

AValiação DE TRÊS CEPAS DE VíRUS Rábico ANTIGENICAMENTE DISTINTAS, EM CAMUNDONGOS. I — ESTUDO DOS PERÍODOS DE OBSERVAÇÃO CLÍNICA*

Pedro Manuel Leal Germano**
Omar Miguel***
Masaio Mizuno Ishizuka**
Egon Vieira da Silva****

GERMANO, P.M.L. et al. Avaliação de três cepas de vírus rábico, antigenicamente distintas, em camundongos. I — Estudo dos períodos de observação clínica. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 22:375-83, 1988.

RESUMO: Estudou-se, comparativamente, o comportamento de três cepas de vírus rábico, duas de origem de cão, Jales e Nigéria, e uma de origem de morcego, DR 19, com perfis antigênicos do nucleocapsídeo distintos. Estas cepas foram inoculadas por via intramuscular, na face interna da coxa, em dois grupos de camundongos, com 21 e 28 dias de idade. Os animais foram observados durante 30 dias, levando-se em consideração os períodos de observação clínica (incubação e duração da doença), determinando-se os coeficientes de mortalidade para cada grupo etário e para cada uma das cepas virais, bem como o título infectante de pool de cérebros de cada sub-grupo experimental. Os resultados obtidos permitiram constatar comportamento semelhante entre as cepas Jales e Nigéria, notadamente em relação aos períodos de observação clínica e mortalidade, para ambos os grupos etários, diferindo, todavia, quando comparados aos da cepa DR 19.

UNITERMOS: Vírus da raiva. Antígenos de vírus. Raiva.

1. INTRODUÇÃO

O período de incubação da raiva, qualquer que seja a espécie animal considerada, é extremamente variável, podendo levar desde alguns dias até vários meses (Bell⁴, 1975). Esta variabilidade pode ser atribuída, primeiramente, às características da própria etiopatogenia da infecção, destacando-se o tipo de cepa viral, a dose infectante e o local de inoculação (Crispin e col.⁶, 1981; Fedaku e Shaddock⁸, 1984). Em segundo lugar, deve-se considerar a espécie animal em estudo e as peculiaridades de cada uma delas; assim, por exemplo, dentre as diferentes raças de camundongos, há algumas que são altamente resistentes à infecção pelo vírus rábico, resistência esta transmitida geneticamente às proles (Lodmell e Ewalt¹⁵, 1985). Do mesmo modo, a idade pode influir, no maior ou menor grau de suscetibilidade dos hospedeiros, tal como é observado entre camundongos albinos suíços, nos quais o período de incubação da raiva é abreviado e a letalidade aumentada entre

os lactentes (Bagnaroli e col.³, 1970, Nilsson e col.^{18,19}, 1968).

Os sintomas da raiva, nos seres vertebrados, traduzem-se, normalmente, por alterações do comportamento, iniciando-se por crises de hiperexcitabilidade e terminando com paralisia. No homem, o sinal mais característico é a hidrofobia. De modo geral, a maior parte dos casos de raiva é atípica (Schneider²⁰, 1975).

Embora a raiva seja considerada uma doença "sempre" fatal no homem, a literatura científica, desde os tempos de Pasteur, registra exceções (Bell⁴, 1975), referindo casos clínicos de raiva em que houve remissão dos sintomas, com ou sem seqüelas, no homem e em animais, quer em condições naturais, quer em condições experimentais (Baer e col.², 1977; Fekadu e col.⁹, 1983). Por outro lado, constata-se com relativa freqüência, principalmente em morcegos, a ocorrência de animais aparentemente sadios portadores do vírus rábico (Bell⁴, 1975), apesar do mesmo fenômeno também ter sido constatado em cães (Fekadu e col.⁹, 1983). As causas

* Trabalho apresentado no IV Congresso Internacional de Veterinária de Língua Portuguesa, São Paulo, 1987.

** Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Av. Corifeu de Azevedo Marques, 2720 — 05340 — São Paulo, SP — Brasil.

*** Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo — Av. Dr. Arnaldo, 715 — 01255 — São Paulo, SP — Brasil.

**** Unidade de Controle de Vacinas Anti-Rábicas do Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) de Campinas, do Ministério da Agricultura. Rod. Heitor Penteado Km 3,5 — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

apontadas como responsáveis pela variabilidade do período de incubação da doença são também consideradas no contexto da raiva abortiva (Bell⁴, 1975).

Quando se considera a imunopatologia da infecção rábica, sabe-se que o sistema imunitário não reage de modo idêntico frente a amostras de vírus de diferentes origens (Tsiang e Lagrange²², 1980) e que, em certas condições, é responsável pelas alterações na expressão dos sintomas e pelo fenômeno de letalidade precoce (Andral¹, 1982).

