

ESTUDO DA SENSIBILIDADE DE UM SISTEMA BIOLÓGICO EMPREGADO NO DIAGNÓSTICO DA RAIVA

VALDSON DE ANGELIS CÔRTEZ

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Saúde Pública da Universidade
de São Paulo, Departamento de Prática de
Saúde Pública, para obtenção do título de
Mestre em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Gil Vianna Paim

SÃO PAULO
1978

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
SÃO PAULO

A

memória

de

meus

país.

Ao

Prof.Dr. Gil Vianna Paim

pela orientação do presente trabalho.

A G R A D E C I M E N T O S

À Chefia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, constituída pelos Drs. Omar Jaques Marzagão Barbuto e José de Angelis Côrtes, que nos cedeu gentilmente o laboratório dessa Entidade para a realização do experimento e demais funcionários pela prestimosa colaboração.

Aos Drs. Moacir Rossi Nilsson, Silvio Arruda Vasconcellos, Fumio Honma Ito e Cezar Eduardo Enriquez Rozas, pela valiosa colaboração prestada durante a execução deste trabalho.

Ao Diretor do Instituto Pasteur de São Paulo, Dr. Murilo Pacca de Azevedo e as Dras. Luiza Terezinha Madia de Souza Morita e Esther Luiza Bocato Camelet e demais funcionários pelas facilidades que nos propiciaram para a colheita das amostras.

Ao Diretor do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, Dr. Arnaldo Vila Nova e demais funcionários pelas facilidades que nos proporcionaram na fase de colheita das amostras.

À Bibliotecária Daisy Pires Noronha, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela valiosa colaboração prestada na revisão das referências bibliográficas.

Í N D I C E

	pg.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Secreção salivar.....	6
2.2. Soluções.....	6
2.2.1. Cloridrato de pilocarpina.....	6
2.2.2. Diluente.....	6
2.3. Camundongos.....	6
2.4. Colheita das amostras.....	6
2.5. Identificação do vírus.....	7
3. RESULTADOS.....	8
4. DISCUSSÃO.....	12
5. CONCLUSÕES.....	14
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

R E S U M O.

Quarenta e duas amostras de saliva de cães raivosos foram examinadas por inoculação intracerebral, para apreciar a sensibilidade do camundongo lactente em relação a do adulto jovem, no diagnóstico da raiva. O isolamento do vírus rábico de 100% das amostras utilizadas, nos dois sistemas biológicos, mostrou uma certa concordância dos resultados obtidos.

A identificação de inclusões celulares e de antígeno rábico, mediante as técnicas de Sellers e de anticorpos fluorescentes, revelou uma perfeita regularidade desses indicadores da infecção rábica nas impressões encefálicas tanto de camundongos lactentes como de adultos jovens.

O camundongo lactente revelou uma certa superioridade para revelar inclusões celulares e antígeno rábico, particularmente à imunofluorescência direta.

A taxa de mortalidade mais elevada observada nos grupos de camundongos lactentes, revelou uma diferença altamente significativa em relação ao mesmo evento verificado nos grupos de camundongos adultos jovens, evidenciando uma mais baixa resistência do camundongo lactente ao vírus rábico.

S U M M A R Y.

42 saliva samples of rabid dogs were examined by intracerebral inoculation to appreciate the sensibility of suckling mouse in relation to the young adult in the diagnosis of rabies. Rabies virus isolation of all of the samples utilized in the two biological systems showed certain agreement of results.

Identification of cellular inclusions and rabies antigen by means of the technics of Sellers and fluorescent antibodies revealed a perfect regularity of these indicators of the rabies infection in the encephalic impressions of suckling mice and young adults.

Suckling mouse were somewhat superior to reveal cellular inclusions and rabies antigen especially on direct immunofluorescence.

The higher death rate observed in the suckling mice groups was highly significant in relation to the same event verified in the young adult mice groups demonstrating a lower resistance of suckling mouse to rabies virus.

1. INTRODUÇÃO.

A raiva é uma das antropozoonoses que maior interesse e importância tem despertado, desde sua descoberta. Causa grandes apreensões a humanidade, em face da sua evolução quase sempre fatal (1, 16, 29), acompanhada da dramaticidade peculiar dos casos da doença, especialmente em humanos (31).

