

**DIAGNÓSTICO "IN VIVO" DA RAIVA EM CÃES  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.  
Emprego do teste de córnea e isolamento de vírus  
por inoculação intracerebral de saliva  
em camundongos.<sup>5</sup>**

Sílvia Arruda VASCONCELLOS\*\*  
José de Angelis CÔRTEZ\*\*\*  
Moacir Rossi NILSSON\*\*\*\*  
Fumio Honma ITO\*  
Cezar E. ENRIQUEZ ROZAS\*

RFMV-A/10

VASCONCELLOS, S.A.; CÔRTEZ, J.A.; NILSSON, M.R.; ITO, F.H.; ENRIQUEZ ROZAS, C.E.  
*Diagnóstico "in vivo" da raiva em cães experimentalmente infectados. Emprego do teste de  
córnea e isolamento de vírus por inoculação intracerebral de saliva em camundongos. Rev.  
Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 15 (1): 75-86, 1978.*

**RESUMO:** *Cincoenta e duas amostras de saliva e células de córnea tomadas, paralelamente, em dias sucessivos, de oito cães experimentalmente infectados com o vírus da raiva, foram examinadas, respectivamente, pelas técnicas de inoculação intracerebral em camundongos e imunofluorescência direta aplicada a impressões de córnea (teste de córnea). O teste de córnea apresentou uma positividade de 17/18 (94%) no período pré-clínico e de 33/34 (97%) durante a fase sintomática da doença, enquanto que as proporções de isolamentos de vírus a partir de saliva, para os mesmos períodos, foram, respectivamente de 10/18 (56%) e 3/34 (9%). Em todas as ocasiões em que foi isolado vírus da saliva, o teste de córnea correspondente apresentou resultado positivo. A ocorrência de um resultado negativo ao teste de córnea não exclui a possibilidade de infecção pelo vírus da raiva.*

**UNITERMOS:** *Raiva, cães\*; Diagnóstico "in vivo"; Saliva\*, Vírus, isolamento\*.*

## INTRODUÇÃO

A despeito da existência de relatos de recuperação espontânea<sup>33,34</sup>, o conceito de invariável letalidade tradicionalmente admitido<sup>4,24</sup>, torna a raiva uma das doenças mais temidas pela humanidade.

A persistência na natureza do seu agente causal é assegurada por diversos fatores entre os quais a multiplicação de hospedeiros<sup>36</sup> e o mecanismo de transmissão por contágio direto favorecido pela eliminação de vírus pela saliva<sup>31,40,41,47</sup> associado ao hábito de morder de algumas

§ Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo Prof. S.A. Vasconcellos, para obtenção do título de Doutor.

\* Auxiliar de Ensino.

\*\* Professor Assistente Doutor.

\*\*\* Professor Livre-Docente.

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

\*\*\*\* Médico Veterinário.

Pesquisador Científico, Seção de Raiva e Encefalomielite do Instituto Biológico de São Paulo.

espécies de animais.

Não havendo recursos para sustar a evolução fatal da doença uma vez declarada, a medicina, no caso do hospedeiro humano emprega o tratamento pós-exposição que consiste na aplicação de prolongado processo de imunização, de posologia variável com a gravidade das lesões deixadas pela exposição<sup>4, 10, 16</sup>.

A indicação deste tratamento encontra frequentemente sérias dificuldades, entre as quais incluem-se: o seu sucesso está estreitamente associado com o espaço de tempo decorrido entre a exposição e a sua instituição<sup>4, 12, 16, 31</sup>; há considerável risco para o paciente devido à possibilidade de acidentes<sup>8, 13, 22, 24, 36, 43, 47</sup>, e a incerteza sobre a condição infectante da saliva do animal mordedor por ocasião do acidente<sup>47</sup>.

Apesar de estar comprovada a eliminação do vírus da raiva pela saliva de animais infectados<sup>45, 47</sup>, não são disponíveis na atualidade, recursos adequados para estabelecer com fidelidade o momento a partir do qual esta secreção torna-se infectante.

Os métodos tradicionalmente empregados para o diagnóstico da raiva<sup>23</sup>, utilizam material proveniente do sistema nervoso central, usualmente, obtidos após a morte<sup>31</sup>.

A descrição da reação de imunofluorescência direta (RIFD) aplicada ao diagnóstico da raiva<sup>19</sup>, aliada ao conhecimento da patogenia do vírus, tem suscitado a pesquisa de procedimentos diagnósticos que utilizem materiais não provenientes do sistema nervoso central e conseqüentemente, passíveis de aplicação "in vivo".

VALLONE e cols.<sup>46</sup> em 1966, diagnosticaram a raiva "in vivo" pela RIFD aplicada ao sedimento da saliva de dois meninos acometidos pela doença.

SCHNEIDER<sup>39</sup> em 1969, aplicou a RIFD em decalques tomados "in vivo" pela impressão de lâminas de microscopia sobre a córnea de camundongos experimentalmente infectados com o vírus da raiva.

