

Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo
12:229-34, 1975

RECUPERAÇÃO ESPONTÂNEA DE UM CÃO RAIVOSO, EXPEMENTALMENTE INFECTADO §

Moacyr R. NILSSON *
José de Angelis CÔRTEZ **

RFMV-A/21

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.

RESUMO: Um cão infectado experimentalmente, via intramuscular, com vírus rábico isolado de morcego, manifestou, após período de incubação de 16 dias, sinais clínicos, que perduraram durante 7 dias, quando se iniciou a recuperação, completada 16 dias após os sintomas iniciais.

O vírus foi recuperado da saliva do cão aos 13, 19, 20, 21, 22 e 31 dias depois da infecção e somente em camundongos lactentes inoculados pela via intracerebral, sendo negativas as tentativas de isolamento em camundongos de 30 dias de idade. O diagnóstico de raiva foi confirmado pelo exame dos cérebros dos camundongos inoculados, submetidos aos métodos de Sellers, imunofluorescência e subpassagem em novos camundongos.

Decalques da córnea do cão, revelaram-se positivos à imunofluorescência aos 14, 20, 22, 24, 27 e 34 dias após a inoculação.

O soro do animal apresentou título superior a 1:625 na prova de soro-neutralização realizada 36 dias depois da inoculação, frente a 316 DL do vírus, em contraste com soro retirado antes da inoculação, que não revelou anticorpos contra a raiva.

UNITERMOS: Cães*; Recuperação espontânea*; Raiva*.

I N T R O D U Ç Ã O

Entre as doenças que ameaçam a humanidade, desde os tempos mais remotos, merece destaque a raiva pela apreensão que acarreta. A dramaticidade peculiar de um caso humano de raiva, por si só, justificaria a assertiva anterior, não se somassem a ela as intrincadas condições de persistência,

na natureza, do seu agente causal, estreitamente vinculadas à multiplicidade de hospedeiros, muitos dos quais escapam ao controle do homem.

Não bastassem os aspectos apontados, consubstancia-se a impossibilidade de ação

§ Nota prévia apresentada à XXVI Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo, setembro de 1971.

* Médico Veterinário, Pesquisador Científico.
Chefe da Seção de Raiva e Encefalomielite do Instituto Biológico de São Paulo.

** Professor Assistente Doutor.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da U.S.P.

efetiva frente a seu caráter sempre fatal. Apesar deste conceito universal de invariável fatalidade, exemplos de cura espontânea, embora excepcionais, têm sido registrados, sugerindo a possibilidade de recuperação de indivíduos com quadro declarado da doença. A este respeito revisões sobre casos de recuperação em diversas espécies animais, incluindo-se o homem, foram realizadas em recentes publicações^{10,14}.

Vários autores^{2,4,5,6,13} assinalaram casos adicionais de recuperação de cães inoculados experimentalmente com o vírus rábico, porém sem isolamento do vírus.

HATTWICK et al.¹⁰ descreveram caso de recuperação de raiva humana, transmitida pela mordedura de morcego, também sem isolamento do vírus.

Neste trabalho relatamos mais um caso de recuperação espontânea, após infecção experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus

I. Amostra IPEACS 1661 — D.R. (DR 19/3) — usada para a inoculação do cão. Descrita por SILVA & CUNHA¹⁸ e isolada do cérebro de *Desmodus rotundus* capturado em 1959, em Blumenau, Santa Catarina.

Em nosso laboratório realizamos passagem adicional em camundongos e o inóculo utilizado consistiu no sobrenadante de suspensão a 10% de cérebros dos camundongos infectados e sacrificados na fase paralítica, depois de centrifugada a 1500 rpm/5 minutos. Este inóculo apresentou título de $10^{5,8,2}/0,03\text{ml}$ em camundongos adultos jovens, via intracerebral (IC).

II. Amostra CVS — empregada nas provas de soroneutralização e imunofluorescência.

Diluyente — água destilada com soro de cavalo normal a 2%, previamente inativado a 56°C durante 30 minutos, adicionada de penicilina (1000 unidades/ml) e estreptomomicina (1,25 mg/ml).

Camundongos — Suíços brancos, originários da Fundação Rockefeller, da criação do Instituto Biológico. Utilizamos sempre camundongos de aproximadamente 30 dias

de idade, pesando 11g a 15g, e lactentes de 2 a 7 dias de idade, distribuídos ambos em grupos de 8.

