

ENSAIOS COM O VÍRUS RÁBICO "ERA", NO BRASIL. I. DISTRIBUIÇÃO DO VÍRUS NO ORGANISMO DE BOVINOS INOCULADOS E FORMAÇÃO DE INCLUSÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL¹

RENATO AUGUSTO DA SILVA², NORMA MORAES DA SILVA³ e PAULO ROBERTO VALADÃO MENEZES⁴

SINOPSE.- A amostra de vírus rábido ERA, inoculada por via intramuscular em bovinos, no masseter, foi capaz de se localizar nos tecidos das glândulas salivares (submaxilares, parótidas e sublinguais) e no sistema nervoso central.

A amostra ERA determinou o aparecimento de inclusões no citoplasma e nos prolongamentos dos neurônios dos bovinos, muito semelhantes aos corpúsculos de Negri. Material acidófilo finamente granular, espalhado difusamente no citoplasma celular, pôde ser observado. Os camundongos que receberam intracranialmente a amostra ERA também mostraram inclusões muito semelhantes aos corpúsculos de Negri no citoplasma de suas células nervosas.

O antígeno rábico nos tecidos glandular e nervoso foi evidenciado pelo teste de anticorpos fluorescentes. Não se recuperou vírus dos tecidos imuno-positivos, nem da saliva, por inoculação em camundongos adultos e lactentes.

Palavras chaves adicionais para índice: Raiva.

INTRODUÇÃO

A amostra de vírus rábico denominada ERA originou-se da amostra de vírus fixo "SAD", isolada de um cão raivoso no Communicable Disease Center, Montgomery, Alabama, U.S.A., onde foi exclusivamente passada em cérebro de camundongos (Fenje 1960).

Abelseth (1964a) passou a amostra SAD no embrião de galinha por algumas gerações, via saco da gema, sem no entanto haver aumento do título do vírus, que era de 10^{-3.0} após oito passagens. Posteriormente a estas passagens no embrião, esta amostra foi levada ao cultivo em células renais de suíno com menos de 24 horas de idade. A multiplicação do vírus ocorria em 4 dias como em 21 dias, apresentando títulos em camundongos acima de 10^{-6.0} por ml, não se verificando efeito citopatogênico apreciável. A amostra de vírus rábico obtida das passagens no embrião de galinha e por 35 vezes em cultivo de rim de suíno foi, então, identificada como amostra ERA, iniciais dos pesquisadores Evelyn, Rockett e Abelseth. Líquidos dos cultivos foram coletados com 7, 10 ou 14 dias após inoculação, adicionando-se um estabilizador, e a mistura foi liofilizada e selada em vácuo, constituindo a vacina anti-rábica ERA. Segundo, ainda,

Abelseth (1964b), a amostra ERA, cultivada em células renais de suíno, é patogênica para camundongos, cobaias e "hamsters" inoculados pela via intracerebral. A patogenicidade para essas espécies é baixa, quando se inocula por via intramuscular a vacina. A amostra "ERA" retém um pouco de sua virulência ao ser inoculada em cães e bovinos por via intracerebral (Abelseth 1967).

Com o fito de verificar a progressão do vírus ERA inoculado por via intramuscular, nos diferentes tecidos de bovinos, foi que nos propusemos realizar as pesquisas ora relatadas, que foram efetuadas no Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), em Itaguaí, RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra da vacina

A amostra de vacina utilizada para a inoculação dos animais era constituída pela partida número 588-1, importada pelo Ministério da Agricultura, de acordo com o convênio firmado pelos Governos Brasileiro e Canadense. Esta vacina, fabricada pelo Laboratório "Connaught", contém vírus rábico vivo, modificado por passagens em células renais de suíno. No momento da aplicação desta vacina nos bovinos, foi retirada amostra para a prova de titulação em camundongos.

Bovinos

Os animais selecionados para este trabalho procediam do plantel de entidade oficial, situada no Km 47, onde há vários anos não se tem notícia de casos de raiva bovina. Eram animais adultos, impréstáveis para os fins zootécnicos.

¹ Aceito para publicação em 30 de julho de 1974.

Apresentado ao XIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 19 a 23 de novembro de 1972, Brasília, DF.

² Chefe da Seção de Virologia do Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), e Regente da Disciplina de Virologia do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

³ Veterinário da Seção de Virologia do IPEACS, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e bolsista do CNPq.

⁴ Veterinário da Seção de Virologia do IPEACS, contratado pela Associação Brasileira de Crédito e Assistência Rural.

