

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS VENEZOLANA DE UN MURCIELAGO FRUGIVORO (ARTIBEUS TURPIS) EN MEXICO¹

Dres. C. Wong-Chia² y W.F. Scherer³

Se aisló el virus de la encefalitis venezolana de las vísceras de un murciélago Artibeus turpis capturado en el sudeste de México. Los aislamientos de arbovirus procedentes de murciélagos, las características de las infecciones experimentales arbovíticas de estos animales y sus pautas naturales de conducta hacen que los murciélagos sean de importancia potencial, con respecto a algunas enfermedades producidas por arbovirus, como fuentes de virus para los mosquitos u otros artrópodos vectores.

Introducción

Existen numerosas pruebas de que los murciélagos influyen en el curso natural de diversas enfermedades víricas (1). Si se tienen en cuenta su íntima relación con los mosquitos, y otros vertebrados, su distribución omnipresente, el concepto de portadores asintomáticos y el fenómeno de la hibernación en determinadas especies de murciélagos (2), se puede atribuir a estos animales importancia potencial en las enfermedades causadas por arbovirus. Una de estas, en las Américas, es la encefalitis venezolana (EV), producida por un virus que, según se ha demostrado experimentalmente, infecta a diversas especies de murciélagos insectívoros (3). En el presente artículo se describe el aislamiento del virus EV de los órganos de un murciélago *Artibeus turpis*, capturado en 1963 en Sontecomapan, Veracruz, en la costa tropical del este de México.

Materiales y métodos

Situación y captura de los murciélagos

Los murciélagos fueron capturados de noche con redes invisibles japonesas, en un pequeño sector de selva tropical de unos 300 por 400 m aproximadamente, a 1.2 km al noroeste de Sontecomapan, aldea situada al nivel del mar, al sudoeste de Veracruz, México (4). Se extrajeron asépticamente trozos de tejido cardíaco, pulmonar y hepático de cada murciélago en un cercano laboratorio de campo y, después de reunidos y cerrados herméticamente en ampollas de vidrio, se almacenaron a -60°C en hielo seco hasta el momento de la prueba.

Pruebas de los virus

Se deshelaron los tejidos cardíacos, pulmonares y hepáticos y se maceraron en un mortero con el fin de preparar una suspensión al 10% en albúmina bovina, enfriada al 1% en solución de Hanks, que contenía 100 unidades de penicilina por ml y 100 µg de estreptomycin, también por ml. Después de centrifugado a 400 G durante 10 minutos a 5°C, se inoculó el líquido sobrenadante a camadas de ocho ratones de dos a tres días de edad, en cantidades de 0.01 ml por vía intracraneana (ic) y 0.02 ml por vía subcutánea (sc). Los ratones lactantes inoculados se mantuvieron con sus madres y se examinaron diariamente durante 14 días para descubrir los síntomas de enfermedad. Se

¹Estas investigaciones se realizaron en colaboración con la OPS y el Gobierno de México y contaron, en parte, con el apoyo de la subvención S-T1-AI-231 del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos y, en parte, con el contrato DA-49-193-MD-2295 del ejército de este país.

²Jefe de la Sección de Virología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

³Profesor y Jefe del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cornell, Nueva York, E.U.A.

probó también el inóculo para determinar la esterilidad bacteriana en agar sangre y en caldo de soja con tripticasa. Se extrajeron asepticamente los cerebros y los músculos de las extremidades traseras de los ratones muertos o moribundos y se preparó una suspensión al 10 % que serviría de fuente subsiguiente de virus.

Para la prueba en cultivos celulares en embrión de pollo (CEP), preparados en la forma antes descrita (5), se inoculó 0.1 ml de suspensión vírica en cada uno de los tres tubos de cultivo que se incubaron a 37°C. Se examinaron diariamente los cultivos y se reunieron y mantuvieron a -60°C los líquidos de cultivos celulares en los que se observaron pronunciados efectos citopáticos para que sirvieran de fuente subsiguiente de virus.

Identificación inmunológica de los virus aislados

Se identificó el agente vírico mediante las pruebas de fijación del complemento (FC) y neutralización. Se preparó un antígeno con cerebros de ratones moribundos inoculados con material del pase 2 desangrando a los animales y utilizando una suspensión al 20 % en 0.15 M NaCl. Después de conservada a 4°C durante la noche, se centrifugó la suspensión a 10,000 G por una hora, a 5°C, y se introdujo el sobrenadante en ampollas, manteniéndolo a -60°C. Los antisueros eran de ratón o conejo inoculados con virus EV, cepa 63U2 (4), o procedían de

una persona convaleciente que contrajo una infección de laboratorio con virus 63U2. Los sueros se calentaron a 60°C durante 20 minutos, efectuándose pruebas de fijación del complemento (4).

