

ISOLAMENTO DO VÍRUS RÁBICO DE MORCÊGO INSETÍVORO, *Histiopus velatus*, CAPTURADO NO ESTADO DE SANTA CATARINA ¹

ADALVIO FERNANDES DE AMORIM ², RENATO AUGUSTO DA SILVA ³ e NORMA
MORAES DA SILVA ⁴

Sinopse

Isolou-se vírus rábico do cérebro de morcego insetívoro, *Histiopus velatus* Geoffroy, capturado no Município de Alfredo Wagner, Estado de Santa Catarina.

A suspensão do cérebro foi inoculada em camundongos de 21 dias de idade por via intracraniana, sendo a amostra de vírus identificada como vírus rábico pelos sintomas apresentados pelos camundongos, formação de corpúsculos de Negri, prova de soro-neutralização e técnica de imunofluorescência.

INTRODUÇÃO

No Brasil, são raras as referências sobre a ocorrência de vírus rábico em morcegos não hematófagos, apesar das tentativas de isolamento realizadas por vários pesquisadores: Bauer (1956-57), Silva *et al.* (1961a, 1967) e Sugay e Nilsson (1966). O primeiro relato de isolamento de vírus na ordem Chiroptera foi feito por Haupt e Rehaag (1925), quando produziram a raiva paralítica em coelhos e cobaias pela inoculação intracraniana de suspensão de cérebro de morcego *Phyllostoma superciliatum*, capturado no Estado de Santa Catarina. Em data posterior Silva *et al.* (1916b) isolaram vírus rábico de morcego *Phyllostomus hastatus hastatus* e mais recentemente, Bauer e Crusius (1965), no Estado do Rio Grande do Sul, obtiveram êxito ao trabalhar com espécimes de *Tadarida brasiliensis* e Silva e Alencar (1968), também isolaram vírus rábico de glândulas salivares de *Chrotopterus auritus australis*.

Na literatura consultada sobre a ocorrência de vírus rábico em morcegos não se encontrou referência ao isolamento deste vírus na espécie *Histiopus velatus*, motivando assim a apresentação deste informe.

MATERIAL E MÉTODOS

O material que constitui objeto do presente trabalho foi obtido de um morcego classificado como *Histiopus velatus* Geoffroy, capturado no interior de uma fuma no Município de Alfredo Wagner, localidade de Catuira, a 400 metros de altitude, no Estado de Santa Catarina, pelo Sr. Antonio Carlos Thiesen, vacinador da Secretaria de Agricultura, no dia 9-4-1968. Trazido ao laboratório sob refrigeração em caixa de isopor, ainda no mesmo dia retirou-se o cérebro por punção do buraco occipital, com seringa e agulha.

O Município de Alfredo Wagner está a meio caminho do Planalto Lageano, com altitudes que vão a mais de 700 metros, encontrando-se nele um número incalculável de fuma de morcegos nas encostas dos morros, escondidas pela vegetação e de acesso quase impossível pelos meios comuns.

A raiva bovina ocorre no Município de Alfredo Wagner, sendo conveniente salientar que ao redor dele e fazendo limite estão os Municípios de Angelina, Imbuia, Vidal Ramos, Leoberto Leal, Bom Retiro e Rancho Queimado, todos com focos de raiva em caráter epizootico.

Com a substância nervosa obtida, preparou-se uma suspensão a 20% em soro fisiológico estéril e refrigerado, centrifugando-se, a seguir, durante 10 minutos a 2.000 rpm.

Como animais de experimentação, utilizaram-se camundongos de 21 dias de idade, inoculando-se por via intracraniana, na dose de 0,03 ml.

¹ Recebido 10 jul. 1969, aceito 9 set. 1969.
Boletim Técnico n.º 89 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

² Veterinário Chefe do Laboratório de Zoonoses do Serviço de Defesa Sanitária Animal, São José, Santa Catarina.