Técnica de trabalho

Realizaram-se coletas de amostras de saliva dos quatro animais durante cinco dias anteriores à inoculação da vacina, visando-se à detecção de antígeno viral rábico.

Após a análise da saliva, dois bovinos receberam 6 cm³ da vacina ERA, partida 588-1, pela via intramuscular, sendo 3 cm³ de cada lado, no masseter. Os dois bovinos restantes receberam 2 cm³ da mesma vacina, também no masseter.

A saliva dos animais foi coletada aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias após a inoculação da vacina e, em todas as fases da coleta, a saliva foi examinada pelo método de imunofluorescência e, também, inoculada intracranialmente em camundongos adultos (13 g) e lactentes (4 dias de idade), tendo-se o cuidado de submetê-la ao tratamento por antibióticos (penicilina e estreptomocina).

Decorridos 60 dias da inoculação, os bovinos injetados com 6 cm³ da vacina foram sacrificados. Destes animais, foram coletados o cérebro, cerebelo, medula espinal, fragmentos do músculo masseter no nível do ponto de inoculação, córneas e as glândulas salivares (submaxilares, parótidas e sublinguais).

50% de cada lote inoculado foram sacrificados, sendo os cérebros submetidos à prova de imunofluorescência.

RESULTADOS

A vacina utilizada no presente trabalho apresentou título de 10^{-4,80} em camundongos, no momento de sua aplicação nos bovinos.

A saliva dos bovinos no período anterior à inoculação da vacina não revelou vírus rábico nas provas de imunofluorescência e inoculação em camundongos adultos e lactentes, ficando demonstrada, até certo ponto, a inexistência de vírus rábico circulante nestes animais.

Os resultados dos exames realizados com os bovinos 1, 2, 3 e 4, inoculados os dois primeiros com 6 cm³ e os dois últimos com 2 cm³ da vacina ERA, estão expressos no Quadro 1.

A saliva dos animais injetados com 6 cm³ da vacina, demonstrou a presença de vírus em todos os períodos de coleta, isto é, aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias após a inoculação da vacina, utilizando-se para tal verificação o método de imunofluorescência. Estas amostras, inoculadas em camundongos adultos e de qua-

QUADRO 1. Resultados da pesquisa, por imunofluorescência, do vírus rábico nos diversos tecidos de bovinos vacinados com vírus "ERA"

Tecidos examinados*	Bovino 1	Bovino 2	Bovino 3	Bovino 4
Corno de Ammon	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.
Córtex cerebral	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.
Cerebelo	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.
Bulbo	—	—	Pos. ^b	Pos. ^b
Medula espinal	Neg.	Neg.	Pos.	Pos. ^b
Glândulas submaxilares	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
Glândulas parótidas	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
Glândulas sublinguais	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
Córneas	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Masseter	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

* Estes tecidos foram inoculados intracerebralmente em camundongos adultos e lactentes; após 21 dias de observação, os camundongos foram sacrificados, submetendo-se seus cérebros à prova de imunofluorescência, com resultados negativos.

^b Ocorrência de inclusões citoplasmáticas semelhantes aos corpúsculos de Negri (técnica de Faraco).

Os outros dois bovinos, inoculados com 2 cm³, foram sacrificados com 84 dias, coletando-se o cérebro, cerebelo, bulbo, medula espinal, fragmentos de masseter do ponto de inoculação, córneas e glândulas salivares (submaxilares, parótidas e sublinguais).

Esfregaços em lâminas de diferentes seções dos tecidos nervosos, glândulas submaxilares, parótidas e sublinguais, do masseter e das córneas foram realizados e submetidos à prova de anticorpos fluorescentes (OMS 1967).

Para a pesquisa de inclusões nas células nervosas empregou-se a técnica de Faraco (1938), realizando-se esfregaços em lâminas de fragmentos dos cornos de Ammon, córtex cerebral, cerebelo, bulbo e medula.

As suspensões a serem inoculadas nos camundongos adultos e lactentes foram feitas individualmente a 20% em soro fisiológico a 0,85%, aproveitando-se todos os tecidos. A fim de prevenir as contaminações, adicionou-se penicilina e estreptomocina às diversas suspensões.

Os camundongos em que foram inoculadas as suspensões foram observados pelo período de 21 dias, quando

tro dias de idade por via intracerebral, não reproduziram o quadro clínico de raiva, durante o período de observação de 21 dias. No período final de observação, os cérebros de alguns camundongos sacrificados mostraram-se negativos para a raiva, por imunofluorescência.