Vários são os estudos da patogenia da infecção rábica, notadamente no que concerne ao comportamento de diferentes cepas de vírus rábico frente a sistemas biológicos diversos^{1,2,6,8,9,13,15,17-19}.

Os trabalhos conduzidos com esse escopo têm utilizado como critérios diferenciadores, para caracterizar uma cepa como distinta antigenicamente de outra, a espécie animal a partir da qual a amostra foi isolada ou à qual foi adaptada e a área geográfica de procedência do vírus.

O presente trabalho objetiva estudar o comportamento de três cepas distintas de vírus rábico, duas originadas a partir de cão e outra de morcego, caracterizadas antigenicamente através da técnica dos anticorpos anti-rábicos monoclonais, frente a dois grupos etários diferentes de camundongos normais, considerando os seguintes parâmetros: — período de incubação; período clínico da doença; período total de observação; mortalidade; título dos vírus no cérebro dos animais vitimados pela doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vírus

Foram utilizadas 3 cepas distintas de vírus rábico, em suspensão a 20% em cérebros de camundongos, identificadas antigenicamente através da técnica dos anticorpos anti-rábicos monoclonais antinucleocapside (Germano e col.¹², 1988) e isoladas no Brasil, a saber:

- cepa isolada a partir de cão, procedente da cidade de Jales, São Paulo, primeira passagem em camundongos;
- cepa adaptada às condições de laboratório, isolada a partir de morcego, identificada como DR 19, vigésima segunda passagem em camundongos;
- cepa isolada a partir de cão, procedente da Nigéria, quinta passagem em camundongos.

As cepas Jales e DR 19 foram cedidas pela Unidade de Controle de Vacinas Anti-Rábicas do Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) de Campinas, do Ministério da Agricultura, enquanto que a cepa Nigéria foi obtida junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

2.2 Animais

Foram utilizados diferentes lotes de camundongos albinos suíços, oriundos do biotério do LARA, nas seguintes etapas do trabalho:

2.2.1 Determinação das diluições dos vírus:

Foram utilizadas 180 fêmeas, com 21 dias de idade, pesando em média 11 g, divididas em 3 grupos de igual tamanho. Os animais de cada grupo foram inoculados por via intramuscular com 0,05 ml de suspensão viral, correspondente a cada uma das cepas utilizadas, a fim de determinar a diluição capaz de matar no máximo 90% dos animais. As diluições obtidas foram da ordem de 1:20 para as cepas Jales e Nigéria e de 1:80 para a cepa DR 19.

2.2.2 Inoculação experimental

Foram utilizadas 210 fêmeas, divididas em dois grupos de igual tamanho, o primeiro (Grupo I, subdividido nos sub-grupos 1, 2 e 3) com 21 dias de idade, correspondentes ao dia de desmame, pesando em média 11 g, e o segundo (Grupo II, subdividido nos sub-grupos 4, 5 e 6) com 28 dias de idade, pesando em média 17 g. Cada sub-grupo foi constituído por 35 animais, tendo cada um deles sido inoculado por via intramuscular, na face interna da coxa, com 0,05 ml de suspensão viral, obedecendo ao seguinte esquema:

- Sub-grupos 1 e 4: animais inoculados com uma diluição 1:20 da cepa Jales, correspondendo a 28 DL50/0,05 ml;
- Sub-grupos 2 e 5: animais inoculados com uma diluição 1:80 da cepa DR 19, correspondendo a 23 DL50/0,05 ml;
- Sub-grupos 3 e 6: animais inoculados com uma diluição 1:20 de cepa Nigéria, correspondendo a 41 DL50/0,05 ml.

Os animais, dos diferentes sub-grupos experimentais, foram observados 24 horas após a inoculação, eliminando-se os animais mortos, acidentalmente, e aqueles cujo aspecto geral dife-

ria do padrão estabelecido. Os demais foram mantidos em observação por um período de 30 dias, para a determinação dos períodos de incubação, clínico da doença, considerado a partir do dia do início dos primeiros sintomas até o dia do óbito e total de observação, correspondente à soma dos dois primeiros períodos, todos expressos em dias.

2.3 Titulação intracerebral dos vírus

As provas de inoculação em camundongos e os respectivos cálculos das DL₅₀ dos vírus utilizados foram realizadas segundo a técnica descrita por Koprowski¹⁴ (1973).

