

RAIVA EXPERIMENTAL EM CÃES INOCULADOS COM UMA AMOSTRA ISOLADA DE RAPOSA (*Pseudalopex vetulus*)

Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva

Mestranda em Medicina Veterinária de Ruminantes e Equídeos, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, 58700-970 Patos, PB, Brasil.

Fabiano da Silva Lima

Mestre em Medicina Veterinária de Ruminantes e Equídeos CSTR, UFCG.

Karla Moraes Rocha Guedes

Mestre em Medicina Veterinária de Ruminantes e Equídeos CSTR, UFCG.

Albério Antônio de Barros Gomes

Professor Adjunto da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, CSTR, UFCG. E-mail: alberiogomes@bol.com.br

RESUMO - Os cães, bastante difundidos no semi-árido nordestino, estão expostos ao ataque de raposas, freqüentemente encontradas com raiva na região. Com o objetivo de verificar o comportamento biológico, patogenicidade e a susceptibilidade de cães jovens à infecção experimental com vírus rábico isolado de raposa, foram infectados cinco cães. Os animais foram inoculados no músculo masseter com a amostra R1 (V 915; GenBank AY 962059) e mantidos no canil do HV do CSTR/ UFCG. Apenas um dos cães apresentou sintomatologia característica da raiva, com período de incubação de 99 dias e evolução clínica de cinco dias. Nas provas de IFD e ICC todos os tecidos do SNC e glândula parótida, tireóide e supra-renal foram positivos, e negativos para fígado, pulmão, coração, rim, baço, língua, esôfago e linfonodos. O diagnóstico morfológico à histopatologia constatou encefalite não supurativa, difusa discreta com corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos nos neurônios de Purkinge. Após 180 dias de observação os animais foram eusacrificados e apresentaram IFD, ICC e Exame histopatológico negativos. A amostra testada apresentou comportamento biológico compatível com o genotipo I dos *Lyssavirus*, mostrando-se patogênica para cães.

PALAVRAS CHAVE: Vírus rábico, Epidemiologia, patogenicidade, susceptibilidade.

EXPERIMENTAL RABIES IN DOGS INOCULATED WITH AN ISOLATED SAMPLE OF FOX (*Pseudalopex vetulus*)

ABSTRACT - Dogs are common in the rural zone of the northeastern Brazil, frequently being exposed to the attack of rabid foxes. With the objective of verifying the biological behavior, pathogenicity and susceptibility of young dogs to the experimental infection with a hoary fox (*Dusicyon vetulus*) virus isolate, five dogs without defined race were inoculated into the masseter muscle with 0.1 mL of a 10% brain suspension of the rabies virus isolate R1 (V 915; GenBank AY 962059). The 50% end-point dilution of the virus was $10^{3.25}/0.03$ mL for intracerebral inoculation in 21 day-old mice. The dogs were maintained in the kennel of HV of CSTR / UFCG for 180 days. One of the dogs presented symptoms characteristic of rabies, with the incubation period of 99 days and five days of clinical course. By the FA and MI tests, samples of CNS and parotid, thyroid and suprarenal glands were positive, and negative for liver, lung, heart, kidney, spleen, tongue, esophagus and lymph node tissues. Histological lesions showed signs of diffuse non-suppurative encephalomyelitis, with intracytoplasmic inclusion bodies in the neurons of Purkinge's cells. The other sacrificed dogs presented negative results by FA, MI and Histologic examinations. The fox isolate presented biological behaviors compatible to those described for other genotype I lyssaviruses, being pathogenic for dogs. Dogs are susceptible to rabies virus of fox origin.

Keyword: Rabies virus, Epidemiology; pathogenicity; susceptibility.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença viral com distribuição mundial, acometendo animais domésticos e silvestres, causando uma encefalomielite aguda (WILKINSON, 1988).

O agente etiológico pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e ao gênero *Lyssavirus*, apresentando uma morfologia característica em forma de bala de revólver, diâmetro de 75 nm e comprimento de 100 a 300 nm (TORDO, 1996).

