

IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA EM CÉREBRO E GLÂNDULA SALIVAR DE CAMUNDONGOS UNOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM VÍRUS RÁBICO

LUCIANY LEVIERO SOARES COSTA^a
ERNEST ECHEHARDT MULLER^b
JÚLIO CESAR DE FREITAS^b
AMAURI ALCINDO ALFIERI^b
JANE MEGID^b

COSTA, L.L.S.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; MEGID, J. — Imunofluorescência direta em cérebro e glândula salivar de camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico.

RESUMO

Foram analisados através da técnica de imunofluorescência direta, cérebros e glândulas salivares de oitenta camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico. Sacrificou-se quarenta camundongos em fase assintomática e os demais em fase agônica. Do material cerebral, obteve-se 100% de positividade para os animais sacrificados em fase assintomática e também 100% para os sacrificados em fase agônica. Utilizando-se a prova de imunofluorescência direta para o diagnóstico da raiva em glândula salivar, obteve-se um resultado positivo em 85% para os animais sacrificados em fase assintomática e 100% para os sacrificados em fase agônica. Os resultados comprovam a sensibilidade da prova de imunofluorescência direta no diagnóstico da raiva em glândula salivar.

PALAVRAS-CHAVE: Raiva; Imunofluorescências; Glândulas salivares; Cérebro.

1 — INTRODUÇÃO

A raiva se destaca em saúde pública e animal por ser uma zoonose quase sempre fatal (Nilsson, 1970; Nilsson & Cortês, 1975).

Após a penetração, o vírus rábico se multiplica no sistema nervoso central (SNC) e a partir daí se dissemina para todo o organismo (Murphy, 1977; Tsiang, 1985). Embora o antígeno viral possa ser encontrado em vários órgãos (Muhammad et al, 1986) ele é mais frequente em tecidos ricamente inervados, a maioria relacionados com a porta de entrada ou através da qual possa ser excretado. Neste aspecto a glândula salivar, por ser altamente inervada e possuir função de excreção, tem papel importante na manutenção do agente na natureza (Martin & Sedmak, 1983). A disseminação viral e sua presença na saliva dos animais foi estudada por vários pesquisadores (Ruef et al, 1978; Pépin et al, 1984; Charlton et al, 1983; Fekadu et al, 1982; Fekadu & Shaddock, 1984; Umoh & Blenden, 1982) sendo relatada a eliminação viral através da saliva durante a fase clínica (Pépin et al, 1984) e antes da sintomatologia (Fekadu et al, 1984; Trimarchi et al, 1986).

As técnicas empregadas no diagnóstico devem oferecer condições ótimas de precisão, rapidez e economia (Dean & Abelseth, 1976).

A técnica de imunofluorescência direta é atualmente o método diagnóstico mais rápido e viável superando inclu-

sive quando bem realizada, a inoculação em camundongos (Wachendorfer et al, 1985).

A aplicação da técnica da imunofluorescência direta em glândula salivar foi relatada por Abelseth & Trimarchi, 1983; Pilomoron et al, 1967; Turner, 1983/4, sendo testada sua viabilidade diretamente na saliva de animais suspeitos (Cortes & Oliveira, 1981), considerada uma alternativa viável para a realização do diagnóstico (Webster & Casey, 1988).

Hati & Sarkar (1988) realizaram imunofluorescência direta em material cerebral e glândulas salivares de camundongos experimentalmente inoculados com vírus rábico, obtiveram respectivamente 12,5% e 100% de positividade em material cerebral de camundongos sacrificados em fase assintomática e agônica. Na glândula salivar, estes autores relatam 72,2% de resultados positivos em camundongos sacrificados em fase agônica.

Considerando a possibilidade de utilização para o diagnóstico da raiva a glândula salivar e o fato de que o diagnóstico rábico através da imunofluorescência direta é baseado na suposição de que um animal com resultado negativo na imunofluorescência direta de cérebro não apresenta vírus na saliva, este trabalho tem por objetivo verificar a positividade da glândula salivar comparativamente ao material cerebral em camundongos inoculados experimentalmente e sacrificados em fase assintomática e agônica.

a - Curso de Especialização em Sanidade Animal/Universidade Estadual de Londrina.

b - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Patologia Animal e Zootecnia - CCA/Universidade Estadual de Londrina.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Camundongos suíços albinos, adultos jovens de 12 a 14 gramas.

