

DIAGNÓSTICO DA RAIVA CANINA

I. COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE SALIVA E DE ENCÉFALO

Valdson de Angelis Côrtes *
Gil Vianna Paim **
Maria Cecília Gibrail de Oliveira ***

RSPUB9/480

CÔRTEZ, V. DE A. et al. *Diagnóstico da raiva canina. I. Comparação entre amostras de saliva e de encéfalo.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 13: 353-6, 1979.

RESUMO: *Foram examinadas mediante as técnicas de inoculação em camundongos e de imunofluorescência, 30 amostras de saliva e 30 amostras de encéfalo, colhidas de 30 cães raivosos. Todas as amostras, tanto de saliva como de encéfalo, apresentaram resultados positivos frente às duas técnicas usadas, demonstrando uma perfeita correlação entre os métodos e os espécimens utilizados. Foi ressaltada a importância da saliva para o estabelecimento de um diagnóstico mais precoce da raiva.*

UNITERMOS: *Raiva, virus. Saliva. Diagnóstico. Cães. Zoonoses.*

INTRODUÇÃO

O diagnóstico da raiva pode ser realizado por meio de técnicas histológicas, imunológicas e biológicas^{1,2,3}. Na prática, tem uso mais generalizado a pesquisa de inclusões celulares por coloração direta, a imunofluorescência e a inoculação de camundongos, combinadas simultaneamente, objetivando eliminar as possibilidades de erro^{1,2,6}.

A comparação dos três métodos tem revelado uma concordância mais perfeita entre a imunofluorescência e a inoculação de camundongos^{9,10}, embora ocorram, es-

poradicamente, resultados falsos negativos ora em uma, ora em outra técnica^{1,9}. A pesquisa de inclusões celulares, em relação às outras duas técnicas, tem revelado 10 a 12% de falhas^{1,8,10}.

No que se refere ao material de exame, são realizadas, na prática e ordinariamente^{1,8}, amostras do encéfalo, colhidas no "post-mortem" para demonstrar a infecção. Entretanto, com este proceder, o resultado do exame não é tão rápido quanto seria conveniente, de modo a permitir uma tomada de decisão, a mais imediata possível, no que diz respeito ao tratamento humano

* Doutorando da Faculdade de Saúde Pública da USP — Av. Dr. Arnaldo, 715 — 01255 — São Paulo, SP — Brasil — Bolsista da CAPES.

** Do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP.

*** Do Instituto Pasteur de São Paulo — Av. Paulista, 393 — 01311 — São Paulo, SP — Brasil.

logo após o contato (no caso, por exemplo, de mordedura).

A recuperação do vírus rábico da saliva de cães assintomáticos ^{4,11,12,13,15} e de recuperados da doença ^{11,13} mostra claramente a possibilidade do uso de espécimens obtidos no "ante-mortem", visando a um diagnóstico mais precoce, tanto para a confirmação clínica como para a realização de inquéritos epidemiológicos ^{8,11}, apesar da inconstância desse achado em algumas oportunidades ^{4,11,14,15}.

O emprego da técnica de anticorpos fluorescentes permite atualmente o diagnóstico da infecção no "ante-mortem" mediante o teste de córnea, a biópsia de pele e o isolamento do vírus a partir da saliva ^{4,9,14}, embora um resultado negativo não elimine a possibilidade de infecção ^{9,15}.

O objetivo deste trabalho é analisar o valor da saliva, comparativamente ao do encéfalo, para o diagnóstico da raiva canina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 cães mantidos em observação no Centro de Controle de Zoonoses ou no Instituto Pasteur de São Paulo.

Colheita de amostras

a) *Secreção salivar* — Uma amostra de saliva foi colhida, na fase clínica da raiva natural, de cada um dos 30 cães. Os animais eram contidos por imobilização dos maxilares, recebendo logo a seguir o estimulante da secreção salivar, segundo a técnica descrita por Clemmer e col.³, em 1970. Após 15 min., a saliva era colhida em uma placa de Petri estéril.

b) *Encéfalo* — Após a morte, os cães foram necropsiados, retirando-se em condições de assepsia, do encéfalo de cada animal, um fragmento do corno de Ammon.