Conhecida desde a mais remota antiguidade, a sua persistência na natureza está assegurada pela capacidade do seu agente causal de parasitar um número elevado de espécies de vertebrados, aliada ao equilíbrio biológico que estabelece com algumas delas (1, 16, 29). Contribui também para a sua perpetuação na natureza, o mecanismo usual de transmissão por contágio direto, principalmente pelo hábito de morder de algumas espécies hospedeiras (2, 16, 38), associado a excreção do vírus através a saliva (10, 32, 39, 40, 43).

A importância da saliva como material virulento, tem sido exaustivamente demonstrada (9, 10, 31, 32, 39, 40, 43), em períodos pré-clínicos (39, 40), clínicos (9, 32, 39, 40, 41), pós-clínicos, em casos de recuperação espontânea (29, 31) e a partir de portadores assintomáticos (10, 43), tanto na infecção experimental (10), como na natural (43), embora uma periodicidade irregular tenha sido observada na demonstração do vírus da saliva (10, 16, 31, 43).

Apesar da importância do conhecimento da condição infectante da saliva do animal agressor, por ocasião da exposição do susceptível, demonstrada em várias situações (3, 9, 32, 38, 39, 40, 41, 43), com vistas ao tratamento preventivo, o tecido do sistema nervoso central ordinariamente (3, 6, 14, 16, 19, 20, 21, 23, 25), e o tecido da glândula salivar

submaxilar esporadicamente (2, 7, 19, 26, 41, 42); continuam a ser utilizados para demonstrar a infecção, embora só possam ser colhidos após a morte do indivíduo (16, 42).

Para o diagnóstico da raiva a partir desses espécimes, vários recursos desenvolvidos no passado encontram-se disponíveis atualmente (3, 5, 11, 12, 14, 16, 20, 34, 44), mas a pesquisa de corpúsculos de Negri em impressões e esfregaços, através coloração direta, a imunofluorescência direta e a prova biológica por inoculação intracerebral de camundongos, apresentam certa significância prática (5), no uso corrente. Embora, nenhum método seja inteiramente satisfatório para atender os requisitos de precisão, rapidez, segurança do operador, custo e conveniência no contexto das diferentes situações e prioridades (5, 11, 12, 20). A esse respeito, para melhor adequar as necessidades do diagnóstico da enfermidade, a maioria dos laboratórios utiliza uma combinação apropriada dos métodos disponíveis para tal procedimento (5, 11, 12, 16, 20, 21, 23, 27), eliminando ao máximo, a possibilidade de erro (3).

Considerando a prova biológica como critério definitivo para elucidar a presença ou ausência de infecção, a pesquisa de inclusões celulares em esfregaços e impressões tem revelado uma taxa de 10 a 12% de falhas (3, 16, 21, 27), enquanto a imunofluorescência direta tem demonstrado uma concordância mais perfeita com a inoculação de camundongos (3, 5, 6, 7, 20, 23, 36, 37), embora resultados falsos negativos ocorram esporadicamente em ambas as técnicas (7, 15, 20).

Mais recentemente, outros métodos foram descritos, para o diagnóstico da raiva "in vivo", mediante a aplicação da técnica de anticorpos fluorescentes. Dentre estes, o teste de córnea, a biópsia de pele e o isolamento do vírus a partir da saliva podem ser utilizados, com este propósito, embora um resultado negativo não afaste a possibilidade de infecção (20, 24, 41).

O isolamento do vírus tem sido usualmente considerado como o método mais apropriado para o diagnóstico da raiva (15). Com esse objetivo, vários animais de laboratório foram ensaiados, especialmente o coelho, o cobaio, o camundon

