

Anticorpos neutralizantes para a amostra leste do virus de encefalomielite equina em equídeos no Brasil (*)

por

Edwin H. Lennette e John P. Fox

(Com 1 mapa no texto)

Casos diagnosticados como *encefalomielite equina* tem sido desde longa data descritos em diversas partes do mundo (1). De muito se suspeitava que estavam incluídas sob essa designação doenças infecciosas de etiologia diversa. Somente, entretanto, nas últimas duas décadas, foi possível demonstrar esse fato. Assim, devido principalmente aos trabalhos de Zwick e colaboradores (2), ficou provado que a encefalomielite equina tipo Borna é devida a um *virus* filtravel. Nos Estados Unidos da América do Norte a doença não é produzida pelo *virus* de Borna (3) mas sim por duas amostras de *virus de encefalomielite equina* antigenicamente distintas, a de oeste (4) e a de leste (5) (6). Na América do Sul foi isolado na Argentina (7) um *virus* indistinguível da amostra oeste da encefalomielite equina norteamericana (7) (8) e na Venezuela foi isolado um outro *virus* que se diz antigenicamente distinto (9) (10) tanto da amostra oeste como da amostra leste. O *virus* isolado na Rússia (amostra Moscow N. 2) foi recentemente identificado como sendo o *virus da raiva* (11).

Pouco se conhece da etiologia da encefalomielite equina no Brasil. As primeiras referências encontradas na literatura brasileira sobre essa doença parecem ser as de Dupont (12) que descreveu um surto em cavalos no Paraná em 1915 e procurou, infrutiferamente, transmitir a doença a animais de laboratório. Também foram negativas as experiências de transmissão de Urbain

* Recebido para publicação a 24 de novembro de 1942 e dado à publicidade em fevereiro de 1943.

Os estudos e observações em que se baseia este artigo foram realizados sob os auspícios do Serviço de Estudos e Pesquisas sobre a Febre Amarela, mantido pelo Ministério da Educação e Saúde com a cooperação da Divisão Sanitária Internacional da Fundação Rockefeller.