Cão — Sem raça definida, do sexo feminino, idade aproximada de 5 anos, selecionado previamente através prova de soroneutralização. Inoculamos o vírus na dose de 5ml, via intramuscular, na região da espádua.

Tomadas de saliva — Colhemos amostras do cão, diariamente, a partir do 13.º ao 36.º dia da inoculação. Recolhemos a saliva em placa de Petri, quando adicionamos igual volume de diluyente, com o qual permanecia em contato durante aproximadamente 30-40 minutos, em banho de gelo, antes da inoculação.

Tentativas de isolamento do vírus — Inoculamos cada amostra de saliva pela via IC, em camundongos adultos jovens e em lactentes, nas doses de 0,03ml e 0,01ml, respectivamente. Deixamos os camundongos em observação por 30 dias, sacrificando-se aqueles que apresentassem qualquer sintoma nervoso capaz de induzir à suspeita de raiva, a partir do 5.º dia da inoculação. Destes, assim como dos mortos no mesmo período, submetemos os cérebros aos exames retoneiros para o diagnóstico da raiva, isto é, pesquisa dos corpúsculos de Negri pelo método de Sellers, imunofluorescência e subpassagem em camundongos.

Exame da córnea — Seguimos, em essência, o "cornea-test" idealizado por SCHNEIDER⁷ em camundongos. Paralelamente à colheita de saliva, efetuamos impressões (decalques) diversas de córnea em 4 lâminas para cada globo ocular, tendo-se o cuidado de ocupar dois campos em cada lâmina. Após fixação a -20°C em acetona, por período de 24 horas, submetemos os decalques à técnica de anticorpos fluorescentes.

Imunofluorescência — Utilizamos a técnica recomendada por DEAN⁹ e pelo Centro Panamericano de Zoonoses⁷ e as leituras efetuadas em microscópio Zeiss com lâmpada HBO 200 e filtros adequados.

Aplicamos a imunofluorescência não só para os cérebros dos camundongos mortos ou sacrificados, como para os decalques de córnea.

Soroneutralização — Seguimos a técnica de ATANASIU³, utilizando 5 camundon-

gos por diluição do soro e 10 camundongos para cada diluição do vírus na determinação do título, que foi calculado pelo método de REED & MUENCH¹⁵.

RESULTADOS

No 16.^o dia após a inoculação, o animal apresentou mudança no comportamento, traduzida por inquietação e agitação. Nos dias seguintes manifestou perturbações locomotoras, tremores musculares, incoordenação dos movimentos, impossibilidade de levantar-se, paresia, à semelhança dos casos de paralisia dos posteriores, já que conseguia movimentar os membros anteriores na tentativa de postar-se de pé, o que conseguia algumas vezes, apoiando-se na grade da gaiola. Em momento algum apresentou agressividade ou perda de apetite, conseguindo deglutir o alimento durante toda a duração da doença.

Aos 23 dias da inoculação, portanto, 7 dias depois do aparecimento das primeiras manifestações clínicas, iniciou-se a regressão da sintomatologia e o animal já se erguia, mas ainda com alguma incoordenação. Nos dias subsequentes, verificamos melhora acentuada, até o completo restabelecimento. Desde o momento em que desapareceram os sintomas nervosos, inclusive a paresia, o cão entrou em estado de apatia profunda, de prostração, tão evidente a ponto de deixar pender a cabeça, quando posto num plano superior no momento da colheita da saliva. Assim permaneceu o animal até a recuperação total, ocorrida aproximadamente 15 dias depois do aparecimento dos primeiros sintomas.

Depois de inteiramente restabelecido, o animal mostrou alterações de comportamento, traduzidas por vivacidade, inquietude, agitação, movimentando repetidas vezes a cabeça, assim se mantendo até a presente data (setembro de 1974), portanto mais de três anos depois da recuperação.

O reisolamento do vírus foi possível tão somente em camundongos lactentes e mesmo assim nas 1.^a, 7.^a, 8.^a, 9.^a, 10.^a e 19.^a colheitas de saliva, ou seja, aos 13, 19, 20, 21, 22 e 31 dias após a inoculação. O período de incubação nestes camundongos variou de 7 a 12 dias e apenas nos dois primeiros isolamentos, ao 13 e 19 dias, houve morte de todos os camundongos inoculados, enquanto nos restantes os resultados foram 3/7 (mortos/inoculados), 4/8, 4/7 e 4/8. A

presença dos corpúsculos de Negri pelo método de Sellers, a imunofluorescência e a reprodução da raiva em novos camundongos, nas subpassagens, confirmaram o diagnóstico da raiva.