A epidemiologia da raiva depende da transmissão do vírus de um indivíduo infectado a outro susceptível, principalmente através da saliva (KAPLAN, 1985). O período de incubação, mais comum varia de 30 a 90 dias. No entanto, existem casos que o período de incubação é de poucos dias, e outros de até mais de um ano. Variando em função da quantidade de vírus inoculado no animal, do tipo de vírus, do local de penetração e da área da mordedura e da adaptação das amostras ao sistema biológico utilizado (GERMANO et al., 1988).

O principal reservatório da raiva humana é o cão enquanto que para os herbívoros são os morcegos, raposas e cães. Os cães são fonte de infecção, devido sua popularidade. No mundo, existem diferenças entre as espécies capazes de atuarem como reservatórios da doença e das diversas formas que elas interagem em seus habitat (KAPLAN, 1985).

No Brasil, conforme a Organização Pan-Americana de Saúde (2001) foram registrados 61 casos de raiva em animais silvestres no ano de 2000, dos quais 22 ocorreram em raposas. Com relação à raposa do Nordeste (*Dusicyon vetulus*), existem registros da doença no Estado do Ceará (BARROS et al., 1989), Paraíba (GOMES, 2004), Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (ARAÚJO, 2002).

Em Patos, no semi-árido paraibano, o animal silvestre mais envolvido em agressões a humanos tem sido a raposa. No período de 15 de agosto de 2000 a 11 de fevereiro de 2003, 24 pessoas foram agredidas por raposas e atendidas na Unidade Básica de Saúde Aderban Martins, no Município de Patos-PB (SOUZA, 2003).

Os cães são bastante difundidos no semi-árido nordestino e as campanhas de vacinação anual não são suficientes para imunizar o grande número de animais nascidos nesse intervalo. Na zona rural não existe nenhum controle de natalidade, é grande o número de cães jovens e não imunizados, constituindo assim, uma população de susceptíveis exposta ao ataque de carnívoros silvestres, principalmente as raposas que são vistas com frequência tanto no meio rural como próximo à periferia das cidades e nas rodovias, onde são frequentemente atropeladas.

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento biológico e a patogenicidade de uma amostra de vírus rábico de raposa, autóctone da região semi-árida paraibana, bem como, a suscetibilidade de cães domésticos à infecção experimental por via intramuscular.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco cães sem raça definida, de uma mesma ninhada sendo de uma matriz com histórico de imunização anti-rábica nos últimos sete anos. Estes foram mantidos em baias individuais no canil do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (CSTR/UFCG), por um período de adaptação de 30 dias. Foram vermifugados e 21 dias após repetiu-se a vermifugação, ainda na fase de adaptação.

Os cães com 68 dias de vida foram inoculados no músculo masseter direito com 0,1 mL de uma suspensão a 1:10 p/v preparada a partir de cérebro de camundongo previamente inoculados com a amostra de vírus isolado de raposa (*P. vetulus*) na sua primeira passagem, contendo entre 300 e 1000 DL₅₀.

Estes foram observados por um período de 180 dias após o desafio, para verificação dos períodos de incubação e evolução clínica da doença. Os cães que sobreviveram esse período foram submetidos à eutanásia seguindo o protocolo sugerido pela comissão de Bioética do CSTR/UFCG: aplicação de 0,5mg/kg de xilazina por via intravenosa (IV), 15 minutos após, aplicação de 12,5 mg/kg de tiopental sódico por via IV e 3 minutos após, aplicação de éter etílico por via inalatória.

A amostra de vírus rábico utilizada para desafio foi a R1 (V 915; GenBank AY 962059) procedente de raposa (*D. vetulus*) isolada e mantida pelo Laboratório de Virologia do CSTR/UFCG, amostra esta submetida a tipificação antigênica e genética com base no gene M1, realizada no "Canadian Food and Inspection Agency", Fallowfield, Ottawa, Canadá, patrocinado pela IICA – "Inter-American Institutes for Cooperation on Agriculture" (BERNARDI et al, 2005) e caracterização genética do gene N no laboratório do "National Institute of Infectious Diseases", Toyama, Tóquio, pelos pesquisadores do "College of Bioresources Sciences" da Nihon University, Kanagawa, Japão (SHOJI et al., 2006).

