

DETECCION DE VIRUS RABICO

M. Martell D.¹ y A. Aldasoro M.¹

Mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes se procesaron cortes por congelación de glándula salival, lagrimal y córnea de casos de perros y bovinos afectados naturalmente de rabia y se estableció la frecuencia con que se observa antígeno rábico en los tejidos mencionados.

Introducción

La rabia es una enfermedad que, por ser una zoonosis, requiere un diagnóstico rápido, seguro y confiable. La efectividad del tratamiento y las medidas profilácticas por seguir dependen de la premura con que se obtenga aquél.

Desde que se le reconoció una etiología viral a la rabia, se han desarrollado varios métodos para confirmar la presencia del virus. Los que se emplean con más frecuencia son:

a) La tinción de corpúsculos de Negri con colorantes inespecíficos (Sellers, Faraco, Mann, Giemsa, Lepine, etc.) (18). Uno de los inconvenientes del empleo de esta tinción es que sólo detecta cepas negrigénicas (5) y que, además, requiere el uso exclusivo de tejidos frescos.

b) La inoculación intracerebral en ratones lactantes, o de 21 días de edad, para lo cual se emplean suspensiones de glándula salival y encéfalo (18). El inconveniente de este método radica, principalmente, en el tiempo requerido, que en ocasiones es mayor de 21 días.

c) La utilización de la técnica de los anticuerpos fluorescentes (AF) (12) ha dado muy buenos resultados y en la actualidad se le considera como la mejor, más

rápida y efectiva prueba diagnóstica en rabia, lo cual explica la aceptación que tiene en los laboratorios de diagnóstico.

En la práctica —para el diagnóstico de la rabia por detección de corpúsculos de Negri, inoculación intracerebral e inmunofluorescencia— se utilizan porciones de corteza, asta de Ammon y cerebelo, así como de glándulas salivales (19, 25). Esta última tiene el inconveniente que debido a la consistencia del tejido es difícil hacer impresiones.

Los trabajos de patogenia en diferentes especies animales han demostrado la variabilidad con respecto a la presencia de virus rábico, tanto en tejido nervioso como en otros tejidos, en murciélagos hematófagos (6, 8, 17, 28); en murciélagos insectívoros (2, 26). En bovinos (4, 7); en ratas (3, 13); en ratones (23, 24); en perros (1); en gatos (29) y en humanos (9, 10, 15, 20).

Se ha logrado aislar virus rábico de secreción y glándula lagrimal, humor acuoso y humor vítreo de bovinos infectados experimentalmente (4). Existen informes sobre el aislamiento de virus rábico de cerebro, riñón, pulmón y corazón de bovino (7) como también de virus rábico de cerebro, riñón, pulmón y glándulas salivales de murciélagos hematófagos (6).

Asimismo, se ha logrado detectar virus en perros por AF en hígado, pulmón, riñón, pelvicilla renal, glándulas suprarrenales, médula ósea, tejido linfoide y tejido nervioso (1).

¹Laboratorio Central Nacional de Diagnóstico (LCND) Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de la Dirección General de Sanidad Animal, Subsecretaría de Ganadería, S.A.G. México. Palo Alto, México, D.F.

Otros autores han descrito pruebas para el diagnóstico de rabia *in vivo*, para las cuales han utilizado colorantes inespecíficos (16) y AF para detectar antígeno rábico de improntas corneales (23). Una de las particularidades de estos trabajos, sobre patogenia de rabia es que casi todos ellos se han efectuado en animales inoculados experimentalmente.

Este trabajo tiene como fin detectar el virus rábico en cortes histológicos por congelación, teñidos con AF, según las técnicas descritas anteriormente (12, 14).

Además se investigará la frecuencia con que se presenta el virus en glándulas salivales, glándula lagrimal y epitelio corneal en perros y bovinos, infectados naturalmente.

Material y métodos

Material biológico

De 98 casos positivos de rabia diagnosticados por impresiones cerebrales teñidas con AF, obtenidos en el LCND y el Instituto Antirrábico de la S.S.A., 80 correspondían a perros y 18 a bovinos. En cada caso se tomaron muestras de epitelio corneal, glándula salival y glándula lagrimal.

Método diagnóstico

Los 98 juegos de muestras que incluían epitelio corneal, glándulas salival y lagrimal fueron procesados en cortes por congelación de 2 a 4 micras de acuerdo con el método descrito (14). Mediante la utilización de un criostato marca Ames, Modelo D, estos cortes fueron teñidos con conjugado antirrábico elaborado en el LCND bajo las normas descritas (11). La tinción se realizó según el método de AF (12) y el montaje de laminillas se hizo con elvanol.