SCHAAF e SCHAAL<sup>38</sup> em 1971, relataram a pesquisa do vírus rábico, pela RIFD, em impressões realizadas "post mortem" sobre a mucosa nasal e oral de diversas espécies animais.

FUH e BLENDEN<sup>17</sup> em 1971, descreveram em animais a técnica de biópsia, para o diagnóstico precoce da raiva, que aplica a RIFD em secção congeladas da pele, método cuja utilização tem sido posteriormente efetuada tanto em animais<sup>6, 18, 44</sup> quanto ao homem<sup>7</sup>.

BAUER<sup>3</sup> em 1975, apresentou a possibilidade do diagnóstico da raiva "in vivo" em cães e bovinos com sintomas da doença, através do exame da secreção nasal colhida com "swab" e tratada pela RIFD.

Dentre estes métodos destaca-se, pela facilidade de execução, o descrito por SCHNEIDER<sup>39</sup> denominado teste de córnea. Ao descrever esta técnica o autor constatou, em camundongos, a existência de estreita relação entre o resultado obtido e a condição infectante das glândulas salivares, tanto antes como após o aparecimento dos sintomas.

Caso este fato seja confirmado em outras espécies de animais, o método poderá servir como indicar da presença de vírus na saliva, por ocasião da exposição de seres humanos ao risco de infecção.

Embora encontre-se na literatura uma série de trabalhos relatando o emprego do teste de córnea em diversas espécies de animais<sup>1, 2, 5, 20, 21, 26, 27, 29, 32, 37, 38, 48, 49</sup> no homem<sup>9, 25, 30, 31</sup>, bem como perspectivas para o aprimoramento de sua execução<sup>28</sup>, nenhum destes estudos procurou demonstrar, em cães, a relação entre os resultados do teste de córnea "in vivo" e a condição infectante da saliva.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar a possibilidade de aplicação do teste de córnea para o diagnóstico "in vivo" da raiva em cães comparando os resultados obtidos com os do isolamento de vírus da saliva por inoculação intracerebral em camundongos.

A hipótese de nulidade estabelecida admitia igualdade entre as proporções de resultados positivos obtidos com o teste de córnea e exames de saliva realizados em paralelo.

O nível de significância adotado foi de 0,05.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados oito cães sem raça definida, com idade compreendida entre 12 a 24 meses, criados em condições de isolamento a partir do segundo mês de vida que vieram a sucumbir em decorrência da raiva contraída experimentalmente.

O sistema biológico empregado para o isolamento de vírus das amostras de saliva, titulação de vírus e confirmação do diagnóstico em materiais colhidos "post mortem", foi constituído por camundongos albinos suíços, adultos jovens, com peso variando entre 12 a 15 gramas, distribuídos em grupos de oito a dez indivíduos.

O vírus empregado para desafio, consistiu de uma suspensão a 20% (peso/volume) de glândula salivar de cão naturalmente infectado pelo vírus da raiva, previamente identificado por prova de soro neutralização. Esta suspensão foi adicionada a igual volume de glicerina neutra a 50%, agente conservador para o vírus rábico descrito por CÔRTEZ e NILSSON<sup>15</sup> e foi distribuída em alíquotas de 1,0 mililitro às quais foram conservadas em congelador à temperatura de -20°C. No momento da inoculação, acrescentou-se a cada alíquota igual volume de saliva de cão normal, devido a presença de fator de difusão para o vírus rábico conforme OLIVEIRA e cols.<sup>35</sup>. O título infectante em camundongos, deste inóculo, obtido por ocasião da inoculação de cada grupo de cães, situou-se entre  $10^{2,32}$  e  $10^{3,0}$  DL<sub>50</sub>/0,03 ml, com valor médio de  $10^{2,9}$  DL<sub>50</sub>/0,03 ml.

O diluente empregado tanto no preparo das suspensões de vírus, como no tratamento das amostras de saliva, consistiu de água destilada com 2% de soro equino normal (previamente inativado a 56°C por 30 minutos) e antibióticos, sendo 1000 unidades internacionais de penicilina G potássica e 1,25 miligramas de sulfato de estreptomicina por mililitro.

Com exceção do cão de número 6, os demais receberam cortisona, administrada por via sub-cutânea, na dose diária de 1,0 mililitro de acetato de delta hidrocortisona em suspensão a 25%, nos três dias que antecederam e por ocasião da inocula-

ção do vírus. O emprego desta droga teve finalidade de facilitar o estabelecimento da infecção experimental pelo vírus da raiva.

A aplicação de vírus, nos cães, foi efetuada por via intramuscular, em uma dose de 5,0 mililitros conforme o seguinte esquema: 2,0 mililitros distribuídos em cinco pontos ao longo de uma linha imaginária situada entre as tuberosidades coxais, 2,0 mililitros em quatro pontos na região da cernelha e 0,5 mililitros entre as falanges de cada um dos membros posteriores.

