

# DEMONSTRAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTIGENO RÁBICO NAS GLÂNDULAS SALIVARES SUBMAXILARES E PAROTIDAS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS. EMPREGO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA EM IMPRESSÕES DE TECIDO GLANDULAR SEMI-MACERADO

VALDSON DE ANGELIS CORTES  
Professor Assistente Doutor  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da UNESP

FUMIO HONMA ITO  
Professor Assistente Doutor  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP

SILVIO ARRUDA VASCONCELLOS  
Professor Livre Docente  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP

JOSE DE ANGELIS CORTES  
Professor Titular  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP

CORTES, V.A.; ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A.; CORTES, J.A. Demonstração da presença de antígeno rábico nas glândulas salivares submaxilares e parótidas de cães naturalmente infectados. Emprego da reação de imunofluorescência direta em impressões de tecido glandular semi-macerado. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 24(2):181-186, 1987.

**RESUMO:** As glândulas salivares submaxilares e parótidas de 30 cães, naturalmente infectados pelo vírus da raiva, foram examinadas mediante a reação de imunofluorescência direta (IFD), aplicada a raiva em impressões obtidas do tecido glandular semi-macerado. Os controles adotados foram o exame de tais glândulas através da técnica de inoculação intracerebral em camundongos (IIC) e a pesquisa da presença do vírus rábico no corno de Ammon dos respectivos

animais, segundo as técnicas de IFD e de IIC. As glândulas salivares submaxilares e o corno de Ammon foram positivos em todas as oportunidades para as técnicas de IFD e IIC. As glândulas salivares parótidas revelaram um resultado negativo frente às duas técnicas referidas e 11 resultados discordantes, dos quais cinco IFD negativa-IIC positiva e seis IFD positiva-IIC negativa. Os valores observados demonstraram um bom comportamento para o exame das glândulas salivares submaxilares pela IFD aplicada à raiva em impressões do tecido glandular semi-macerado. Esta metodologia oferece um novo instrumento para o estudo da patogenia da raiva, particularmente em investigações que procurem esclarecer a presença do vírus ao nível dos órgãos envolvidos com a sua transmissão.

**UNITERMOS:** Raiva, cães; Diagnóstico; Glândulas salivares

## INTRODUÇÃO

A sistemática atualmente disponível para o diagnóstico laboratorial da raiva em animais domésticos e silvestres implica no exame de amostras de sistema nervoso central, segundo três tipos de procedimentos: técnicas histoquímicas, (2,4); reação de imunofluorescência direta (IFD) (2,6,8) e a prova biológica de inoculação intracerebral em camundongos (IIC) (2,4)

Dentre as técnicas que permitem a obtenção de resultados em curto espaço de tempo destaca-se a de imunofluorescência direta (IFD), pela excelência dos resultados relativos às características de sensibilidade e de especificidade (8,10)

A IFD pode ser aplicada tanto a cortes de tecido por congelamento, (3), como também a impressões obtidas pela compressão do material suspeito em lâminas de microscopia, (8). Esta última metodologia foi a que encontrou maior aplicação, tendo em vista a sua facilidade de execução.

Saliente-se, no entanto, que os estudos sobre a patogenia da raiva têm procurado investigar a presença do vírus em materiais não provenientes do sistema nervoso central. (1,8,13). Neste particular, o exame das glândulas salivares tem se revelado de grande interesse. (1,3,7,9,11,13,14,19).

De fato, a disponibilidade de métodos práticos e efetivos, capazes de demonstrar a presença do vírus da raiva

nas glândulas salivares de animais domésticos ou silvestres, constitui instrumento de trabalho de grande importância para o estudo da epidemiologia desta temível zoonose, (9,11,15,17,18)

Se o exame de glândulas salivares submaxilares pela IFD aplicada a cortes de tecido por congelamento tem apresentado resultados promissores, (3), as tentativas de aplicação de tal técnica e impressões de tecido glandular tem oferecido resultados irregulares, (5,7). Talvez esta discordância seja consequência da dificuldade observada na elaboração das impressões a partir de fragmentos de glândulas salivares, pois a consistência destes materiais é muito mais firme do que aquela verificada em espécimes de sistema nervoso central.

Deste modo, o presente trabalho tem por objetivo o exame de glândulas salivares submaxilares e parótidas de cães naturalmente infectados pelo vírus da raiva, aplicando-se o processo da semi-maceração do tecido glandular a fim de facilitar a obtenção das impressões a serem tratadas pela IFD aplicada à raiva.

Os parâmetros utilizados para o controle foram o exame das glândulas salivares pela IIC e o estudo do tecido cerebral dos respectivos animais pelas técnicas de IFD e IIC.

