

## EMPREGO DO RATO BRANCO COMO SISTEMA BIOLÓGICO ALTERNATIVO PARA O ESTUDO DO VÍRUS DA RAIVA

VALDSON DE ANGELIS CÔRTEZ  
Professor Assistente Doutor  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP  
Campus de Botucatu

JOSÉ DE ANGELIS CÔRTEZ  
Professor Titular  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

CÔRTEZ, V.A.; CÔRTEZ, J.A. Emprego do rato branco como sistema biológico alternativo para o estudo do vírus da raiva. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.29, n.1, p.61-6, 1992.

**RESUMO:** Estudo realizado objetivando comparar a sensibilidade ao vírus da raiva, de dois sistemas biológicos representados pelo camundongo suíço albino (*Mus musculus*) e pelo rato branco (*Rattus norvegicus*), revelou a inexistência de diferença estatisticamente significativa entre eles relativamente aos seguintes parâmetros: período de incubação, período de evolução da doença, momento do aparecimento dos corpúsculos de Negri, suscetibilidade, e sintomas (excitação, agressividade, emagrecimento, paralisia, aerofobia e morte). Tais achados viabilizam a utilização do rato branco como sistema biológico alternativo para o estudo do vírus da raiva, sempre que a situação o exigir.

**UNITERMOS:** Raiva, vírus; Diagnóstico, raiva; Camundongos

### INTRODUÇÃO

Do ponto de vista da saúde pública a raiva tem se constituído em motivo de intensa preocupação por parte das autoridades sanitárias dos países envolvidos com esta zoonose, destacando-se nas prioridades dos programas de saúde não apenas em razão de sua elevada letalidade, mas também pela sensação de insegurança que infunde na comunidade, diante da expectativa dos indivíduos expostos a contrair a doença<sup>1</sup>.

Não menos importantes são as conseqüências que acarreta à produção pecuária das áreas onde grassa endemicamente, particularmente à exploração bovina,

cujas perdas anuais, ainda que de elevada monta, são de difícil quantificação face à inexistência de serviços veterinários adequados, capazes de assegurar a indispensável informação de sua ocorrência<sup>1</sup>.

O sucesso em sua prevenção, todos sabemos, está na dependência estrita de um sistema de diagnóstico efetivo e dinâmico onde o laboratório seja de saúde pública<sup>5</sup>, seja de saúde animal<sup>22</sup> desempenha papel indispensável na orientação da conduta a ser seguida pelos profissionais responsáveis pela decisão final. É essencial, contudo, que tais estruturas laboratoriais disponham de meios e métodos que atendam aos requisitos mínimos de precisão, sensibilidade, especificidade, custos e conveniências operacionais satisfatórias<sup>4</sup>.

Em que pese a existência de numerosos métodos estabelecidos e consagrados para o diagnóstico da raiva<sup>4,16</sup> como: a coloração direta de impressões e esfregaços<sup>24</sup>, imunofluorescência direta<sup>11</sup> e o isolamento do vírus por inoculação intracerebral em camundongos<sup>25</sup>, nenhum método, utilizado isoladamente, atende totalmente os requisitos do diagnóstico, razão porque a maioria dos laboratórios utiliza, objetivando evitar eventuais falhas, uma combinação apropriada de técnicas adequadas às suas condições<sup>2,4</sup>.

Na prática, das técnicas mais usadas sistematicamente, a imunofluorescência direta, sensível e rápida<sup>4,11</sup>, tem evidenciado uma concordância quase perfeita com a inoculação intracerebral em camundongos<sup>2,16</sup>, embora resultados falso-negativos ocorram, esporadicamente, ora em uma, ou em outra técnica<sup>16</sup>. Em tais circunstâncias, para atender à demanda imediata dos laboratórios, faz-se imprescindível a disponibilidade de sistemas biológicos padronizados<sup>4,12</sup>, entre os quais se destacam o camundongo branco, o coelho, o cobaio e o hamster, ressaltando-se que cada uma destas espécies apresenta características restritivas na dependência do tipo de ensaio pretendido<sup>2,12</sup>.