Solução diluente

Para tratamento e diluição dos espécimens de saliva e encéfalo foi usada água destilada contendo 2% de soro equino normal, previamente inativado a 56°C por 30 min., e adicionada de 1000 a 2000 unidades de penicilina e de 1,25 a 2,50 miligramas de estreptomomicina por mililitro.

Sistema biológico

Para o isolamento do vírus das amostras de saliva e de encéfalo foram empregados camundongos adultos jovens de 4-6 semanas de idade, em grupos de 8 a 11 animais.

Isolamento e identificação do vírus

Cada amostra de saliva foi acrescentada de igual volume de diluente e deixada a temperatura ambiente por 2 horas; a seguir, foi inoculada em camundongos adultos, por via intracerebral, na dose de 0,03 ml por animal. Os camundongos inoculados foram então observados durante 21 dias e os encéfalos daqueles que apresentaram sintomas indicativos de raiva eram submetidos a reação de imunofluorescência direta⁷ para confirmar a infecção.

Os fragmentos de corno de Ammon foram submetidos a reação de imunofluorescência direta⁷ e à técnica de inoculação em camundongos¹⁶.

RESULTADOS

Todas as amostras examinadas, tanto de saliva como de encéfalo, mediante a técnica de inoculação de camundongos, permitiram o isolamento do vírus rábico. A identificação deste antígeno rábico nos encéfalos dos camundongos inoculados foi confirmada através da técnica de anticorpos fluorescentes.

Todas as amostras de corno de Ammon provenientes dos 30 cães objeto do experimento e examinadas diretamente pela técnica de anticorpos fluorescentes revelaram a presença de antígeno rábico.

TABELA

Isolamento e identificação do vírus da raiva de 30 cães, na fase clínica da doença, segundo os espécimens e os métodos utilizados.

Número de espécimens	Métodos		Total de positivos
	IC	RIFD	
30 de saliva	+	NR	30
30 de encéfalo	+	+	30

IC — Inoculação em camundongos

RIFD — Reação de imunofluorescência direta

NR — Não realizado

A média aritmética e os extremos dos intervalos de variação, em dias, do menor período de incubação observado nos camundongos inoculados com suspensão de encéfalo (6,9 e 4 — 10, respectivamente), em relação aos inoculados com saliva (6,0 e 4 — 9), mostraram um período de incubação ligeiramente mais curto quando a saliva foi usada como inóculo.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados positivos obtidos em 100% das 30 amostras de encéfalo examinadas, tanto à imunofluorescência direta como à inoculação de camundongos, mostram uma perfeita concordância entre as duas técnicas para o diagnóstico da raiva a partir do referido espécimen. Uma correlação quase perfeita de resultados obtidos com estes métodos, tem sido citada na literatura^{1,9,10}, embora a prova biológica seja considerada o critério definitivo para elucidar o diagnóstico^{1,2,6}. Uma concordância perfeita, de igual sensibilidade das técnicas de imunofluorescência e de inoculação de camundongos foi descrita por McQueen e col.¹⁰, em 1960, utilizando espécimens encefálicos de animais domésticos e silvestres.

O isolamento do vírus da raiva de 100% das 30 amostras examinadas, tanto de encéfalo como de saliva, mediante a técnica de inoculação em camundongos, mostrou uma perfeita correlação dos resultados encontrados com os 2 tipos de espécimens

usados no experimento. Apesar desta perfeita correlação dos resultados, um período de incubação ligeiramente mais curto (cerca de um dia) foi observado nos grupos inoculados com saliva. Estão de acordo com estes resultados, os obtidos em 1970 por Clemmer e col.³, em experimento realizado com 15 cães raivosos, naturalmente infectados, dos quais o vírus da raiva foi isolado do encéfalo e da saliva por inoculação de camundongos. Outras pesquisas também têm mostrado o encontro mais ou menos freqüente de vírus rábico na saliva de cães inclusive de assintomáticos^{4,11,12,13,15}. Por outro lado, alguns autores^{4,11,14,15} relatam certa inconstância de isolamento.