2.4 Imunofluorescência direta

A prova de imunofluorescência direta foi realizada, em todas as suas etapas, conforme a técnica descrita por Dean e Abelseth⁷ (1973), utilizando-se microscópio binocular, marca Zeiss, com objetiva de imersão 40X provida de diafragma, ocular 10 X, campo escuro, com condensador cardióide, lâmpada HBO 200, filtro excitador VGI e filtro barreira Zeiss 43.

O conjugado foi utilizado na diluição 1:80, e a suspensão de CVS (Challenge Virus Standard) apresentou um título igual a 10^{7.1} DL₅₀/0,03 ml.

2.5 Análise estatística

Aos resultados obtidos no trabalho aplicou-se a distribuição normal com o teste "Z" (Berquo e col.⁵, 1980), para duas médias independentes, com a finalidade de verificar se dentro de cada cepa viral e de cada período de observação clínica havia diferenças significantes entre os animais com 21 e 28 dias de idade. Aplicou-se, ainda, o teste de duas proporções, com aproximação normal, para determinar a existência ou não de diferenças significantes entre os grupos etários e entre os períodos de observação clínica e mortalidade em cada grupo etário, considerando as cepas virais duas a duas.

Adotou-se como nível de rejeição alfa igual a 0,05 e o valor crítico de "Z" de alfa igual a 1,96.

3. RESULTADOS

Os resultados da observação clínica, individual, dos camundongos de cada sub-grupo experimental, estão expressos na Tabela 1.

A Tabela 2 fornece os valores concernentes

aos períodos médios de observação clínica de ambos os grupos etários de camundongos, face às três cepas de vírus rábico utilizadas no experimento.

A Tabela 3 apresenta o coeficiente de mortalidade, calculado através da razão entre o número de animais mortos e o total de animais inoculados para as três cepas de vírus rábico, considerando-se ambos os grupos etários.

A partir dos valores médios expressos na Tabela 2 procedeu-se à análise estatística, utilizando-se o teste de duas médias independentes, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4. Do mesmo modo, os coeficientes de mortalidade apresentados na Tabela 3 foram analisados, estatisticamente, utilizando-se o teste de duas proporções com aproximação normal, dando origem à Tabela 5, onde constam os valores obtidos por esta análise.

Na Tabela 6 estão expressos os resultados obtidos através da titulação intracerebral em camundongos, de cada uma das cepas virais em estudo, em cada um dos grupos etários, no momento do início do experimento e ao final do mesmo, sobre o *pool* de cérebros provenientes dos animais que sucumbiram à infecção.

4. DISCUSSÃO

A análise da Tabela 1 permitiu constatar que as cepas Jales e Nigéria apresentaram comportamento quase idêntico no que se refere ao período mínimo de incubação e à amplitude dos períodos clínicos, em ambos os grupos etários, mas diferindo, marcadamente, da cepa DR 19.

Com relação aos períodos máximos de incubação, verificou-se, para as cepas de vírus rábico utilizadas, valores mais elevados no grupo etário com 21 dias de idade, o qual, coincidentemente, correspondeu ao grupo com maior número de animais vitimados pela infecção. Este fenômeno pode ser atribuído ao grau de suscetibilidade individual dos camundongos, frente a uma mesma dose infectante de vírus, ou seja, quanto maior o número de animais afetados mais evidentes se tornam as variações individuais (Germano e col.¹¹, 1982).

Nas Tabelas 2, 4 e 5 constatou-se que para os períodos de observação clínica não se registraram diferenças significantes entre os dois grupos etários para as três cepas de vírus rábico. A exceção foi observada no período clínico da cepa Jales, onde a duração da doença foi menor nos animais com 21 dias de idade, sendo esta diferença significativa.

Quando da comparação das cepas virais, duas a duas, observou-se diferenças significan-

TABELA 1

Camundongos inoculados experimentalmente, por via intramuscular, segundo o grupo etário, a cepa de vírus rábico e os períodos de observação clínica (dias). São Paulo, 1986.