La lectura de las laminillas se llevó a cabo en un microscopio Zeiss con lámpara de luz ultravioleta HBO 200 OSRAM, y se usó el BG 12 como filtro de excitación.

Interpretación

Se consideraron como casos positivos aquellos en los cuales se observaba fluorescencia específica intracitoplasmática, sin considerar la cantidad de corpúsculos observados. Se consideraban como negativos los casos carentes de fluorescencia específica intracitoplasmática, sin considerar la cantidad de corpúsculos observados y se consideraban como negativos los casos en que no se observaba fluorescencia específica.

Resultados

En los perros (cuadros 1 y 3) se detectó el virus rábico en el epitelio corneal en 58 de 80 casos (72.5%); en 64 de 80 (80%), en glándula lagrimal, y 53 de 79 casos (67.3%), fueron positivos en glándula salival.

En lo que respecta a los bovinos (cuadros 2 y 3), tres casos fueron inoculados experi-

CUADRO 1—Detección de virus rábico con inmunofluorescencia a partir de cortes por congelación de epitelio corneal y glándulas salivales, y lagrimales de perros infectados naturalmente.

Caso	Encéfalo	Epitelio corneal	Glándulas	
			Lagrimal	Salival
1	+	—	—	—
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	—
5	+	+	+	+
6	+	—	—	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	—
9	+	+	+	—
10	+	+	+	+
11	+	+	+	—
12	+	+	+	—
13	+	—	+	—
14	+	—	+	+
15	+	+	+	+
16	+	—	—	—
17	+	+	+	+
18	+	—	—	—
19	+	—	+	+
20	+	+	—	+
21	+	—	+	+
22	+	+	+	+
23	+	+	+	—
24	+	—	—	—
25	+	—	—	—
26	+	—	—	+

CUADRO 1 (Continuación)

Caso	Encéfalo	Epitelio corneal	Glándulas	
			Lagrimal	Salival
27	+	—	—	—
28	+	+	+	—
29	+	+	+	—
30	+	+	+	+
31	+	+	+	+
32	+	+	+	+
33	+	+	+	+
34	+	+	+	+
35	+	+	+	—
36	+	+	+	No hubo
37	+	—	+	+
38	+	+	+	+
39	+	—	+	+
40	+	+	+	+
41	+	+	+	+
42	+	+	+	+
43	+	+	+	+
44	+	+	+	—
45	+	—	—	—
46	+	+	+	+
47	+	+	+	+
48	+	+	+	+
49	+	+	+	+
50	+	+	+	—
51	+	—	+	+
52	+	+	+	+
53	+	—	—	+
54	+	—	—	—
55	+	—	—	—
56	+	+	+	+
57	+	+	—	+
58	+	+	+	+
59	+	+	+	+
60	+	—	—	+
61	+	+	+	+
62	+	+	+	—
63	+	+	+	+
64	+	+	+	+
65	+	+	+	+
66	+	+	+	—
67	+	+	+	+
68	+	+	+	+
69	+	+	+	+
70	+	+	+	—
71	+	+	+	+
72	+	+	+	—
73	+	—	—	—
74	+	+	+	+
75	+	+	+	—
76	+	—	+	+
77	+	+	+	—
78	+	+	+	+
79	+	+	+	+
80	+	+	+	+
Totales	80/80	58/80	64/80	53/79

+ Hubo fluorescencia específica.
— No se observó fluorescencia específica.

mentalmente y 15 correspondieron a bovinos naturalmente infectados. Se detectó el virus rábico en el epitelio corneal de 12 de 18 casos (66.6%); el mismo porcentaje fue encontrado en glándula lagrimal. En glándulas salivales 13 de 18 casos fueron positivos (72.2%).

CUADRO 2—Detección de virus rábico con inmunofluorescencia a partir de cortes por congelación de epitelio corneal y glándulas salivales y lagrimales de bovinos infectados naturalmente.

Caso	Encéfalo	Epitelio corneal	Glándulas	
			Lagrimal	Salival
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	—	—	—
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	—	+
9	+	+	+	+
10	+	+	+	+
11 Exp. 1	+	+	+	—
12 Exp. 2	+	—	—	—
13 Exp. 3	+	—	—	+
14	+	—	+	—
15	+	—	—	—
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	—	—	1
Totales	18/18	12/18	12/18	13/18

+ Se observó fluorescencia específica.
— No se observó fluorescencia específica.