³ Veterinário Chefe Agregado da Seção de Vírus, do IPEACS Km 47, Campo Grande, GB. ZC-26, e Professor Adjunto da Escola de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

⁴ Veterinária, M.S., da Seção de Vírus do IPEACS.

Para a identificação da amostra de vírus isolada, utilizaram-se as seguintes provas:

a) *Exame histopatológico*: consistiu de esfregaços em lâminas do cérebro de camundongos que apresentaram sintomas de raiva, sacrificados na fase parálitica, utilizando-se as técnicas de Faraco (1938) e de Sellers (WHO 1966).

b) *Prova de soro-neutralização*: na realização desta prova foi seguida a técnica preconizada pela World Health Organization (1966); a prova consistiu em se colocarem partes iguais das diluições de vírus, que variaram de 10^{-7} a 10^{-8} para o soro normal de cavalo e de 10^{-6} a 10^{-1} para o soro padrão; agitaram-se bem os tubos, permanecendo as misturas séros e vírus em banho-maria a 37°C por uma hora; após este período, os tubos contendo as misturas foram transferidos para um banho de gelo, procedendo-se às inoculações intracranianas nos camundongos de 21 dias de idade, na dose de 0,03 ml; para cada diluição, utilizou-se um lote de 6 camundongos, observando-se esses animais por um período de 21 dias; para o cálculo do título do vírus e das doses neutralizantes, usou-se o método de Reed e Muench (1938), e considerou-se a neutralização de 100 DL_{50} suficiente para o estabelecimento da identidade do vírus (WHO 1966).

c) *Técnica de imunofluorescência*: utilizou-se o conjugado anti-rábico produzido pelo Instituto Pasteur de Paris, gentilmente cedido pelo Dr. Pasco Atanasiu, quando de sua vinda ao Brasil no ano de 1967; a diluição do conjugado, conforme indicação, foi de 1:8, fazendo-se a diluição do mesmo com suspensão de cérebro de camundongos normais e de camundongos infectados com vírus rábico fixo "Pasteur"; as suspensões de cérebro de camundongos foram feitas a 20% em gema de ovos de galinha embrionados ao 7.º dia de incubação, diluída a 10% com salina tamponada com fosfato; o meio de montagem consistiu em glicerina a 90% em salina tamponada com pH igual a 8,5; o vírus rábico fixo "Pasteur" foi usado comumente para a preparação de impressões testemunhas de anticorpos fluorescentes rábico-positivos e para a inibição específica em colaboração para este anticorpo.

Para as observações utilizou-se um microscópio Leitz Ortholux monocular com condensador "cardioid", ocular 10x munida de filtro protetor e objetiva com aumento 10x. A fonte de iluminação constou de um equipamento Leitz apropriado com lâmpada de mercúrio de 150 W, usando-se filtro calorífico e o ultra violeta de 4 mm UG.

Os cérebros dos camundongos sacrificados, correspondentes à terceira passagem da amostra de vírus isolada em camundongos, foram examinados pela prova de imunofluorescência usando-se o método direto de coloração (WHO 1966).

RESULTADOS

Isolou-se o vírus da raiva da suspensão de cérebro de *Histiotes velatus* que, inoculada em camundongos adultos, determinou o aparecimento de sintomas de raiva nestes animais no período de incubação de 7 a 12 dias.

Os resultados das provas de identificação do vírus são os seguintes:

a) *Exame histopatológico*: o exame microscópico dos esfregaços dos cérebros dos camundongos, desde

a primeira passagem, revelou inúmeros corpúsculos de Negri.

b) *Prova de soro-neutralização*: nas misturas soro normal de cavalo e vírus, a amostra em estudos atingiu o título $10^{-5,50}$, enquanto que naquelas contendo soro imune — originário do Instituto Butantan, São Paulo — o mesmo vírus alcançou título $10^{-2,00}$. Desta forma, verifica-se que mais de 316 DL_{50} foram neutralizadas pelo soro anti-rábico, resultado que permite estabelecer a identidade sorológica do vírus obtido do cérebro de morcego.

c) *Técnica de imunofluorescência*: nos esfregaços de cérebro de camundongos correspondentes à terceira passagem da amostra de vírus isolada, verificou-se a presença de antígeno viral rábico.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente trabalho demonstrou-se a presença de vírus rábico no cérebro de morcego insetívoro da espécie *Histiotes velatus*, pertencente à família *Vespertilionidae*, que inclui apenas morcegos insetívoros.