N	21 Dias									28 Dias								
	Jales			DR 19			Nigéria			Jales			DR 19			Nigéria		
	PI	PC	PT	PI	PC	PT	PI	PC	PT	PI	PC	PT	PI	PC	PT	PI	PC	PT
1	8	1	9	6	2	8	9	2	11	8	2	10	5	3	8	8	4	12
2	8	4	12	6	2	8	9	4	13	9	4	13	6	2	8	8	5	13
3	8	4	12	6	3	9	9	4	13	9	5	14	6	2	8	9	5	14
4	10	2	12	6	3	9	9	4	13	10	5	15	6	2	8	9	5	14
5	10	2	12	6	3	9	9	5	14	11	4	15	6	2	8	10	4	14
6	10	2	12	6	3	9	9	5	14	11	4	15	6	2	8	10	4	14
7	10	4	14	6	3	9	10	4	14	11	6	17	6	2	8	10	5	15
8	10	4	14	6	3	9	10	4	14	11	7	18	6	2	8	11	4	15
9	10	4	14	6	3	9	10	5	15	11	8	19	6	2	8	11	4	15
10	11	3	14	7	2	9	10	5	15	12	7	19	6	3	9	11	4	15
11	11	4	15	7	2	9	10	5	15	12	7	19	6	3	9	11	5	16
12	11	4	15	7	2	9	10	5	15	12	7	19	7	2	9	11	5	16
13	11	4	15	7	3	10	10	5	15	12	7	19	7	2	9	11	6	17
14	11	4	15	7	3	10	10	6	16	12	8	20	7	2	9	12	5	17
15	12	3	15	7	3	10	10	6	16				7	2	9	12	7	19
16	12	4	16	7	3	10	10	6	16				7	2	9	12	9	21
17	12	4	16	7	3	10	11	6	17				7	3	10	13	8	21
18	13	5	18	7	3	10	11	6	17				7	4	11	15	10	25
19	13	5	18	7	3	10	11	6	17				8	3	11			
20	13	5	18	9	2	11	11	6	17				8	4	12			
21	14	6	20	9	2	11	12	6	18				8	4	12			
22	14	6	20	9	2	11	12	6	18				8	4	12			
23	14	7	21	9	2	11	12	6	18				9	5	14			
24	15	6	21	9	3	12	12	6	18				9	5	14			
25	17	4	21	9	3	12	12	6	18				9	6	15			
26				9	4	13	13	7	20				9	6	15			
27				9	5	14	14	6	20				9	10	19			
28				9	5	14	14	6	20									
29				10	4	14	14	6	20									
30				13	3	16	15	5	20									
31							15	6	21									
32							18	4	22									

N : Número do animal

PI : Período de Incubação

PC : Período Clínico

PT : Período Total de Observação

tes entre a cepa DR 19 e as outras duas, Jales e Nigéria, para ambos os grupos etários. Entre as cepas originadas de cão, a exceção ocorreu no período clínico do grupo com 21 dias, inoculado com a cepa Jales onde este período foi de menor duração.

O exame das Tabelas 3, 4 e 5 permitiu constatar que não houve diferença significativa entre

os coeficientes de mortalidade nos animais com 21 dias, considerando-se as cepas de vírus rábico, duas a duas, em razão das cepas virais terem sido utilizadas nas diluições, previamente determinadas, capazes de matar no máximo 90% dos animais. As diferenças marcantes são notadas no grupo de camundongos com 28 dias, onde se registraram diferenças significantes na

TABELA 2

Camundongos inoculados experimentalmente, por via intramuscular, com vírus rábico, segundo a cepa de vírus, os períodos médios de observação clínica (dias) e seus respectivos desvios-padrão. São Paulo, 1986.

Condição	Período de Incubação		Período Clínico		Período Total de Observação	
	21 Dias	28 Dias	21 Dias	28 Dias	21 Dias	28 Dias
Cepa						
Jales	11,5 ± 2,2	10,8 ± 1,3	4,1 ± 1,3	5,8 ± 1,7	15,6 ± 3,2	16,6 ± 2,9
DR 19	7,6 ± 1,6	7,1 ± 1,2	2,9 ± 0,8	3,3 ± 1,8	10,5 ± 2,0	10,4 ± 2,8
Nigéria	11,3 ± 2,2	10,8 ± 1,7	5,3 ± 1,0	5,5 ± 1,8	16,6 ± 2,7	16,3 ± 3,2

TABELA 3

Mortalidade (percentagem) de camundongos inoculados experimentalmente, por via intramuscular, com vírus rábico, segundo o grupo etário e a cepa de vírus. São Paulo, 1986.

Cepa	21 Dias			28 Dias		
	Obit	Inoc	Mort	Obit	Inoc	Mort
	F	F	%	F	F	%
Jales	25	27	92,6	14	32	43,8
DR 19	30	34	88,2	27	30	90,0
Nigeria	32	35	91,4	18	28	64,3

Obit : Número de animais mortos
 Inoc : Número de animais inoculados
 Mort: Mortalidade
 F : Frequência

TABELA 4

Valores da estatística "Z" e sua significância, quando da utilização do teste de duas médias independentes, para a comparação dos resultados obtidos entre os grupos etários (21 e 28 dias) e os períodos médios de observação clínica e mortalidade, em camundongos experimentalmente inoculados, por via intramuscular, com vírus rábico, segundo a cepa viral utilizada, São Paulo, 1986.

