

# SUSCEPTIBILIDAD DE RATONES LACTANTES Y ADULTOS AL VIRUS RÁBICO DEMOSTRADA POR INMUNOFUORESCENCIA

R. A. Bagnaroli<sup>1</sup>, O. P. Larghi<sup>2</sup> y N. Marchevsky<sup>3</sup>

*Se describe un método para el diagnóstico de la rabia que sería útil cuando la prueba de inmunofluorescencia en el material original resulte negativa. Consiste en inocular ratones lactantes y examinar sus cerebros por inmunofluorescencia a partir del primer día después de la inoculación.*

## Introducción

Cuando se ha comparado la tinción de Sellers, la técnica de anticuerpos fluorescente (AF) y la inoculación en ratones como métodos para el diagnóstico de la rabia, se ha observado que la mejor correlación de resultados se obtuvo con las dos últimas técnicas (1). A pesar de ello, dicha correlación no ha sido siempre perfecta, pues en varias ocasiones se han obtenido resultados positivos para AF en especímenes no infectantes para ratones (2-5). Estos hallazgos se han atribuido a lo que se ha dado en llamar "sustancia inhibidora del virus rábico" (2, 5, 6). Por otra parte, ocasionalmente se han obtenido resultados negativos para AF en especímenes que fueron positivos por inoculación en ratones (2, 6, 7). Estos resultados han sido explicados por la baja concentración del virus y la distribución desigual del antígeno rábico en el tejido (7).

En el laboratorio del Centro Panamericano de Zoonosis, como en muchos otros (8), ha sido una práctica acelerar el diagnóstico de las muestras críticas inoculándolas en ratones adultos y examinando los cere-

bros de estos animales mediante la técnica de AF antes de que se desarrollen los síntomas de rabia.

Dado que varios autores han demostrado una mayor susceptibilidad al virus rábico en los ratones lactantes que en los adultos (9-11), el presente estudio fue planificado con el propósito de determinar el tiempo de aparición del antígeno rábico, empleando el método de AF, en los cerebros de ratones lactantes y adultos, inoculados intracerebralmente (IC). Los resultados obtenidos indican que utilizando ratones lactantes se puede realizar el diagnóstico de la rabia con mayor rapidez.

## Materiales y métodos

Se prepararon suspensiones al 20% con cerebros de 10 animales infectados naturalmente (perros y gatos) que habían sido positivos para rabia por la técnica de AF y por inoculación en ratones. Se hizo una mezcla con fracciones alícuotas del sobrenadante de estas 10 suspensiones y la mezcla se tituló por inoculación IC en ratones adultos. El título se determinó por el método de Reed y Muench (12).

Treinta lotes de 8 ratones adultos (3 semanas) y 30 lotes de 6 a 8 ratones lactantes (2-5 días) se inocularon intracerebralmente con dicha mezcla. Diariamente se sacrificaron un ratón lactante y uno adulto de cada uno de los 30 lotes, a partir de las 24 horas después de la inoculación. Se realizaron im-

<sup>1</sup> Actualmente trabaja en el Ministerio de Agricultura y Ganadería, Santa Fe, Argentina. Este estudio se desarrolló durante su adiestramiento en el Centro Panamericano de Zoonosis y es parte de la tesis presentada a la Facultad de Ciencias Veterinarias, La Plata, Argentina, en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener el grado de "Master" en Ciencias.

<sup>2</sup> Virólogo Asistente, Centro Panamericano de Zoonosis, Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Centro de Bioestadística, Hospital Escuela "General San Martín", Buenos Aires, Argentina.

presiones de los cerebros de los ratones sacrificados, las cuales fueron fijadas y teñidas por AF, de acuerdo con las técnicas descritas por Goldwasser y Kissling (13). Los portaobjetos se identificaron por código y el técnico a cargo de la observación microscópica no conocía su origen. Los casos positivos para AF se clasificaron de 1 a 4 cruces, de acuerdo con la cantidad de antígeno rábico presente (cuadro 2).

## Resultados

La mezcla utilizada para inocular a los ratones tuvo un título de  $10^{4.5}$  DL<sub>50</sub>/0.03 ml.

Aplicando la técnica de AF, no se encontró antígeno rábico en los cerebros de ratones adultos y lactantes al primero y segundo día después de la inoculación (cuadro 1), mientras que al tercer día el mismo se observó en 28 ratones lactantes de un total de 30 (93%) y solo en uno de los 30 ratones adultos (3%). Al cuarto día se encontró antígeno en los cerebros de todos los ratones lactantes (100%) y solamente en 18 de los 30 ratones adultos (60%). Las diferencias observadas en la proporción de animales en los cuales se detectó antígeno al tercero y cuarto día después de la inoculación, fueron estadísticamente significativas según la prueba de  $Ji^2$  ( $p < 0.0002$ ).

