

ISOLAMENTO DE VÍRUS RÁBICO DE MORCÊGO NÃO HEMATÓFAGO DA ESPÉCIE PHYLLOSTOMUS HASTATUS HASTATUS (PALLAS)

RENATO AUGUSTO DA SILVA *, GERALDO VEIGA RIVELLO **
e MOACYR ROSSI NILSSON *

I. INTRODUÇÃO

A possibilidade dos morcêgos transmitirem o vírus da raiva aos bovinos e equinos do Estado de Santa Catarina, foi lembrada por Carini⁵, em 1911. Posteriormente, Haupt e Rehaag⁶, em 1925, descreveram casos de raiva em bovinos e equinos no mesmo Estado, resultantes de mordeduras de morcegos. Hurst e Pawan⁷, em 1931, relataram um surto de raiva na espécie humana, na Ilha de Trinidad e sugeriram o morcêgo como transmissor da doença para o homem e bovinos. Tôrres e Queiroz Lima¹⁵, em 1935, concluíram que nos focos de raiva epizootica e fora deles são encontrados morcêgos hematófagos portadores de vírus rábico. Pawan¹¹, em 1936, diagnosticou a raiva em morcêgos frugívoros das espécies *Artibeus planirostris trinitatis*, *Hemiderma* e *Diclidurus albus*. Tellez Giron¹⁴, em 1944, isolou vírus rábico das glândulas salivares de um lote de *Desmodus rotundus murinus*, em focos ativos de raiva no México. Johnson⁸, em 1948, também diagnosticou a raiva em morcêgos da espécie *Desmodus rotundus murinus*, no México. Málaga-Alba⁹, em 1954, examinando 100 cérebros de *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata*, encontrou 2 casos positivos de raiva. Venters e cols.¹⁶, em 1954, isolaram o vírus rábico, de morcêgos das espécies *Dasypterus floridanus* e *Lasiurus seminola* ambos insetívoros. Witte¹⁸, em 1954, diagnosticou a raiva na espécie *Lasiurus cinereus*, na Pennsylvania. No mesmo ano, Scatterday²³, constatou a presença de vírus rábico em morcêgos das espécies *Dasypterus floridanus*, *Lasiurus seminola* e *Tadarida cynocephala*, na Flórida. Burns e Farinacci³, em 1955, isolaram o vírus da raiva de morcêgo da espécie *Tadarida mexicana*, no Texas. Ainda, no ano de 1956, Burns e col.⁴, sugeriram que os morcêgos insetívoros da espécie *Tadarida mexicana*, possam desempenhar importante papel como reservatório de vírus rábico no Texas. Nikolitch e col.¹⁰, em 1956, relataram o isolamento do vírus da raiva de morcêgos insetívoros da espécie *Nyctalus noctula*, na Iugoslavia. Recentemente, Beel e Moore¹, isolaram vírus rábico do tecido adiposo e dos cérebros de morcêgos insetívoros dos gêneros *Eptesicus* e *Myotis* e Villa e col.¹⁷, também isolaram vírus rábico de morcêgos insetívoros da espécie *Mormoops m. megalophylla*, no México.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Histórico do material

Os morcêgos que deram origem ao presente trabalho, foram capturados pelo Dr. Aurélio Málaga Alba, em janeiro de 1957, quando de sua vinda ao Rio

* Da Seção de Zoonoses por Vírus do Instituto de Biologia Animal. Rio de Janeiro.

** Do Instituto de Biologia Animal.

de Janeiro, a fim de estudar o problema da Raiva no Brasil. Estes morcêgos foram apanhados na Igreja de São Benedito de Corôa Grande, no Distrito de Corôa Grande, Município de Itaguaí, no Estado do Rio de Janeiro. Neste Município ocorre frequentemente casos de raiva em bovinos e equinos, não relacionados com cães.