Após a inoculação, os cães foram mantidos em observação em jaulas individuais e transcorrido um período de tempo que variou entre 10 e 18 dias, foram iniciadas as colheitas diárias de amostras de saliva e células de córnea, as quais prolongaram-se até a morte do animal.

O início da fase clínica foi estabelecido com base na ocorrência das seguintes manifestações: inquietação, alterações no latido, tremores superficiais e modificações no equilíbrio, presentes em todos os casos.

As amostras de células de córnea foram obtidas através de impressões repetidas tomadas em dois campos de cada uma de oito lâminas de microscopia, sendo quatro para cada olho. Uma vez obtidas, as lâminas foram fixadas por 24 horas em acetona a -20°C e a seguir mantidas dentro de caixas de madeira em temperatura de congelamento, até o momento do exame.

O exame das impressões de córnea foi efetuado pela técnica de imunofluorescência direta<sup>19</sup> e os critérios de interpretação foram aqueles descritos por SCHNEIDER<sup>39</sup>.

A saliva foi colhida em placa de Petri estéril, empregando metodologia descrita por CÔRTEZ e NILSSON<sup>14</sup>. Sempre que necessário, utilizou-se como recurso adicional para estímulo da secreção salivar, a aplicação de cloridrato de pilocarpina à 1,0% por via intramuscular na dose de 0,5 a 1,0 mililitro por animal conforme preconizado por CLEMMER e cols.<sup>11</sup>.

Cada amostra de saliva foi acrescentada a igual volume de diluente, mantida à temperatura ambiente por 30 minutos e a seguir inoculada em camundongos

TABELA 1. Resultados dos exames de córnea e de saliva de cães com raiva experimental segundo o animal, o tipo de material e o momento da colheita expresso em dias em relação ao aparecimento dos sintomas — São Paulo, 1978

| Momento da Colheita  | -6    | -5    | -4    | -3   | -2    | -1    | 0**  | +1    | +2    | +3    | +4    | +5  | +6    | TOTAL*      |
|----------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------------|
| Natureza do Material |       |       |       |      |       |       |      |       |       |       |       |     |       |             |
| Nº do Animal         | C     | S     | C     | S    | C     | S     | C    | S     | C     | S     | C     | S   | C     | S           |
| 06                   | ...   | ...   | ...   | ...  | ...   | ...   | N    | P     | P     | N     | X     | X   | X     | 3/4 0/4     |
| 10                   | ...   | ...   | ...   | N    | P     | P     | P    | P     | X     | X     | X     | X   | X     | 4/5 1/5     |
| 11                   | ...   | ...   | ...   | ...  | ...   | ...   | P    | P     | N     | X     | X     | X   | X     | 4/4 0/4     |
| 12                   | P     | P     | P     | P    | P     | P     | P    | P     | P     | N     | P     | P   | N     | 13/13 6/13  |
| 13                   | ...   | ...   | ...   | P    | P     | P     | P    | P     | N     | X     | X     | X   | X     | 11/11 6/11  |
| 16                   | ...   | ...   | ...   | ...  | ...   | ...   | P    | P     | N     | X     | X     | X   | X     | 3/3 0/3     |
| 17                   | ...   | ...   | ...   | ...  | ...   | ...   | P    | P     | N     | X     | X     | X   | X     | 4/4 0/4     |
| 18                   | ...   | ...   | ...   | ...  | P     | N     | P    | N     | P     | N     | P     | N   | X     | 8/8 0/8     |
| TOTAL*               | 1/1   | 2/2   | 2/2   | 2/3  | 4/4   | 6/6   | 7/8  | 8/8   | 7/7   | 4/4   | 3/3   | 0/3 | 1/1   | 50/52 13/52 |
| % Positivos          | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 66,6 | 100,0 | 100,0 | 87,5 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 96,1 25,0   |

P - POSITIVO  
 N - NEGATIVO  
 ... - NÃO REALIZADO  
 X - EXAMES NÃO REALIZADOS, devido a morte do animal.

C - Células córneas  
 S - SALIVA  
 O - ÓBITO

\* - POSITIVOS/EXAMINADOS  
 \*\* - DIA DO APARECIMENTO DOS SINTOMAS;  
 Colheitas anteriores aparecem com sinal negativo e as posteriores com sinal positivo.



por via intracerebral, na dose de 0,03 mililitros por animal. Estes animais foram observados por um período de 21 dias e aqueles que morreram ou apresentaram sinais indicativos de raiva, a partir do terceiro dia após a inoculação, tiveram seus cérebros submetidos a confirmação do diagnóstico de raiva, através da reação de imunofluorescência direta<sup>19</sup> e quando necessário, procedendo-se a sub-passagem em camundongos.

Após a morte, os cães foram necropsiados, colhendo-se fragmentos de corno de Ammon, cerebelo e bulbo, bem como as glândulas salivares submandibulares. Os materiais provenientes de sistema nervoso central foram submetidos à reação de imunofluorescência direta<sup>19</sup> e à técnica de inoculação em camundongos<sup>23</sup>, as glândulas salivares, somente foram examinadas por inoculação em camundongos.