go e o hamster^(3, 16). No início das atividades de diagnóstico e de pesquisa sobre a raiva, o coelho representou um papel importante^(3, 32). Mais tarde, experiências demonstraram a superioridade do camundongo branco de laboratório, de 4 a 6 semanas de idade e de diferentes linhagens, para isolar e identificar o vírus rábico, a partir de tecido do sistema nervoso central por via intracerebral^(3, 16, 17, 19, 21, 44, 45). Ultimamente, mostrou-se igualmente útil para demonstrar a infectividade de diferentes tecidos e secreções de animais subsequentemente raivosos^(7, 9, 26, 35, 43). Apesar das vantagens do método, o inconveniente de um resultado demorado⁽¹⁵⁾, especialmente em casos negativos⁽²²⁾, levou a certas modificações da técnica original de WEBSTER & DAWSON⁽⁴⁴⁾, objetivando tornar a prova mais precoce^(22, 33, 35). Com esse intuito, MARKSON et alii⁽²²⁾ aplicando a técnica de imunofluorescência direta a encéfalos de camundongos de 5 dias de idade, inoculados com suspensão cerebral virulenta, obtiveram resultados positivos 3 a 4 dias após a inoculação. Achados idênticos foram observados por PILO MORON et alii⁽³³⁾, em camundongos de 4 a 5 dias de idade, inoculados com glândula salivar submaxilar de cão e gato, mas só demonstraram o antígeno rábico à imunofluorescência 4 a 5 dias após a inoculação de espécimes de tecido cerebral. MARTELL et alii⁽²⁵⁾, utilizando suspensão de tecido encefálico de cães, bovinos e morcego, adicionada de Dimetil Sulfóxido (DMSO), como substância difusora, obtiveram a redução de 24 horas no período de incubação da doença em camundongos de 21 dias de idade.

Certas variáveis, podem modificar a uniformidade e a regularidade da resposta do sistema biológico à infecção pelo vírus rábico⁽⁴⁵⁾. Nesse contexto, a idade do camundongo joga um papel importante na susceptibilidade a raiva, demonstrada em diferentes oportunidades^(3, 4, 14, 16, 33). CASALS⁽⁸⁾, em um experimento comparativo mostrou a diferença de susceptibilidade existente entre o camundongo lactente e o adulto jovem para recuperação do vírus da raiva, a partir de suspensões de encéfalo, demonstrando a superioridade dos animais mais jovens. Corroborando com esta assertiva, uma amostra Flu-ry de alta passagem em ovo embrionado, produziu infecção fatal em camundongos de 3 a 8 dias de idade, pela via intracerebral, mas falhou em reproduzir a doença em animais de 14 dias

de idade, sob as mesmas condições experimentais⁽¹⁸⁾. Algumas amostras isoladas de animais silvestres mostraram-se mais patogênicas para camundongos lactentes em comparação aos adultos jovens^(3, 16). Observações similares foram descritas por GOMEZ et alii⁽¹³⁾, em seu relato sobre o isolamento do vírus rábico do encéfalo de uma criança acometida da doença de origem silvestre, obtido somente em camundongos lactentes de idade inferior a 24 horas. Subsequentemente, NILSSON & SUGAY⁽³⁰⁾, demonstraram a superioridade do camundongo lactente de 3 dias de idade, para recuperar o vírus rábico de 2 espécimes de tecido do sistema nervoso central de herbívoros domésticos, verificando na ocasião do diagnóstico, uma baixa mortalidade, um longo período de incubação e um caso de recuperação espontânea, achados sugestivos de baixa concentração de vírus nos materiais examinados.

Um estudo avaliativo da sensibilidade do camundongo de 4 a 8 dias de idade e de 21 a 35 dias, para demonstrar quantitativamente a infectividade de espécimes encefálicas de diferentes espécies de animais domésticos, demonstrou a maior precisão do camundongo lactente, tanto para o diagnóstico, como para mensurar suspensões virulentas⁽²⁸⁾.

A infectividade da saliva de animais raivosos, era conhecida antes da descoberta da etiologia da raiva⁽³⁾. No entanto, o uso desse espécime para o diagnóstico da doença foi negligenciado no passado por motivos de ordem prática⁽¹⁶⁾. Mas com o conhecimento da transmissão da enfermidade, diferentes recursos diagnósticos foram desenvolvidos, visando o isolamento e a identificação do vírus da raiva da saliva de animais acometidos por esta virose^(3, 16, 24, 32).