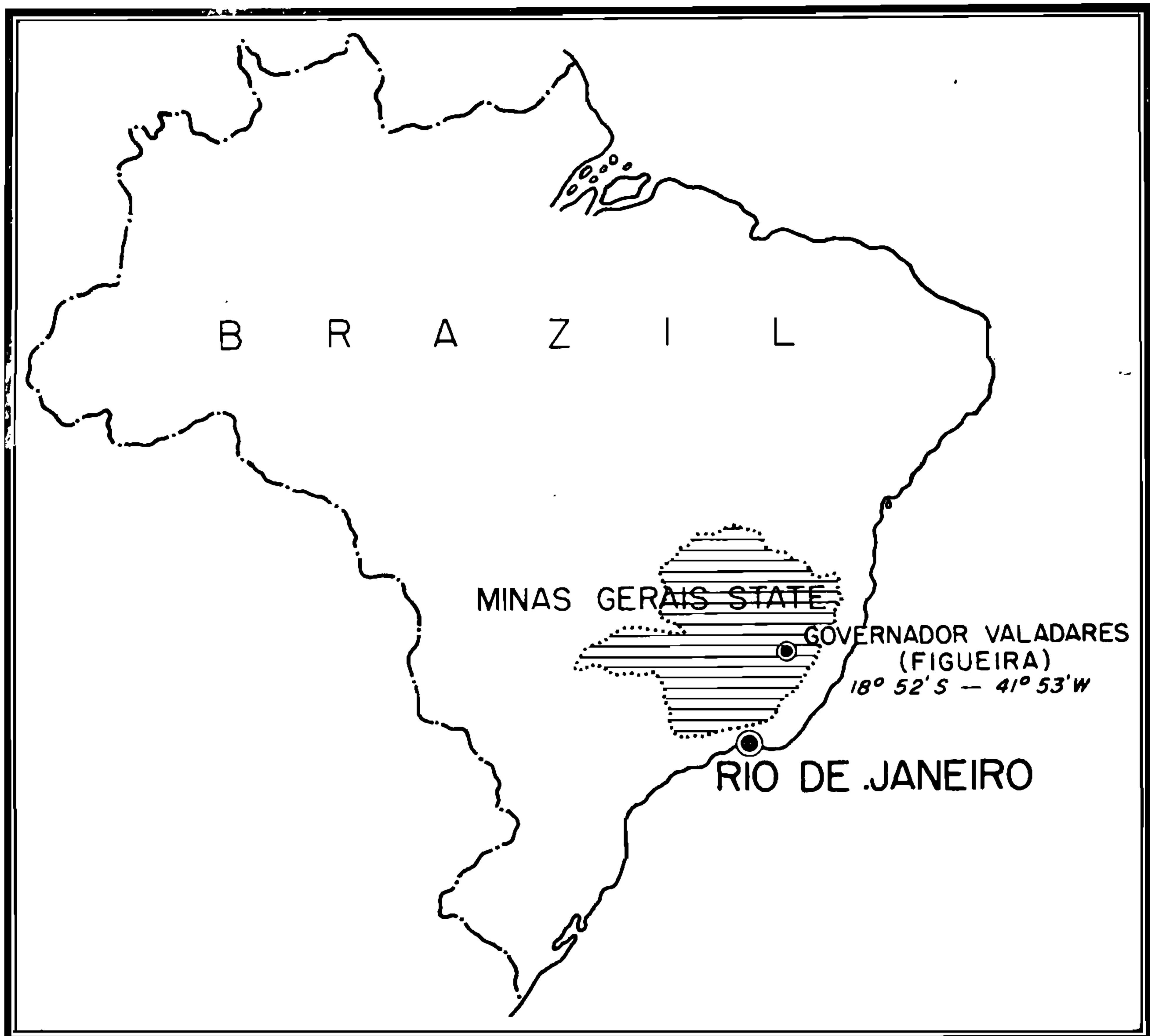
(13) no Paraná, no mesmo ano. Vernet (14), em 1925, entretanto, conseguiu infetar coelhos e cobaios com material proveniente de cavalos, mas não identificou o agente etiológico. Carneiro (15) em 1937 isolou um *virus* que, baseado em dados clínicos e histopatológicos em animais experimentais, acreditou ser muito semelhante ao *virus* da encefalomielite infecciosa dos Estados Unidos. Mais recentemente Carneiro (16) verificou que uma vacina formolizada preparada com seu *virus* protegia cobaios inoculados com *virus* homólogo por via intracerebral. No entanto, não conseguiu revelar imunidade cruzada entre esse *virus* e o da Argentina, de maneira que, continua não identificado o *virus* brasileiro. O. de Magalhães (17) isolou um *virus* em Morro Velho, Minas Gerais, em 1939, mas infelizmente a amostra foi perdida antes que tivesse sido feita a identificação. O *virus* isolado por Valle (18) na Baía em 1938 foi estudado por ele mesmo e por Cunha (19) e foi identificado pelo último pesquisador (20) como sendo o *virus* da raiva.

Em vista da incerteza na identificação dos diversos agentes infecciosos isolados de casos de encefalomielite equina no Brasil, acreditamos ser de interesse registrar o fato de termos encontrado em cavalos no Brasil anticorpos para a amostra leste do *virus* de encefalomielite equina.

MATERIAL E MÉTODOS USADOS NAS PROVAS DE SORO-NEUTRALIZAÇÃO

Origem dos soros. — Durante investigações sobre a etiologia de um surto de encefalite humana após vacinação contra a febre amarela na região de Guanhões, Minas Gerais (21), um grande número de soros foi colhido de cavalos e mulas, tanto na área afetada como nas regiões contíguas. Por essa ocasião fomos informados pelo Dr. Honorio Godoy, veterinário do Centro Agro-Pecuário de Guanhões, de que uma forma de encefalomielite equina com mortalidade elevada ocorrera na vizinhança da cidade de Governador Valadares, antigamente conhecida como Figueira do Rio Doce; a situação desta cidade está assinalada no mapa n. 1.

Investigações posteriores mostraram que na Fazenda Rio Bugre, situada entre o Rio Suassuí Grande e o Córrego Bananal no município de Peçanha, 148 cavalos tinham adoecido de setembro de 1940 a fevereiro de 1941, tendo morrido 114 deles. Em julho de 1941, 22 animais dos 34 sobreviventes foram transferidos para a Fazenda Bela Vista, perto de Chonin, município de Governador Valadares; entre estes estavam incluídos animais que se tinham restabelecido da encefalomielite e também vários que aparentemente não haviam



Posição Geográfica da Cidade de Governador Valadares

contraído a moléstia. Na Fazenda Bela Vista ainda se encontravam 17 dos 22 animais por ocasião da sangria em setembro de 1941; não foi retirado sangue de 26 animais que tinham permanecido na Fazenda Rio Bugre. Finalmente, na Fazenda Cachoeira, no município de Governador Valadares, foi colhido um espécime de soro de mula que, segundo informação, tinha estado em contacto com três cavalos que morreram com suspeita de encefalomielite.