La nueva identificación de virus comprendía una prueba de neutralización cualitativa en CEP de virus EV, cepa 63U2, utilizándose anti-suero de conejo preparado con virus de ratón lactante en el pase 3 a una dilución de 1:20, frente a dos o tres diluciones de virus al céntuplo, como suspensión al 10% de cerebro y músculos de ratón. La neutralización positiva se indicó mediante células normales de embrión de pollo en cultivos en tubo, con medio líquido inoculado con 1-3 diluciones de virus y anti-suero, y la total destrucción celular en cultivos inoculados con diluciones correspondientes de virus sin antisuero, después de 3 a 5 días, a 37°C.

Resultados

En la noche del 6 de agosto de 1963 se reunieron 65 especímenes de murciélagos capturados en la selva de Sontecomapan (cuadro 1).

Se aisló una cepa de virus, la 63Y75, de una suspensión de 10 % de un conjunto de tejidos cardíacos, pulmonares y hepáticos tomados de un macho *Artibeus turpis* (cuadro 2). Se produjeron ocho defunciones al segundo día en la camada original de ocho ratones lactantes inoculados y en el material original se obtuvieron

CUADRO 1—Vísceras de murciélago obtenidas en la selva de Sontecomapan, Veracruz, México, el 6 de agosto de 1963, sometidas a prueba para determinar la presencia de arbovirus.

Especie	Sexo		Desconocido	Total
	Machos	Hembras ^a		
<i>Carollia perspicillata</i>	19	13(3)		32
<i>Artibeus turpis</i>	9	8(1)	6	23
<i>Glossophaga soricina</i>	3	4		7
Otros ^b	2		1	3
Total	33	25(4)	7	65

^a() número de hembras preñadas.

^b1 macho *Artibeus lituratus*, 1 macho *Artibeus jamaicensis* y 1 *Vampiroides major* de sexo desconocido.

títulos de $10^{-4.5}$ por 0.03 ml de tejido, cuando se inoculó en ratones lactantes por las vías ic y sc. Una suspensión al 10%, preparada con cerebro y músculo de ratón muerto y representativa del pase 1 en ratón lactante, produjo la muerte de un segundo grupo de ocho ratones lactantes en el primer día; otro grupo de 10 ratones lactantes murieron en el primer día, después de la inoculación del virus en el pase 2. En un antígeno fijador del complemento preparado con cerebros de ratón, después de los pases del virus en ratones, se obtuvo un título de 1:16 frente a ocho unidades de EV, cepa 63U2, antisuero de ratón o suero convaleciente humano, pero el antígeno 63Y75 no reaccionó en una dilución de 1:4, con ocho unidades de anticuerpo de suero específico de ratón, con respecto al virus de Tlacotalpán, cepa 61D240 (6), o al virus Patois, cepa 63A49 (7).

Se aisló de nuevo el virus satisfactoriamente de una suspensión de víscera original congelada, alrededor de siete semanas después del primer aislamiento (cuadro 2). La suspensión produjo la muerte a los nueve ratones lactantes de una camada en los días 1-3, y pases subsiguientes en ratones o cultivos celulares en embrión de pollo produjeron la muerte inmediata o efectos citopáticos. En un antígeno de FC, pre-

parado con cerebros de ratón lactante con el virus aislado de nuevo, se obtuvo un título de 1:16 frente a ocho unidades de suero EV de convaleciente humano, y el virus se neutralizó en CEP mediante una dilución de 1:20 de EV, cepa 63U2, de antisuero de conejo.

Resumen

La encefalitis venezolana (EV) se reconoció primeramente como enfermedad de los equinos (8), pero han ocurrido infecciones recientes de virus de EV en proporciones epidémicas en las poblaciones humanas (9), habiéndose aislado el virus de varios animales (1, 10). El presente informe de un aislamiento de virus EV procedente del murciélago frugívoro *Artibeus turpis*, en México, extiende la gama de huéspedes del virus EV. La validez del aislamiento fue corroborada por el hecho de que el antígeno 63Y75 fue el cuarto de una serie de siete especímenes, elaborados en el mismo cubículo en las primeras horas de una mañana; los otros seis especímenes, tres elaborados antes del 63Y75 y tres después resultaron negativos. No era probable la contaminación en el campo, porque sólo

CUADRO 2—Aislamiento y reaislamiento de virus EV, cepa 63Y75, de las vísceras de un murciélago macho *Artibeus turpis*.