A saliva dos animais inoculados com 2 cm³ da vacina, coletada nos mesmos intervalos referidos, em nenhuma fase demonstrou a ocorrência de antígeno viral rábico, quer pelo método de imunofluorescência, quer pela inoculação em camundongos. O exame dos cérebros de alguns camundongos, pela imunofluorescência, após 21 dias de observação, deu resultado negativo para a raiva.

Os bovinos 1 e 2, que receberam 6 cm³ e foram sacrificados aos 60 dias de vacinação, apresentaram antígeno rábico nas glândulas salivares (submaxilares, parótidas e sublinguais), havendo total negatividade nos demais tecidos.

No bovino 3, inoculado com 2 cm³ e sacrificado após 84 dias, evidenciou-se por imunofluorescência, nas diferentes seções do bulbo e da medula, a ocorrência de

antígeno viral rábico. As córneas, masseter, cérebro, cerebelo e corno de Ammon forneceram resultados negativos.

O bovino 4, igualmente inoculado com 2 cm³ e também sacrificado aos 84 dias, evidenciou antígeno viral rábico nos seguintes tecidos: corno de Ammon, córtex cerebral, cerebelo, bulbo, medula, glândulas parótidas e sublinguais. Os outros tecidos, representados pelas glândulas submaxilares, masseter e córnea, deram resultados negativos.

As suspensões individuais dos diferentes materiais imunopositivos ou imunonegativos, inoculadas em camundongos adultos e lactentes, não determinaram sinais clínicos de raiva. Os cérebros de alguns dos camundongos correspondentes a cada suspensão foram imunonegativos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar de ser o vírus ERA uma amostra de vírus seriamente passada em cérebro de camundongos, cultivo celular de rim de "hamsters", algumas passagens no embrião de galinha e posterior adaptação ao cultivo em célula renal de suíno, esta amostra não perdeu determinadas características da virulência. Assim, a amostra mantém sua patogenicidade para camundongos adultos, bovinos, cães e gatos, cobaias e "hamsters" inoculados pela via intracerebral, conforme demonstrou Abelseth. Pela via intramuscular a virulência da amostra é baixa para cobaias, mas até o momento não se tem notificação de virulência no uso a campo, onde mais de 200.000 bovinos e animais de outras espécies já foram vacinados (Abelseth 1967).

Em nossas experiências, em bovinos, inoculados no masseter com amostra de vacina ERA, observamos que este vírus tem capacidade de se multiplicar nas glândulas salivares e, também, no tecido nervoso central. Animais injetados com 6 cm³ demonstraram a presença de antígeno viral na saliva desde os 7 até os 56 dias após inoculação, não se encontrando vírus na saliva dos animais que receberam a dose de vacina de 2 cm³.

Nas diferentes seções das glândulas salivares, o antígeno viral rábico, apreciado pelo teste de anticorpos

fluorescentes, foi encontrado em maior quantidade nas glândulas sublinguais tanto dos bovinos que receberam 6 cm³ como dos que receberam 2 cm³ da amostra de vacína ERA.

A amostra ERA determinou o aparecimento de inclusões muito semelhantes aos corpúsculos de Negri no citoplasma e prolongamentos dos neurônios da região bulbar e medular de bovinos inoculados com 2 cm³ e sacrificados após 84 dias. Além destas inclusões, observamos material acidófilo granular espalhado difusamente no citoplasma dos neurônios (Fig. 1), material este que, confirmado pela prova de imunofluorescência, mostrou tratar-se de antígeno viral rábico. Estes achados não foram visualizados nos neurônios dos animais que receberam maior dose de vacina, mas que foram sacrificados, após 60 dias. Neste caso, não se examinou o bulbo.

Em cérebros de camundongos, nas provas de titulação da vacina, temos encontrado com frequência a formação de inclusões indistinguíveis dos corpúsculos de Negri, freqüentemente encontrado nas infecções rábicas por vírus das ruas.

Fenje (1960), ao trabalhar com a amostra "SAD" seriamente passada em camundongos e adaptada ao cultivo em células renais de "hamsters", não encontrou a ocorrência de inclusões semelhantes aos corpúsculos de Negri nos cérebros de camundongos e coelhos inoculados e, sim, material acidófilo finamente granular difusamente espalhado no citoplasma de alguns neurônios. Esta amostra de vírus SAD foi que deu origem à amostra ERA.

Ravaioli *et al.* (1970), verificando a possibilidade de falsos diagnósticos de raiva com o uso de vacinas vivas, tipo Flury, LEP, em condições experimentais de inoculação intramuscular no cobaio, demonstraram, por imunofluorescência, a ocorrência de vírus nos cérebros destes animais.