Esses 18 soros mais tarde foram examinados quanto à presença de anticorpos para o *virus* de encefalite St. Louis e amostras leste e oeste de encefalomielite equina norteamericana. Vinte soros de cavalos foram usados como testemunha. Esses soros haviam sido colhidos nos municípios de Guanhões, Peçanha, Sabinópolis e S. João Evangelista, em várias localidades onde não se registara a ocorrência de encefalomielite equina.

Virus. — As amostras leste e oeste do *virus* de encefalomielite equina norteamericana foram obtidas do Dr. P. K. Olitsky do Instituto Rockefeller, Nova York, e o *virus* de St. Louis foi fornecido pelo Dr. M. G. Smith da Universidade de Washington, St. Louis, Missouri.

O *virus* era preparado da seguinte maneira: camundongos brancos de raça Suíça eram inoculados por via intracerebral com 0,03 ml. de suspensão a 10% ou 1% de cérebros de camundongos infectados. Quando os sintomas apareciam os animais eram mortos com clorofórmio e os cérebros retirados assepticamente. Cada cérebro era colocado num tubo de ensaio, retirando-se antes pequena porção para cultura em caldo. Os cérebros eram guardados congelados até o dia seguinte. Quando o resultado da prova bacteriológica era conhecido todos os cérebros estereis eram então misturados, pesados e triturados em gral sem alumdum; pouco a pouco se adicionava caldo com 10% de soro normal de coelho até que se obtivesse uma suspensão dos cérebros a 20% (por peso). Essa suspensão era centrifugada por 15 minutos a cerca de 2.000 r. p. m. em centrifugador horizontal. O líquido sobrenadante era distribuído em volumes de 0,5 ml. por tubos de 100 x 13 mm. Os tubos eram imersos em mistura de álcool e neve carbônica e rapidamente agitados para congelar o conteúdo em fina camada nas paredes. Estando o conteúdo completamente congelado eram os tubos colocados em dessecador do tipo Hempel contendo ácido sulfúrico. Ligava-se então o dessecador a uma bomba de vácuo deixada em contínuo funcionamento por 4 horas, fechado e em seguida era colocado na geladeira. No dia seguinte o dessecador antes de ser aberto era posto em temperatura ambiente, para evitar a condensação de água no mesmo, e o ácido mudado. Fazia-se outra vez o vácuo pelo processo anterior guardando-se o dessecador na geladeira. Após 24 horas o dessecador era aberto, com os mesmos cuidados, e os tubos selados ao macarico o mais depressa possível, rotulados e armanezados a 4°C. Na ocasião de ser usado, o material era reidratado com água destilada esteril ou solução fisiológica.

Provas de soro-neutralização. — As suspensões de *virus* usadas nas provas de neutralização foram obtidas ou pela rehidratação de *virus* dessecado ou pela preparação de suspensão de cérebros frescos de camundongo, de acordo com a técnica acima descrita. Foram feitas diluições decimais seriadas partindo da suspensão original a 20% e transferindo 0,5 para 4,5 ml. de caldo com 10% de soro normal de coelho. Na prova foram usadas as três diluições mais altas sabidamente infectantes.

A 0,15 ml. de cada uma das diluições de *virus* adicionou-se igual volume de soro não diluído. Depois da agitação foi o conteúdo dos tubos imediatamente inoculado em camundongos com idade de 28 a 30 dias; 0,03 ml. de cada

mistura foi o volume injetado por via intracerebral em cada um de seis camundongos. Soros de coelho positivos e negativos foram incluídos em cada prova como testemunhas e foram dosados em zona mais ampla de diluição de *virus* de maneira a se ter certeza de atingir o extremo da dosagem.

O título de *virus* em presença de cada soro foi calculado pelo método de Reed e Muench (50% de mortalidade) (22) e comparado com o título obtido em presença de soro testemunha de coelho normal. A diferença entre os dois títulos indicava o número de doses de *virus* neutralizado pelo soro em prova. Para fins de tabulação foram os soros divididos em três grupos, de acordo com as quantidades de *virus* que eram capazes de neutralizar. Aqueles que neutralizavam menos de 10 DLM foram considerados como negativos, os que neutralizavam entre 10 e 100 DLM foram classificados como positivos e os que neutralizavam mais do que 100 DLM, fortemente positivos.