Os resultados obtidos no presente trabalho, bem como em outros, encorajam estudos, com espécimens salivares, visando o seu uso sistemático no diagnóstico "ante-mortem" da raiva. Para este tipo de diagnóstico, conseqüentemente, é necessária a colheita do material "in vivo". O risco que isto acarreta tem desestimulado maiores estudos sobre o valor da saliva como material de diagnóstico, bem como de procedimentos para a sua coleta e manipulação seguras. A importância de uma decisão rápida quanto ao tratamento anti-rábico humano, entretanto, está a exigir o desenvolvimento desses estudos e procedimentos para que se torne factível, rotineiramente, o emprego da saliva visando o diagnóstico mais prematuro da raiva.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de São Paulo e ao Instituto Pasteur de São Paulo pelas facilidades proporcionadas para a colheita de

amostras. Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP pelos recursos laboratoriais cedidos.

RSPUB9/480

CÔRTEZ, V. DE A. et al. [Diagnosis of canine rabies. I. Comparison of saliva and encephalon samples] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 13:353-6, 1979.

ABSTRACT: Thirty saliva samples and 30 encephalon samples, collected from an equal number of rabid dogs, were examined by both the mouse inoculation and immunofluorescent techniques. The results for each sample were positive with both techniques, showing perfect correlation in the methods and specimens used. The importance of saliva for early diagnosis was stressed.

UNITERMS: Rabies, virus. Saliva. Diagnosis. Dogs. Zoonoses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATANASIU, P. Animal inoculation and negri body. In: Baer, G. M., ed. *The natural history of rabies*. New York, Academic Press, 1975. v. 1, p. 373-400.
2. BEDFORD, P. G. C. Diagnosis of rabies in animals. *Vet. Rec.*, 99:160-2, 1976.
3. CLEMMER, D. I. et al. Estudio sobre la rabia canina en la ciudad de Cali. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 69:212-20, 1970.
4. CORTES, J. de A. & NILSSON, M. R. Isolamento do vírus rábico de cães aparentemente normais inoculados experimentalmente. *Rev. Fac. Med. vet. Zoot. Univ. S. Paulo*, 12:223-8, 1975.
5. DONE, J. T. et al. Laboratory diagnosis of rabies. *Vet. Rec.*, 99:259, 1976.
6. EDWARDS, S. J. Laboratory diagnosis of rabies in the dog. *Vet. Rec.*, 99:301, 1976.
7. GOLDWASSER, R. A. & KISSLING, R. E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 98:219-23, 1958.
8. 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. 356-80.
9. LARGHI, O. P. *Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia*. Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1975. (Nota técnica, 8).
10. McQUEEN, J. L. et al. Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I. Its evaluation in a public health laboratory. *Amer. J. publ. Hlth*, 50:1743-52, 1960.
11. NILSSON, M. R. O problema do portador em raiva. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 67:195-205, 1969.
12. NILSSON, M. R. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 68:486-94, 1970.
13. NILSSON, M. R. & CORTES, J. de A. Recuperação espontânea de um cão raivoso, experimentalmente infectado. *Rev. Fac. Med. vet. Zoot. Univ. S. Paulo*, 12:229-34, 1975.
14. VAUGHN, J. B. et al. Excretion of street rabies virus in the saliva of dogs. *J. Amer. med. Ass.*, 193:113-8, 1965.
15. VEERARAGHAVAN, N. et al. Studies on the salivary excretion of rabies virus by the dog from surandai. *Sci. Rep. Pasteur Inst. Sth India*, 1969. p. 69-70.
16. 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.*, 32:570-3, 1935.

Recebido para publicação em 18/06/1979

Aprovado para publicação em 30/07/1979