O camundongo branco, de um modo geral, pode ser considerado como satisfatório para detectar o vírus rábico em materiais suspeitos<sup>12,13,21,25</sup>, razão porque tem tido, na atualidade, uma ampla utilização tanto nos trabalhos de diagnóstico laboratorial em raiva<sup>1,2,3,7,8</sup>, como na replicação de vírus para a produção de vacinas<sup>9,14</sup>.

O coelho, apesar de sua importante função exercida no início dos estudos do vírus da raiva, inclusive na produção de vacinas, tem sido substituído por outros sistemas mais adequados, não apenas em razão da irregularidade com que responde à infecção por este vírus, particularmente no tocante ao período de incubação, mas também devido aos custos de produção, manutenção e manuseio ao nível laboratorial<sup>2,10,25</sup>.

## Emprego do rato branco como sistema biológico alternativo...

O cobaio apresenta relativa suscetibilidade ao vírus da raiva de rua, pela via intramuscular, o que justifica sua utilização nos experimentos de imunidade cruzada, bem como na avaliação da potência de vacinas anti-rábicas<sup>2,12,20</sup>, ainda quando revele alguma irregularidade na resposta ao desafio<sup>20</sup>.

Os hamsters jovens são particularmente úteis para ensaios que requeiram exposição extraneural do vírus rábico porque, nesta espécie, a DL50 do desafio intramuscular basicamente se equivale à intracerebral<sup>2,12</sup>.

O rato branco, tradicionalmente utilizado nos diferentes campos experimentais da área médica<sup>19</sup>, é também suscetível ao vírus da raiva<sup>2</sup> e, em que pese a realização de alguns estudos relacionados à patogenia da raiva nesta espécie<sup>15,18</sup>, inexistem ensaios conclusivos acerca do seu emprego nos procedimentos sistemáticos praticados usualmente nos laboratórios de diagnóstico da raiva<sup>2,12</sup>.

O objetivo do presente trabalho foi estudar, comparativamente, o comportamento do rato branco frente ao desafio com o vírus rábico de rua, visando estabelecer bases para sua possível utilização como sistema biológico alternativo para os ensaios com este vírus.

## MATERIAL E MÉTODO

## SISTEMAS BIOLÓGICOS

*Rato Branco*

Utilizamos no ensaio 441 ratos (*Rattus norvegicus*), variedade wistar, de ambos os sexos, com idade situada entre 19 e 31 dias. Destes, os 321 destinados à observação do sistema biológico, com vistas à manifestação aparente da doença, foram distribuídos, para efeito de manejo, em 24 grupos de 8 a 10 animais cada. Como a precocidade do aparecimento do corpúsculo de Negri é fundamental no processo de diagnóstico laboratorial da raiva, incluímos no estudo, para cada grupo constituído, um sub-grupo de 5 indivíduos reservados ao sacrifício a partir do terceiro dia da inoculação.

*Camundongo Albino*

Como sistema de referência foram utilizados 441 camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), de ambos os sexos, na faixa etária de 19 a 31 dias e distribuídos segundo os mesmos procedimentos adotados para o sistema anterior.

## VÍRUS

O vírus rábico utilizado foi representado por amostras provenientes do encéfalo de 4 (quatro) cães e de 4 (quatro) bovinos, acometidos de raiva, colhidas imediatamente após a morte natural dos animais.

## CONJUGADO ANTI-RÁBICO

Para demonstrar as estruturas antigênicas específicas de raiva em impressões encefálicas tanto das amostras de campo como daquelas colhidas de ratos e de camundongos, pela técnica de anticorpos fluorescentes<sup>11</sup>, utilizamos conjugado anti-rábico preparado a partir de soro anti-rábico hiperimune, produzido em equino, purificado, concentrado e marcado pelo isotiocianato de fluoresceína, isômero I, cromatograficamente puro, conforme procedimentos previamente estabelecidos<sup>16,17</sup>, cujo título foi de 1/32.

