

# VIRUS RABICO EN RATAS Y RATONES INOCULADOS INTRAPLANTARMENTE

M. Martell D.<sup>1</sup> y L. P. Moles y C.<sup>2</sup>

*Se inocularon ratas y ratones por vía intraplantar con virus rábico con el fin de observar el tiempo transcurrido entre la inoculación y la detección del virus en médula espinal, encéfalo y córnea, antes de la aparición de signos clínicos.*

## Introducción

La rabia es una enfermedad que afecta a muchos mamíferos, y que produce cuadros clínicos caracterizados por trastornos del sistema nervioso, y casi siempre es mortal. Con toda probabilidad esta es una de las antropozoonosis que mayor importancia e interés ha despertado desde que se descubrió.

Primero se pensó que el virus rábico solo infectaba las glándulas salivales y el sistema nervioso central, pero estudios posteriores

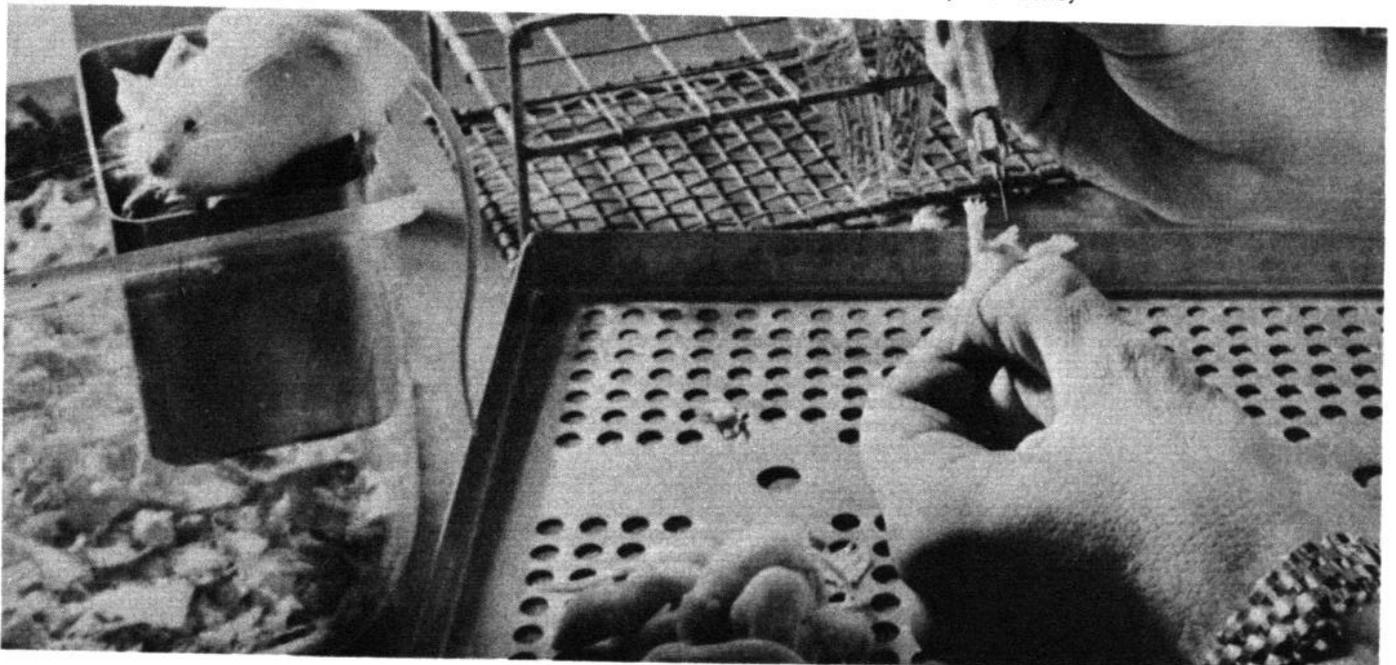
sobre patogenia demostraron que este virus se puede aislar de glándula lagrimal, humor acuoso, humor vítreo, pulmón, corazón, riñón, adrenales, y de otras glándulas de secreción externa, lo cual ha sido demostrado en el hombre (10); en murciélagos (22, 23); en bovinos (4, 14, 21); en perros (1, 5, 9), y en ratones (12, 20).