Os morcêgos, em número de quatro, foram trazidos ao Instituto de Biologia Animal, ainda vivos e no mesmo dia, sacrificados; sendo coletados os cérebros e conservados em temperatura de menos 20°C. O exame da caixa craneana destes quirópteras feito pelo Dr. Málaga-Alba, revelou sinais de mordedura e em um deles havia dilaceramento da base do craneo.

Dois exemplares foram levados para o México, sendo classificados pelo Professôr Bernardo Villa (Mastozoologista da Oficina Sanitária Panamericana, zona II), como *Phyllostomus hastatus hastatus*. Os outros dois exemplares foram enviados ao Dr. Carlos Vieira da Cunha, do Departamento de Zoologia da Secretaria do Estado de São Paulo e também foram classificados como *Phyllostomus hastatus hastatus*.

Na realização do presente trabalho, foram efetuados exames para o isolamento e a identificação do vírus.

1) *Isolamento de vírus*

Para o isolamento de vírus preparamos suspensão de cada cérebro de morcêgo em sôro fisiológico a 8,5 por mil, os quais haviam permanecido por 12 horas na temperatura de menos 20°C. Em seguida estas suspensões foram centrifugadas durante 15 minutos a 2.000 r.p.m. Para cada sobrenadante obtido, inoculou-se um grupo de 8 camundongos de 4 semanas de idade, pela via intra-craneana na dose de 0,03 ml.

Com material nervoso, constante de cérebro de camundongo morto na primeira passagem (quadro I), realizamos nova suspensão em sôro-fisiológico, tendo-se o cuidado de tratar pelo éter a suspensão obtida. Após a eliminação do éter na geladeira, inoculou-se um grupo de 8 camundongos de 28 dias de idade, pela via intra-craneana, na dose de 0,03 ml.

2) *Identificação do vírus*

Para a identificação do vírus foram realizados exames a) histo-patológicos e b) prova de sôro-neutralização.

a) *Exame histo-patológico*

Consistiu êste exame em se efetuar esfregaços em lâmina de um dos hemisférios cerebrais de camundongo, proveniente da segunda passagem do material em estudos, empregando-se a técnica de Faraco². O outro hemisfério cerebral foi incluído em parafina, sendo os cortes corados pela Hematoxilina-eosina.

b) *Prova de sôro-neutralização*

Para a realização desta prova utilizamos sôro imune contra a Raiva, prêviamente preparado por nós em cavalo; um sôro normal de cavalo e um sôro imune contra a Raiva, do Instituto Biológico de São Paulo, gentilmente cedido pelo Dr. René Corrêa.

O preparo do sôro imune consistiu em submetemos um cavalo a 10 vacinações com uma vacina anti-rábica glicero fenicada, cuja proteção foi avaliada pelo teste de Habel em 28.850 DL₅₀. A dose da vacina utilizada foi de 30 ml, sendo a via de inoculação, a sub-cutânea. Cinco dias após a última vacinação, foram inoculados 10 ml de uma diluição a 1:10 de vírus rábico fixo Pasteur, pela via intra-muscular, na coxa. Decorridos 14 dias desta inoculação, foi realizada a sangria para obtenção do sôro.

Consistiu a prova, em se colocar quantidades iguais de vírus, em diluição que variaram de 10⁻¹ a 10⁻⁷ e de sôro ou salina, em tubos de hemólise. Agitavam-se bem os tubos, permanecendo as misturas em banho-maria a 37°C, por meia hora; após este tempo, os tubos contendo as misturas eram transferidos para um banho de gelo, procedendo-se as inoculações intra-cranianas em camundongos de 4 semanas de idade.

III. RESULTADOS

1) Isolamento de vírus

Pela leitura do quadro I, verifica-se que decorridos 7 dias da inoculação, um camundongo morre sem ter apresentado sintomas de doença. No dia imediato, outro camundongo adocece e para uma melhor observação foi deixado para ser sacrificado no dia seguinte, amanhecendo então, morto. Os restantes camundongos apresentam-se normais por um período de observação de 1 mês.

QUADRO I

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	14	15	16
8	M									
7	D	M							
6
5
4
3
2
1

NOTA — Convenção: . — Camundongo normal; D — Camundongo Doente; M — Camundongo Morto.