## TÉCNICAS

*Inoculação em animais*

Para efeito de isolamento do vírus, a partir de espécimens encefálicos de animais raivosos, foram observados os princípios da técnica de inoculação intracerebral em camundongos, desenvolvida por WEBSTER; DAWSON<sup>25</sup> (1935).

*Anticorpos Fluorescentes*

Com vistas à identificação de inclusões celulares de Negri no tecido encefálico de animais doentes, empregou-se a técnica de Imunofluorescência Direta, aplicada ao diagnóstico da raiva, consoante o descrito por GOLDWASSER; KISSLING<sup>11</sup> (1958).

*Análise estatística*

A análise estatística dos dados foi realizada mediante o teste de duas médias, segundo REMINGTON; SCHORK<sup>23</sup> (1970) e o nível de significância adotado foi de 0,05.

## PARÂMETROS

Escolhemos como indicadores da resposta do sistema biológico à infecção pelo vírus da raiva os seguintes parâmetros: período de incubação, espaço de tempo compreendido entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas; período de evolução ou de duração da doença, aquele que se estendia entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o óbito; momento

Emprego do rato branco como sistema biológico alternativo...

do aparecimento do corpúsculo de Negri, caracterizado pela primeira descoberta, em cada subgrupo, do corpúsculo de Negri, expresso em dias após a inoculação; suscetibilidade do sistema biológico, determinada pela frequência com que os indivíduos inoculados vieram a apresentar sintomatologia e óbito; e sintomatologia apresentada incluindo excitação e agressividade, emagrecimento rápido, paralisia e sensibilidade ao ar (aerofobia).

#### PROCEDIMENTOS

Imediatamente após a colheita das amostras encefálicas dos cães e dos bovinos, os espécimens obtidos foram conservados a 18 graus Celsius até o momento de seu processamento.

A partir deste material preparamos, em todas as ocasiões, uma suspensão a 20% (p/v) de material encefálico em diluente constituído de água destilada contendo 2% de soro de equino normal, inativado a 56 graus Celsius e adicionada de antibiótico à base de cloridrato de lincomicina, na proporção de 3 miligramas por mililitro. A suspensão assim obtida foi submetida a centrifugação a 2.500 rpm durante 15 minutos e, a seguir, mantida em banho de gelo durante o período de sua inoculação nos sistemas biológicos.

Os dois sistemas biológicos foram inoculados, pela via intracerebral, com uma dose individual diferenciada da suspensão viral, de modo que no sistema representado pelo rato branco cada animal recebeu 0,05 mililitros, enquanto que a quantidade aplicada a cada camundongo foi de 0,03 mililitros, já universalmente consagrada. Os animais inoculados foram mantidos em observação durante 21 dias. A partir do terceiro dia da inoculação procedíamos ao sacrifício de um indivíduo pertencente a cada subgrupo de ambos os sistemas. Os encéfalos colhidos, tanto dos animais sacrificados com dos que vieram a sucumbir pela doença, sofreram, para ambos os sistemas biológicos, o mesmo processamento que consistiu da preparação de impressões, em lâminas apropriadas para a microscopia de fluorescência, em número de 2 (dois) pares por material correspondente a cada animal. Tais lâminas foram, a seguir, fixadas em acetona a frio, numa temperatura de 20 graus Celsius negativos, durante 4 horas, após o que eram mantidas em idênticas condições de frio até o momento de serem submetidas aos procedimentos da reação de imunofluorescência direta<sup>11</sup>.

#### RESULTADOS

Os resultados obtidos estão condensados, consoante os diferentes indicadores, nos Quad. 1 e 2.