Inóculo: Correspondente a uma suspensão de 20% (Peso/Volume) de cérebros de camundongos inoculados experimentalmente por via intracerebral com vírus rábico (M3/87) testado previamente pela técnica de neutralização em camundongos (Johnson, 1976) originariamente isolados de bovinos e mantidos através de seis passagens em camundongos.

Diluinte para suspensão viral: Preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (1975).

Challenge Virus Standard (CVS): Fornecido gentilmente pelo Depto. Med. Vet. Prev. da USP.

Suspensão de cérebro normal (SCN): Preparado segundo a técnica preconizada pelo Centro Panamericano de Zoonoses (1975).

Conjugado utilizado na reação de imunofluorescência: Produzido no Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da Universidade de São Paulo e diluído a 1:50 com a suspensão de cérebro de camundongo normal (SCN) e suspensão de Challenge Virus Standard (CVS), preparados segundo a técnica preconizada pelo Centro Panamericano de Zoonoses (1975).

Inoculação: Segundo técnica descrita por Koprowski (1976).

Reação de imunofluorescência direta: Segundo metodologia de Goldwasser & Kissling (1958).

Foram inoculados oitenta camundongos por via intracerebral com um volume de 0.03 ml de vírus rábico (M3/87) e observados diariamente. Sacrificou-se quarenta camundongos no 5^o dia após a inoculação, ainda se encontravam em fase assintomática. Retirou-se o cérebro e glândula salivar para o preparo das impressões em lâmina e posterior aplicação da prova de imunofluorescência direta. Os quarenta camundongos restantes, foram sacrificados em fase agônica, o que ocorreu no 8^o dia após a inoculação. Destes animais também retirou-se o cérebro e glândula salivar para o preparo das impressões. Utilizou-se como controle material cerebral e glândula salivar procedente de camundongos sadios sacrificados nos mesmos dias.

Para cada material cerebral e glândula salivar, foram preparadas duas lâminas correspondentes, que após secarem, foram fixadas em acetona a -20°C por trinta minutos. As lâminas, depois de fixadas, secaram em temperatura ambiente e procedeu-se a técnica de imunofluorescência direta que foram lidas logo após o processamento.

3 — RESULTADOS

A imunofluorescência direta em material cerebral de animais sacrificados em fase assintomática e agônica resultou 100% positiva.

Em material procedente de glândula salivar obtivemos 100% de positividade nos animais sacrificados em fase agônica e 85% em fase assintomática.

A positividade na reação de imunofluorescência direta em material cerebral e glândula salivar foi caracterizada, pela presença de grânulos e estruturas fluorescentes de diferentes formas e tamanhos em material submetido ao conjugado absorvido com SCN e ausência dos mesmos no material submetido ao conjugado absorvido com CVS.

O material procedente do grupo controle apresentou ausência de grânulos e estruturas fluorescentes quando submetido a ambos os conjugados.

4 — DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A presença de antígeno rábico foi demonstrada através da visualização de corpúsculos fluorescentes de diferentes formas e tamanhos submetidos ao conjugado absorvido com SCN e ausência dos mesmos aos submetidos ao CVS. Dos oitenta camundongos testados, quarenta em fase assintomática e quarenta em fase agônica, todos foram positivos.

Dados semelhantes foram obtidos por Bagnaroli et al (1970) que estudando cérebro de camundongos inoculados experimentalmente via intracerebral, determinaram o tempo de apresentação de antígenos rábico em três dias após a inoculação, utilizando para isso a técnica de imunofluorescência direta. Dos trinta camundongos do experimento 93,3% apresentavam-se positivos no 3^o dia e atingindo 100% de positividade no 4^o dia após a inoculação.

Kotwal & Narayan (1985) examinando impressões cerebrais de camundongos infectados com material de campo positivos a raiva, observaram 100% de positividade a imunofluorescência direta, dado este, concordante aos resultados obtidos neste experimento.

Mocsari (1987) e Ratan & Padmanaban (1986) ao analisarem cérebros de diferentes espécies, determinaram positividade de 99,33% e 95% respectivamente quando utilizada a técnica de imunofluorescência direta. Estes autores concluem que esta prova é específica, precisa, rápida e direta, além de determinar antígeno rábico em fase anterior a sintomatologia.

A partir de impressões das glândulas salivares, trinta e quatro dos quarenta camundongos sacrificados em fase assintomática foram positivos a prova de imunofluorescência direta, já em fase agônica, os quarenta estudados foram positivos. A positividade em glândulas salivares foi verificada pela presença de grânulos fluorescentes compatíveis com os observados por Charlton et al (1983).