Em camundongos adultos de 30 dias de idade, os resultados foram sempre negativos, não se registrando qualquer reisolamento do vírus.

Os decalques de córnea revelaram-se positivos à imunofluorescência nas 2.^a, 8.^a, 10.^a, 12.^a, 15.^a e 22.^a extrações, correspondentes aos 14, 20, 22, 24, 27 e 34 dias após a inoculação.

O soro do animal em sangria efetuada aos 36 dias da inoculação, revelou título superior a 1:625 na prova de soroneutralização em camundongos, contra 316 DL do vírus CVS.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Não só a sintomatologia apresentada, mas principalmente a eliminação do vírus pela saliva em 6 ocasiões diversas e a positividade dos decalques de córnea, em também 6 oportunidades, assim como o alto teor de anticorpos no soro colhido aos 36 dias da inoculação, indicam que o cão adquiriu realmente a raiva em consequência da inoculação experimental. Não houve relação absoluta entre a eliminação do vírus pela saliva e a demonstração do antígeno rábico nos decalques de córnea, pois só em duas ocasiões, ambos os processos revelaram resultados positivos, nas 8.^a e 10.^a colheitas. Na fase clínica mais acentuada da doença, o cão eliminou vírus regularmente do 4.^o dia após o surgimento dos primeiros sinais, até o 7.^o dia. Ainda houve eliminação do vírus 3 dias antes do aparecimento dos primeiros sinais e após a regressão da sintomatologia, mas ainda na fase de apatia, de prostração. Esta periodicidade irregular da eliminação do vírus pela saliva havia sido verificada antes por VEERARAGHAVAN et al.¹⁹, na Índia, em cão portador assintomático. REMLINGER¹⁶ assinalou infeciosidade da saliva até 5 dias depois da cura de um cão.

O conseguirmos isolar vírus da saliva do cão por 6 vezes, diversamente de MARKUS et al.¹³ e de ARKO et al.² deve ser atribuído a efetuarmos extrações diárias, durante 25 dias seguidos, além de realizarmos todas as inoculações também em camundongos lactentes, pois só nestes obtivemos êxito

em nossos intentos, enquanto em ocasião alguma conseguimos reproduzir a raiva em camundongos adultos jovens, a partir da saliva. Neste sentido, VEERARAGHAVAN et al.¹⁹, quando trabalharam com cão portador sadio, realizaram 913 retiradas de saliva e obtiveram 14 isolamentos do vírus em camundongos lactentes e somente 6 em camundongos adultos. JOHNSON¹² referiu-se à maior sensibilidade de camundongos lactentes em relação aos adultos, quando inoculados com amostras de vírus rábico originárias de animais selvagens.

Segundo JOHNSON¹¹ os cães são pouco sensíveis aos vírus de origem morcego. Isto poderia, talvez, contribuir para explicar a recuperação do cão que inoculamos com vírus proveniente de morcego. CONSTANTINE⁸ também se referiu a cães relativamente refratários a vírus rábico de origem morcego, obtendo igualmente um caso de sobrevivência após desenvolvimento de sinais clínicos da raiva.

Outro ponto em nosso trabalho, favorável à possibilidade de recuperação, foi o fato de que o animal continuou a alimentar-se normalmente, durante todo o período em que apresentou evidências clínicas.

Nossos resultados encontram apoio e somam-se aos achados de ANDRAL & SÉRIÉ¹, que isolaram vírus da saliva de cão na fase paralítica e posteriormente recuperado, REMLINGER¹⁶, JOHNSON¹¹, CONSTANTINE⁸, MARKUS et al.¹³, BELL et al.⁵ BELL et al.⁶ e ARKO et al.².

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

À Dra. Tamara Nikitin pela valiosa colaboração prestada e ao Dr. Oscar Larghi, do Centro Panamericano de Zoonosis, pelo fornecimento das amostras de vírus e do conjugado.

RFMV-A/21

NILSSON, M. R. & CÔRTEZ, J. de A. — *Spontaneous recovery of a dog artificially infected with rabies*. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:229-34, 1975.