El uso de colorantes inespecíficos ha permitido la detección de virus directamente en epitelio corneal (11). Luego, usando la técnica de tinción con anticuerpos fluorescentes, también se ha detectado en la córnea (20). En ratones inoculados experimentalmente, Schneider (20) observó 70% de casos positivos en córnea y en glándula salival simultáneamente. Sin embargo, en

<sup>1</sup> Jefe del Laboratorio Central Nacional de Diagnóstico, Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico (RENALDI), Dirección General de Sanidad Animal, Secretaría de Agricultura y Ganadería, México, D.F.

<sup>2</sup> Departamento de Patología, Laboratorio Central Nacional de Diagnóstico, Dirección General de Sanidad Animal, Secretaría de Agricultura y Ganadería, México, D.F.

Inoculación intraplantar de virus rábico en ratones (Foto OMS)



casos naturales en perros se observó 70% de positividad en córnea, pero no siempre coincidió con la presencia de virus en glándula salival (12). En ratones inoculados intracerebralmente con una cepa de origen canino se ha logrado la detección de virus rábico en encéfalo, 96 horas antes de la presentación de signos clínicos; al utilizar una cepa proveniente de vampiro, la detección fue 87 horas antes (15).

En bovinos sacrificados en el rastro se detectó virus rábico en médula espinal. Esto ocurrió en animales de zonas donde el derriengue es enzoótico, sin observarse alteraciones clínicas aparentes (13).

Este experimento se realizó con el fin de observar a cuántas horas después de la inoculación intraplantar era posible detectar el virus rábico en médula espinal, encéfalo y córnea, antes de la aparición de signos clínicos, utilizando ratas y ratones como animales de experimentación.

### Material

**Animales.** Se emplearon 100 ratones albinos suizos adultos y 100 ratas blancas adultas.

**Virus.** Cepa V-319 —de virus rábico con título de  $10^{4.6}$  D.L. 50% (0.03 ml I.C. en ratones de 21 días)— aislada de glándulas salivales de vampiros (*Desmodus rotundus*) y fijada por pases intracerebrales en ratones.<sup>3</sup>

**Inóculo.** Suspensión al 10% de cerebros de ratones infectados, utilizando solución salina Hanks como diluyente (8).

**Microscopía.** Microscopio de luz U.V. para fluorescencia, Carl Zeiss, con lámpara HB<sup>0</sup> 200 Osram, filtro de excitación BG-12 y Kg 1 como barrera.

### Métodos

**Ratones.** Se hizo una dilución de  $10^{-1}$  de inóculo del cual se aplicó 0.08 ml en el

cojinete plantar del miembro posterior izquierdo de cada animal. Luego se sacrificaron grupos de 3 a 5 ratones cada 12 horas, hasta observar la parálisis en el grupo de animales sobrevivientes, lo cual se consideró como el primer signo clínico (2, 9, 15 y 19).

**Ratas.** Estas fueron inoculadas intraplantarmente en el miembro posterior izquierdo, con 0.1 ml de la suspensión  $10^{-1}$ . Se sacrificaron 3 ratas por grupo, el primero a las 18 horas posteriores a la inoculación; el segundo a las 24 horas, y después, cada 12 horas, hasta observar la parálisis.

**Titulación del virus.** A 6 grupos de 6 ratones cada uno, se les inoculó intracerebralmente 0.03 ml de diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ . Los animales muertos durante las primeras 96 horas fueron desechados, por considerar que murieron por causas ajenas al virus. El título se calculó por el método de Reed y Muench (17).

**Diagnóstico.** Después de sacrificar con éter a los animales, se procedió a disecar la columna vertebral y el encéfalo. Se hicieron cortes sagitales a la altura de la región lumbar, torácica, cervical, y del cerebelo y cerebro. Con estos tejidos se hicieron impresiones al igual que de epitelio corneal, procesándose por el método de anticuerpos fluorescentes (6).

### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en los ratones se presentan en el cuadro 1; y los de las ratas, en el cuadro 2.