Discusión

Fue posible comprobar la presencia del virus rábico en glándulas salivales tanto en casos naturales como experimentales. Se aisló virus rábico en las glándulas salivales de 1 de 6 casos de rabia en humanos (15). Schaaf y Schall (22) aislaron el virus en el 90% de las glándulas de 55 animales (31 zorros, 13 bovinos, 6 venados, 2 borregos, 2 gatos, y 1 perro). Svet-Moldavskaya (27) notificó la infectividad de las glándulas salivales de ratones de laboratorio; Sikes (21) lo encontró en la saliva de 10 de 24 zorros y en la de 15 de 18 zorrillos, pero hace notar

CUADRO 3—Totales y porcentaje de detección del virus rábico.

	Encéfalo	Epitelio corneal	Glándulas	
			Lagrimal	Salival
Perros	80/80	58/80	64/80	53/79
	100%	72.5%	80%	67.3%
Bovinos	18/18	12/18	12/18	13/18
	100%	66.6%	66.6%	72.2%

que no todos los animales con virus en las glándulas salivales lo excretaron en forma detectable en la saliva.

El porcentaje encontrado en este trabajo coincide con el de Schneider (23) quien notificó virus rábico en el 70% de las muestras de glándula salival estudiadas, pero no concuerda con la observación que, al encontrar virus en epitelio corneal, aparecerá también en glándula salival, por cuanto en este estudio, en 26 de 58 casos hay discrepancia, porque en 11 muestras hubo virus en glándulas salivales (6, 14, 19, 21, 26, 37, 39, 51, 53, 60, 76) (20.7%), pero no en epitelio corneal (cuadro 1).

En epitelio corneal el número de casos de virus rábico detectado en este trabajo se acerca al 70% encontrado por Schneider (23) en ratones inoculados experimentalmente. Sin embargo, también existen diferencias, ya que en 16 casos positivos en el epitelio corneal no se encontró virus en las glándulas salivales 4, 8, 9, 11, 12, 23, 29, 35, 44, 50, 62, 66, 70, 72, 75 y 77 (27.5%) (cuadro 1).

En un estudio con perros se encontró 12.7% más de casos positivos en glándulas lagrimales que en salivales, observándose una mayor relación entre los resultados obtenidos en epitelio corneal y glándula lagrimal. Aunque en glándula lagrimal hubo 7.5% más de casos positivos que en el epitelio corneal, hubo también mayor relación, ya que de los 58 casos positivos en 56 también se detectó el virus en las glándulas lagrimales, no habiendo relación en los casos 20 y 57 en los que no obstante haberse detectado el virus en córnea no se observó

en glándula lagrimal. Aparentemente la presencia del virus en glándulas lagrimales coincide con su presencia en córnea. No se observó la relación directa córnea-glándulas salivales como lo propone Schneider (23) en su estudio experimental en ratones.

Referente a la detección de antígeno rábico encontrado en los órganos estudiados en bovinos (cuadro 2), aparentemente la correlación glándulas lagrimales-epitelio corneal y glándulas salivales-epitelio corneal es la misma, ya que solamente en 3 de 18 casos hubo divergencias. En el caso 13 se detectó únicamente el virus en glándula salival y a la inversa, en los casos 14 y 18 se detectó el virus solamente en glándula lagrimal. Probablemente en bovinos la patogenia viral esté encaminada hacia las glándulas salivales, dado que el sitio de mordida preferido por los murciélagos hematófagos es la tabla del cuello.

Es difícil establecer una regla con respecto al porcentaje de animales que eliminan virus, debido a la variabilidad de la patogenia, puesto que cada caso de rabia es un caso patogénicamente individual. Debe tomarse muy en cuenta la presencia de virus en glándula lagrimal, pues esto implica su eliminación en la secreción lagrimal lo cual podría llegar a ser un factor importante en la transmisión de la enfermedad.

Resumen y conclusiones

El empleo de los cortes por congelación de tejidos tales como córnea, glándula salival y lagrimal teñidos con AF para el diagnóstico de rabia, es útil para un estudio complementario por cuanto los cortes histológi-

cos dan una definición clara de los tejidos, y ello facilita aún más el diagnóstico, por la localización intracelular del antígeno rábico.

Aparentemente, en casos de rabia en perros infectados naturalmente, la presencia del antígeno rábico en córnea no indica necesariamente la presencia del virus en glándulas salivales. Es probable que la secreción de las glándulas lagrimales sea la que infecte la córnea.