A análise destes dados mostra que o período de incubação apresentou, para ambos os sistemas, um intervalo de variação idêntico, embora o sistema convencional tenha revelado um valor médio, em dias, ligeiramente inferior, da ordem de 19,00 horas aproximadamente. Essa mesma tendência pode ser verificada quando apreciamos os valores relativos ao período de evolução da doença.

Nesse caso, contudo, o intervalo foi o mesmo, mas os números absolutos variaram entre 3 e 6 dias para o rato e entre 2 e 5 dias para o camundongo, com um valor médio inferior em cerca de 22,00 horas para este último sistema. Quanto ao aparecimento de inclusões específicas nos cérebros dos animais inoculados verificamos que o valor mínimo tenha sido idêntico para ambos os sistemas embora, em termos de valores médios, o surgimento destas tenha sido mais tardio em cerca de 12,00 horas no rato branco. Tais resultados, contudo, quando submetidos à análise pelo teste de duas médias, revelaram a inexistência de qualquer diferença estatisticamente significativa, capaz de caracterizar a superioridade de qualquer dos dois sistemas estudados.

A suscetibilidade, expressa em termos da relação mortos/inoculados, revelou-se absoluta (100%) para ambos os grupos e, no tocante à sintomatologia, merece destaque a ausência, no rato branco, de "aerofobia" ao manuseio, seguida de crises espasmódicas, sempre presentes no camundongo.

#### DISCUSSÃO

A observação dos valores absolutos obtidos e a sua correspondente análise permitem caracterizar uma identidade de resposta em ambos os sistemas biológicos, com vistas ao isolamento e identificação do vírus, a partir de espécimens encefálicos de animais raivosos, evidenciados tanto pela reprodução da doença como pela presença de estruturas antigênicas detectadas em todos os indivíduos incluídos no presente estudo.

De fato, quando apreciamos os diferentes parâmetros considerados para efeitos comparativos, verificamos que, a despeito de ligeiras oscilações observadas nos dados absolutos, todos apresentaram valores estatisticamente indistintos para ambos os sistemas estudados. Com efeito, a variação da resposta de animais de laboratório ao vírus rábico depende não apenas da suscetibilidade da espécie, mas também da amostra de vírus utilizada, da dose empregada e,

principalmente, da via de inoculação, dentre os numerosos fatores intervenientes <sup>3,6,12,13,15,18,25</sup>, havendo diferenças no período de incubação da doença e na época de aparecimento de inclusões encefálicas, na mesma espécie e entre espécies diferentes de animais usados como sistemas biológicos no diagnóstico da raiva <sup>3,13,18</sup>.

Quando cotejamos os resultados aqui obtidos com aqueles advindos de estudos anteriores constatamos, também, a inexistência de discrepâncias capazes de caracterizar uma diferença estatisticamente significativa. De fato, os valores médios encontrados em nosso estudo correspondem àqueles descritos para o camundongo <sup>12,13</sup> e para o rato <sup>15</sup>, porém discordam daqueles obtidos por ATANASIU <sup>2</sup> (1975) para ambas as espécies, com uma amplitude da ordem de 7 a 20 dias, resguardando-se porém, ter utilizado, este autor, todos os métodos de inoculação.

Discordam, também, dos nossos achados os valores relativos ao período de duração da doença, da ordem de 1 a 3 dias, relatados por outros autores <sup>2,12,13,15</sup> para uma ou outra espécie, sendo, contudo, concordantes os achados anteriores <sup>3,13</sup> relativos ao aparecimento de inclusões celulares no encéfalo de animais inoculados intracerebralmente com amostras de campo do vírus da raiva.

Em termos de uma metodologia de diagnóstico que vise, basicamente, o isolamento e a identificação do vírus, ambos os sistemas mostraram uma performance semelhante, frente ao desafio com vírus da raiva, pela via intracerebral, resguardadas as doses de 0,05 ml por animal para o rato e de 0,03 ml para o camundongo, cuja resposta foi invariavelmente positiva, em todos os grupos e para ambos os sistemas.