### RESULTADOS

Os resultados obtidos estão condensados nas Tabelas apresentadas a seguir.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados dos exames de córnea e de saliva correspondentes a cada um dos animais, segundo o momento da realização expresso em dias relativamente ao aparecimento dos sintomas clínicos.

Os dados desta Tabela mostram que, durante o período de execução do presente estudo, o teste de córnea apresentou resultados positivos com maior frequência e constância que o exame da saliva.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste de Mc Nemar, segundo SIEGEL<sup>42</sup>.

Mesmo quando são considerados isoladamente os resultados obtidos nos exames efetuados antes e após o aparecimento dos sintomas clínicos, persiste a superioridade dos percentuais de positividade do teste de córnea se comparados àqueles obtidos com os exames de saliva.

Uma vez obtido um resultado positivo ao teste de córnea, esta condição permaneceu constante nos dias sucessivos ao passo que a presença de vírus na saliva, demonstrada nos exames realizados em paralelo, mostrou-se bastante irregular.

Em nenhuma oportunidade foi demonstrada a presença de vírus na saliva de um animal sem que o teste de córnea correspondente fosse igualmente positivo.

Embora através do teste de córnea o diagnóstico "in vivo" da raiva tenha sido efetivado em todos os animais, ao exame de saliva, cinco dos oito animais examinados não apresentaram vírus em momento algum do período de estudo.

Quando são consideradas todas as amostras examinadas verifica-se que os percentuais de resultados positivos foram bastante distintos, sendo 96% para o teste de córnea e 25% para o exame de saliva.

Na Tabela 2, encontram-se os resultados dos exames de laboratório segundo o tipo de material colhido durante o período de observação de cães experimentalmente infectados com o vírus da raiva e a natureza do resultado.

O exame desta Tabela indica que os 37 resultados discordantes foram positivos para o teste de córnea e negativos ao exame de saliva.

TABELA 2. Exames de laboratório segundo o tipo de material colhido, durante o período de observação de cães experimentalmente infectados com o vírus da raiva e a natureza do resultado — São Paulo, 1978.

| CÉLULAS DE<br>CÓRNEA<br>SALIVA | POSITIVO | NEGATIVO | TOTAL |
|--------------------------------|----------|----------|-------|
|                                | POSITIVO | 13       | 0     |
| NEGATIVO                       | 37       | 2        | 39    |
| TOTAL                          | 50       | 2        | 52    |

A análise estatística destes valores pela técnica de MC NEMAR<sup>42</sup>, revelou para o  $X^2$  um valor de 35,02 que quando comparado ao valor crítico desta estatística para um grau de liberdade, ao nível de significância adotado de 0,05, mostra-se altamente significante e conduz à aceitação

da hipótese alternativa, segundo a qual a proporção de resultados positivos com o teste de córnea é significativamente maior que a de isolamentos de vírus da saliva pela técnica de inoculação intracerebral em camundongos.

TABELA 3. Exames de laboratório segundo o tipo de material colhido, antes do estabelecimento dos sintomas clínicos de cães experimentalmente infectados pelo vírus da raiva e a natureza do resultado – São Paulo, 1978.

| SALIVA \ CÉLULAS DE CÔRNEA | POSITIVO | NEGATIVO | TOTAL |
|----------------------------|----------|----------|-------|
|                            | POSITIVO | 10       | 0     |
| NEGATIVO                   | 7        | 1        | 8     |
| TOTAL                      | 17       | 1        | 18    |

TABELA 4. Exames de laboratório segundo o tipo de material colhido, após o estabelecimento dos sintomas clínicos de cães experimentalmente infectados pelos vírus da raiva e a natureza do resultado – São Paulo, 1978.

| SALIVA \ CÉLULAS DE CÔRNEA | POSITIVO | NEGATIVO | TOTAL |
|----------------------------|----------|----------|-------|
|                            | POSITIVO | 3        | 0     |
| NEGATIVO                   | 30       | 1        | 31    |
| TOTAL                      | 33       | 1        | 34    |

As Tabelas 3 e 4 incluem isoladamente os resultados dos exames laboratoriais segundo o tipo de material colhido, antes e após o estabelecimento dos sintomas clínicos de cães experimentalmente infectados pelo vírus da raiva e a natureza do resultado.

Adotando-se os mesmos princípios estatísticos, anteriormente referidos, foram encontrados os valores de  $X^2$  de 5,142 e 28,03, respectivamente, para as Tabelas 3 e 4, superiores portanto ao valor crítico

desta estatística para 1 grau de liberdade ao nível de significância de 0,05.

Portanto, os resultados observados tanto na fase pré-clínica como na fase sintomática conduzem a aceitação da hipótese alternativa, segundo a qual a proporção de resultados positivos com o teste de córnea é significativamente maior que a de isolamentos de vírus a partir da saliva pela técnica de inoculação intracerebral em camundongos.