SUMMARY: A 5-years-old female dog developed clinical signs of rabies 16 days after being inoculated intramuscularly with rabies from bat origin.

The diagnosis of rabies was supported not only by isolating the virus from saliva but by demonstrating it in cornea cells.

Recovery from the clinical illness was complete 31 days post inoculation, with no demonstrable sequelae.

Serum neutralization test performed 36 days post inoculation revealed titer 1:625.

No treatment was given to the animal.

UNITERMS: Recovery spontaneous; Rabies*; Dog.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, L. & SÉRIÉ, C. — Études expérimentales sur la rage en Ethiopie. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 93: 475-88, 1957.
2. ARKO, R. J. SCHNEIDER, L. G.; BAES, G. M. — Non-fatal canine rabies. *Am. J. Vet. Res.*, 34:937-8, 1973.
3. ATANSIU, P. — Titration des anticorps rabiques pratiqué sur les sérums humaines. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 67: 383-7, 1967.
4. BADIALLI, L. & ABOU-YOUSSEF, M. — Contributo al problema della rabia abortiva o sub-letale. *Vet. Ital.*, 19: 807-35, 1968.

NILSSON, M. R. & CORTES, J. de A. — Recuperação espontânea de um cão raivoso, experimentalmente infectado. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:229-34, 1975.

5. BELL, J. F.; GONZALEZ, M. A.; DIAZ, A. M.; MOORE, G. J. — Nonfatal rabies in dogs: experimental studies and results of a survey. *Am. J. Vet. Res.*, 32:2049-58, 1971.
6. BELL, J. F.; SANCHO, M. I.; DIAZ, A. M.; MOORE, G. J. — Nafatal rabies in an enzootic area: results of a survey and evaluation of techniques. *Amer. J. Epidemiol.*, 95:190-8, 1972.
7. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS — Prueba de anticorpos fluorescentes para rabia. *Nota téc. Centro Panam. Zoonosis*, (8):1-23, 1969.
8. CONSTANTINE, D. G. — Transmission experiments with bat rabies isolates responses of certain carnivora to rabies virus isolated from animals infected by nonbite route. *Amer. J. Vet. Res.*, 27:13-5, 1966.
9. DEAN, D. J. — The fluorescent antibody test. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory techniques in rabies*. 2nd. ed. Geneve, 1966. p. 59-68. (WHO Monogr. Ser., 23).
10. HATTWICK, M. A. W.; WEIS, T. T.; STECHSCHULTE, C. J.; BAER, B. M.; GREG, M. B. — Recovery from rabies. *Ann. Intern. Med.*, 76:931-42, 1972.
11. JOHNSON, H. N. — Derriengue: vampire bat rabies in Mexico. *Amer. J. Hyg.* 47:189-204, 1948.
12. JOHNSON, H. N. — Rabies. In: RIVERS, T. M. & HORSFALL, F. L., *Viral and rickettsial infections of man*. Philadelphia, J. B. Lippincot, 1959.
13. MARKUS, H. L.; JOBIM, G. O.; JOBIM, G. B. — Cura espontânea de raiva em cão experimentalmente infectado. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 67:101-7, 1969.
14. NILSSON, M. R. — Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 68:486-94, 1970.
15. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-7, 1938.
16. REMLINGER, P. — La guérison spontanée de la rage expérimentale du chien et la persistance du virus rabique das la salive des animaux guéris. *Rec. Med. Vet., Ec. Alfort*, 84:269-80, 1907.
17. SCHNEIDER, L. G. — The cornea test: a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. *Zentrabl. Vet. Med.: Reike B*, 16:24-31, 1968.
18. SILVA, R. A. & CUNHA, R. G. — Vacinas anti-rábicas com hidróxido de alumínio e provas para controle de sua eficiência. *Rev. bras. Biol.*, 33:127-34, 1973.
19. VEERARAGHAVAN, N.; GAJANANA, A.; RANGASSAMI, R.; CONNUNNI, P. T.; SARASWATHI, K. C.; DEVARAJ, R.; HALLAN, K. M. — Studies on the salivary excretion of rabies virus by the dog from Surandai. *Sci. Rep. Pasteur Inst. st. India*, p. 66, 1969.

Recebido para publicação em 14-8-75

Aprovado para publicação em 17-9-75