A amostra foi reativada após uma passagem por via intracerebral camundongos (ICC), a partir de uma suspensão a 10% p/v de cérebros dos camundongos infectados. Sendo titulada pelo método de Reed & Muench. (MESLIN, 1996)

À necropsia colheram-se amostras do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula cervical, torácica e lombar), e alguns órgãos como fígado, pulmão, coração, rim, glândula parótida, tireóide, supra-renal, baço, língua, esôfago e linfonodo para a imunofluorescência direta (IFD) de acordo com Dean et al., (1996) e ICC conforme a metodologia descrita por Koprowski (1996) e exame histopatológico corado com hematoxilina – eosina.

O título encontrado para a amostra inoculada após sua primeira passagem em camundongos de 21 dias foi de 10^{3,25}/0,03mL por via intracerebral.

Dos cinco cães apenas um apresentou sintomatologia nervosa característica da raiva. Durante o período de incubação que foi de 99 dias, todos os parâmetros fisiológicos mantiveram-se normais. Os sinais observados foram: movimentos laterais da cabeça, prurido no músculo masseter direito e na região orbicular direita, letargia, desidratação leve evoluindo para grave, ausência de reflexo de deglutição, fasciculações musculares generalizadas, sinais de incoordenação: ataxia, paresia dos membros torácicos e andar em círculo. Devido à dispnéia mixta, tentava assumir a posição de cão sentado caia ficando em decúbito lateral com dificuldade para levantar. Apresentava movimentos de pedalagem, claudicação, e arqueamento dorsal. Apresentava também hiperexcitabilidade, taquicardia, hipertermia, congestão ocular, movimentos mastigatórios irregulares, anorexia, urinou várias vezes em pequenas quantidades, defecando uma pequena quantidade de fezes liquefeitas. Apresentou uns cinco segundos de agressividade. A evolução clínica durou cinco dias.

Às provas de IFD e ICC mostraram-se positivas para o sistema nervoso central e as glândulas parótida, tireóide e supra-renal, enquanto que para fígado, pulmão, coração, rim, baço, língua, esôfago e linfonodo apresentaram-se negativas, nos tecidos do cão que apresentou sintomatologia nervosa.

A histopatologia não foram encontradas lesões histológicas significativas no córtex frontal, córtex temporal, córtex occipital e no hipocampo; focos discretos de infiltrado mononuclear no neurópilo e nos núcleos da base; discreto infiltrado mononuclear perivascular no tálamo e no colículo rostral; discreto infiltrado mononuclear na ponte e pedúnculo; discreto infiltrado mononuclear perivascular no neurópilo e no óbex; corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos nos neurônios de Purkinje no cerebelo; discreto infiltrado perivascular nas medulas cervical, torácica e lombar; Acentuada congestão: no fígado e pulmão; não foram encontradas lesões histológicas significativas no coração, rim, glândula parótida, tireóide, supra-renal, linfonodo, baço; Focos de infiltrado neutrofilico no epitélio e entre as fibras musculares da língua. Ao diagnóstico morfológico da histopatologia constatou-se encefalite não supurativa, difusa discreta com corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos nos neurônios de Purkinje e glossite neutrofilica multifocal moderada.

Aos 180 dias de observação os outros animais foram sacrificados, para colheita de materiais visando à confirmação do diagnóstico. Todas as provas de IFD, ICC e Exames histopatológicos apresentaram-se negativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variabilidade de sinais clínicos pode ser determinada pelo título de vírus no inóculo, pela patogenicidade da cepa viral, pela proximidade entre o local de inoculação e o encéfalo e pelo estado imune do

animal (JUBB e HUXTABLE, 1993). O título encontrado nesse trabalho foi menor que o observado por Jayakumar et al., (1990) em uma amostra de cão, podendo ter relação com a variação nos resultados.