En los ratones inoculados se detectó virus rábico en médula a las 84 horas (3.5 días) en 5 de 5 animales, o sea 84 horas (3.5 días) antes de la aparición de los signos clínicos. Se hicieron observaciones simultáneas en médula torácica y cervical. En cerebelo y cerebro, a las 96 horas (4 días) se encontró virus, o sea 72 horas (3 días) antes de la aparición de los primeros signos. En córnea a las 120 horas (5 días) se

<sup>3</sup> Cepa amablemente proporcionada por el Dr. Pierre Sureau, Director del Proyecto sobre Rabia Paralítica Bovina, I.N.I.P. (FAO).

CUADRO 1—Detección de virus rábico antes de la aparición de signos clínicos en médula lumbar, torácica, cervical, cerebelo y cerebro de ratones inoculados intraplantarmente.

Horas posteriores a la inoculación	Regiones					
	Lumbar	Torácica	Cervical	Cerebelo	Cerebro	Córnea
12	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
24 (1 día)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
36	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
48 (2 días)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
72 (3 días)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
84	5/5	5/5	5/5	3/5	3/5	0/5
96 (4 días)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5
108	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
120 (5 días)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
132	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
144 (6 días)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5
156	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

Título— $10^{4.0}$  D.L. 50%.

Período de incubación, 168 horas (7 días).

observó fluorescencia. Sin embargo, a las 96 horas (4 días), 2 de 5 resultaron positivos, y 156 horas (6.5 días) después de la inoculación hubo 3 de 3 negativos. Esto puede deberse a una fase ciega en la multiplicación viral y también muestra cuán variable puede ser la detección de virus en este tejido. Esta variación coincide con la

observada anteriormente en bovinos por Hernández (7), quien detectó virus en epitelio corneal en la fase agónica de la enfermedad y no al morir los animales. En médula lumbar se detectó el virus a las 84 horas (3.5 días), o sea 12 horas después de lo observado por Schindler (19) al inocular ratones por vía intramuscular con 126,000

CUADRO 2—Detección de fluorescencia específica a rabia en médula lumbar, torácica, cervical, cerebelo y cerebro de ratas inoculadas intraplantarmente.

Horas posteriores a la inoculación	Regiones					
	Lumbar	Torácica	Cervical	Cerebelo	Cerebro	Córnea
18	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
24 (1 día)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
36	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
48 (2 días)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
60	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
72 (3 días)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
84	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	0/3
96 (4 días)	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	1/3
108	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
120 (5 días)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
132	0/3	1/3	2/3	3/3	1/3	0/3
144 (6 días)	2/3	2/3	2/3	3/3	3/3	2/3
156	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3
168 (7 días)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3
180	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
192 (8 días)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
204	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
216 (9 días)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3

Título— $10^{4.0}$  D.L. 50%.

Período de incubación, 228 horas (9.5 días).

(D.L. 50%, 0.03 ml I.C. en ratones de 21 días), lo cual pudo haber influido en la temprana aparición del virus en la médula, o tal vez esta diferencia se deba a la vía de inoculación, ya que en este estudio se inocularon 12,000 (D.L. 50%, 0.03 ml I.C. en ratones de 21 días).

Con respecto a las diferencias con trabajos anteriores, donde se utilizó la inoculación intracerebral, Salido (18) menciona la presencia de virus a las 24 horas posteriores a la inoculación. Bagnaroli y colaboradores (3), al utilizar ratones lactantes, observaron fluorescencia en 28 de 30 ratones a las 72 horas (3 días) después de la inoculación intracerebral. Pilo Moron y colaboradores (16) la observaron a las 120 horas (5 días) con cepas aisladas de glándula salival. En este experimento en ratones, se detectó virus rábico a las 84 horas (3.5 días) en médula lumbar al inocular por vía intraplantar, que equivale a 36 horas (1.5 días) antes que el hallazgo de Pilo Moron y colaboradores (16) al utilizar la vía intracerebral.