Entre el quinto y el octavo día se encontró antígeno en los cerebros de todos los ratones, tanto adultos como lactantes. Sin em-

CUADRO 1—Porcentaje de ratones positivos para AF en diferentes intervalos.

Días después de la inoculación	% positivos	
	Adultos	Lactantes
1	0	0
2	0	0
3 <sup>a</sup>	3	93
4 <sup>b</sup>	60	100
5	100	100
6	100	100
7	100	100
8	100	100

<sup>a</sup> Prueba de significancia de  $Ji^2 = 48.6$  ( $p < 0.00001$ ).

<sup>b</sup> Prueba de significancia de  $Ji^2 = 15$  ( $p < 0.0002$ ).

bargo, al quinto día se observaron cantidades de antígeno de 3 y 4 cruces en los cerebros de los ratones lactantes, mientras que solo el 10% de los cerebros de los ratones adultos presentaron 3 cruces (cuadro 2). Al sexto día, el 100% de los cerebros de los ratones lactantes presentaron cantidades de antígeno de 4 cruces, mientras que el 30% de los cerebros de ratones adultos presentaron 3 cruces y solo el 7% 4 cruces. Las diferencias observadas en las cantidades de antígeno encontradas al quinto y sexto día fueron estadísticamente significativas según la prueba de  $Ji^2$  ( $p < 0.0001$ ).

Durante los 8 días de observación no se observaron síntomas de rabia en ninguno de los componentes de los 60 grupos de animales.

## Discusión

Goldwasser y Kimron (8) utilizaron muestras individuales y ratones adultos en el es-

CUADRO 2—Número de ratones examinados y cantidad de antígeno demostrado por AF en diferentes intervalos.

Días después de la inoculación		Número de ratones					
		Examinados	Cantidad de antígeno <sup>a</sup>				
			0	1	2	3	4
1	{ Adultos	30	30	—	—	—	—
	{ Lactantes	30	30	—	—	—	—
2	{ Adultos	30	30	—	—	—	—
	{ Lactantes	30	30	—	—	—	—
3	{ Adultos	30	29	1	—	—	—
	{ Lactantes	30	2	10	13	5	—
4	{ Adultos	30	12	14	4	—	—
	{ Lactantes	30	—	—	5	16	9
5 <sup>b</sup>	{ Adultos	30	—	17	10	3	—
	{ Lactantes	30	—	—	—	13	17
6 <sup>c</sup>	{ Adultos	30	—	7	12	9	2
	{ Lactantes	30	—	—	—	—	30
7	{ Adultos	30	—	3	9	15	3
	{ Lactantes	24	—	—	—	—	24
8	{ Adultos	28	—	—	6	18	4
	{ Lactantes	14	—	—	—	2	12

<sup>a</sup> 0 + = No se demostró antígeno.

1 + = Menos de una inclusión por campo de 100 ×.

2 + = 1-2 inclusiones por campo de 100 ×.

3 + = 3-15 inclusiones por campo de 100 ×.

4 + = Más de 15 inclusiones por campo de 100 ×.

<sup>b</sup> Prueba de significancia de  $Ji^2 = 49.1$  ( $p < 0.00001$ ).

<sup>c</sup> Prueba de significancia de  $Ji^2 = 27.8$  ( $p < 0.00001$ ).

tudio realizado para determinar, por AF, el tiempo de aparición del virus rábico después de la inoculación IC. En el presente estudio los ratones adultos y lactantes se inocularon con una mezcla de cerebros positivos para rabia a fin de eliminar las variaciones en el título de muestras individuales y facilitar el análisis estadístico de los resultados.

Nilsson y Sugay (11) demostraron que los ratones de 2 días de edad eran más susceptibles que los de 30 días para el aislamiento de dos cepas de virus de la calle. En los estudios de los autores, la diferencia entre el momento de aparición del antígeno rábico en los cerebros de los ratones lactantes y adultos fue de 24 horas y la cantidad de antígeno presente en los cerebros de los animales sacrificados fue mayor en los primeros, lo cual indicaría claramente que el virus rábico se multiplicó más rápidamente en los cerebros de los ratones más jóvenes.

La mayor susceptibilidad de los ratones lactantes y la temprana aparición del virus rábico en sus cerebros aplicando la técnica de AF, permite disminuir el período de observación necesario para obtener un resultado positivo con la prueba de inoculación de animales. Consideramos que en los casos sospechosos o críticos en los cuales la coloración de AF de la muestra original es negativa, sería de utilidad la inoculación de ratones lactantes y la tinción diaria de sus cerebros por AF, a partir del primer día después de la inoculación.