No quadro II, está expresso o resultado da 2.^a inoculação em camundongos, com suspensão de cérebro do camundongo que morreu no nono dia após a inoculação com material original. Decorridos 6 dias da inoculação, aparecem um camundongo paralítico e três doentes. No dia seguinte, o camundongo paralítico amanhece morto e os três doentes mostram-se paralíticos, tendo adoecido outros dois, restando um, aparentemente normal.

Passagens subsequentes em cérebro de camundongos reduziram o período de incubação do vírus para 3 ou 4 dias.

As demais suspensões originais de cérebros dos outros morcêgos coletados foram consideradas negativas para a Raiva, após um período de observação dos animais de 30 dias.

QUADRO II

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
8	M															
7	P	M									
6	D	P	S								
5	D	P	S								
4	D	P	S								
3	D	M								
2	D	P	M							
1

NOTA — Convenção: . — Camundongo normal; D — Camundongo Doente; P — Camundongo Paralítico; M — Camundongo Morto; S — Camundongo Sacrificado.

2) Identificação do vírus

a) Exame histopatológico

O exame dos esfregaços de cérebro de camundongo, na 2.^a passagem, revelou a presença de numerosos corpúsculos de Negri e o estudo do cérebro, após inclusão em parafina revelou encefalite não purulenta e presença de corpúsculos de Negri no citoplasma de células nervosas.

b) Prova de soro-neutralização

O quadro III, mostra o resultado desta prova. Os sôros imunes do I.B.A. e do Inst. Biológico, apresentaram índices de neutralização de 2,0 e 1,32, correspondendo a uma neutralização de 1.738 e 8.318 doses letais 50% em camundongo. O soro normal de cavalo não apresentou índice de neutralização. O título infectante do soro normal foi $10^{-4,09}$. O título do vírus considerado foi dado pela mistura de vírus mais soro fisiológico, que corresponde a diluição 1:17.380.

Verifica-se pela prova de soro-neutralização, que a amostra de vírus isolada foi neutralizada pelos sôros imunes, possuidores de anticorpos contra o vírus da Raiva.

QUADRO III

VÍRUS ISOLADO DE MORCÊGO	Título em DL 50/0,03 ml	RESULTADOS
		N.º de DL 50 neutralizadas
Vírus + salina.....	$10^{-5,24}$	
Vírus + soro normal de cavalo.....	$10^{-4,69}$	0
Vírus + soro imune IBA.....	$10^{-2,0}$	1.738
Vírus + soro imune inst. Biológico.....	$10^{-1,32}$	8 318

IV. RESUMO

Os autores isolaram o vírus da Raiva do cérebro de um morcêgo da espécie *Phyllostomus hastatus hastatus* (Pallas), procedente do Município de Itaguaí, no Estado do Rio de Janeiro. O vírus foi obtido pela inoculação da suspensão de cérebro em camundongos, pela via intra-cerebral.

A amostra de vírus isolada de morcêgo comportou-se como vírus rábico em face das provas de inoculação em animais de laboratório (camundongos), pela formação de corpúsculos de Negri nas células nervosas do camundongo e pela neutralização com sôros contendo anticorpos para o vírus rábico. Na prova de sôro-neutralização, utilizando sôros do Instituto de Biologia Animal e do Instituto Biológico de São Paulo.

V. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Aurélio Málaga-Alba, Professôr Bernardo Villa, Dr. Carlos da Cunha Vieira e Dr. René Corrêa, pela colaboração prestada no presente trabalho. Ao patologista, Dr. Jefferson Andrade dos Santos, apresentamos igualmente os nossos agradecimentos pelos exames histopatológicos realizados.