TABELA 5. Período de incubação, duração da fase clínica e resultados dos exames efetuados, segundo o animal e material colhido "post mortem", com cães experimentalmente infectados com o vírus da raiva – São Paulo, 1978.

| Nº do Animal | Período Incubação (Dias) | Duração fase clínica (Dias) | Resultado material examinado |     |                      |                        |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----|----------------------|------------------------|
|              |                          |                             | Cérebro                      |     | Glândula Salivar INO | Células de Córnea RIFD |
|              |                          |                             | RIFD                         | INO |                      |                        |
| 6            | 17                       | 4                           | P                            | P   | N                    | P                      |
| 10           | 18                       | 2                           | P                            | P   | N                    | NR                     |
| 11           | 16                       | 3                           | P                            | P   | N                    | P                      |
| 12           | 16                       | 7                           | P                            | P   | N                    | P                      |
| 13           | 16                       | 6                           | P                            | P   | N                    | NR                     |
| 16           | 10                       | 3                           | S                            | P   | N                    | P                      |
| 17           | 11                       | 3                           | S                            | P   | N                    | P                      |
| 19           | 12                       | 6                           | P                            | P   | P                    | NR                     |

NR – Não realizado

S – Suspeito

P – Positivo

N – Negativo

RIFD – Reação de Imunofluorescência direta

INO – Inoculação em camundongos

A Tabela 5 apresenta os períodos de incubação, duração da fase clínica e os resultados dos exames efetuados nos materiais colhidos "post mortem".

Observando-se a Tabela 5 constata-se que os períodos de incubação variaram entre 10 e 18 dias e a duração da fase clínica da doença foi de dois a sete dias.

Apenas o animal de número 19 apresentou vírus nas glândulas salivares, embora não tenha sido possível o isolamento de vírus da saliva, deste animal, nas colheitas realizadas "in vivo"; por outro lado, nos animais de número 10, 12 e 13, que apresentaram vírus na saliva "in vivo", não foi possível o isolamento de vírus nas glândulas salivares pela técnica de inoculação intracerebral em camundongos.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, realçam alguns aspectos cuja discussão se impõe.

Nas condições empregadas neste experimento, o teste de córnea, quando realizado segundo os princípios estabelecidos por SCHNEIDER<sup>39</sup>, mostrou-se um instrumento de valor para o diagnóstico "in vivo" da raiva em cães.

Realmente os elementos da Tabela 1 mostram que, por ocasião do aparecimento dos sintomas clínicos, sete dos oito animais examinados (87,5%) apresentaram teste de córnea positivo, nos exames subsequentes todos os animais (100%) foram positivos por esta técnica.

Uma vez positivo o teste de córnea assim se manteve, nos exames realizados posteriormente, até a morte do animal. Esta característica pode ser constatada mesmo nas impressões de córnea colhidas na fase pré-clínica da doença, condição altamente relevante, quando se tem por objetivo o diagnóstico "in vivo" da raiva em cães.

Um resultado falso negativo para o teste de córnea foi verificado com o exame do material colhido do animal de número 6.

por ocasião do início da sintomatologia clínica. Caso semelhante é referido, em camundongos, por SCHNEIDER<sup>39</sup>, quando dois de 42 animais foram positivos ao teste de córnea somente a partir do segundo dia da fase clínica da doença.

A ocorrência deste resultado falso negativo está de acordo com LARGHI e cols.<sup>29</sup> e ZIMMERMANN<sup>49</sup>, quando afirmam que resultados negativos obtidos por este procedimento, não excluem a possibilidade de raiva.

Os dados da Tabela 1 ainda mostram que o exame da saliva, pela inoculação intracerebral em camundongos revelou-se pouco eficiente como recurso diagnóstico da raiva em cães, nas condições aqui utilizadas.

Apenas 12,5% dos oito animais examinados apresentou vírus na saliva por ocasião do estabelecimento dos sintomas e nos dias subsequentes os valores observados foram 1/8; 0/7; 1/4; 0/3 e 0/1, respectivamente.

Deve ainda ser ressaltada a marcante flutuação verificada nos exames de saliva de um mesmo animal realizados em diferentes oportunidades e a alta frequência de resultados falso negativos obtida 5/8 (62,5%). Efetivamente os animais de números 6, 11, 16, 17 e 19, em nenhuma ocasião revelaram a presença de vírus na saliva, com a técnica empregada. Valores semelhantes são referidos por VAUGHN<sup>47</sup> que, empregando o mesmo sistema de isolamento de vírus, encontrou em 54 cães experimentalmente infectados com o vírus da raiva, 52% de resultados falso negativos, ou seja 28 cães não apresentaram vírus na saliva em nenhuma ocasião.

O menor número de isolamentos de vírus em amostras de saliva colhidas durante a fase clínica de doença (9%), quando comparado àquele obtido das amostras tomadas antes do aparecimento dos sintomas (56%), está de acordo com SHASHEN'KO e KOVALEV<sup>41</sup>, que trabalhando com diversas espécies de animais experimentalmente infectados com o vírus da raiva (inclusive cães) encontraram vírus em amostras de saliva obtidas antes do aparecimento de sintomas, mas todas as amostras colhidas durante a fase clínica,

foram não infectantes.