La mezcla de virus rábico utilizada en este ensayo tuvo un título bastante alto para un tejido infectado naturalmente. Suponemos que la inoculación de virus de título más bajo, aumentaría el período de aparición del antígeno rábico, pero aun así, esta podría producirse antes en los cerebros de los ratones lactantes que en los de los adultos. Esto último debería ser comprobado experimentalmente.

Reagan y colaboradores (14) demostraron que algunas cepas de virus de la calle producen períodos de incubación más cortos, y

que los corpúsculos de Negri son más grandes y numerosos en hamsters que en ratones. Colussi (15) observó que la inoculación intraperitoneal en ratones de bacterias no viables acorta el período de incubación de la rabia. Todos estos resultados sugieren la posibilidad de disminuir aun más, el período requerido para la aparición del antígeno rábico demostrable por AF, mediante el uso de bacterias muertas en hamsters lactantes.

Con posterioridad a la terminación de este trabajo, se ha sabido que Pilo Moron y colaboradores (16) desarrollaron un procedimiento similar por el cual demostraron por AF la presencia de antígeno rábico en los cerebros de ratones lactantes tres días después de la inoculación de muestras individuales.

#### Resumen

Se determinó el tiempo de aparición del antígeno rábico en los cerebros de ratones lactantes y adultos inoculados IC con una mezcla de virus de la calle, usando el método de AF. Tres días después de la inoculación se encontró antígeno rábico en los cerebros de 28 de un total de 30 ratones lactantes, mientras que todos los ratones adultos, excepto uno, resultaron negativos. Al cuarto día, los cerebros de todos los ratones lactantes fueron positivos, mientras que 18 cerebros de un total de 30 ratones adultos fueron negativos. La cantidad de antígeno rábico encontrado en los cerebros de los ratones lactantes fue mayor que en los de los adultos. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas mostrando dependencia entre la edad de los ratones, el tiempo de aparición y la cantidad de antígeno presente en los cerebros.

Para realizar un diagnóstico de la rabia preciso y rápido cuando la muestra original resulte negativa a AF, se recomienda la inoculación de ratones lactantes y la tinción diaria de sus cerebros por AF, a partir del primer día después de la inoculación. □

## REFERENCIAS

- (1) McQueen J. L. "Rabies diagnosis. Special application of fluorescent antibody techniques". En *Proc Annual Meet United States Livestock Sanitary Association* 63: 356-363, 1965.
- (2) Carski T. R., Wilsnack R. E. y Sikes R. K. "Pathogenesis of rabies in wildlife. II. Fluorescent antibody studies". *Amer J Vet Res* 23:1048-1052, 1962.
- (3) Girard K. F. et al. "Rabies in bats in Southern New England". *New Engl J Med* 272:75-80, 1965.
- (4) Lennette E. et al. "The diagnosis of rabies by fluorescent antibody method (FRA) employing immune hamster serum". *Health Lab Sci* 2:24-34, 1965.
- (5) Parker R. L. y Sikes R. K. "The development of rabies inhibiting substance in skunks infected with rabies virus". *Public Health Rep* 81:941-946, 1966.
- (6) Wilsnack R. E. y Parker R. L. "Pathogenesis of skunk rabies virus. Rabies inhibiting substance as related to rabies diagnosis". *Amer J Vet Res* 27:39-43, 1966.
- (7) Goldwasser R. A. et al. "Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals". *Bull WHO* 20:579-588, 1959.
- (8) Goldwasser R. A. y Kimron A. "Time of appearance of rabies virus antigen in brains of mice following inoculation of virus". *Int Ass Microbiol Soc Sect Biol Standardization* 5:69-76, 1960.
- (9) Casals J. "Influence of age factor on susceptibility of mice to rabies virus". *J Exp Med* 72:445-451, 1940.
- (10) Koprowski H., Black J. y Nelsen D. "Studies on chick embryo adapted virus. VI. Further changes in pathogenic properties following prolonged cultivation in the developing chick embryo". *J Immunol* 72: 94-106, 1954.
- (11) Nilsson M. R. y Sugay W. "O uso de camundongos lactantes no diagnostico da raiva". *Arch Int Biol* 33:47-48, 1966.
- (12) Reed L. J. y Muench H. "A simple method of estimating 50 per cent end points". *Amer J Hyg* 27:493-497, 1938.
- (13) Goldwasser R. A. y Kissling R. E. "Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens". En *Proc Soc Exp Biol* (Nueva York) 98:219-223, 1958.
- (14) Reagan R. L., Day W. C. y Brueckner A. L. "Rabies street virus strain in the Syrian hamster and in the Swiss albino mouse". En *Proc Soc Exp Biol* (Nueva York) 81:654-656, 1952.
- (15) Colussi A. D. "Modificación del 'test' biológico y su utilidad en el diagnóstico de la rabia". *Rev Med Vet (B Aires)* 42: 187-206, 1961.
- (16) Pilo Moron E. et al. "Diagnostic rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous-maxillaire aux souris et par l'immunofluorescence". *Arch Inst Pasteur* (Argelia) 45:5-10, 1967.