En el lote de ratas se hizo la detección del virus por primera vez a las 72 horas (3 días) en todas las porciones de la médula y encéfalo en 3 de 3 ratas sacrificadas. El hallazgo en córnea fue en 2 de 3 animales a las 144 horas (6 días). Estos resultados indican que la aparición de fluorescencia en médula y encéfalo fue a las 156 horas (6.5 días) antes de presentarse los signos clínicos, los que ocurrieron a las 228 horas (9.5 días).

Baer y colaboradores (2), trabajando con ratas inoculadas por vía intraplantar, observaron el virus por primera vez a las 72 horas, pero únicamente en la porción lumbar de la médula con indicios en el segmento torácico; a las 96 horas (4 días) había virus en cerebro, pero los animales ya se encontraban en la fase parálitica.

En los ratones, el virus fue detectado en médula a las 84 horas (3.5 días), o sea 12 horas después de la detección en médula de las ratas. Además, en estas se realizó la

detección de virus en cerebro también a las 72 horas (3 días) y en ratones a las 96 horas (4 días), o sea, 24 horas después. Aparentemente, el virus inoculado en las ratas pasó por el tejido nervioso con mayor rapidez que en los ratones a pesar de ser una cepa fijada en ratones por pases intracerebrales. Quizá a ello se debió que el período de incubación fuera más corto en ratones, 168 horas (7 días), mientras que en las ratas fue de 228 horas (9.5 días).

Con respecto al epitelio corneal en los ratones, el virus se detectó a las 96 horas (4 días) en 2 de 5 animales, y a las 108 horas (4.5 días) no se detectó, pero volvió a aparecer a las 120 horas (5 días) con detección variable. En ratas sucedió algo semejante lo cual pone de manifiesto la variabilidad de la presencia del virus en este tejido.

El virus fue detectado siempre. Primero en la médula y posteriormente en el encéfalo, lo que sugiere que en este caso pasó al encéfalo por vía centripeta. Además, según los hallazgos hechos en córnea, que fueron posteriores a los del tejido nervioso, es de suponer que el virus no llegó tampoco por vía sanguínea.

Las diferencias tan marcadas que se observaron entre los resultados obtenidos por diversos autores pueden deberse al tipo de cepa del virus que se utilizó; a la especie animal o a la cantidad del inóculo usado.

### Resumen

Para realizar este experimento y con el propósito de encontrar cuántas horas antes de la aparición de los primeros signos clínicos es posible detectar virus rábico en médula espinal, cerebelo, cerebro y córnea por medio del método de inmunofluorescencia, se inocularon ratones por vía intraplantar con 0.08 ml y ratas con 0.1 ml. Se sacrificaron grupos de 3 a 5 animales cada 12 horas, haciendo impresiones del material nervioso y epitelio corneal, las cuales fueron

procesadas por el método de anticuerpos fluorescentes para su diagnóstico.

En ratones se detectó virus en médula a las 84 horas (3.5 días), o sea 84 horas (3.5 días) antes de la aparición de signos clínicos en médula lumbar, a las 96 horas (4 días) antes de la aparición de signos clínicos en médula torácica y cervical, y a las 72 horas (3 días) antes de la presencia de signos clínicos en encéfalo. En córnea la detección se realizó desde las 120 horas (5 días).

En ratas, el hallazgo de virus en médula y encéfalo fue simultáneo, a las 72 horas (3 días), o sea a las 156 horas (6.5 días) antes de la aparición de signos clínicos. En córnea hasta las 144 horas (6 días). Los resultados obtenidos indican que aparentemente el virus viajó con mayor rapidez en el tejido nervioso de las ratas, que en el de los ratones. □

#### Agradecimiento

Se agradece al Dr. A. Uruchurtu M. su valiosa ayuda en la redacción de este trabajo.