Desse modo, PAWAN et alii⁽³²⁾, conseguiram isolar o vírus rábico da saliva de bovinos, equinos, humanos e vampiros raivosos, friccionando este material sobre a superfície da parede abdominal de coelhos, previamente escarificada. VAUGHN et alii^(39, 40), detectaram o vírus desse espécime, de cães e gatos infectados experimentalmente, utilizando camundongos adultos jovens de 4 a 6 semanas de idade, por inoculação intracerebral. Utilizando camundongos desmamados de 21 dias de idade, CLEMMER et alii⁽⁹⁾, demonstraram a infectividade

de da secreção salivar de 15 cães infectados naturalmente, sendo 14 na fase clínica e de um assintomático. VALLONE et alii (41), tiveram êxito na identificação do antígeno rábico de material salivar de origem humana, utilizando a técnica de imunofluorescência direta, aplicada pela primeira vez por GOLDWASSER & KISSLING (14), ao diagnóstico da raiva, evidenciando a possibilidade de um diagnóstico pré-mortem. Empregando a mesma técnica, VEERARAGHAVAN et alii (43), demonstraram o antígeno rábico na saliva de um cão aparentemente saudável, infectado naturalmente.

A maior sensibilidade do camundongo lactente em relação ao adulto jovem, para o isolamento do vírus rábico da saliva de animais infectados, também tem sido demonstrada, em algumas oportunidades (10, 31, 43), tanto na infecção experimental (31), como na natural (43) e de animais assintomáticos (10, 43), em ambas condições. Nesse sentido, NILSSON & CÔRTEZ (31) demonstraram a presença do vírus rábico em 6 amostras de saliva de um cão infectado experimentalmente com vírus proveniente de morcêgo, apenas em camundongos lactentes de 2 a 7 dias de idade, tendo fracassado nas tentativas de isolamento em camundongos adultos jovens de 30 dias de idade. Sob as mesmas condições experimentais, CÔRTEZ & NILSSON (10) obtiveram dois resultados positivos apenas em camundongos lactentes e dois somente em adultos jovens, utilizando saliva de dois cães aparentemente saudáveis, experimentalmente infectados com uma estirpe de vírus rábico proveniente de morcêgo. VEERARAGHAVAN et alii (43), relataram 14 isolamentos do vírus em camundongos lactentes e somente 6 em adultos jovens, utilizando 913 espécimes de saliva colhidas de um cão portador assintomático, infectado em condições naturais.

No presente estudo, pretendemos apreciar a sensibilidade do camundongo lactente para o isolamento do vírus da raiva da saliva de cães na fase clínica da doença natural, comparando os resultados obtidos com a sensibilidade do camundongo adulto jovem.

2. MATERIAL E MÉTODOS.

2.1. Secreção salivar.

No presente estudo foram utilizadas 42 amostras de saliva, colhidas na fase clínica da raiva natural, de 30 cães mantidos em observação no Instituto Pasteur e no Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo.

2.2. Soluções.

2.2.1. Cloridrato de pilocarpina.

Como estimulador da secreção salivar, utilizamos uma solução de cloridrato de pilocarpina a 1%, em água destilada.

2.2.2. Diluyente.

No tratamento da saliva utilizou-se água destilada contendo 2% de soro de equino normal, previamente inativado a 56°C durante 30 minutos, adicionada de 1.000 a 2.000 unidades de penicilina e de 1,25 a 2,50 miligramas de estreptomicina por mililitro.

2.3. Camundongos.

O sistema biológico empregado para o isolamento do vírus das amostras de saliva foi representado por camundongos suíços albinos, lactentes de 5 a 8 dias de idade e adultos jovens de 4 a 6 semanas de idade, distribuídos em grupos cujo tamanho variou de 8 a 12 e de 8 a 11, respectivamente. Cada grupo de camundongos lactentes era acompanhado da respectiva mãe.

2.4. Colheita das amostras.

Os animais clinicamente raivosos, eram contidos por imobilização dos maxilares, recebendo logo a seguir o estimulante da secreção salivar, segundo a técnica descrita por CLEMMER et alii⁽⁹⁾ (1970). Quinze minutos após, a saliva era colhida diretamente em uma pla

ca de Petri estéril, utilizando-se algumas vezes, uma seringa como auxiliar na operação.

2.5. Identificação do vírus.

Cada amostra de saliva recolhida era imediatamente adicionada de igual volume de diluente, mantida a temperatura ambiente por duas horas e a seguir inoculada, por via intracerebral em um grupo de camundongos lactentes na dose de 0,01 ml e em outro de camundongos adultos jovens na dose de 0,03 ml por animal. Estes animais eram observados por 21 dias, submetendo-se aos exames específicos para a raiva (Sellers⁽³⁴⁾ e imunofluorescência direta⁽¹⁴⁾), os cérebros daqueles que apresentassem qualquer anormalidade ou que viessem a sucumbir a partir do terceiro dia da inoculação.