RESULTADOS

Nenhum dos soros dos 38 equídeos incluídos no presente estudo continham anticorpos demonstráveis para os *virus* de encefalite de St. Louis e de encefalomielite equina da amostra oeste. No quadro I, portanto, só são apresentados os resultados obtidos com a amostra de *virus* de encefalomielite equina de leste.

QUADRO I

RESULTADOS DAS PROVAS DE SORO-NEUTRALIZAÇÃO COM A AMOSTRA DE VIRUS DE ENCEFALOMIELITE EQUINA LESTE

MUNICÍPIO	LOCALIDADE	RESULTADO DA PROVA DE NEUTRALIZAÇÃO			
		Número de Soros	Negativos	Positivos	Fortemente Positivos
ENCEFALOMIELITE					
Governador Valadares	Fazenda Bela Vista	17	3	8	6
	Fazenda Cachoeira	1	1		
TESTEMUNHAS					
Guanhães	Guanhães	1	1		
	Barreiras	1	1		
	Jacutinga	1	1		
	Vila Prata	2	2		
Peçanha	S. José de Jacurí	5	4		1
Sabinópolis	Monteiros	3	3		
	Euxenita	2	2		
S. João Evangelista	S. S. Pintos	5	5		
Total de soros de	Localidades com Encefalomielite	18	4	8	6
	Localidades—Testemunhas.	20	19	0	1

O soro de uma mula proveniente da Fazenda Cachoeira não neutralizou o *virus*. Segundo informações, este animal tinha estado no mesmo pasto que três cavalos os quais morreram de uma moléstia suspeita, parecendo ser encefalomielite. Entretanto, a mula nunca mostrou sintomas de encefalomielite.

Dos 17 soros da Fazenda Bela Vista somente 3 não continham anticorpos neutralizantes demonstráveis para esse *virus*. Um desses três provinha de cavalo que tinha estado doente (encefalomielite?) por 10 dias, o segundo de cavalo no qual não se tinha notado nenhuma doença durante a epizootia e o terceiro foi obtido de uma mula jovem cuja mãe morrera de encefalomielite. Dos 14 soros positivos 12 provinham de animais que haviam sofrido doença diagnosticada como encefalomielite com duração entre 2 e 8 dias e dois de animais que nunca tinham mostrado nenhum sinal de doença; estes neutralizaram respectivamente 10 e 93 DLM de *virus*.

Soros obtidos de 20 cavalos em localidades nas quais não havia sido constatada encefalomielite equina foram negativos com uma única exceção; este soro que neutralizou 330 DLM de *virus* era de interesse porque provinha do Município de Peçanha, onde está a Fazenda Rio Bugre, na qual ocorrera uma epizootia.

Como já indicado anteriormente neste trabalho, das diversas amostras de *virus* até agora isolados de surtos de encefalomielite em cavalos no Brasil somente um único foi identificado e este era de raiva. Se aceitarmos as provas de neutralização como específicas, i. é., que os anticorpos demonstrados apareceram nos animais como resultado de infecção com *virus* específico e não por infecção com um agente infeccioso imunologicamente aparentado, devemos concluir que o *virus* de encefalomielite equina de leste existe no Brasil.

SUMÁRIO

Resume-se a literatura sobre a encefalomielite equina no Brasil. Dos vários agentes infecciosos isolados de epizootias dessa doença somente um foi identificado com certeza e era o *virus* da raiva (Cunha).

Exames feitos neste Laboratório com soros de equídeos que haviam passado por uma epizootia de encefalomielite no município de Peçanha, Minas Gerais, durante o fim de 1940 e princípio de 1941 revelaram que a maioria possuía anticorpos neutralizantes para o *virus* de encefalomielite equina de leste. Estes achados indicam que esse *virus* ocorre também no Brasil não sendo, portanto, restrito à América do Norte.

Os autores especialmente agradecem ao Dr. Simão Luty Kossobudzki do Serviço de Estudos e Pesquisas sobre a Febre Amarela pela colheita dos soros dos cavalos suspeitos, que tornou possível este estudo.