#### REFERENCIAS

- (1) Aluja, S. A.; Velázquez, E. A., y Galindo, R. F. "Identificación del virus rábico en diferentes tejidos celulares mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes". *Rev Med Vet Zoot* 2(4):143-156, 1963.
- (2) Baer, M. G.; Schanthaveerappa, R. T., y Bourne, H. G. "Studies on the pathogenesis of fixed rabies virus in rats". *Bull WHO* 33:783-794, 1965.
- (3) Bagnaroli, R. A.; Larghi, O. P., y Marchevsky, N. "Susceptibilidad de ratones lactantes y adultos al virus rábico demostrada por inmunofluorescencia". *Bol Ofic Sanit Panamer* 68(5):388-392, 1970.
- (4) Benignos, J. *Estudio de patogenia del virus rábico en ganado inoculado experimentalmente*. Tesis profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1970.
- (5) Estañol, A. C. *Contribución al estudio de la patogenia del virus rábico*. Tesis profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1971.
- (6) Goldwasser, R. A. y Kissling, R. E. "Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens". *Proc Soc Exp Biol* 98:219-223, 1958.
- (7) Hernández, Y. H. *Estudio comparativo entre un caso natural y uno experimental de derriengue en bovinos*. Tesis profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1970.
- (8) Hsiung, G. D. *Diagnostic virology*. Yale University Press, New Haven y Londres, 1964.
- (9) Kitselman, C. H. y Mital, A. K. "Terminal dissemination of rabies virus in selected rat tissues". *Can J Comp Med* 32:461-464, 1968.
- (10) Leach, C. N. y Johnson, N. H. "Human rabies with special reference to virus distribution and titer". *Amer J Trop Med* 20:335-340, 1940.
- (11) Levaditti, C. y Schoen, R. "Les corps de Negri dans le cytoplasm des epithelium de la cornée". *Ann Inst Pasteur Suppl. Commemorative* 55:69-96, 1935.
- (12) Martell, D. M. y Aldasoro, M. A. "Detección de virus rábico en glándula salival, lagrimal y epitelio corneal de perros afectados en forma natural". (En prensa)
- (13) Martell, D. M. y Del Valle, P. Trabajo presentado en el XIX Congreso Mundial de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D.F., 1971.
- (14) Martell, D. M.; Batalla, C. D., y Baer, M. J. "Estudio de inmunofluorescencia de diferentes segmentos de encéfalos de bovinos muertos de rabia paralítica o derriengue en forma natural e inoculados experimentalmente". *Téc Pec Méx* 12-13:24-27, 1969.
- (15) Martell, L. M.; Batalla, C. D. y López, R. J. "Detección de fluorescencia específica de rabia antes de la aparición de signos en ratones inoculados intracerebralmente con 5 cepas de virus rábico con y sin dime-tilsulfóxido (DMSO)". *Téc Pec Méx* 12-13:28-32, 1969.
- (16) Pilo Moron, E. et al. "Diagnosticque rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous maxillaire aux souris et par l'immunofluorescence". *Arch Inst Pasteur Algerie* 45:5-10, 1967.
- (17) Reed, L. J. y Muench, R. "A simple method of estimating fifty per cent end points". *Amer J Hyg* 27:493-497, 1938.

- (18) Salido y Rengell, F. "Estudio de la cinética del virus de la rabia en ratones inoculados intracerebralmente". *Rev Invest Sal Pùb Méx* 28(3):183-192, 1968.
- (19) Schindler, R. "Studies on the pathogenesis of rabies". *Bull WHO* 25:119-126, 1961.
- (20) Schneider, L. G. "Pathogenesis of rabies in mice. III. Centrifugal and virus spread and generalization in the body". *Zbl Bakt Parasit Kde I*, 212:13-41, 1969.
- (21) Silva, R. A. y Souza, A. M. "Aislamiento de virus rábico de pulmón, corazón, riñón, vejiga y otros diferentes tejidos de murciélagos hematógafos de las especie *Desmodus rotundus*". En V Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Caracas, Venezuela, 1966.
- (22) Sulkin, E. S.; Krutz, H. P., y Allen, R. "Role of brown bat in pathogenesis of rabies in insectivorous bats (*Tadarida b. mexicana*)". *Proc Soc Expl Biol Med* 96(2): 461-464, 1957.
- (23) Villa, B. R.; Alvarez, B. L., y Domínguez, E. C. "Presencia y persistencia del virus de la rabia en la glándula interescapular de algunos murciélagos mexicanos". *Cienc Méx* 22(5):137-140, 1963.