3. RESULTADOS.

Os resultados obtidos neste experimento, estão expressos nas tabelas apresentadas a seguir.

A Tabela 1 expõe os resultados do isolamento do vírus rábico a partir das amostras de saliva examinadas, segundo o sistema biológico utilizado (camundongo lactente e adulto jovem). 100% de resultados positivos foram obtidos em ambos grupos etários de camundongos.

A Tabela 2 mostra os resultados da identificação dos corpúsculos de Negri e do antígeno rábico do encéfalo dos camundongos lactentes e adultos jovens, segundo as técnicas de Sellers e de anticorpos fluorescentes. Estes indicadores da infecção rábica foram demonstrados em 100% dos animais examinados por ambos os métodos empregados. Apesar dessa concordância de resultados, uma maior riqueza de inclusões celulares e de antígeno rábico foi regularmente observada nos espécimes de camundongos lactentes, particularmente à técnica de anticorpos fluorescentes.

A Tabela 3 expressa a mortalidade de camundongos verificada nos dois grupos etários utilizados no experimento. Os resultados revelam uma elevada taxa de mortalidade nos dois lotes de camundongos, mas uma taxa ligeiramente superior foi observada nos grupos de camundongos lactentes (99,74%), em relação aos adultos jovens (96,73%).

A análise estatística dos resultados pelo método do qui-quadrado, revelou um valor $\chi^2 = 10,292$, altamente significativo ao nível de rejeição adotado de 5%.

TABELA 1

Isolamento do vírus rábico da saliva de cães na fase clínica da doença, segundo o sistema biológico utilizado.

Camundongo Amostras Nº	LACTENTE	ADULTO JOVEM
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23	+	+
24	+	+
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	+
30	+	+
31	+	+
32	+	+
33	+	+
34	+	+
35	+	+
36	+	+
37	+	+
38	+	+
39	+	+
40	+	+
41	+	+
42	+	+
Total	42/42	42/42

(+) = positivo

(-) = negativo

TABELA 2

Resultados dos exames dos cérebros de camundongos lactentes e adultos jovens, inoculados com saliva de cães raivosos, segundo a técnica diagnóstica utilizada.

Camundongo	LACTENTES		ADULTOS JOVENS	
Técnica Amostras Nº	Sellers	I.F.D.	Sellers	I.F.D.
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	+	+	+
19	+	+	+	+
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
23	+	+	+	+
24	+	+	+	+
25	+	+	+	+
26	+	+	+	+
27	+	+	+	+
28	+	+	+	+
29	+	+	+	+
30	+	+	+	+
31	+	+	+	+
32	+	+	+	+
33	+	+	+	+
34	+	+	+	+
35	+	+	+	+
36	+	+	+	+
37	+	+	+	+
38	+	+	+	+
39	+	+	+	+
40	+	+	+	+
41	+	+	+	+
42	+	+	+	+
Total	42/42	42/42	42/42	42/42

(+) = positivo
 (-) = negativo

I.F.D. = imunofluorescência direta

TABELA 3

Mortalidade de camundongos inoculados com amostras de saliva de caes raivosos, segundo o grupo etario.

Camundongo Amostras Nº	LACTENTE	%	ADULTO JOVEM	%
1	9/9*	100,00	8/8	100,00
2	8/8	100,00	9/9	100,00
3	10/10	100,00	8/8	100,00
4	8/8	100,00	8/8	100,00
5	8/9	88,89	9/9	100,00
6	8/8	100,00	9/9	100,00
7	8/8	100,00	10/10	100,00
8	9/9	100,00	7/9	77,78
9	8/8	100,00	9/9	100,00
10	9/9	100,00	8/9	88,89
11	8/8	100,00	8/8	100,00
12	8/8	100,00	8/8	100,00
13	12/12	100,00	10/10	100,00
14	8/8	100,00	8/8	100,00
15	8/8	100,00	10/10	100,00
16	10/10	100,00	10/10	100,00
17	10/10	100,00	9/9	100,00
18	8/8	100,00	10/10	100,00
19	9/9	100,00	10/10	100,00
20	12/12	100,00	10/10	100,00
21	9/9	100,00	9/10	90,00
22	9/9	100,00	8/8	100,00
23	10/10	100,00	9/9	100,00
24	12/12	100,00	10/10	100,00
25	9/9	100,00	9/9	100,00
26	10/10	100,00	10/10	100,00
27	9/9	100,00	10/10	100,00
28	10/10	100,00	10/10	100,00
29	8/8	100,00	10/10	100,00
30	11/11	100,00	9/9	100,00
31	12/12	100,00	10/10	100,00
32	10/10	100,00	6/10	60,00
33	10/10	100,00	10/10	100,00
34	8/8	100,00	5/10	50,00
35	10/10	100,00	10/10	100,00
36	8/8	100,00	11/11	100,00
37	10/10	100,00	11/11	100,00
38	9/9	100,00	10/10	100,00
39	8/8	100,00	10/10	100,00
40	11/11	100,00	10/10	100,00
41	9/9	100,00	10/10	100,00
42	11/11	100,00	10/10	100,00
Total	391/392	99,74	385/398	96,73