ENGLISH SUMMARY

The literature on equine encephalomyelitis in Brazil is very briefly summarized. It is shown that of the several infectious agents isolated from epizootics of this disease, only one has been identified with certainty and has been found to be rabies virus (Cunha).

During late 1940 and early 1941 an epizootic of encephalomyelitis occurred in the Municipio (County) of Peçanha, which is located in the east central part of the State of Minas Gerais. Sera were collected from eighteen horses and mules which had passed through the epizootic, and tested for neutralizing antibodies to the St. Louis encephalitis virus and to the eastern and western strains of equine encephalomyelitis virus. None of the sera contained demonstrable antibodies to the St. Louis or western equine encephalomyelitis viruses; fourteen of the eighteen sera, however, possessed antibodies to the eastern strain. Only one of the twenty control sera, obtained from adjacent areas, was found to contain antibodies for the eastern strain, and this one also came from the Municipio of Peçanha.

It is concluded that the eastern strain of equine encephalomyelitis virus occurs also in Brazil and is not confined to North America.

BIBLIOGRAFIA

- 1 HUTYRA, F., MAREK, J., AND MANNINGER, R.
1938. Special pathology and therapeutics of the diseases of domestic animals, London, Balliere, Tindall and Cox, 4th English edition, vol. 3, p. 302.
- 2 MEDICAL RESEARCH COUNCIL
1930. A system of bacteriology in relation to medicine, London, His Majesty's Stationery Office, vol. 7.
- 3 HOWITT, B. F., AND MEYER, K. F.
1934. Tests for cross-immunity between the virus of Borna disease and that of equine encephalomyelitis, *J. Infect. Dis.*, 54, 364-367.
- 4 MEYER, K. F., HARING, C. M. AND HOWITT, B. F.
1931. The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquin Valley, *Science*, 74, 227.
- 5 TEN BROECK, C., AND MERRILL, M. H.
1933. A serological difference between eastern and western equine encephalomyelitis virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 31, 217-220.
- 6 GILTNER, L. T., AND SHAHAN, M. S.
1933. The 1933 outbreak of infectious equine encephalomyelitis in the eastern states. *No. Amer. Vet.*, 14, 25-27.

- 7 ROSENBUSCH, F.
1934. Ueber die epizootische Enzephalomyelitis der Pferde in Argentinien, *Ztschr. f. Infektionskr.*, 47, 48-59.
- 8 HOWITT, B. F.
1935. An immunological study in laboratory animals of thirteen different strains of equine encephalomyelitis virus, *J. Immunol.*, 29, 319-341.
- 9 BECK, C. E., AND WYCKOFF, R. W. G.
1938. Venezuelan equine encephalomyelitis, *Science*, 88, 530.
- 10 KUBES, V., AND RIOS, F. A.
1939. The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela, *Science*, 90, 20.
- 11 HOWITT, B. F.
1941. Relationship of Moscow 2 virus of equine encephalomyelitis to rabies. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 46, 69-73.
- 12 DUPONT, O.
1915. Peste de cegar. *Rev. Zoot. Vet.*, 1913, 3, 376-378 Molestia de Borna?
Rev. Zoot. Vet., 5, 198-201.
- 13 URBAIN, G.
1915. Peste de cegar. Encephalomyelite epizootica do cavalo. *Rev. Zoot. Vet.*, 5, 238-241.
- 14 VERNET, H.
1925 Encephalite enzootica dos cavallos. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 2, 461-467.
- 15 CARNEIRO, V.
1937 A encephalomyelite infecciosa dos equídeos no Brasil. *Arch. Inst. Biol.*, 8, 115-134.
- 16 CARNEIRO, V.
Comunicação pessoal.
- 17 MAGALHÃES, O.
1939. Encephalomyelitis infecciosa dos equídeos. *Brasil Médico*, 53, 949-950.
- 18 VALLE, A. L.
Citado por Cunha, referência 19.
- 19 CUNHA, R.
1941. Da transmissão a animais domésticos de um *virus* da encefalomyelite equina isolada na Baía (Brasil), *Rev. Mil. Med. Vet.*, 4, 1-34.
- 20 CUNHA, R.
Comunicação pessoal.
- 21 FOX, J. P., LENNETTE, E. H., MANSO, C., AND SOUZA AGUIAR, J. R.
1942. Encephalitis in man following vaccination with 17D yellow fever virus. *Am. J. Hyg.*, 36, 117-142.
- 22 REED, L. J., AND MUENCH, H.
1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.