## MATERIAL E METODOS

O substrato básico no presente trabalho consistiu das glândulas salivares submaxilares e parótidas e dos encéfalos de 30 cães que apresentaram óbito natural, após terem manifestado sintomas compatíveis com a raiva.

O sistema biológico adotado para isolamento do vírus foi representado por camundongos albinos sulcos da linhagem CH-3/Rockefeller, adultos jovens, pesando de 12 a 15 gramas, distribuídos em grupos de oito indivíduos.

O conjugado utilizado na reação de IFD foi o soro anti-rábico, marcado com o isotiocianato de fluoresceína, produzido pelo Centro Panamericano de Zoonoses da Organização Panamericana de Saúde, com diluição ótima de trabalho de 1:60.

O diluente empregado no preparo das suspensões tissulares foi constituído por água destilada com 2,0% de soro eqüino normal (previamente inativo a 56°C por 30 minutos) e o antibiótico cloridrato de lincomicina na concentração final de três miligramas

por mililitro.

As glândulas salivares parótidas foram colhidas por incisão da pele e do tecido conjuntivo subjacente à região auricular, no sentido infero-superior, contornando a base do pavilhão auricular e removendo o tecido de revestimento. Após a exposição, os respectivos órgãos foram extraídos e armazenados em placas de Petri estéreis, mantidas em temperatura de 20°C negativos, enquanto se aguardava o processamento.

As glândulas salivares submaxilares foram colhidas segundo a técnica descrita por TIERKEL, 16 (1976).

Os procedimentos executados para o exame das glândulas salivares pelas técnicas de IFD e de IIC foram os seguintes: cada órgão foi fracionado, de modo a fornecer uma amostra que contemplasse porções de diversas áreas com um peso final de duas gramas. Esta amostra foi fragmentada, inicialmente com uma tesoura e, a seguir, submetida à primeira etapa de maceração em gral e pistilo, sob condições de assepsia. Neste estágio do processamento, dos pequenos fragmentos de tecido semi-macerado, foram preparadas as impressões em dois campos de cada uma de oito lâminas de vidro, destinadas à microscopia de fluorescência. O tecido glandular foi, então, submetido à segunda etapa de maceração, agora auxiliada pela adição de areia estéril e prosseguindo-se no processo de trituração até que o material assumisse uma consistência totalmente pastosa. Nesta ocasião foi acrescentado o diluente em quantidade suficiente para o preparo da suspensão a 20% (peso/volume) a qual, após sofrer centrifugação a 1.500 rotações por minuto durante cinco minutos, teve o seu sobrenadante como o inóculo utilizado na técnica de IIC, (19)

Do encéfalo de todos os animais o material escolhido como representante do sistema nervoso central foi o processado segundo as técnicas convencionais para o diagnóstico da raiva, (2,6,19)

A reação de IFD foi conduzida conforme o preconizado por GOLDWASSER & KISSLING, 6 (1958).

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste da binomial para a comparação de duas proporções em populações relacionadas, conforme SIEGEL, 12 (1955). O nível de significância adotado foi o de 0,05.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos estão expos-

tos na tabela apresentada a seguir que relaciona os 30 cães naturalmente infectados pelo vírus da raiva, segundo o número de identificação, o tipo de material examinado, a técnica utilizada e a natureza do resultado.

A observação desta tabela demonstra que nas glândulas salivares parótidas as proporções de resultados positivos foram de 24/30 (80,00%) e de 23/30 (76,66%), respectivamente para as técnicas de IFD e de IIC. Em tais exames as duas técnicas foram concordantes em 19 ocasiões, das quais 18 (60,00%) com resultado positivo e uma (3,33%) com resultado negativo. Os 11 resultados discordantes apresentaram o seguinte comportamento: cinco IFD-negativa/IIC-positiva e seis IFD-positiva/IIC-negativa.

Prosseguindo no exame dos resultados constantes da referida tabela, pode-se constatar que as glândulas salivares

submaxilares e os cornos de Ammon demonstraram o percentual de positividade de 100,00% (30/30) frente às duas técnicas utilizadas (IFD e IIC).

A proporção de resultados positivos, verificada mediante às técnicas de IFD e de IIC nos exames de espécimes de corno de Ammon e de glândula salivar submaxilar (30/30), foi significativamente superior ( $p < 0,02$ ) àquela verificada para os exames das glândulas salivares parótidas, com os valores de 24/30 e de 23/30, respectivamente para as técnicas de IFD e de IIC.