(*) = mortos/inoculados

4. DISCUSSÃO.

Considerando uma resposta positiva em pelo menos um camundongo de cada grupo inoculado, os resultados constantes da Tabela 1, demonstram uma perfeita concordância entre o camundongo lactente e o adulto jovem como substratos biológicos para o isolamento do vírus rábico de cães, na fase clínica da doença natural, usando como inóculo espécimes de saliva.

Resultados dessa natureza podem ser encontrados entre sistemas biológicos que diferem ligeiramente em espectro de sensibilidade, utilizando alta dose infectante de material virulento, como demonstraram JOHNSON & LEACH (17) (1940), estudando a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos de laboratório e uma variedade de campo, ao vírus rábico, empregando como inóculo, material do sistema nervoso central de humanos e caninos.

Resultados discordantes destes, foram descritos antes, por outros autores, embora em condições diferentes das observadas neste experimento. Desse modo, NILSSON & CÔRTEZ⁽³¹⁾ (1975), utilizando saliva de um cão infectado experimentalmente com uma amostra isolada de morcêgo, obtiveram 6 isolamentos do vírus rábico em camundongos lactentes, mas fracassaram em tal procedimento em camundongos adultos jovens.

A respeito de achados discordantes, VEERARAGHAVAN et alii⁽⁴³⁾, trabalhando com 913 amostras de saliva de um cão portador assintomático, infectado em condições naturais, conseguiram o isolamento do vírus rábico de 14 amostras em camundongos lactentes e destas, apenas 6 infectaram camundongos adultos jovens.

Os resultados da identificação de corpúsculos de Negri e de antígeno rábico nos encéfalos de ambos grupos etários de camundongos inoculados (Tabela 2), revelam a presença destes indicadores da infecção rábica em 100% dos animais examinados (camundongos lactentes e adultos jovens), tanto à técnica de Sellers como à imunofluorescência direta. Ape

sar dessa concordância, verificada em termos de pelo menos uma unidade positiva de cada grupo, algumas observações são suficientemente importantes, merecendo, portanto, uma análise mais pormenorizada. Embora não tivéssemos estabelecido um critério quantitativo a priori, a riqueza de inclusões celulares e de antígeno rábico observada nas impressões encefálicas dos camundongos foi uma constante, no entanto, mais destacada nas impressões de camundongos lactentes e mais nítida e regular a imunofluorescência direta.

Constatações dessa natureza foram relatadas antes por BAGNAROLI et alii⁽⁴⁾, para demonstrar a maior susceptibilidade do camundongo lactente em relação ao adulto jovem, tomando por base a quantidade de antígeno rábico presente no encéfalo dos camundongos inoculados com um "pool" de material virulento de alta concentração, proveniente do sistema nervoso central de cão e de gato, segundo um critério quantitativo previamente estabelecido para calcular as diferenças significativas.

Uma elevada mortalidade foi observada nos dois grupos etários de camundongos utilizados (Tabela 3).

Realmente, os resultados revelam que a mortalidade foi ligeiramente mais elevada nos grupos de camundongos lactentes (99,74%), comparativamente ao mesmo evento observado nos grupos de camundongos adultos jovens (96,73%), evidenciando uma ligeira diferença de resistência ao vírus rábico entre o camundongo lactente e o adulto jovem.