Dada la afinidad por los tejidos extra-neurales de las cepas de virus fijo y de virus de la calle, en los diferentes estudios experimentales de patogenia se deberían incrementar los estudios de casos naturales, ya

que en ocasiones los experimentales pueden dar resultados distintos, que darían resultados equivocados en la interpretación natural de la enfermedad.

Ante esta situación, parecen estar indicadas futuras investigaciones de casos naturales tanto en perros como en bovinos, con el objeto de dilucidar mejor su patogenia.

De acuerdo con los resultados obtenidos sería recomendable que para el diagnóstico de rabia se usara como método rutinario los cortes por congelación teñidos con anticuerpos fluorescentes de glándulas salivales para poder determinar la posible presencia de virus rábico en las secreciones salivales. □

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 Méd Vet Zoot* 2(4):149-156, 1963.
- (2) Baer, G. M. y Bales, G. L. "Experimental rabies infection in the Mexican freetail bat". *J Inf Dis* 117:82-90, 1967.
- (3) Baer, G. M.; Santhaveerappa, T. R., y Borne, G. H. "Studies on the pathogenesis of fixed virus in rats". *Bull WHO* 33, 1965.
- (4) Benignos, J. "Estudio de patogenia del virus rábico en ganado inoculado experimentalmente". U.N.A.M., Tesis profesional, 1970.
- (5) Crandell, R. A. "Laboratory investigation of arctic strains of rabies virus". *Acta Path Microbiol Scand* 63:587-596, 1965.
- (6) Da Silva, R. A. y Souza, A. M. "A pesquisa de virus rábico em morcegos no Brasil". *Rev Vet* 105-111, 1966.
- (7) Da Silva, R. A. y Souza, A. M. "Isolamento de virus rábico do rim, coração e cerebro de bovino na doença natural". *Pesquisa Agropecuaria* 2:359-366, 1967.
- (8) Da Silva, R. A. y Souza, A. M. "Aislamiento de virus rábico de pulmón, corazón, riñón, vejiga y otros diferentes tejidos de murciélagos hematófagos de la especie *Desmodus rotundus*". En V Congreso Panamericano Medicina Veterinaria y Zootecnia, Caracas, Venezuela, 1966.
- (9) Dean, D. J. "Pathogenesis and prophylaxis of rabies in man". *NY State J Med* 63:3507-3513, 1963.
- (10) Dean, D. J. y McLlure, R. C. "Pathogenesis of rabies". *Bull WHO* 29:803-811, 1963.
- (11) Goldman, M. *Fluorescent antibody methods*. Academy Press: N.Y., 87-117, 1968.
- (12) Goldwasser, R. A. y Kissling, R. E. "Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens". *Proc Soc Exp Biol* 98:211-223, 1958.
- (13) Kitsellman, C. H. y Mital, A. K. "Terminal dissemination of rabies virus in selected rat tissues". *Canad J Comp Med* 32: 461-464, 1968.
- (14) Kundin, W. F.; Chien, Liu, y Rodina, P. "Pathogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus". *J Immunol* 96: 39-48, 1966.
- (15) 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.
- (16) Levaditti, C. y Schoen, R. "Les corps de Negri dans le cytoplasme des epitheliums de la corneé". *Ann Inst Pasteur Suppl Commemorative* 55:69-96, 1935.
- (17) Malaga, A. A. "Pathogenesis of rabies in vampire bats". *Canad J Comp Med* 23:12, 19-20, 1959.
- (18) OMS. *Técnicas de laboratorio aplicadas a la rabia*. *Ser Inf Técn* 23, pág. 24, 1959.
- (19) Runnells, R. A.; Manlux, W. S., y Monlux, A. W. *Principios de patología veterinaria*, (Ed Continental S.A.; México, 1968.) págs. 713-715.
- (20) Sabin, B. A. y Ruchman, I. "Spread virus in an unvaccinated case of human rabies". *Proc Soc Exp Biol Med* 44:577, 1940.
- (21) Sikes, R. K. "Pathogenesis of rabies in wildlife". *Amer J Vet Res* 23(96):1041-1047, 1962.