Condição	Vírus		
	Jales	DR 19	Nigéria
PI	1,15 N.S.	1,38 N.S.	0,86 N.S.
PC	3,46 *	1,08 N.S.	0,56 N.S.
PT	0,97 N.S.	0,20 N.S.	0,34 N.S.
Mort.	3,94 *	0,23 N.S.	2,64 *

P.I. : Período de Incubação
 P.C. : Período Clínico
 P.T. : Período Total de Observação
 Mort. : Mortalidade
 * Significante / N.S. Não Significante

TABELA 5

Valores da estatística "Z" e sua significância, quando da utilização do teste de duas médias independentes, para a comparação dos resultados obtidos entre o tipo de cepa de vírus, duas a duas, grupo etário (21 e 28 dias) e os períodos médios de observação clínica e mortalidade de camundongos inoculados experimentalmente, por via intramuscular, com vírus rábico. São Paulo, 1986.

Condição	Jales x DR 19		Jales x Nigéria		DR 19 x Nigéria	
	21 Dias	28 Dias	21 Dias	28 Dias	21 Dias	28 Dias
P.I.	7,60*	9,30*	0,41 N.S.	0,01 N.S.	7,56*	8,66*
P.C.	3,85*	4,21*	3,94 *	0,46 N.S.	10,31*	4,02*
P.T.	7,11*	6,64*	1,28 N.S.	0,27 N.S.	10,14*	6,50*
Mort.	0,57 N.S.	3,84*	0,17 N.S.	1,58 N.S.	0,44 N.S.	2,34*

P.I. : Período de Incubação / P.C. : Período Clínico
 P.T. : Período Total de Observação / Mort. : Mortalidade
 * Significante / N.S. Não Significante

TABELA 6

Camundongos inoculados experimentalmente, por via intramuscular, com o vírus da raiva, segundo a cepa e os títulos ($\text{Log}_{10} \text{DL}_{50}/0,03 \text{ ml}$), no momento da inoculação e no *pool* de cérebros dos animais vitimados pela infecção, de acordo com o grupo etário. São Paulo, 1986.

Cepa	Título		
	Inicial	21 Dias	28 Dias
Jales	$10^{4,83}$	$10^{4,69}$	$10^{4,43}$
DR 19	$10^{6,35}$	$10^{6,61}$	$10^{6,61}$
Nigéria	$10^{5,00}$	$10^{4,71}$	$10^{4,50}$

mortalidade entre as cepas Jales e DR 19, e Nigéria e DR 19, não se observando, porém, diferença significativa entre as cepas Jales e Nigéria. Em relação aos grupos etários, constatou-se diferença significativa nas cepas Jales e Nigéria e ausência de significância com a DR 19.

As diferenças de comportamento verificadas com a cepa DR 9 não estão ligadas, exclusivamente, às características antigênicas que a diferenciam das duas outras cepas, Jales e Nigéria. Na verdade, esta cepa de vírus rábico, de origem de morcego, tem as características de uma cepa intermediária entre as fixas e as naturais (Fuenzalida e Larghi¹⁰, 1972). Em razão do maior grau de adaptação desta cepa a camundongos, a replicação viral é mais rápida, abreviando, conseqüentemente, o período de observação clínica e mantendo o mesmo coeficiente de mortalidade, independentemente da idade dos animais (Fuenzalida e Larghi¹⁰, 1972). Este tipo de comportamento já havia sido relatado por Kitselman e Mital¹³ (1967) quando da comparação de cepas fixas e naturais. Comparando-se os resultados de Marcovitz¹⁶ (1985), obtidos a partir da inoculação intraplantar de camundongos de diferentes estirpes, com cepas de vírus fixo e de rua, respectivamente, observou-se que os valores dos períodos de incubação (5,0 e 10,3 dias), clínicos (2,1 e 4,9 dias) e totais de observação (7,2 e 15,2 dias), quando confrontados com os valores dos períodos de observação clínica da cepa DR 19 (Tabela 2), estes situaram-se, exatamente, entre os valores obtidos para os grupos inoculados com CVS e com a cepa de vírus selvagem.

O período de observação clínica das cepas de origem de cão, Jales e Nigéria, apresentaram, por sua vez, comportamento semelhante ao da cepa de vírus natural, origem de raposa, utilizada por Marcovitz¹⁶ (1985) através da inoculação intraplantar em camundongos.

No que se refere aos grupos etários, em relação à mortalidade, a suscetibilidade maior foi verificada nos sub-grupos com 21 dias de idade, inoculados com as cepas Jales e Nigéria, sendo estas diferenças estatisticamente significantes, não se verificando o mesmo fato com a cepa DR 19.