A análise estatística dos resultados pelo método do qui-quadrado revelou um valor $\chi^2 = 10,292$, altamente significativo ao nível de rejeição adotado de 5%.

5. CONCLUSÕES.

A análise dos resultados obtidos neste estudo sugere as seguintes conclusões:

- Considerando pelo menos uma unidade positiva em cada grupo de camundongo utilizado, a sensibilidade do camundongo lactente foi idêntica a do adulto jovem, para o isolamento do vírus rábico de espécimes de saliva nas condições deste experimento.
- Houve uma ligeira superioridade do camundongo lactente para revelar inclusões celulares e antígeno rábico, principalmente à prova de imunofluorescência direta.
- A taxa de mortalidade ligeiramente mais elevada, observada nos grupos de camundongos lactentes, revelou à análise estatística uma diferença altamente significativa, em relação ao mesmo evento verificado nos grupos de camundongos adultos jovens.
- A diferença do evento mortalidade verificada entre os dois sistemas estudados, mostrou uma resistência ligeiramente mais baixa nos camundongos lactentes, em relação a dos adultos jovens.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ACHA, P.N. Algunas consideraciones sobre las condiciones actuales de la rabia en las Americas. Salud publ. Méx., 10: 9-14, 1968.
2. AFSHAR, A. et alii. A contribution to the detection of inapparent rabies in stray dogs. Vet. Rec., 91: 562-5, 1972.
3. ATANASIU, P. Animal inoculation and the Negri body. In: BAKER, G.M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v.1, p. 373-400.
4. BAGNAROLI, R.A. et alii. Susceptibilidad de ratones lactentes y adultos al virus rábico demostrada por inmunofluorescencia. Bol. Ofic. sanit. panamer., 48: 388-92, 1970.
5. BEDFORD, P.G.C. Diagnosis of rabies in animals. Vet. Rec., 99: 160-2, 1976.
6. BEAUREGARD, M. et alii. The use of fluorescent antibody staining in the diagnosis of rabies. Can. J. comp. Med. Vet. Sci., 29: 141-7, 1965.
7. BEAUREGARD, M. & CASEY, G.A. Demonstration of rabies antigen in salivary glands of rabies suspected animals. Can. J. comp. Med., 33: 55-8, 1969.
8. CASALS, J. Influence of age factors on susceptibility of mice to rabies virus. J. exp. Med., 72: 445-51, 1940.
9. CLEMMER, D.I. et alii. Estudio sobre la rabia canina en la ciudad de Cali. Bol. Ofic. sanit. panamer., 69: 212-20, 1970.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. Referências bibliográficas em ciências biomédicas. São Paulo, Divisão de Biblioteca e Documentação da USP, 1971.

10. CÔRTEZ, J. de A. & NILSSON, M.R. Isolamento de vírus rabico de cães aparentemente normais inoculados experimentalmente. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo. 12: 223-8, 1975.
11. DONE, J.T. et alii. Laboratory diagnosis of rabies. Vet. Rec., 99: 259, 1976.
12. EDWARDS, S.J. Laboratory diagnosis of rabies in the dog. Vet. Rec., 99: 301, 1976.
13. GOMEZ, M.R. et alii. A human case of skunk rabies. J.Amer. med. Ass., 194: 101-3, 1965.
14. GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 98: 219-23, 1958.
15. GOLDWASSER, R.A. et alii. Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. Bull. Wld Hlth Org., 20: 579-88, 1959.
16. JOHNSON, H.N. Rabies virus. In: LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N. J., ed. Diagnosis procedures for viral and rickettsial diseases. 3rd ed. New York, American Health Association, 1969, p. 356-380.
17. JOHNSON, H.N. & LEACH, C.N. Comparative susceptibility of different strains of mice to rabies virus. Amer. J. Hyg., 32: 38-45, 1940.
18. KOPROWSKI, H. Biological modification of rabies virus as a result of its adaptation to chicks and developing em**br**os. Bull. Wld Hlth Org., 10: 709-24, 1954.
19. KOPROWSKI, H. Prueba de inoculation en ratones. In: ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Tecnicas de laboratorio a plicadas a la rabia. Ginebra, 1956. p. 57-69. (Série de monografias, 23).