- (22) Schaaf, J. y Schall, E. "Virus localization in rabies". *Di Tierarztl W. acr.* 75:315-316 y 319-323, 1968.
- (23) Schneider, L. G. "The corneal test a new method for the intravitam diagnosis of rabies". *Zol Vet Med* B16, 24-31, 1969.
- (24) 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.
- (25) Smith, H. A. y Jones, T. C. *Patología veterinaria*. UTEHA, la Ed, México, págs. 266-269, 1962.
- (26) Sulkin, E. S. *et al.* "Studies in the pathogenesis of rabies in insectivorous bats. I. Roles of brown adipose tissue". *J Exp Med* 110:369-388, 1959.
- (27) Svet-Moldavskaya, I. A. "Experiments study of the infectivity of salivary glands of laboratory animals, in the latent form of street rabies". *Rabies* 56(6):607-609, 1958.
- (28) 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". *Ciencia en México* 22(5), 1963.
- (29) Vaught, B. J. y Gerhardt, P. "Isolation of Flury rabies virus from the salivary gland of a cat". *JAVMA* 139(2):221-223, 1961.

Detection of rabies virus (Summary)

Frozen tissue cross-sections stained with fluorescent antibodies provide a good complementary test for use in rabies diagnosis. Histological cross-sections from the salivary glands, lacrimal glands, and cornea give clean tissue definition, thus facilitating diagnosis through intracellular location of the rabies antigen.

In the case of rabid dogs infected naturally, the antigen's presence in the cornea does not appear to necessarily indicate that the virus is present in the salivary glands. The cornea is probably infected by secretions from the lacrimal glands.

The affinity of fixed and street virus strains for extraneural tissues in experimental patho-

genic studies shows that the study of natural cases should be increased, since experimental studies can sometimes yield different results tending to lead to mistaken interpretation of the disease.

In view of this situation, further investigation of natural cases in both dogs and cattle seems indicated, so as to gain more knowledge about the pathogenesis of such cases.

In accordance with the results obtained, it would be advisable to routinely employ frozen tissue cross-sections in rabies diagnosis, staining the tissues with fluorescent antibodies from salivary glands to find out if rabies virus is present in the salivary secretions.

Descoberta do virus rábico (Resumo)

O uso de cortes por congelação de tecidos tais como córnea, glândula salivar e lacrimal coloridos com AF para o diagnóstico de raiva, é útil para um estudo complementar por quanto os cortes histológicos dão uma definição clara dos tecidos, e isto facilita ainda mais o diagnóstico, pela localização intracelular do antígeno rábico.

Aparentemente, em casos de raiva contraída naturalmente por cachorros, a presença do antígeno rábico na córnea não indica necessariamente a presença do vírus nas glândulas salivares. É provável que a secreção das glândulas lacrimais seja aquela que infeccione a córnea.

Dada a afinidade pelos tecidos extraneuros das variedades de vírus fixo e de vírus da rua,

nos diferentes estudos experimentais de patogenia, deveriam ser incrementados os estudos de casos naturais, já que algumas vezes os experimentais podem dar resultados diferentes, que dariam resultados errados na interpretação natural da enfermidade.

Perante esta situação, parecem aconselháveis futuras investigações nos casos naturais, tanto em cachorros como em bovinos, com o objetivo de elucidar melhor sua patogenia.

De acordo com os resultados obtidos seria recomendável que para o diagnóstico da raiva se usasse como método normal os cortes por congelação coloridos com anticorpos fluorescentes de glândulas salivares para poder determinar a possível presença de vírus rábico nas secreções salivares.

Détection du virus rabique (Résumé)

L'emploi de sections de tissus congelées, telles que la cornée, la glande salivaire ou lacrymale colorées par l'AF pour le diagnostic

de la rage, permet une étude complémentaire, étant donné que ces sections donnent une définition nette des tissus et facilite encore

davantage le diagnostic en vue de la localisation intracellulaire de l'antigène rabique.

Il semble que dans les cas de rage chez les chiens infectés naturellement la présence de l'antigène rabique dans la cornée n'indique pas nécessairement la présence du virus dans les glandes salivaires. Il est probable que la sécrétion des glandes lacrymales est celle qui infecte la cornée.

Etant donné l'affinité pour les tissus extra-neuraux des souches de virus fixe et de virus de la rue constatée dans les différentes études expérimentales de pathogénie, il faudrait intensifier les études de cas naturels du fait que les études expérimentales peuvent parfois

donner des résultats différents qui seraient susceptibles de produire des erreurs lors de l'interprétation naturelle de la maladie.

Dans ces conditions, de futures recherches s'imposent pour des cas naturels tant chez les chiens que chez les bovins dans le but de mieux élucider leur pathogénie.

D'après les résultats obtenus, il conviendrait d'utiliser comme méthode courante pour le diagnostic de la rage les sections de tissus congelées colorées par des anticorps fluorescents de glandes salivaires afin de pouvoir déterminer la présence éventuelle du virus rabique dans les sécrétions salivaires.