Os presentes resultados, concernentes aos períodos de observação clínica e mortalidade, relacionados às diferenças ligadas à idade, estão próximos dos obtidos por outros autores, embora a grande maioria das pesquisas tenha sido desenvolvida utilizando a inoculação intracerebral em camundongos. Nessas condições, nem sempre têm sido observadas diferenças relacionadas com a idade dos animais (Miyamoto e Matsumoto¹⁷, 1967) e, embora se considere os camundongos lactentes como mais suscetíveis à infecção rábica (Bagnaroli e col.³, 1970; Nilsson e col.¹⁹, 1968), continua sendo recomendada a utilização de camundongos de 3 a 5 semanas de idade para os testes de inoculação intracerebral, como havia sido proposto por Kowrowski¹⁴ em 1973. Em relação à suscetibilidade, em função do grupo etário, relacionado à via intramuscular de inoculação, como praticada neste trabalho, nada consta de definitivo na literatura. Crispin e col.⁶, em 1981, observaram graus de suscetibilidade variáveis quando da inoculação de camundongos, de ambos os sexos, por via intramuscular, mas utilizando o músculo masseter como local para a inoculação intramuscular.

A tentativa de confrontar os resultados dos períodos de incubação e clínico da infecção rábica, obtidos a partir de inoculações intramusculares, com aquelas praticadas intracerebralmente (Nilsson e col.¹⁸, 1968), permitem, tão somente, constatar serem esses períodos mais longos quando da inoculação intramuscular, notadamente quando praticados ao nível da musculatura do membro posterior, o que não deixa de ser óbvio, pois nessa condição o vírus necessita percorrer todo um trajeto através do sistema nervoso periférico até atingir o Sistema Nervoso Central (SNC). Do mesmo modo, é difícil tentar estabelecer um termo de comparação, quando a inoculação intramuscular é praticada em massa muscular da região cefálica (Crispin e col.⁶, 1981), onde este trajeto, até o SNC, é muito mais curto, abreviando, em conseqüência, tanto os períodos de observação clínica quanto a própria mortalidade.

A confrontação destes resultados, com os obtidos a partir de inoculações intraplantares, com cepa selvagem de vírus rábico, realizados por Marcovitz¹⁶ (1985) em camundongos, parecem mais próximos daqueles observados no

presente trabalho, sugerindo haver semelhança entre estas duas vias de inoculação, no que se refere aos períodos de observação clínica.

No que tange à análise dos títulos, obtidos a partir dos *pool* de cérebros dos animais vitimados pela raiva e confirmados previamente pela prova de imunofluorescência direta realizada sobre decalques desses mesmos cérebros, referidos na Tabela 6, nota-se que, para as cepas de origem de cão, Jales e Nigéria, os resultados comportaram-se de modo similar, verificando-se uma queda desses títulos em ambos os grupos etários em relação ao título inicial de cada vírus. O contrário sucedeu com a cepa de origem de morcego, DR 19, onde o título dos *pool* de cérebros foi superior ao do momento da inoculação.

Com relação aos grupos etários, não houve diferença entre os animais com 21 e 28 dias de idade, inoculados com a cepa DR 19. Para as cepas Jales e Nigéria, constatou-se ser o título dos animais com 21 dias superior ao daqueles com 28.

Os resultados obtidos, notadamente, com as cepas de origem de cão, Jales e Nigéria, explicam em parte, a ausência quase total de diferenças estatisticamente significantes, nos períodos de observação clínica e na mortalidade. Complementarmente, os títulos mais elevados, obtidos a partir dos *pool* de cérebros provenientes dos camundongos com 21 dias de idade, poderiam contribuir para as diferenças significantes encontradas nos coeficientes de mortalidade de ambos os grupos etários. De modo análogo, o título idêntico, encontrado no *pool* de cérebros dos animais inoculados e mortos em consequência da infecção pela cepa DR 19, explicaria a ausência total de diferenças estatisticamente significantes, nos períodos de observação clínica e na mortalidade, quando comparados os grupos etários.

A diferença entre os títulos dos *pool* de cérebros dos animais mortos pela cepa DR 19, com 21 e 28 dias de idade, bem superiores aos das cepas Jales e Nigéria, nas mesmas circunstâncias, explicaria também as diferenças estatisticamente significantes observadas nos períodos de observação clínica em todas as suas fases, bem como nos coeficientes de mortalidade dos animais com 28 dias.