No Brasil, a pesquisa do vírus da raiva em morcegos tem revelado um maior número de positividade entre os morcegos hematófagos, principalmente *Desmodus rotundus*, pois as espécies *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* apresentam-se em menor número e têm áreas muito delimitadas. Não é raro capturá-los, nos focos de raiva, exemplares de *Desmodus* voando em pleno dia, atacando bovinos e o próprio homem. Os estudos de Torres e Queiroz Lima (1935) deram margem a que estes pesquisadores concluíssem "que nos focos de raiva epizootica e fora deles são encontrados morcegos hematófagos portadores de vírus rábico".

Posteriormente aos trabalhos de Haupt e Rehaag (1925) em morcego não hematófago, o vírus rábico foi encontrado pela primeira vez em morcego insetívoro na ilha de Trinidad, por Pawan (1936).

Nos Estados Unidos, a primeira informação sobre raiva entre os morcegos insetívoros data do ano de 1953, quando isolou-se o vírus da raiva de morcegos *Dasypterus floridanus* e *Lasiurus seminola*, na Flórida (Venters et al. 1954). Desde aquela data, sabe-se que ocorre raiva em morcegos em 47 estados americanos e em 26 das 40 espécies conhecidas. Encontraram-se ainda morcegos insetívoros portadores de vírus rábico no Canadá (Beauregard & Stewart 1964), Turquia (Organización Mundial de la Salud 1966) e Iugoslávia (Nikolitch & Jelesic 1965).

No México, Villa (1967) comprovou a presença de anticorpos rabicidas e vírus rábico em 53 espécies e subespécies das 154 já identificadas no País.

Não se conhece no Brasil a verdadeira situação da raiva entre os morcegos, acreditando-se que a enfermidade tenha um alto índice entre estes animais. Parece que as técnicas para detectar o vírus não são as mais adequadas e com a introdução da imunofluorescência aliada aos outros métodos ter-se-á em futuro próximo a realidade do problema.

A amostra de vírus isolada determinou o aparecimento de corpúsculos de Negri nos cérebros dos camundongos inoculados e a prova de soro-neutralização demonstrou tratar-se de vírus rábico, pois obteve-se um índice de neutralização superior a 316 DL₅₀.

Além destas provas, realizou-se o teste de imunofluorescência nos cérebros dos camundongos que mostraram sintomas de raiva quando inoculados com as suspensões de cérebros de camundongos, correspondentes à terceira passagem da amostra de vírus isolada do morcego. Esta prova revelou a presença de antígeno viral rábico.