A análise interna das diferenças observadas nos resultados dos exames das glândulas salivares parótidas pelas duas técnicas aplicadas (IFD e IIC), não apresentou significado estatístico ( $p = 0,5$ ) ao nível adotado para a rejeição da hipótese de nulidade.

TABELA: Resultados de exames laboratoriais para a raiva em cães naturalmente infectados, segundo a identidade do animal, o tipo de espécime colhido e a técnica utilizada. São Paulo, 1987.

ESPECIMENS ANIMAIS	GLANDULAS SALIVARES				ENCEFALO	
	PAROTIDAS		SUBMAXILARES		IFD	IIC
	IFD	IIC	IFD	IIC		
01	P	P	P	P	P	P
02	P	P	P	P	P	P
03	P	P	P	P	P	P
04	P	P	P	P	P	P
05	P	P	P	P	P	P
06	P	P	P	P	P	P
07	P	P	P	P	P	P
08	P	P	P	P	P	P
09	P	P	P	P	P	P
10	N	P	P	P	P	P
11	N	P	P	P	P	P
12	N	P	P	P	P	P
13	P	P	P	P	P	P
14	N	P	P	P	P	P
15	P	P	P	P	P	P
16	P	P	P	P	P	P
17	P	P	P	P	P	P
18	P	N	P	P	P	P
19	P	P	P	P	P	P
20	P	N	P	P	P	P
21	P	N	P	P	P	P
22	P	N	P	P	P	P
23	N	N	P	P	P	P
24	P	P	P	P	P	P
25	P	P	P	P	P	P
26	P	N	P	P	P	P
27	P	P	P	P	P	P
28	P	N	P	P	P	P
29	P	P	P	P	P	P
30	N	P	P	P	P	P
TOTAL	24/30*	23/30	30/30	30/30	30/30	30/30
% DE POSITIVOS	80,00	76,66	100,00	100,00	100,00	100,00

IFD - Imunofluorescência direta  
 IIC - Inoculação intracerebral em camundongos  
 N - Negativo  
 P - Positivo  
 \* - Positivos/examinados

## DISCUSSÃO

A positividade para a raiva, observada no corno de Ammon dos 30 cães examinados tanto pela IIC como pela IFD, demonstra que, de fato, o grupo de animais observado estava efetivamente infectado pelo vírus da raiva. Esta condição foi considerada como parâmetro para a avaliação da sensibilidade das técnicas aplicadas às glândulas salivares submaxilares e parótidas.

A obtenção de resultados positivos pela IIC, em todos os exames das glândulas salivares submaxilares, caracteriza outro parâmetro, pois confirma a existência da etapa de difusão centrifuga do vírus rábico do sistema nervoso central até as glândulas salivares submaxilares, em todos os indivíduos examinados.

A constatação de resultados positivos na IFD em todas as impressões de glândula salivar submaxilar, obtidas após a semi-maceração do tecido glandular, ressalta que esta metodologia apresentou elevada sensibilidade para estabelecer o diagnóstico da raiva, bem como para demonstrar a presença do antígeno rábico ao nível de um dos principais órgãos implicados na transmissão do agente etiológico desta importante zoonose.

De fato, o conhecimento da existência do vírus da raiva nas glândulas salivares de animais agressores assume aspecto de capital importância para a avaliação do risco da infecção nos indivíduos agredidos.

Os exames das glândulas salivares parótidas com sensibilidade de 80,0% pela IFD e de 76,66 % pela IIC salientam que este tipo de material tem menor valor para o diagnóstico da raiva do que as glândulas salivares submaxilares e o corno de Ammon.

Persistindo na análise dos resultados dos exames realizados nas glândulas salivares parótidas, verifica-se a existência de resultados discordantes entre a IFD e a IIC, em 11 oportunidades. Este

tipo de comportamento poderia ser explicado tanto por uma irregularidade na distribuição do vírus, como é citado por GOLDWASSER et alii, 7 (1959) e por CARSKI et alii, 5 (1962), como também por uma possível participação de substâncias inibidoras do vírus, como foi referido por WILSNACK & PARKER, 20 (1966) em animais silvestres e por SILVA & SILVA, 13 (1973) em cães.

CORTES, V.A.; ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A.; CORTES, J.A. Demonstration of rabies antigens in the submaxillary and parotid salivary glands of naturally infected dogs. Use of the fluorescent antibody (FA) technique on smears of semi-ground salivary gland tissue. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 24(2):181-186, 1987.