As diferenças notadas entre os títulos dos *pool* de cérebros dos camundongos com 21 e 28 dias de idade, inoculados com as cepas Jales e Nigéria, comprovaram ser o grupo com 21 dias o mais suscetível à infecção do que o de 28 dias de idade, confirmando a maior sensibilidade dos jovens ao vírus rábico. Estes resultados estão de acordo com o que ficou estabelecido por

Nilsson e col.¹⁹ (1968), embora estes autores comparassem resultados entre camundongos lactentes e adultos, inoculados por via intracerebral, registrando, conseqüentemente, diferenças mais amplas entre os valores dos títulos de um grupo para o outro. Em relação aos títulos das suspensões virais, inoculadas por via intramuscular em camundongos, e aos *pool* de cérebros dos animais por ela vitimados, não há na literatura citações suficientes que possibilitem a confrontação destes resultados.

As cepas de vírus rábico, de origem de cão, Jales e Nigéria, embora geograficamente diferentes, e mais importantes ainda, antigenicamente distintas, apresentaram comportamento semelhante quando da comparação dos períodos de observação clínica e dos coeficientes de mortalidade, independentemente do grupo etário considerado. Contudo, diferiram, substancialmente, do comportamento da cepa de origem de morcego, DR 19, quando da comparação destes mesmos parâmetros. Estes aspectos possibilitam o estabelecimento da suposição de que cepas distintas antigenicamente, quando adaptadas na natureza a um determinado sistema biológico, neste caso o cão, teriam, do ponto de vista clínico, o mesmo comportamento quando inoculadas em camundongos.

As determinações dos períodos de observação clínica e dos coeficientes de mortalidade são extremamente importantes para a epidemiologia da raiva, notadamente, quando se estuda o comportamento de cepas de vírus rábico antigenicamente distintas (Wiktor²³, 1982).

O conhecimento destes parâmetros constitui a base fundamental, sobre a qual se apoia a própria prevenção da raiva, onde se constata a necessidade de utilizar vacinas que protejam, eficazmente, os suscetíveis contra as cepas de vírus rábico prevalentes na área geográfica, de onde estas mesmas cepas foram isoladas (Fuenzalida e Larghi¹⁰ 1972; Germano e col.¹¹, 1982; Schneider²¹, 1982; Lodmell e Ewalt¹⁵, 1985).

Com base nos resultados obtidos, faz-se necessário novos estudos, na mesma linha de pesquisa, a fim de dirimir dúvidas sobre a possibilidade de cepas naturais de vírus rábico, antigenicamente distintas, oriundas de uma mesma espécie animal, apresentarem comportamento semelhante, quando inoculadas, experimentalmente, em um mesmo sistema biológico.

5. CONCLUSÕES

Os períodos de observação clínica não registraram diferenças estatisticamente significantes quando da comparação dos resultados de ambos os grupos etários, para as três cepas virais;

o mesmo ocorreu quando da comparação entre as cepas Jales e Nigéria, exceção feita ao período clínico da cepa Jales de duração menor no grupo de animais com 21 dias de idade, em ambas as circunstâncias.

Os períodos de observação clínica registraram diferenças estatisticamente significantes quando da comparação das cepas virais Jales e Nigéria, em relação à cepa DR 19, em ambos os grupos etários.

Os coeficientes de mortalidade do grupo de camundongos com 28 dias de idade, inoculados com as cepas Jales e Nigéria, não apresentaram

diferenças estatisticamente significantes entre si; todavia, foram significantes quando comparadas com o coeficiente de mortalidade dos animais inoculados com a cepa DR 19.

A suscetibilidade maior, em função do grupo etário, verificou-se nos animais com 21 dias de idade, inoculados com as cepas Jales e Nigéria.

Os títulos dos *pool* de cérebros dos animais vitimados pela raiva, inoculados com as cepas Jales e Nigéria, foram inferiores aos títulos das suspensões virais inoculadas, intramuscularmente, nos camundongos com 20 dias de idade. O contrário sucedeu com os animais inoculados com a cepa DR 19, em ambos os grupos etários.

GERMANO, P.M.L. et al. [Evaluation of three antigenically different rabies virus strains in mice. I — Study of the clinical observation periods]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 22:375-83, 1988.

ABSTRACT: A study was conducted to compare three rabies virus strains, two of them, Jales and Nigeria, isolated from dogs, and the other, DR 19, from vampire bats, with different nucleocapside antigenic variations. These strains were intramuscularly inoculated in the inside part of the thigh of 21 and 28 day-old mice. The animals were observed for 30 days, in accordance with the clinical observation periods (incubation and illness). Mortality rates by age and viral strain were recorded. The brain pooled infective tittle of each experimental subgroup was determined. The results showed that Jales and Nigeria strains were similar when clinical observation periods and mortality rates were analysed for both age groups. However, these results were different from those obtained for the DR 19 strain.