O vírus inoculado nos bovinos não foi recuperado dos tecidos nervoso e glandular imunopositivos em nenhuma ocasião, por provas de inoculação em camundongos adultos e lactentes.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO 1973), o uso de vacinas vivas não interfere com o diagnóstico laboratorial da raiva pelo teste de anticorpos fluorescentes; com isto está em desacordo o presente trabalho, pois demonstramos, por imunofluorescência, a ocorrência de antígeno viral rábico nos tecidos glandulares e nervoso de bovinos injetados no masseter com amostra de vacina ERA. Além do antígeno rábico, inclusões muito semelhantes aos corpúsculos de Negri, como também material acidófilo granular espalhado no citoplasma celular, foram visualizados nos neurônios.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos Laboratoristas Adhemar Lourenço e Argemiro Lourenço, como aos demais auxiliares da Seção de Virologia, pela prestimosa colaboração durante o desenvolvimento dos trabalhos.

REFERÊNCIAS

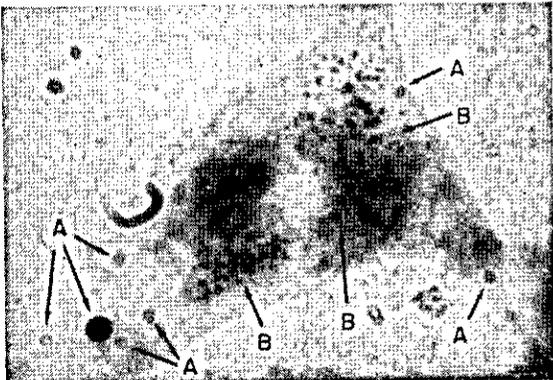


FIG. 1. Neurônio bulbar de bovino inoculado com 2 cm³ da vacina ERA e sacrificado 84 dias após a inoculação, mostrando inclusões semelhantes aos corpúsculos de Negri (A) e material acidófilo granular difusamente espalhado no citoplasma (B).

Abelseth, M.K. 1964a. Propagation of rabies virus in pig kidney cell culture. *Can. vet. J.* 5(4):84-87.

Abelseth, M.K. 1964b. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Can. vet. J.* 5(11):279-286.

- Abelseth, M.K. 1967. Vacunas antirrabicas producidas em cultivo de tejidos. Primer Seminario Internacional sobre Rabia para las Americas, 286-299, Ramos Mejia, Argentina.
- Faraco, J. 1938. Nova técnica para obtenção de esfregaço "por compressão e distensão" de partes do encéfalo, medula espinal, etc. . . para a pesquisa de Corpúsculos de Negri (coloração rápida dos esfregaços pelo método de Mann). Revta Biol. Hig., S. Paulo, 98:90-96.
- Fenje, P. 1960. Propagation of rabies virus in cultures of hamsters kidney cells. Can. J. Microbiol. 6(5):479-484.
- Organization Mondiale de la Santé 1967. La rage. Techniques de laboratoire. Monogr. n.º 23, Genève.
- Ravaioli, L., Palliola, E. Pestalozza, S., Granieri, M. & Ciuchini, F. 1970. Immunofluorescence in rabies diagnosis. I. Detection of rabies virus (Flury LEP and fixed challenge virus) in the cerebellum of guinea pigs inoculated i/m. Archo vet. ital. 21:421-430. (Vet. Bull. 41, Abstr. 6234)
- World Health Organization 1973. Sixth Report, WHO Expert Committee on Rabies, Genève.

ABSTRACT.- Silva, R.A.da; Silva, N.M.da; Menezes, P.R.V. [Studies on the "ERA" strain of rabies virus in Brazil. I. Distribution of the virus in the organism of inoculated cattle and formation of inclusions in the central nervous system]. Ensaio com vírus rábico "ERA", no Brasil. I. Distribuição do vírus no organismo de bovinos inoculados e formação de inclusões no sistema nervoso central. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1974) 9, 49-52 [Pt, en] IPEACS, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, Brazil.

Rabies virus, "ERA" strain, inoculated by intra-muscular route into the masseter muscle was capable of localizing in the salivary glands, brain, cerebellum, bulbus and spinal cord. The "ERA" strain determined the appearance of inclusions, in the cytoplasm of the neurons of bulbus and spinal cord, which resembled Negri bodies. Fine granular acidophile material diffusely dispersed in the cytoplasm was encountered.

The viral rabies antigen was detected in high concentration in the bulbus, spinal cord and salivary glands, by fluorescent antibodies techniques. The rabies virus was not recovered from the nervous tissues, salivary glands saliva of mice.