Tais achados não sugerem a substituição do camundongo como sistema biológico no diagnóstico laboratorial da raiva, mas propiciam elementos para a utilização do rato branco como sistema biológico alternativo para aqueles laboratórios que já dispõem de colônias de ratos brancos e que desejam trabalhar com o diagnóstico da raiva.

### CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o rato branco (*Rattus norvegicus*) constitui uma espécie apropriada para a utilização satisfatória nos procedimentos de isolamento e identificação do vírus da raiva.

CÔRTEZ, V.A.; CÔRTEZ, J.A. Use of white rat as an alternative biological system for the study of rabies virus. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.29, n.1, p.61-6, 1992.

**SUMMARY:** The response of white rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*) to 8 field isolates of rabies virus was assessed in 441 white Wistar strain rats and in the same number of albino mice of both sexes, aged between 19 - 31 days and randomly divided into 24 groups of 8 - 10 animals each. The 20% (w/v) bovine and canine rabid brain suspensions were inoculated intracerebrally using 0.05 ml and 0.03 ml, respectively for a single rat and mouse dose. The animals were observed daily for rabies signs and symptoms and deaths for up to 21 days post inoculation and brains of dead animals were submitted to Fluorescent Antibody (FA) examination. For early recognition of Negri bodies, each group had sacrificed one animal daily from the third post inoculation day. The incubation period, the clinical disease and the time needed for the early detection of rabies through the FA testing were statistically not significant at alpha level of 0.05, although in mice the signs and symptoms of rabies were detected several hours earlier than in rats. Both species have revealed a susceptibility of 100% and aerophobia and spasmodic signs, though always detected in mice, were not observed in rats after their manipulation. The use of white rats for isolation and identification of rabies virus is feasible and the authors suggest their use as an alternative species to mice especially for those laboratories that deal with research and diagnosis of rabies.

**UNITERMS:** Rabies virus; Diagnosis, rabies; Mice

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*. Washington, Organización Panamericana de la Salud, 1986. p.502-26. (Publicación Científica, 503)
- 02-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.
- 03-BAGNAROLI, R.A.; LARGHI, O.P.; MARCHEVSKY, N. Susceptibilidad de ratones lactentes y adultos al virus rabico demostrada por inmunofluorescencia. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, v.48, p.388-92, 1970.
- 04-BEDFORDM, P.G.C. Diagnosis of rabies in animals. *Vet. Rec.*, v.99, p.160-2, 1976.

Emprego do rato branco como sistema biológico alternativo...