SUMMARY: Submaxillary and parotid glands of 30 naturally rabies infected dogs were examined using the direct fluorescent antibody (FA) technique on tissue smears of semi-ground salivary glands. Mouse inoculation (MI) tests of all examined salivary glands were run in parallel and the rabies diagnosis was confirmed by means of FA and MI tests of materials taken from the Ammon's horn. Specimens taken from the submaxillary glands and Ammon's horn were 100.0% positive for FA and MI tests, however, for the specimens taken from the parotid glands it was found one negative result with both FA and MI test and 11 discrepancies: five FA negative - MI positive results and six FA positive - MI negative results. The results found in this experiment demonstrated the practicality of the FA test using smears of semi-ground salivary glands. This technique should become an alternative tool for the study of rabies pathogenesis, especially for the search of the rabies virus associated with the organs involved in the virus transmission.

UNITERMOS: Rabies; Dogs; Diagnosis; Salivary glands

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - AFSHAR, A.; BAHMANYAR, M.; FAYAZ, A. A contribution to the detection of inaparent rabies in stray dogs. Occurrence of

precipitating antibodies in sera and antigens in salivary glands and saliva. Vet. Rec., 91:562-565, 1972.

- 2 - ATANASIU, P. Animal inoculation and Negri bodies. In: BAER, G.M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v.1. p.373-400.
- 3 - BEAUREGARD, M. & CASEY, G.A. Demonstration of rabies antigen in salivary glands of rabies suspected animals. *Canad.J.comp. Med.*, 33:55-58, 1969.
- 4 - BEAUREGARD, M.; BOULANGER, P.L. WEBSTER, W.A. The use of fluorescent antibody staining in the diagnosis of rabies. *Canad.J.comp.Med.*, 29:141-147, 1965.
- 5 - CARSKI, T.R.; WILSNACK, R.E.; SIKES, R.K. Pathogenesis of rabies in wildlife. II. Fluorescent antibody studies. *Am.J.vet.Res.*, 23:1048-1052, 1962.
- 6 - GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc.Soc.exp.Biol.*, 98:219-223, 1958.
- 7 - GOLDWASSER, R.A.; KISSLING, R.E.; CARSKI, T.R.; CARSKI, T.S. Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. *Bull.World Hlth.Org.*, 20:579-580, 1959.
- 8 - KISSLING, R.E. The fluorescent antibody in rabies. In: BAER, G.M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975, v.1. p.401-416.
- 9 - MC QUEEN, J.L.; LEWIS, A.L.; SCHNEIDER, N.J. Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I. Evaluation in a public health laboratory. *Amer.J. publ.Hlth.*, 50:1743-1752, 1960.
- 10 - MARTELL, D.M.A. & ALDASORO, M.A. Deteccion de virus rábico. *Bol.Ofic.sanit.pan.amer.*, 73:117-123, 1972.
- 11 - SCHARF, J. & CHARL, E. Virus localization in rabies. *Dtsch.tierarztl.Wschr.*, 75:315-323, 1968.
- 12 - SIEGEL, S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York, McGraw Hill, 1956.
- 13 - SILVA, R.A. & SILVA, N.M. Infecção rábica em cão com presença de vírus virulento nas glândulas salivares e avirulência no encéfalo. *Pesq.Agropec. bras.*, Sér.Vet., 8:89-90, 1973.
- 14 - SILVA, R.A. & SOUZA, A.M. Ocorrência do vírus da raiva em diferentes tecidos de cão na doença natural. *Pesq.Agropec. bras.*, Sér.Vet., 3: 317-318, 1968.
- 15 - SUBRAHMANYAN, B. & PATHAL, R.C. Diagnosis of rabies in dogs. Comparison on microscopic, biological and fluorescent antibody tests for diagnosis. *Indian vet.J.*, 48:123-127, 1971.
- 16 - TIERKEL, E.S. Envío de muestras y técnicas de preparación de los tejidos animales. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. La rabia: técnicas de laboratorio. 3.ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. p.29-57. (Série de monografias, 23).
- 17 - VAUGHN, J.B.; GERHARDT, P.; NEWELL, K.W. Excretion of street rabies virus in the saliva of dogs. *J.Amer.med.Ass.*, 193:363-368, 1965.
- 18 - VEERARAGHAVAN, N.; BALASUBRAMANIAN, A.; RANGASWAMI, R. Virus content of brains and

submaxillary glands and occurrence of Negri bodies in animals suspected of having died of natural rabies infection. Bull. World Hlth.Org., 18:469-471, 1958.

19 - 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., 32:570-573, 1935.

20 - WILSNACK, R.E. & PARKER, R.L. Pathogenesis of skunk rabies virus. Rabies inhibitory substance as related to rabies diagnosis. Am.J.vet.Res., 27:39-43, 1966.

Recebido para publicação em 25/02/87  
Aprovado para publicação em 01/04/87