Em face destas provas, conclui-se pelo isolamento de vírus rábico do cérebro de *Histiotus velatus*, morcego insetívoro, constituindo tal achado, até onde se conhece, a primeira notificação de raiva nesta espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores deixam consignados, no presente trabalho, os seus agradecimentos ao Dr. Pascu Atanasiu, do Instituto Pasteur de Paris, pela doação do conjugado para a raiva, e ao Dr. Adriano Peracchi, Professor de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela classificação do morcego que deu margem às suas pesquisas. Agradecem, ainda, aos incansáveis auxiliares da Seção de Vírus do IPEACS, Srs. Argemiro Lourenço e Adhemar Lourenço, pela ajuda prestada durante o desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Bauer, A.C. 1956-57. Consideração sobre a raiva e sua transmissão por morcegos do Rio Grande do Sul. Arqs Inst. Pesq. Desidério Finamôr, Porto Alegre, 2:19-22.
- Bauer, A.C. & Crusius, V.A. 1965. Isolamento de vírus de morcego insetívoro no Rio Grande do Sul. IV Conf. Anual Soc. vet. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 3 p.
- Beaugard, M. & Stewart, R.C. 1964. Bat rabies in Ontario. Canad. J. comp. Med., 28:43.
- Faraco, J. 1938. Nova técnica para a obtenção de esfregaços por compressão e distensão, de partes do encefalo, medula espinal etc. para a pesquisa de corpúsculos de Negri (Coloração rápida dos esfregaços pelo Método de Mann). Revta Biol. Hig., S. Paulo, 9:90-96.
- Haupt, H. & Rehaag, H. 1925. Raiva epizootica nos rebanhos de Santa Catarina, Sul do Brasil, transmitida por morcegos. Bolm Soc. bras. Med. vet. 2(1-2):17-47.
- Nikolitch, M. & Jelesic, Z. 1965. Isolation of rabies virus from insectivorous bats in Yugoslavia. Bull. World Hlth. Org. 14:801-804.
- Organización Mundial de la Salud. 1966. 5.º informe. Serv. Inf. Téc. n.º 321, Comité de Experts de la OMS en Rabia, Ginebra.
- Pawan, J.L. 1936. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bats. Ann. trop. Med. Parasit. 30:101-130.
- Reed, L.J. & Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end-points. Am. J. Hyg. 27:493-497.
- Silva, R.A., Cola, C.B., Rego, H.F. & Ruschi, A. 1961a. A pesquisa de vírus rábico em morcegos do Estado do Espírito Santo. Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J., 4:121-126.
- Silva, R.A., Rivello, G.V. & Nilsson, M.R. 1961b. Isolamento de vírus rábico de morcego não hematófago da espécie *Phyllostomus hastatus hastatus* (Pallas). Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J., 4:115-120.
- Silva, R.A. & Alencar, O.A. 1968. Isolamento de vírus rábico das glândulas salivares de morcegos carnívoros da espécie *Chrotopterus auritus australis* (Thomas). Veterinária, Rio de J., 21:7-10.
- Silva, R.A., Souza, A.M., Passos, J.J., Alencar, O.A., Corrêa Lima, A. & Borges, B. 1967. A pesquisa de vírus rábico em morcegos do Brasil. Veterinária, Rio de J., 20(3-4): 105-114.
- Sugay, W. & Nilsson, M.R. 1966. Isolamento do vírus da raiva de morcegos hematófagos do Estado de São Paulo, Brasil. Bolm Of. san. panam. 60(4):310-315.
- Torres, S. & Queiroz Lima, E. 1935. A raiva e sua transmissão por morcegos hematófagos infectados naturalmente. Revta Dep. nac. Prod. anim., Rio de J., 1(1, 2, 3):1-66.
- Venters, H.D., Hoffert, W.R., Scatterday, J.E. & Hardy, A.V. 1954. Rabies in bats in Florida. Am. J. publ. Hlth. 44: 182-185.
- Villa, B.R. 1967. Comunicação pessoal.
- World Health Organization 1966. Laboratory techniques in rabies. WHO scient. Publ., Washington, 23.

THE ISOLATION OF RABIES VIRUS FROM INSECTIVOROUS BAT, *Histiotus velatus*, CAPTURED IN THE STATE OF SANTA CATARINA (SOUTH OF BRAZIL)

Abstract

Rabies virus was isolated from the brain of an insectivorous bat, *Histiotus velatus* Geoffroy, captured in the Municipality of Alfredo Wagner, State of Santa Catarina (South Brazil).

The brain suspension was inoculated into adult mice by intracerebral route. The virus strain was identified as rabies virus by the presence of Negri bodies in the cytoplasm of nervous cells from brains of mice inoculated at 21 days of age. Identification was made by neutralization test using a standard rabies immune serum and by fluorescent antibody technique.