UNITERMS: Rabies virus. Antigens, viral. Rabies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRAL, B. Le phénomène de mortalité précoce du à l'antigene rabique chez la souris sensibilisée — étude qualitative et cinétique. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, 5:79-1, 1982.
- BAER, G.M.; CLEARY, W.F.; DIAZ, A.M.; PERL, D.F. Characteristics of 11 rabies virus isolates in mice: titers and relative invasiveness of virus, incubation period of infection, and survival of mice with sequelae. *J. infect. Dis.*, 136:336-45, 1977.
- BAGNAROLI, R.A.; LARGHI, O.P.; MARCHEVSKY, N. Susceptibilidad de ratones lactantes y adultos al virus rabico demostrada por inmunofluorescencia. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 68:388-92, 1970.
- BELL, J.F. Latency and abortive rabies. In: Baer, G.M., ed. *The natural history of rabies*. New York, Academic Press, 1975. v.1, p. 331-54.
- BERQUÓ, E.; SOUZA, J.M.P. de; GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*. São Paulo, E.P.U., 1980.
- CRISPIN, L.S.; BLANCOU, J.; AUBERT, M.F.A. Sensibilité comparée de la souris à la rage expérimentale selon le sexe, l'age et la voie d'infection. *Bull. Soc. Sci. vét. Méd. comp. Lyon*, 83:145-51, 1981.
- DEAN, D.J. & ABELSETH, M.K. The fluorescent antibody test. In: World Health Organization. *Laboratory techniques in rabies*. 3rd ed. Geneva, 1973. p.73-84.
- FEKADU, M. & SHADDOCK, J.H. Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Amer. J. vet. Res.*, 45:724-9, 1984.
- FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; CHANDLER, F.W.; BAER, G.M. Rabies virus in the tonsils of a carrier dog. *Arch. Virol.*, 78:37-47, 1983.
- FUENZALIDA, E. & LARGHI, O.P. Características de una cepa de virus rabico aislada del cerebro de *Desmodus rotundus*. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 73:93-8, 1972.
- GERMANO, P.M.L.; ISHIZUKA, M.M.; NILSSON, M.R.; MIGUEL, O. Avaliação da resposta imunitária da vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes aplicada em cães primo vacinados, em condições naturais. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 19:67-74, 1982.
- GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V.; SUREAU, P. Determinação do perfil antigênico de 3 cepas de virus rábico, isoladas no Brasil, através da técnica dos anticorpos monoclonais antinucleocapside. *Rev. Fac. Med.vet. Zootec. Univ. S. Paulo*. 1988 [no prelo].
- KITSELMAN, C.H. & MITAL, A.K. Pathogenesis of rabies in the rat. *Canad. J. comp. Med.*, 31:122-4, 1967.
- KOPROWSKY, H. The mouse inoculation test. In: World Health Organization. *Laboratory techniques in rabies*. 3rd ed. Geneva, 1973. p.85-93.

15. LODMELL, D.L. & EWALT, L.E. Pathogenesis of street rabies virus infections in resistant and susceptible strains of mice. *J. Virol.*, **55**:788-95, 1985.
16. MARCOVISTZ, R. *Etude de l'action de l'interferon endogene et exogene au cours de l'infection de la souris par le virus rabique*. Paris, 1985. [Thèse de Doctorat d'Etat — Université Paris 7].
17. MIYAMOTO, K. & MATSUMOTO, S. Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J. exp. Med.*, **125**:447-56, 1967.
18. NILSSON, M.R.; SUGAY, W.; PASQUALIN, O.L. Diagnóstico da raiva. Observação sobre o tempo de incubação e a duração da doença em camundongos, no período de 1960 a 1966. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, **35**:1-7, 1968.
19. NILSSON, M.R.; SUGAY, W.; PASQUALIN, O.L.; MUELLER, S.B. Rabies diagnosis: comparative study on susceptibility of adult and suckling mice. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, **35**:43-7, 1968.
20. SCHNEIDER, L.G. Spread of virus from the central nervous system. In: Baer, G.M., ed. *The natural history of rabies*. New York, Academic Press, 1975. v.1, p. 273-301.
21. SCHNEIDER, L.G. Antigenic variants of rabies virus. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, **5**:101-7, 1982.
22. TSIANG, H. & LAGRANGE, P.H. In vivo detection of specific cell mediated immunity in street rabies virus infection in mice. *J. gen. Virol.*, **47**:183-91, 1980.
23. WIKTOR, T.J. Introduction à l'étude des variants antigéniques du virus rabiques. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, **5**:93-4, 1982.

Recebido para publicação em 28/10/1987

Reapresentado em 2/5/1988

Aprovado para publicação em 10/6/1988