**Susceptibility of suckling and adult mice to rabies virus as demonstrated by immunofluorescence (Summary)**

The time of appearance in the brain of rabies antigen detectable by fluorescent antibodies (FA) was determined in suckling and adult mice inoculated intracerebrally with a street rabies virus pool.

Rabies antigen was found in the brains of 28 of 30 suckling mice on day 3 post-inoculation, while all the adult mice but one were negative. On day 4 all the suckling mouse brains were positive and 18 of 30 adult mouse brains were still negative. The amount of antigen found in

the suckling mouse brains was greater than in the adult mice. The differences observed were statistically significant showing dependence between the age of the mice and both, the time of appearance and the amount of antigen present in the brains.

Inoculation of suckling mice and daily FA staining of their brains starting on the first day post-inoculation is recommended to obtain rapid and accurate rabies diagnosis, when the FA stain of the original sample is negative.

**Susceptibilidade de camundongos lactentes e adultos ao vírus da raiva, demonstrada por imunofluorescência (Resumo)**

Determinou-se o tempo de apresentação do antígeno rábico nos cérebros de camundongos lactentes e adultos inoculados IC com uma mescla de vírus de rua, pelo método de AF.

Três dias após a inoculação, observou-se antígeno rábico nos cérebros de 28 de um total de 30 camundongos lactentes, enquanto que todos os camundongos adultos, exceto um, se apre-

sentaram negativos. Ao quarto dia, os cérebros de todos os camundongos lactentes foram positivos, enquanto que 18 cérebros de um total de 30 camundongos adultos foram negativos. A quantidade de antígeno rábico encontrado nos cérebros dos camundongos lactentes foi maior que a dos adultos. As diferenças observadas foram estatisticamente significativas e mostraram dependência entre a idade dos camundon-

gos, o tempo de apresentação e a quantidade do antígeno presente nos cérebros.

Para fazer um diagnóstico de raiva preciso e rápido quando a amostra original der resultado negativo a AF, recomenda-se a inoculação de camundongos lactentes e a coloração diária de seus cérebros por AF, desde o primeiro dia da inoculação.

### La susceptibilité des souriceaux au virus rabique révélée par l'immunofluorescence (Résumé)

L'auteur a établi le temps de l'apparition de l'antigène rabique dans les cerveaux des souriceaux et des souris adultes inoculés par un mélange de virus des rues en utilisant la méthode AF. Trois jours après l'inoculation, on a constaté la présence de l'antigène rabique dans les cerveaux de 28 souriceaux sur un total de 30, alors que toutes les souris adultes, sauf une, se sont révélées négatives. Le quatrième jour, les cerveaux de tous les souriceaux ont été positifs, alors que 18 cerveaux sur un total de 30 souris adultes ont été négatifs. La quantité d'antigène rabique trouvée dans les cerveaux des souri-

ceaux a été plus grande que celle des souris adultes. Les différences enregistrées ont été importantes du point de vue statistique font ressortir une corrélation entre l'âge des souris, le temps d'apparition et la quantité d'antigène présente dans les cerveaux.

Pour effectuer un diagnostic précis et rapide de la rage lorsque l'échantillon original se révèle négatif à l'AF, l'auteur recommande l'inoculation des souriceaux et la coloration quotidienne de leurs cerveaux par l'AF à compter du premier jour de l'inoculation.

### HIGIENE DENTAL EN LOS ESTADOS UNIDOS

El Departamento de Salud del estado de Montana inició un programa entre los alumnos de escuela primaria con el fin de disminuir la incidencia de caries dentales. Al finalizar el año lectivo 1968-1969 dicho programa se había instituido en dos escuelas de Billings y en las del condado de Ravalli.

Este programa se realizó con la cooperación de dentistas locales quienes enseñaron a los alumnos a usar el fluoruro de fosfato acidulado. Una vez instruidas en la forma apropiada de cepillarse los dientes, las madres sirvieron como voluntarias.

Según el Dr. A. Jack Terrill, director de la División de Salud Dental, el procedimiento de autoaplicación del producto ha surtido tan buen efecto que no hay razón para que no se instituya el programa en cualquier lugar de Montana. Comenta, asimismo, que los resultados obtenidos en un laboratorio del estado de Dakota del Norte indican que la penetración del fluoruro de fosfato acidulado autoadministrado parecía ser superior a la obtenida con una solución.

[“Program notes”. *Public Health Rep* 84(10):906, 1969.]