Jayakumar et al., (1990) relataram em infecção experimental com vírus em cães que o período de incubação foi diferente, nos cães que apresentaram raiva furiosa média de 17 dias, na raiva paralítica média de 32 dias. No nosso caso o período de incubação foi de 99 dias, o que concorda com as informações de Tierkel (1959) que mostra que em cão pode variar de dez dias até seis meses.

Usualmente classifica-se o curso clínico da raiva em três fases: prodrômica, excitatória e paralítica, estas fases podem apresentar variabilidade de sinais e extensões irregulares (TIERKEL, 1959; ROBINSON e FISHBEIN, 1991) No entanto, o curso clínico de cinco dias observado neste experimento, caracterizou-se apenas em duas fases: uma prodrômica e outra paralítica.

O isolamento do vírus a partir de emulsões de supra-renal e parótida confirma a presença do vírus em outros órgãos além do sistema nervoso o que condiz com achados de Silva e Souza (1968).

Dantas et al., (2001) encontraram as seguintes alterações microscópicas em um cão naturalmente infectado com o vírus da raiva. No encéfalo observaram-se manguitos perivasculars mononucleares. Havia microgliose, degeneração neuronal, múltiplas áreas de hemorragia no hipocampo e no tronco encefálico e a presença de inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas em neurônios do hipocampo. Observou-se também infiltrado inflamatório semelhante no Gânglio trigêmio, nas glândulas salivares e nas adrenais; e macroscópicas após ser fixado como: áreas puntiformes avermelhadas no diencéfalo, no tronco encefálico e na porção inicial da medula espinhal, estas alterações não foram encontrados no cão infectado com vírus de raposa.

A amostra R1 já foi inoculada em caprinos e ovinos, que apresentaram um período de incubação com intervalo de 17 a 20 dias, mostrando perda de apetite, dificuldade de apreensão e mastigação, bruxismo, prurido intenso no local de inoculação, incoordenação motora, decúbito lateral, fasciculações musculares e movimentos de pedalagem (GOMES et al., 2005). Estes mesmos sintomas também foram observados no cão. Porém a sialorréia intensa nos cães, descrita por Robinson e Fishbein, (1991), Dantas et al., (2001) e por Gomes et al., (2005) nos caprinos e ovinos não foi verificada no nosso experimento.

Lima et al., (2005) associa um caso de raiva em ovino a um cão que tinha sido mordido anteriormente por uma raposa. Radostits et al., (2002) relata que a raiva pode ser transmitida por carnívoros, devido à facilidade com que os ovinos são agredidos por cães ou raposa. A susceptibilidade do cão observada neste experimento ao vírus originário de raposa reforça a importância dessas espécies na epidemiologia da doença na região semi-árida do Nordeste.

Rupprecht et al., (2002) considera o cão como maior reservatório e vetor causando 35000 mortes em humanos por ano. Sendo considerado de susceptibilidade moderada a infecção com vírus rábico, enquanto a raposa é extremamente sensível, isto baseado em DL₅₀ por via intramuscular em camundongos (Kaplan 1985). Neste experimento de cinco animais infectados apenas um (20 %) apresentou sintomas no período observado, deixando evidente que o vírus prevalente na raposa do semi-árido pode ser uma ameaça à saúde humana.

O fato de apenas um dos cães ter apresentado evolução clínica da raiva, pode ser creditado à interferência de anticorpos maternos. Mesmo que seja procedente de cadela vacinada com a dose utilizada foi capaz de reproduzir a doença.

CONCLUSÕES

A amostra de vírus R1 (V 915, Genbank AY 962059) apresentou comportamento biológico compatível com o genótipo I dos *Lissavirus*, mostrando-se patogênica para o cão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F.A.A. *Raiva humana no Brasil: 1992-2001*. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2002. 90 f.