Hati & Sarkar (1988) determinaram através da técnica imunofluorescência direta em glândula salivar de camundongos inoculados intracerebralmente e sacrificados em fase agônica, uma positividade de 72,2%.

Cortés & Oliveira (1981) utilizando trinta amostras de saliva colhidas em fase clínica de trinta cães provenientes do isolamento do Serviço de Profilaxia da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo, obtiveram 96,66% de positividade a prova de imunofluorescência direta.

Neste trabalho, encontramos 85% de positividade em glândula salivar de camundongos em fase assintomática e 100% de positividade em fase agônica. A alta positividade observada na glândula salivar poderia ser explicada em fun-

ção da dose do inóculo e cepa viral (Fekadu & Shaddock, 1984) bem como a susceptibilidade do hospedeiro (Umoh & Blendon, 1982). A menor positividade observada em animais em fase assintomática justifica-se pelo menor período de evolução (Fekadu et al, 1982), pois existe uma relação direta entre título viral no corno, na glândula salivar e evolução clínica da doença (Pépin et al, 1984).

Todos os animais negativos à imunofluorescência direta de glândula salivar, apresentaram resultado positivo a esta mesma prova quando realizada em material cerebral, o que se justifica pela multiplicação viral inicialmente no cérebro seguida de disseminação posterior à glândula salivar (Charlton et al, 1983). A ausência de animais negativos à

imunofluorescência direta cerebral, não nos permite inferir sobre a suposição de que os animais negativos não apresentam vírus na saliva.

Quando comparada ao material cerebral, a imunofluorescência direta em glândulas salivares apresentou uma positividade menor quando realizada em camundongos sacrificados em fase assintomática e resultado idêntico em animais sacrificados em fase agônica.

Estes resultados confirmam a possibilidade de sua utilização como material alternativo no diagnóstico da raiva. Deve-se salientar porém, que a leitura das lâminas é mais delicada exigindo maior experiência por parte do técnico responsável.

COSTA, L.L.S.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; MEGID, J. — Direct immunofluorescence in brain and salivary gland of mice experimentally inoculated with rabies virus.

SUMMARY

Through the fluorescent antibody test, brains and salivary glands of 80 mice experimentally inoculated with the rabies virus have been analyzed. 40 mice were killed in the non-symptomatic stage and the others were killed in the agonizing stage. From the brain material, 100% positiveness was obtained regarding the animals killed in both the non-symptomatic and the agonizing stage. When making use of the fluorescent antibody teste for the rabies diagnosis in the salivary glandis, a positive result was obtained in 85% of the animals killed during the non-symptomatic stage and 100% of the animals killed in the agonizing stage. The results have proved the sensitivity of the fluorescent antibody test for the rabies in the salivary glands.

KEY-WORDS: Rabies; Fluorescent antibody; Salivary glands; Brains.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABELSETH, M.K. & TRIMARCHI, C.V. Laboratory diagnosis of rabies. In: ABELSETH, M.K. et al. *Report on rabies*. Princeton Junction: Fromm Laboratories, 1983. 15 p.
- 2 - BAGNAROLI, R.A.; LARGHI, O.P.; MARCHEVSKY, N. Susceptibilidade de ratones lactentes y adultos al virus rabico demonstrada por imunofluorescência. *Bol. Ofic. Panamer.*, 68: 388-392, 1970.
- 3 - CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. *Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia*. Buenos Aires, 1975. 24 p. (Nota técnica, 8, rev. 2).
- 4 - CHARLTON, K.M.; CASEY, G.A.; CAMPBELL, J.B. Experimental rabies in skunks. mechanisms of infection of the salivary glands. *Can. J. Comp. Med.*, 47: 363-369, 1983.
- 5 - CORTES, V.A. & OLIVEIRA, M.C.G. Diagnóstico da raiva em cães a partir da saliva por imunofluorescência direta. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 48: 78-81, 1981.
- 6 - DEAN, D.J. & ABELSETH, M.K. Prueba de los anticuerpos fluorescentes. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, I. *La rabia: técnicas de laboratorio*. 3 ed. Geneva: Organization Mundial de la Salud, 1976. p. 75-83.
- 7 - FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; BAER, G.M. Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. *J. Infect. Dis.* 145 (5): 715-719, 1982.
- 8 - FEKADU, M. & SHADDOCK, J.H. Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Am. J. Vet. Res.*, 45 (4): 724-729, 1984.
- 9 - COLGWASSER, R.A. & KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, New York, 98: 219-223, 1958.
- 10 - HATI, R. & SARKAR, P. Dissemination of rabies street virus in experimentally infected mice. *Int. J. Vir.*, 3: 18-25, 1988.
- 11 - JOHNSON, H.N. Rabies virus. In: Lennete, E.H. & SCHMIDT, N.J. *Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infection*. 5. ed. Washington: American Public Health Association. 1976. p. 843-847.
- 12 - KOPROWSKI, H. Prueba de inoculation al raton. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. *La rabia: técnicas de laboratorio*. 3. ed. Geneva: Organizacion Mundial de la Salud, 1976. p. 88-97.
- 13 - KOTWAL, S. & NARAYAN, K.G. Direct immunoperoxidase test diagnosis of rabies an alternative to fluorescent antibody test. *Int. J. Zoon.*, 12: 80-85, 1985.
- 14 - MARTIN, M.L. & SEDMAK, P.A. Rabies part I. Epidemiology, pathogenesis and diagnosis. *The Comp. Contin. Educat. Pract. Vet.* 5 (7): 521-528, 1983.
- 15 - MOCSARI, E. Experience in the laboratory diagnosis of rabies in the period 1967-1986. *Magy. Allatorv. Lap.* 42: 683-686, 1987.
- 16 - MAUHAMMAD, A.K.; DIESCH, L.S.; GOYAL, S.M. Current status of rabies. In: *Int. J. Zoon.*, 13: 215-229, 1986.
- 17 - MURPHY, F.A. Rabies pathogenesis; brief review. *Arch of virology*, 54: 279-297, 1977.