20. LARGHI, O.P. Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1975. 24 p. (Nota técnica, 8).
21. LEACH, C.N. Comparative methods of diagnosis of rabies in animals. Amer. J. publ. Hlth., 28: 162-6, 1938.
22. MARKSON, L.M. et alii. A biological test for rabies using suckling mice. Trop. Anim. Hlth Prod., 3: 89-92, 1971.
23. McQUEEN, J.L. et alii. Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I. Its evaluation in a public health laboratory. Amer. J. publ. Hlth, 50: 1743-52, 1960.
24. MANCISIDOR, N. & ARELLANO, C. Aislamiento de virus rábico en cultivos celulares a partir de saliva. Téc. Pec. Méx., 18: 89-92, 1971.
25. MARTELL, D.M.A. et alii. Detecção de fluorescência específica a rabia antes de la aparición de signos en ratones inoculados intracerebralmente con 5 cepas de virus rábico con y sin Dimetil-sulfoxido (DMSO). Téc. Pec. Méx., 12/13: 28-32, 1969.
26. MARTELL, D.M.A. & ALDASORO, A. Detection de virus rábico. Bol. Ofic. sanit. panamer., 73: 117-23, 1972.
27. NILSSON, M.R. & SUGAY, W. Diagnóstico da raiva - Comparação entre a pesquisa de inclusões em esfregaços e a inoculação de camundongos. Arq. Inst. biol., S. Paulo, 33: 11-6, 1966.
28. NILSSON, M.R. et alii. Rabies diagnosis. Comparative study on susceptibility of adult and suckling mice. Arq. Inst. biol., S. Paulo, 35: 43-7, 1968.
29. NILSSON, M.R. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. Bol. Ofic. sanit. panamer., 68: 486-94, 1970.
30. NILSSON, M.R. & SUGAY, W. O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. Arq. Inst. biol., S. Paulo 33: 47-8, 1966.

31. NILSSON, M.R. & CÔRTEZ, J. de A. Recuperação espontânea de um cão raivoso experimentalmente infectado. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S.Paulo, 12: 229-34, 1975.
32. PAWAN, J.L. et alii. Infectivity of the saliva in paralytic rabies. Ann. trop. Med. Parasit., 31: 267-70, 1937.
33. PILO MORON, E. et alii. 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 Algérie, 45: 5-10, 1967.
34. SELLERS, T.F. A new method for staining Negri bodies of rabies. Amer. J. publ. Hlth, 17: 1080-1, 1927.
35. SILVA, R.A. & SOUZA, A.M. Ocorrência do vírus da raiva em diferentes tecidos de cão na doença natural. Pesq. Agropec. bras., 3: 317-8, 1968.
36. SILVA, R.A. et alii. A utilização do método de imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímico e biológico no diagnóstico da raiva. Pesq. Agropec. bras., Ser. Vet., 8: 1-4, 1973.
37. SUBRAHMANYAM, B. & PATHAK, R.C. Diagnosis of rabies in dogs - Comparative study on microscopic, biological and fluorescent antibody tests for diagnosis. Indian Vet. J., 48: 123-7, 1971.
38. TIERKEL, E.S. Canine rabies. In: BAER, G.M. ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975, v.1, p. 123-137.
39. VAUGHN, J.B. et alii, Excretion of street rabies virus in the saliva of dogs. J. Amer. med. Ass., 193: 113-8, 1965.
40. VAUGHN, J.B. et alii. Excretion of street rabies in the saliva of cats. J. Amer. med. Ass., 184: 119-22, 1963.

41. VALLONE, E.F. et alii. Rabia humana. Diagnostico "pré-mortem" a partir de la saliva por inmunofluorescencia. Arch. Pediat. Uruguay, 37: 563-7, 1966.
42. VEERARAGHAVAN, N. et alii. Virus content of brains and submaxillary glands and occurrence of Negri bodies in animals suspected of having died of natural rabies infection. Bol. Org. mund. Salud, 18: 469-71, 1958.
43. VEERARAGHAVAN, N. et alii. Studies on the salivary excretion of rabies virus by the dog from Surandai. Sci. Rep. Pasteur Inst. Sth. India, 1969. p. 69-70.
44. WEBSTER, L.T. & DAWSON, J.R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 32: 570-3, 1935.
45. WEBSTER, L.T. A mouse test for measuring the immunizing potency of antirabies vaccines. J. exp. Med., 70: 87-106, 1939.