Considerando-se os resultados dos exames de córnea e de saliva realizados em amostras colhidas em paralelo, verifica-se que o teste de córnea apresentou uma maior frequência e constância de resultados positivos do que a técnica de isolamento de vírus na saliva por inoculação intracerebral em camundongos.

A análise estatística dos dados da Tabela 2 revelou que, nas condições do presente estudo, a proporção de resultados positivos com o teste de córnea foi significativamente maior que a de isolamentos de vírus da saliva pela inoculação intracerebral em camundongos.

A observação desta Tabela ainda revela que em nenhuma oportunidade foi demonstrada a presença de vírus na saliva de um animal sem que o teste de córnea, realizado em paralelo, fosse também positivo.

Tal condição não está de acordo com CÔRTE e NILSSON<sup>15</sup> e NILSSON e CÔRTE<sup>34</sup> que ao descreverem, respectivamente, três casos de raiva abortiva e um caso de recuperação espontânea, em cães, infectados experimentalmente com vírus originário de morcego, encontraram resultados negativos ao teste de córnea, quando a saliva foi positiva pela inoculação em camundongos lactentes; no entanto os casos descritos corresponderam a situações bastante raras e os autores sugeriram a possível influência da amostra de vírus empregada.

Deve também ser salientado que o tratamento prévio com cortisona dos cães de números 10, 11, 12, 13, 16, 17 e 19 possa de alguma forma ter interferido com a patogenia da doença.

Mesmo quando são considerados isoladamente os resultados obtidos nos exames de materiais colhidos na fase pré-clínica ou na fase sintomática (Tabelas 3 e 4) persiste a condição de superioridade do teste de córnea, segundo a qual a proporção de resultados positivos por este método é significativamente maior que a de isolamentos de vírus da saliva pela inoculação em camundongos.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que dos oito animais estudados,



nas glândulas salivares, embora não tenha sido possível isolar-se vírus "in vivo" da saliva deste animal. Por outro lado resultaram negativas as tentativas de isolamento de vírus das glândulas salivares de três outros animais (10, 12 e 13) que haviam eliminado "in vivo" vírus pela saliva. Casos semelhantes são referidos por SCHNEIDER<sup>40</sup>, aonde entre as explicações aventadas

a vida a partir de outras estruturas que não as glândulas salivares, tais como as membranas mucosas oro nasais.

Embora as conclusões obtidas neste experimento, limitem-se às condições aqui empregadas, os resultados indicam que maiores estudos devam ser realizados relativamente ao uso do teste de córnea para o diagnóstico "in vivo" da raiva em cães.

RFMVZ-A/10

VASCONCELLOS, S.A.; CORTES, J.A.; NILSSON, M.R.; ITO, F.H.; ENRIQUEZ ROZAS, C.E. *Rabies diagnosis during life, in experimentally infected dogs. Use of the Cornea test and virus detection by intracerebral inoculation of saliva in mice.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 15 (1): 075-086, 1978

**SUMMARY:** *The direct fluorescent antibody test for rabies on corneal impression smears (cornea test) and virus assay in saliva by intracerebral mice inoculation were carried out on eight dogs, which developed typical rabies after experimental infection with street virus. Fifty-two samples of saliva and cornea cells were examined and the proportion of positive results to the cornea test was 17/18 (94%) during the incubation period and 33/34 (97%) at the clinical phase of the disease, while, virus detection in saliva, was 10/18 (56%) and 3/34 (9%), respectively to the same disease phases. None of the rabies-infected dogs, with a negative cornea test, with or without symptoms, revealed virus in their correspondent saliva sample. A negative cornea test result do not necessarily indicate freedom from infection.*

**UNITERMS:** Rabies, dogs\*; Diagnosis during life\*; Saliva\*; Virus\*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ATANASIU, P.; GUILLON, J.C.; VALLÉE, A. Contribution a l'étude de la rage expérimentale du renard. *Ann. Inst. Pasteur*, 119 (2): 260-9, 1970.
- 2 - BALASUBRAMANIAN, A.; GAJANAYA, A.; MARIASUSAI, M.; SIVANANJAN, L.; DAVARAJ, R.; GASS, M.E. The value of corneal test in the diagnosis of rabies. In: *The Pasteur Institute of Southern of India, Coonnor. Annual Report of the Director.* 1972-1973. p.45.
- 3 - BAUER, A.G. Possibilidade do diagnóstico "in vivo" da raiva, pelo exame das fossas nasais. *Bol.Inst.Pesq.vet. Desidério Finamor*, 3: 125-31, 1975.
- 4 - BAUER, H. A guide for laboratory diagnosis and post exposure treatment of rabies. *Arch.envirohm.Hlth.*, 19 (6): 68-70, 1969.
- 5 - BESEDA, M. Reliability of the corneal test in the diagnosis of rabies; comparative studies. *Vet.Cas.* 14 (4): 121-3, 1972. apud *Vet.Bull.*, 42 (12): 6836, 1972.
- 6 - BLENDEN, D.C. Diagnosis of rabies in various species by immunofluorescent staining of skin. *J.Amer.vet.med.Ass.*, 165 (8): 735, 1974.
- 7 - BRYCESON, A.D.M.; GREENWOOD, B.M.; WARRELL, D.A.; DAVIDSON, N.M.; POPE, H.M.; LAWRIE, J.H.; BARNES, H.J.; BAILIE, W.E.; WILCOX, G.E. Demonstration during life of rabies antigen in humans. *J.infect.Dis.*, 131 (1): 71-4, 1975.
- 8 - CARAWAY, C.T. & MACKOWIAK, P.A. The risk of rabies prophylaxis vs the risk of the disease. *J.La.med.Soc.*, 127 (8): 1975.