#### Rabies Virus in Rats and Mice Inoculated Intraplantarally (Summary)

The article describes an experiment to determine how soon rabies virus can be detected by immunofluorescence in the spinal cord, cerebellum, cerebrum, and cornea before the first clinical signs of disease appear. Mice were inoculated intraplantarally with 0.08 ml and rats with 0.1 ml, and groups of three to five animals were sacrificed every 12 hours. Impressions were prepared from the nerve material and corneal epithelium and processed for diagnosis by the fluorescent antibody (FA) technique.

In the mice, virus was detected in the medulla at 84 hours (3.5 days)—an advance

over the appearance of clinical signs of 84 hours (3.5 days) for the lumbosacral cord, 96 hours (4 days) for the thoracic and cervical medulla, and 72 hours (3 days) for the brain. In the cornea detection was possible at 120 hours (5 days).

In the rats, virus was found simultaneously in the medulla and in the brain at 72 hours (3 days), or 156 hours (6.5 days) sooner than the clinical signs appeared at either of these sites, and in the cornea at 144 hours (6 days).

The results would appear to indicate that the virus traveled more rapidly in the nerve tissue of the rats than in that of the mice.

#### Vírus rábico inoculado intraplantarmente em ratos e ratazanas (Resumo)

O artigo demonstra uma experiência realizada para determinar com quantas horas de antecedência ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos é possível detectar o vírus rábico na medula espinhal, no cerebelo, no cérebro e na córnea por meio do método de imunofluorescência. Durante a experiência, inocularam-se ratos por via intraplantar com 0,08 ml e ratazanas com 0,1 ml e se sacrificaram grupos de três a cinco animais cada 12 horas, fazendo-se impressões do material nervoço e do epitélio corneal, para cujo diagnóstico foram processadas pelo método de anticorpos fluorescentes.

Detectaram-se vírus na medula de ratazanas decorridas 84 horas (3,5 dias), ou seja, 84

horas (3,5 dias) antes do aparecimento de sinais clínicos na medula lombar, 96 horas (4 dias) antes do aparecimento de sinais clínicos na medula torácica e cervical, e 72 horas (3 dias) antes da presença de sinais clínicos no encéfalo. A detecção na córnea foi realizada a partir das 120 horas (5 dias).

Em ratos, a detecção de vírus na medula e no encéfalo foi simultânea em 72 horas (3 dias), ou seja, 156 horas (6,5) dias antes do aparecimento de sinais clínicos. Na córnea, a detecção foi feita com uma antecedência de até 144 horas (6 dias). Os resultados obtidos indicam que, aparentemente, o vírus viajou com maior rapidez no tecido dos ratos do que no das ratazanas.

### Virus rabique chez les rats et les souris inoculés par voie intraplantaire (Résumé)

L'étude signale une expérience réalisée dans le but d'établir combien d'heures avant l'apparition des premiers signes cliniques il est possible de déceler le virus rabique dans la moelle épinière, le cervelet, le cerveau et la cornée par la méthode d'immunofluorescence. Pendant l'expérience, on a inoculé par voie intraplantaire 0,08 ml à des souris et 0,1 ml à des rats; toutes les 12 heures on a sacrifié trois à cinq animaux en faisant des impressions du matériel nerveux et de l'épithélium cornéal, lesquelles ont été traitées par la méthode des anticorps fluorescents en vue de leur diagnostic.

Chez les souris, le virus a été décelé dans la moelle dans les 84 heures (3,5 jours), soit 84 heures (3,5 jours) avant l'apparition de signes

cliniques dans la moelle lombaire, 96 heures (4 jours) avant l'apparition de signes cliniques dans la moelle thoracique et cervicale, et 72 heures (3 jours) avant la présence de signes cliniques dans l'encéphale. Dans la cornée, le dépistage a été réalisé à partir de 120 heures (5 jours).

Chez les rats, la découverte du virus dans la moelle et l'encéphale a été simultanée, 72 heures (trois jours), soit 156 heures (6,5 jours) avant l'apparition de signes cliniques. Dans la cornée jusqu'à 144 heures (6 jours). Il ressort des résultats obtenus que le virus circule apparemment avec une plus grande rapidité dans le tissu nerveux des rats que dans celui des souris.