BARROS, J. S.; FREITAS, C. E. A. A. de; SOUSA, F. S. de. Raiva em animais silvestres no Estado do Ceará particularmente na raposa (*Dusicyon vetulus*). *Zoonoses revista internacional*, v. 1, n.1, p. 9-13, 1989.

BERNARDI, F.; NADIN-DAVIS, S.A.; WANDELER, A.I.; ARMSTRONG, J.; GOMES, A.A.B.; LIMA, F. S.; NOGUEIRA, F.R.B.; ITO, F.H. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *Journal of General Virology*. v.86, p. 3153-3162, 2005

DANTAS, A.F.M.; BENETTI, A.H.; GRECCO, E.B.; COLVARA, I. G. Lesões macroscópicas no encéfalo de um cão com raiva. X Encontro Nacional de Patologia Veterinária (X ENAPAVE). Funep, Jaboticabal, 2001.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed. Geneva: World Health Organization, p. 88-95. 1996.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M. M.; SILVA, E. V. Avaliação de três cepas de vírus rábico antigenicamente distintas, em camundongos. I. Estudo dos períodos de observação clínica. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 22, p. 375-383, 1988.

GOMES, A.A.B. 2004. *Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 107p.

GOMES, A.A.B.; BERNARDI, F.; OLIVEIRA, A.G.F.; ITO, F.H.; MAIORKA, P.C.; SOARES, R.M.; HEINEMANN, M.B.; CORTEZ, A.; RICHTZENHAIN, L.J. Raiva experimental em caprino e ovinos inoculados com uma amostra de vírus isolada de raposa (*Dusicyon vetulus*). *Ciência Veterinária nos Trópicos, Pernambuco*. v.8, n.1/2/3. p. 29-34. 2005

JAYAKUMAR, R.; RAMADASS, P.; NEDUNCHELLIAN, S. Experimental Infection With Street rabies virus in dogs. *Indian Journal of Animal health*, June, v. 29, p. 9-11, 1990

JUBB, K. V. F.; HUXTABLE, C. R. The nervous system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEY, P. C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. 4 ed. San Diego: Academic, v. 3, cap. 3, p. 267-439, 1993.

KAPLAN, C. Rabies: a worldwide disease. In: BACON, P. J. (ed.), *Population dynamics of rabies in wildlife*. London: Academic Press, p. 1-21.1985.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneve: WHO, p. 80-87. 1996.

LIMA, E.F.;RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S. de; GOMES, A.A.B.; LIMA, F.S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 25, n. 4, p. 250-264, 2005.

MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. 1996. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneve: WHO, 476 p.

ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD (Rio de Janeiro) Boletín: Vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas. v. XXXIII, 2001. 40 p.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, D.C. *Clinica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

ROBINSON, L. E. & FISHBEIN, D. B. Rabies. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery* (Small Animal), v. 6, n. 3, p. 203-211, 1991

RUPPRECHT, C.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 2, 327- 343, 2002.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; GOMES, A.A.B.; ITOU, T; ITO, F.H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraíba, Brazil. *Acta virologica*. 50: 33-38, 2006.

SILVA, R. A. & SOUZA, A. M. Ocorrência do Vírus da Raiva em Diferentes Tecidos de Cão na Doença Natural. *Boletim Técnico nº57*. Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-sul. v. 3, 1968.

SOUSA, M. H. Livro de Registro Permanente de Controle da Vacina Anti-rábica Humana. Unidade Básica de Saúde Aderban Martins, Patos-PB, p. 01 – 18, 2003

TIERKEL, E.S. Canine Rabies. In: GEORGE M. B. ed. *The Natural History of Rabies*. New York, Academic Press New York, 1975.

TIERKEL, E.S. Rabies. *Advances in Veterinary science*. V. 5. p. 183-226, 1959.

TORDO, N.; Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F.-X.;KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. *Laboratory techniques in rabies*. Fourth Edition. Geneva. World Health Organization. 1996. p. 28 – 51.

WILKINSON, L. Understanding the nature of rabies: an historical perspective. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. ed. *Rabies*. Boston, Kluwer Academic, 1988. p.1-23.