THE ISOLATION OF RABIES VIRUS FROM NONSANGUIVOROUS BATS,
PHYLLOSTOMUS HASTATUS HASTATUS (PALLAS)*Abstract*

The authors examining four brains from bats (*Phyllostomus hastatus hastatus*) and from one of them they isolated the rabies vírus. Identification of the vírus was made by presence of Negri bodies on the nervous cells of microscopic preparations of brain's mice and neutralization tests with immune sera prepared at the Instituto de Biologia Animal (Ministério da Agricultura) and at the Instituto Biológico of São Paulo.

VI. REFERÊNCIAS

- 1) BEEL, J.F. & MOORE, G.J. (1960).—Rabies Virus from Brown Fat of Naturally Infected Bats. *Proc. Soc. Exp. Biology*, 103: 140-142. N York.
- 2) BIER, O. (1951).—*Bacteriologia e Imunologia*, 5.^a edição, pg. 713.
- 3) BURNS, K.F. & FARINACCI, C.J. (1955).—Rabies in Nonsanguivorous Bats of Texas. *Jour. Infec. Diseases*, 97: 211-218.
- 4) BURNS, K.F., FARINACCI, C.J. & MURNANE, T.G. (1956).—Rabies in Insectivorous Bats of Texas. *Jour. Am. Vet. Med. Ass.*, 128 (1): 27-31.
- 5) CARINI, A. (1911).—Sur une grande épizootie de rage. *Ann. Inst. Pasteur*, 11: 843-846.
- 6) HAUPT, H. & REHAAG, H. (1925).—Raiva epizootica nos rebanhos de Santa Catarina (Sul do Brasil) transmitida por morcegos. *Bol. Soc. Bras. Bras. Med. Vet.*, II (1-2): 17-47.
- 7) HURST, F.W. & PAWAN, J.L. (1931).—An Outbreak of Rabies in Trinidad without Story of Bites and with the Symptom of Acute Ascending Myelitis. *Lancet*, 2: 622-628.
- 8) JOHNSON, H.N. (1948).—Derriengue; Vampire Bats Rabies in México. *Am. Jour. Hyg.*, 47: 189-204.
- 9) MALLAGA-ALBA, A. (1954).—El Vampiro portador de la rabia. *Bol. Of. San. Panamericana*, 37 (1): 53-65.
- 10) NIKOLITCH, M. & JELESIC, Z. (1956).—Isolation of Rabies Virus from Insectivorous Bats in Yugoslavia. *Bull. World Hlth. Org.*, 14: 801-804.

- 11) PAWAN, J.L. (1936).—The Transmission of Paralytic Rabies in Trinidad by the Vampire Bat. *Ann. Trop. Med. and Paras.*, 30: 101-130.
- 12) REED, L.J. & MUENCH, H. (1938).—A Simple Method of Estimating Fifty per Cent End-Points. *Am. Jour. Hyg.*, 27: 493-497.
- 13) SCATTERDAY, J.E. (1954).—Bats Rabies in Florida. *Jour. Am. Vet. Med. Assi.*, 124 (923): 125.
- 14) TELLEZ GIRON, A. (1944).—El Vampiro portador de virus del Derriengue. *Rev. de la Soc. Mexic. de Hist. Nat.*, 5 (1-2): 35-42.
- 15) TORRES, S. & QUEIROZ LIMA, E. (1935).—A Raiva e sua transmissão por morcêgos hematófagos e infectados naturalmente. *Rev. Dep. Nac. da Prod. Animal*, I (1, 2 e 3): 1-66.
- 16) VENTERS, H.D., HOFFERT, W.R., SCATTERDAY, J.E. & HARDY, A.V. (1954).—Rabies in Bats in Florida. *Am. Jour. Publ. Hlth.* 44: 182-185.
- 17) VILLA B.R. & JIMENEZ, A.G. (1960).—Acerca da la posicion taxonomica de *Mormoops megalophylla senicula* (Rehn) y la presencia de virus rábico en estos murcielagos insectivoros. *Anales del Inst. de Biologia*, 31 (1, 2): 501-509.
- 18) WITTE, E.J. (1954).—Bats Rabies in Pennsylvania. *Am. Jour. Publ. Hlth.*, 44: 186-187.