- 05-CARVALHO, J.P.P. Os laboratórios de Saúde Pública nos programas de saúde. *Rev. Saúde públ.*, São Paulo, v.10, p.191-207, 1976.
- 06-CASALS, J. Influence of age factors on susceptibility of mice to rabies virus. *J. exp. Med.*, v.72, p.445-51, 1940.
- 07-CÓRTEZ, V.A.; CÓRTEZ, J.A.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; ENRIQUEZ ROZAS, C.E.; NILSSON, M.R.; PAIM, G.V. Estudo comparativo entre a suscetibilidade de camundongos lactentes e adultos para isolamento de vírus rábico a partir da saliva de cães com raiva natural. *Arq. Inst. Biol.*, v.46, p.97-102, 1979.
- 08-FUENZALIDA, E. Vacuna de encefalo de raton lactente. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. *La rabia: tecnicas de laboratorio*. 3.ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. p.229-33. (Série de Monografias, 23)
- 09-FUENZALIDA, E.; PALACIOS, V.H. Un metodo mejorado en la fabricacion de la vacuna antirabica. *Bol. Inst. Bacteriol.*, Chile, v.8, p.3-10, 1955.
- 10-GISPEN, R. Vacuna de encefalo de conejo lactente. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKY, H. *La rabia: tecnicas de laboratorio*. 3.ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. p.234-40. (Série de Monografias, 23)
- 11-GOLDWASSER, R.A.; KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.98, p.219-23, 1958.
- 12-JOHNSON, H.N. Rabies virus. In: LENNETTE, E.H.; SCHMIDT, N.J. *Diagnosis procedures for viral and rickettsial diseases*. 3.ed. New York, American Public Health Association, 1979. p.356-80.
- 13-JOHNSON, H.N.; LEACH, C.N. Comparative susceptibility of different strains of mice to rabies virus. *Amer. J. Hyg.*, v.32, p.38-45, 1940.
- 14-KARAKUJUMCAN, M.K.; PARIZ, B.M.; SOLOV'EV, D.V. Vacuna de encefalo de rata lactente. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKY, H. *La rabia: tecnicas de laboratorio*. 3.ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. p.226-8. (Série de Monografias, 23)
- 15-KITSELMAN, C.H.; MITRAL, A.K. Terminal dissemination of rabies virus in selected rat tissues. *Can. J. comp. Med.*, v.32, p.461-4, 1968.
- 16-LARGHI, O.P. *Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia*. Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1978. (Nota Técnica, 8)
- 17-LENNETTE, E.H.; WOODIE, J.D.; NAKAMURA, K.; MAGOFFIN, R.L. The diagnosis of rabies by fluorescent antibody method (FRA) employing immune hamster serum. *Hlth Lab. Sci.*, v.2, p.24-34, 1965.
- 18-MARTELL, D.M.; MOLES, C.L.P. Virus rabico em ratas y ratones inoculados intraplantamente. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, v.75, p.354-60, 1973.
- 19-NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH PUBLIC HEALTH SERVICE. Department of Health and Human Services. *NIH rodents 1980 catalogue; strains and stocks of laboratory rodents provided by the NIH genetic resource*. Bethesda, 1982 (NIH Publication, 83-606)
- 20-NILSSON, M.R.; CÓRTEZ, J.A. Vacinas anti-rábicas Flury de alta passagem. I. Estudo crítico da prova de potência em cobaias. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.15, p.205-41, 1978.
- 21-NILSSON, M.R.; SUGAY, W. O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.33, p.47-8, 1966.
- 22-QUEVEDO, F. Garantia de la calidad de los laboratorios de diagnostico veterinario. *Comun. cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.8, p.31-5, 1984.
- 23-REMINGTON, R.; SCHORK, R. *Statistics with applications to the biological and health sciences*. London, Prentice-Hall International, 1970. p.168-80.
- 24-SELLERS, T.F. A new method for staining Negri bodies of rabies. *Amer. J. Publ. Hlth*, v.17, p.1080-1, 1927.
- 25-WEBSTER, L.T.; DAWSON, J.R. Early of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.32, p.570-3, 1935.

Recebido para publicação em 12/04/91

Aprovado para publicação em 21/11/91

**QUADRO 1** - Valores mínimo, médio e máximo do período de incubação, período de evolução e aparecimento dos corpúsculos de Negri, segundo o sistema biológico utilizado. Botucatu, 1990.

S. biológico			
Indicador		Rato branco	Camundongo
P. incubação (*)	mínimo	6.00	6.00
	médio	7.87	7.08
	máximo	10.00	10.00
P. evolução (*)	mínimo	3.00	2.00
	médio	4.17	3.25
	máximo	6.00	5.00
C. Negri (1) (*)	mínimo	4.00	4.00
	médio	5.96	5.46
	máximo	7.00	6.00

(1) Momento do aparecimento dos primeiros corpúsculos de Negri a partir da inoculação

(\*) Expresso em dias.

**QUADRO 2** - Principais sintomas clínicos observados segundo o sistema biológico utilizado. Botucatu, 1990.

S. biológico	Rato branco	Camundongo
excitação	+	+
agressividade	+	+
emagrecimento	+	+
paralisia	+	+
aerofobia	-	+
morte	+	+