Fecha de la prueba	Material	Sistema utilizado ^c	Mortalidad de ratones o razón entre CEP y ECP ^d	Día de la muerte de ratones o ECP ^e
Aislamiento				
31 de enero de 1964	CPH ^a	RL	8/8	2
5 de febrero de 1964	RL-p1 ^b	RL	8/8	1
11 de febrero de 1964	RL-p2 ^b	RL	10/10	1
Reaislamiento				
20 de marzo de 1964	CPH	RL	9/9	1-3
24 de marzo de 1964	RL-p1	RL	11/11	1-2
24 de marzo de 1964	RL-p1	CEP	6/6	2

^aConjunto de tejidos cardíacos, pulmonares y hepáticos de murciélago.

^bSuspensión de cerebro y músculos de ratón lactante, pases 1 ó 2.

^cRL=ratón lactante; CEP=cultivo celular en embrión de pollo.

^dECP=efecto citopático.

^eEl día de inoculación se consideró como el día 0.

uno de los 65 murciélagos capturados y preparados el 6 de agosto de 1963, con el fin de colocar las vísceras en ampollas sobre hielo seco, produjo un virus. Por lo tanto, este aislamiento de virus EV, junto con los informes de otros aislamientos de arbovirus procedentes de murciélagos (11), las características de la infección experimental por arbovirus de estos animales (3, 12) y su frecuente proximidad natural a los mosquitos, hombres y equinos vectores, indi-

can que los murciélagos pueden tener importancia potencial con respecto a algunas enfermedades arbovíticas. En cuanto a su función, podrían servir indudablemente como fuentes de virus para los mosquitos vectores durante los períodos de viremia, pero es preciso realizar estudios ulteriores para evaluar la excreción o secreción de virus EV por los murciélagos y la posible propagación directa del virus al hombre o los equinos. □

REFERENCIAS

- (1) Sulkin, S.E. "The bat as a reservoir of viruses in nature". *Progr Med Virol* 4:157-207, 1962.
- (2) Sulkin, S.E., Allen, R., Sims, R. y Taylor, S.K. "Bats in relation to arthropod-borne viruses: An experimental approach with speculations". *Amer J Publ Hlth* 55:1376-1385, 1965.
- (3) Corristan, E.C., La Motte, L.C. Jr. y Smith, D.G. "Susceptibility of bats to certain encephalitis virus." *Fed Proc* 15:584, 1956.
- (4) Scherer, W.F. *et al.* "Venezuelan equine encephalitis virus in Veracruz, Mexico, and the use of hamsters as sentinels". *Science* 145:274-275, 1964.
- (5) Scherer, W.F. "Inapparent viral infection of cells *in vitro*. I. Conversion of inapparent to apparent infection by environmental alteration of chicken embryonic cells in cultures inoculated with Japanese encephalitis virus". *Amer J Path* 45:393-411, 1964.
- (6) Scherer, W.F. *et al.* "Isolation of Tlacotalpan virus, a new Bunyamwera-group virus from Mexican mosquitoes". *Amer J Trop Med Hyg* 16:79-91, 1967.
- (7) Zarate, M.L., Geiger, R.H., Shope, R.E. y Scherer, W.F. "Intergroup antigenic relationships among arboviruses manifested by a Mexican strain of Patois virus and viruses of the Bunyamwera, C. California Capim and Guama groups". *Amer J Epid* 88:273-286, 1968.
- (8) Kubes, V. "La peste loca de las bestias. Sus manifestaciones, tratamientos y prevención". *Min de Agr y Grta de Venezuela*, 1936.
- (9) Sellers, R.F., Bergold, G.H., Suárez, O.M. y Morales, A. "Investigations during the Venezuelan equine encephalitis outbreaks in Venezuela 1962-1964". *Amer J Trop Med Hyg* 14:460-469, 1965.
- (10) Sidwell, R.W., Gebhart, L.P. y Thorpe, B.D. "Epidemiological aspects of Venezuelan equine encephalitis virus infections". *Bact Rev* 31:65-81, 1967.
- (11) Sulkin, S.E., Sims, R.A. y Allen, R. "Isolation of St. Louis encephalitis virus from bats (*Tadarida b. mexicana*) in Texas". *Science* 152:223-225, 1966.
- (12) Sulkin, S.E., Allen, R. y Sims, R. "Studies of arthropod-borne virus infections in Chiroptera. I. Susceptibility of insectivorous species to experimental infection with Japanese B and St. Louis encephalitis viruses". *Amer J Trop Med* 12:800-814, 1963.