- 9 – CIFUENTES, E.; CALDERON, E.; BIJLENGA, G. Rabies in a child diagnosed by a new intra vitam method. The cornea test. *J.trop.Met.Hyg.*, 74 (1): 23-5, 1971.
- 10 – CLARK, H.F.; WIKTOR, T.J.; KROPROWSKI, H. Human vaccination against rabies. In: BAER, G.M. *The natural history of rabies*. New York, Academic Press, 1975. p.343-62. v.2.
- 11 – CLEMMER, D.I.D.; THOMAS, J.B.; VAUGHN, J.B.; ESCOBAR, E.; SANMARTIN, C. Estudio sobre la rabia canina en la ciudad de Cali. *Bol.Ofic.Sanit.panamer.*, 69 (3): 212-20, 1970.
- 12 – COREY, L. & HATTWICK, M.A.W. Treatment of persons exposed to rabies. *J.Amer.med.Ass.*, 232 (3): 272-6, 1975.
- 13 – COREY, L.; HATTWICK, M.A.W.; RUBIN, R.J. Dealing with possible rabies exposure. *Postgrad.Med.*, 59 (3): 87-91, 1976.
- 14 – CORTES, J.A. & NILSSON, M.R. Isolamento de vírus rábico de cães aparentemente normais, inoculados experimentalmente. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ. S.Paulo*, 12: 223-8, 1975.
- 15 – CORTES, J.A. & NILSSON, M.R. Nota sobre o emprego da glicerina na conservação do vírus da raiva amostra C.V.S. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo*, 12: 235-40, 1975.
- 16 – COX, H.R. Rabies: Laboratory diagnosis and post exposure treatment. *Amer.J.clin.Path.*, 57 (6): 794-801, 1972.
- 17 – FUH, T.H. & BLENDEN, D.C. Biopsy technique for the early clinical diagnosis of rabies. *Bact.Proc.*, 71: 176, 1971.
- 18 – FUH, T.H. Fluorescent antibody test on frozen sections for diagnosis of rabies. *J.Chinese Soc. vet.Sci.*, 1 (1): 58-71, 1975.
- 19 – GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc.Soc.exp.Biol.*, New York, 98 (2): 219-23, 1958.
- 20 – HORYNA, B. Verification of the corneal test for the intra vital diagnosis of rabies in animals. *Folia microbiol.*, Praha, 18 (2): 181, 1973.
- 21 – HORYNA, B. & KABELIK, V. Verification of the corneal test in laboratory animals for the diagnosis of rabies in animals during life. *Vet.Med.*, Praha, 18 (7): 449-54, 1973 apud *Vet.Bull.*, 44 (3): 1001, 1974.
- 22 – KAYSER, H.B.; SOKOL, A.; BEALL, G.N. Unusual reaction to rabies vaccine. *J.Amer.med.Ass.*, 193 (5): 119-20, 1965.
- 23 – KAPLAN, M.M. Evaluacion de las tecnicas de laboratorio applicables al diagnostico y la prevencion de la rabia y a las investigaciones antirrabicas. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. *La rabia: tecnicas de laboratorio*. 3.ed. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1976. p.19-26, (Serie de monografias, 23).
- 24 – KARLINER, J.S. & BELAVAL, S.G. Incidence of reactions following administration of antirabies serum. Study of 526 cases. *J.Amer.med.Ass.*, 193 (5): 109-12, 1965.
- 25 – KOCH, F.J.; SAGARTZ, J.W.; DAVIDSON, D.E.; LAWHASWASDI, K. Diagnosis of human rabies by the cornea test. *Amer.J.clin.Path.*, 63 (4): 509-15, 1975.
- 26 – KOVALEV, N.A. & SHASHEN'KO, A.S. Immunofluorescent examination of corneal impression smears for rabies. *Veterinariya, Moscow* (9): 44-6, 1970 apud *Vet.Bull.*, 41 (8): 3918, 1971.
- 27 – KOVALEV, N.A. & SHASHEN'KO, A.S. Diagnosis of rabies from print preparations of the cornea using the immunofluorescent method. *Veterinarstvi*, 21 (11): 519-20, 1971 apud *Vet.Bull.*, 42 (5): 2429, 1972.
- 28 – KOVALEV, N.A. & SHASHEN'KO, A.S. Suppression of non specific fluorescence in the diagnosis of rabies by immunofluorescence in corneal impression smears. *Tr. Belorusskii Nauch.Inst.Exp.Vet.*, 14: 82-5, 1976 apud *Vet.Bull.*, 47 (4): 2004, 1977.
- 29 – LARGHI, O.P.; GONZALEZ, L.E.; HELD, J.R. Evaluation of the corneal test as a laboratory method for rabies diagnosis. *Appl.Microbiol.*, 25 (2): 187-9, 1973.
- 30 – LOPEZ, J.H.; ALVAREZ, J.; GILL, J.L.; CEBALLOS, C. Diagnostico in vivo de la rabia humana por inmunofluorescência en cornea. Presentacion del primer caso colombiano. *Antioquia méd.*, 20 (9/10): 577-82, 1970.
- 31 – MARIELL, D.; ALDASORO, M.A. Deteccion de vírus rábico. *Bol.Ofic.sanit.panamer.*, 73 (2): 117-23, 1972.
- 32 – MOREIRA, E.C. & REIS, R. Pesquisa do vírus da raiva no humor aquoso, saliva, glândulas salivares submaxilares e córnea de bezerros inoculados experimentalmente.

- Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 27 (3): 335-49, 1975.
- 33 - NILSSON, M.R. Revisão de conceito de que a raiva é sempre fatal. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 68 (1): 486-94, 1970.
- 34 - NILSSON, M.R. & CORTES, J.A. Recuperação espontânea de um cão raivoso experimentalmente infectado. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12: 229-34, 1975.
- 35 - OLIVEIRA, A.A.; FREIRE, M.C. de L.; REIS, R. Influência da Hialuronidase sobre t50 e DL50 vírus rabico inoculados em camundongos pelas vias intracerebral e subcutânea. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 26 (2): 151-3, 1974.
- 36 - ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *Comité de expertos de la O.M.S. en rabia*. 6.informe. Ginebra, 1973. 56p. (Série de informes técnicos, 523).
- 37 - REIS, R.; FIGUEIREDO, J.B.; MOREIRA, E.C.; NEVES, J.; GONTIJO, M.T.; ORNELLAS SANTOS, P.P. Presença do vírus rábico na córnea, humor aquoso e nervo óptico de humanos, bovinos, felinos e caninos com raiva. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 23: 207-14, 1971.
- 38 - SCHAAF, J. & SCHAAL, E. Diagnostic value of the cornea test, the nose test and the mouth test for diagnosing rabies when carried out on rabies post mortem material *Dtsch. tierarztl. Wschr.*, 78 (12): 341-6, 1971.
- 39 - SCHNEIDER, L.G. The cornea test: a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. *Zbl. Vet. Med.*, Reihe B, 16 (1): 24-31, 1969.
- 40 - SCHNEIDER, L.G. Spread of virus from the central nervous system. In: BAER, G.M. *The natural history of rabies*. New York, Academic Press, 1975, v.1, p.276-7.
- 41 - SHASHEN'KO, A.S. & KOVALEV, N.A. Distribution of rabies virus in the body and its isolation *Veterinariya*, Moscow (5): 42-4, 1971 apud *Vet. Bull.*, 42 (2): 684, 1972.
- 42 - SIEGEL, S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York, McGraw Hill, 1956. 312p.
- 43 - SIKES, R.K. Rabies vaccines. *Arch. environm. Hlth.*, 19 (6): 862-7, 1969.
- 44 - SMITH, W.B.; BLENDE, D.C.; FUH, T.H.; HILER, L. Diagnosis of rabies by immunofluorescent staining of frozen sections of skin. *J. Amer. med. Ass.*, 161 (11): 1495-501, 1972.
- 45 - TIERKEL, E.S. Canine rabies. In: BAER, G.M. *The natural history of rabies*. New York, Academic Press, 1975. p.123-36, v.2.
- 46 - VALLONE, E.F.; VALLONE, R.M.C. de; BAUZA, C.A.; TOSI, H.C. Rabia humana. Diagnóstico "pre mortem" a partir de la saliva por immunofluorescencia. *Arch. Pediat. Urug.*, 37 (10): 563-7, 1966.
- 47 - VAUGHN, J.B.; GERHARDT, P.; NEWELL, K.W. Excretion of street rabies virus in the saliva of dogs. *J. Amer. med. Ass.*, 193 (5): 363-8, 1965.
- 48 - WIEGAND, D. Comparative investigation of the significance of the corneal test in rabies diagnosis *Arch. exp. Vet. Med.*, 29 (3): 323-30, 1975.
- 49 - ZIMMERMANN, T. The applicability of the cornea test in rabies diagnosis *Berl. Munch. tierarztl. Wschr.*, 84 (9): 172-4, 1971.

Aprovado para publicação em 04-09-1978