragés. Org. Mond. Santé 13: 747-772.
- 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.<sup>a</sup> 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. 1, p. 251-254.
- Gajdusek, C. & Sabin, A. 1955. (Citado por Baltazard *et al.* 1955, p. 771)
- Girard, K. & Hitchcock, H. B. Edsall, G. & Mac Gready, R. A. 1965. Rabies in bats in southern New England. New Engl. J. Med. 272 (2): 75-80.
- Johnson, H. N. 1959. The role of the spotted skunk in rabies. Proc. 63rd. Ann. Meeting U. S. Livestock Sanit. Ass., p. 267-274.
- Reed, L. J. & Muench, H. A. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end-points. Am. J. Hyg. 27: 493-497.
- Silva, R. A. da & Souza, A. M. de 1966. Aislamiento de virus rabico del pulmon, corazón, riñon, vejiga y otros diferentes tejidos de murciélagos hematófagos de la especie *Desmodus rotundus*. Ann. V Congr. Pan. Med. Vet. y Zoot., Caracas, Venezuela, p. 563-584.
- Silva, R. A. da, Souza, A. M. de & Lima, A. C. 1966. Isolamento de vírus rábico do rim, coração e cérebro de bovino na infecção natural. V Congr. Panam. Med. Vet. y Zoot., Caracas, Venezuela, p. 582-583. (Comunicação)
- Silva, A. R. da & Souza, A. M. de 1967. Ocorrência do virus da raiva em diferentes tecidos do cão na doença natural. I Semin. Nac. sobre Rabia, Medellín, Colombia, p. 197-199.
- 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. Exp. Biol. and 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 mejicanos. Ciencia 22 (5): 137-140.
- World Health Organization 1954. Laboratory techniques in Rabies 23: 69-74.

#### THE OCCURRENCE OF RABIES VIRUS IN THE LUNGS, KIDNEYS, BLADDER, AND OTHER TISSUES OF NATURALLY INFECTED CAT

##### Abstract

Isolations of rabies virus from brain, lungs, tongue, bladder, kidneys, sub-maxillar and parotid glands of naturally-infected domestic cat were introduced as intracerebral inoculations in five-day old mice. The samples of virus isolated from the cat tissues were identified as rabies virus by presence of Negri bodies into the cytoplasm of nerve cells of the inoculated mice and by evidence of serum neutralization in samples isolated from the brain and lung.

The quantity of virus in the cat tissues was measured by titration tests with lactating mice. The tissues with greater virus content were the sub-maxillary glands, with a titer of  $10^{-4.0}$ , and the tongue with a titer of  $10^{-3.5}$ . The brain, parotid glands, lungs and kidneys gave lower titers.