Isolation of Venezuelan encephalitis (VE) virus from a frugivorous bat (*Artibeus turpis*) in Mexico (Summary)

Venezuelan encephalitis was first recognized as a disease of equines (8) but recent VE virus infections have occurred in epidemic proportions in human populations (9), and the virus has been isolated from a number of animals (1, 10). This report of an isolation of VE virus from a frugivorous bat, *Artibeus turpis*, in Mexico extends the host range of VE virus. The validity of the isolation was substantiated by

the fact that 63Y75 was the fourth of a series of seven specimens processed in the same cubicle early one morning; the other six specimens, three processed before and three after 63Y75, were negative. Contamination in the field was not likely to have occurred because only one of the group of 65 bats caught and processed on 6 August 1963 to put organs in ampules on dry ice yielded a virus.

Therefore, this isolation of VE virus, together with reports of other arbovirus isolations from bats (11), the characteristics of experimental arbovirus infection in these animals (3, 12), and their frequent natural proximity to vector mosquitoes, man and equines, indicate that bats may be of potential importance to some

arbovirus diseases. Their role could certainly be as sources of virus for vector mosquitoes during periods of viremia, but further studies are also needed to evaluate excretion or secretion of VE virus by bats and possible direct spread of virus to man or equines.

Isolamento do vírus da encefalite venezuelana (EV) num morcêgo frugívoro (*Artibeus turpis*) no México (Resumo)

A encefalite venezuelana foi identificada primeiramente como doença dos equinos (8), mas têm ocorrido infecções recentes por vírus de EV em proporções epidêmicas nas populações humanas (9), tendo-se isolado o vírus de vários animais (1, 10). A presente comunicação do isolamento de vírus EV procedente do morcêgo frugívoro *Artibeus turpis*, no México, amplia a gama de hospedeiros do vírus EV. A validade do isolamento foi corroborada pelo fato de que o antígeno 63Y75 foi o quarto de uma série de sete espécimes, elaborados no mesmo cubículo, nas primeiras horas de uma manhã; os outros seis espécimes, três elaborados antes do 63Y75 e três depois, deram resultados negativos. Não era provável a contaminação no campo, porque apenas um dos 65 morcêgos capturados e preparados a 6 de agosto de 1963,

com o fim de colocar as vísceras em ampolas sobre gelo seco, produziu um vírus. Portanto, esse isolamento de vírus EV, com as comunicações de outros isolamentos de arbovírus procedentes de morcêgos (11), as características da infecção experimental por arbovírus desses animais (3, 12) e sua freqüente proximidade natural aos mosquitos, homens e equinos vetores, indicam que os morcêgos podem ter importância potencial com respeito a algumas doenças arbovíricas. Quanto à sua função, poderiam servir indubitavelmente como fontes de vírus para os mosquitos vetores durante os períodos de viremia, mas é preciso fazer novos estudos para avaliar a excreção ou secreção de vírus EV pelos morcêgos e a possível propagação direta do vírus ao homem ou aos equinos.

Isolement du virus de l'encéphalite vénézuélienne (EV) d'une chauve-souris frugivore (*Artibeus turpis*) au Mexique (Résumé)

L'encéphalite vénézuélienne est surtout connue comme maladie des équins (8) mais récemment des infections du virus EV dans des proportions endémiques ont été enregistrées dans certaines populations humaines (9), le virus ayant été isolé dans plusieurs animaux (1, 10). Le présent rapport traite de l'isolement du virus EV provenant de la chauve-souris frugivore *Artibeus turpis*, au Mexique, ce qui étend encore la gamme des hôtes du virus EV. La validité de l'isolement a été corroborée par le fait que l'antigène 63Y75 est le quatrième d'une série de spécimens, analysés dans la même éprouvette aux premières de la matinée. Sur les six autres spécimens, trois ont été analysés avant le 63Y75 et trois après et ont donné des résultats négatifs. Il n'est pas probable que la contamination ait lieu sur le terrain, car une seule des 65 chauves-souris capturées et préparées le 6 août 1963, afin de placer les viscères

dans des ampoules sur de la glace sèche a produit un virus. En conséquence, l'isolement du virus EV, ainsi que les rapports sur les autres isolements d'arbovirus provenant de chauve-souris (11), les caractéristiques de l'infection expérimentale de ces animaux au moyen d'arbovirus (3, 12) et le fait que fréquemment ils soient naturellement près des moustiques (11), des hommes et des équins vecteurs, indiquent que les chauves-souris peuvent avoir une importance potentielle par rapport à certaines maladies "arboviriques". En ce qui concerne leur fonction, elles pourraient certainement servir de sources de virus pour les moustiques vecteurs durant les périodes de virémie, mais il convient de mener des études ultérieures pour évaluer l'excrétion ou la sécrétion du virus EV par les chauves-souris et l'éventuelle propagation directe du virus à l'homme ou aux équins.