- 18 - NILSSON, M.R. Revisão de conceito de que raiva é sempre fatal. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, Washington, 68: 486-494, 1970.
- 19 - NILSSON, M.R. & CORTÉS, J.A. Recuperação espontânea de um cão raivoso, experimentalmente infectado. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. Univ. São Paulo*, São Paulo, 12: 229-234, 1975.
- 20 - PEPIN, M. BLANCOU, J.; AUBERT, M.F.A. Rage expérimentale des bovins: sensibilité, symptômes, réactions immunitaires humorales, lésions et excrétion du virus. *Am. Rech. Vet.*, 15 (3): 325-333, 1984.
- 21 - PILOMORON, E.; VINCENTI, J.; SUREAU, P.; NÉEL, R. Diagnostic rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous-maxillaire aux souriceaux et par l'immunofluorescence. *Arch. Inst. Pasteur D'Algérie*, 45: 5-10, 1967.
- 22 - RATAN, T.S.S. & PALMANABAN, V.D. Clinical diagnosis of rabies in herbivores - examination of corneal impression smears by fluorescent antibody test. *Ind. Vet. J.*, 63: 882-885, 1986.
- 23 - RUEFF, C.; BLANCOU, J.; NADRAL, L. La salive des bovins enrages. Est-elle virulente? Etude bibliographique et expérimentale. *Revue Med. Vét.*, 129 (6): 895-909, 1978.
- 24 - TRIMARCHI, C.V.; RUDD, R.J.; ABELSETH, M.K. Experimentally induced rabies in four cats inoculated with a rabies virus isolated from a bat. *Am. J. Vet. Res.*, 47 (4): 777-780, 1986.
- 25 - TURNER, G.S. Rabies. In: TOPLEY & WILSON'S. *Principles of bacteriology, virology and immunity*, 7. ed. London: Williams & Wilkins, 1983-4. v.4, p. 472-486.
- 26 - TSIANG, H. An in vitro study of rabies pathogenesis. *Bull. de L'inst. Pasteur*, 83: 41-56, 1985.
- 27 - UMOH, J.U. & BLENDEN, D.C. The dissemination of rabies virus into cranial nerves and other tissues of experimentally infected goats dogs and naturally infected skunks. *Int. J. Zoon.*, 9: 1-11, 1982.
- 28 - WACHENDORFER, G.; FROST, J.W.; FROHLICH, J. Current diagnosis procedures of rabies and related viruses. In: KUWERT E.; MÉRIEUX, C.; KOPROWSKI, H.; BOGEL, K. *Rabies in the tropics*. Berlin. Berlin: Springer - Verlag, 1985. p. 40-46.
- 29 - WEBSTER, W.A. & CASEY, G.A. Diagnosis of rabies infection. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K.M. *Rabies*. London: KLUWER Academic Publishes, 1988. p. 201-222.

Recebido para publicação em 31.10.1990.

Endereço p/ correspondência:
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Patologia Animal
e Zootecnia - CCA/UEL.