

## AISLAMIENTO DE VIRUS RABICO EN CULTIVOS CELULARES A PARTIR DE SALIVA

M.V.Z. NADIA MANCISIDOR A.<sup>1, 2</sup>M.V.Z., M.S. CARLOS ARELLANO<sup>1</sup>

Una de las limitantes existentes en el estudio del virus rábico era la carencia de un sistema lo suficientemente sensible y eficaz para cultivar el virus *in vitro*. En 1962 MacPherson y Stoker, obtuvieron la línea celular BHK<sub>21</sub> (Baby Hamster Kidney, batch 21) en la cual demostraron que el virus de la rabia se multiplica rápidamente produciendo inclusiones intracitoplásmicas y citólisis parcial. Martos y Atanasiu (1961) describieron inclusiones intracitoplásmicas en células de riñón de cerdo infectadas con CVS (Challenge Virus Standard) de rabia. Larghi en 1968,<sup>3</sup> logró aislar virus rábico de la saliva de murciélagos y otros animales purificando la muestra mediante filtración milipora y utilizando células BHK<sub>21</sub> como medio de cultivo.

El presente trabajo tiene por objeto encontrar un método lo suficientemente sensible y práctico para detectar la eliminación de virus en la saliva y órganos de animales rabiosos, método que aportaría datos valiosos, en la epizootiología y epidemiología de la enfermedad.

### Material y métodos

#### Material

El virus utilizado corresponde a la cepa VI44<sup>6</sup> Colima, obtenida del cerebro de un vampiro rabioso capturado en el rancho La Albarrada, Municipio de Colima, el 4 de febrero de 1970, el que murió a los 6 días de capturado. Se usó esta cepa en lugar de la

CVS porque en la última es más difícil recuperar virus de saliva, ya que éste tiene muy marcada afinidad por el sistema nervioso.

La línea de células fue la BHK pases 66-69<sup>4</sup> y los animales de laboratorio fueron 18 ratones, de 21 días de edad, de los cuales escogieron 14.

Los medios usados fueron el de recolección y siembra.

#### Medio BHK

Dextrán 2%  
Suero fetal bovino 10%  
Triptosa fosfatada 10%  
Antibióticos:  
Estreptomicina 100 mg/ml  
Micostatina 50 mg/ml  
Penicilina 100 U I/ml  
y el de mantenimiento

#### Medio BHK

Albúmina bovina (al 10%) 2%  
Antibióticos:  
Estreptomicina 100 mg/ml  
Micostatina 50 mg/ml  
Penicilina 100 U I/ml

#### Métodos

Se inocularon por vía intracerebral 18 ratones albinos de 21 días de edad con un volumen de 0.03 cc de la cepa VI44<sup>6</sup> Colima, en suspensión al 10%.

La toma de muestras de saliva se hizo a partir de la boca de los animales que presentaron síntomas, mediante la utilización de un hisopo embebido en medio, el cual se guardó en un tubo de plástico estéril que contenía 2.5 ml del medio de cultivo para recolección y siembra.

Se tomaron 3 muestras de cada ratón con el objeto de infectar monoestratos celulares

<sup>1</sup> Proyecto de Investigación sobre Rabia Parálítica, INIP/FAO. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias SAG, Km. 15½ Carretera México-Toluca, D. F.

<sup>2</sup> Laboratorio de Encefalitis Equina de Venezuela, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG.

<sup>3</sup> Comunicación personal.

<sup>4</sup> Instituto Wistar de Filadelfia, Pa., E.U.A.

I, 24 y 48 horas después de la toma de la muestra. Los tubos durante ese tiempo, con excepción del de una hora, se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  de temperatura.

El diagnóstico de la enfermedad se efectuó a partir de muestras de cerebro, según la técnica de Goldwasser y Kissling (1958); también se obtuvieron muestras de córnea para integrar el diagnóstico, según la técnica descrita por Schneider (1968).

En la preparación de inoculación del monoestrato se siguió la técnica descrita por Martos y Atanasiu (1961) con la única variación de que se utilizaron para la siembra de las células cajas de Petri, de plástico,<sup>5</sup> en las cuales habían sido colocados con anterioridad 3 cubreobjetos lavados y esterilizados. Para obtener un monoestrato completo, se

Los sobrenadantes de cada caja se cosecharon y guardaron en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## Resultados

El diagnóstico de la enfermedad se confirmó, observándose resultados positivos en el 100% de los animales estudiados (Cuadro 1).

De las catorce muestras de saliva, fue posible detectar y aislar el virus en trece (92.8%). Solamente el ratón número 9 no eliminó virus en la saliva cuando fue tomada la muestra (Cuadro 2). Se observó que en las muestras sujetas a congelación (24 horas), la detección del virus fue más rápida y constante en relación a las muestras que se inocularon una hora después de haber sido tomadas.

CUADRO 1

Resultados de las pruebas de córnea e impresiones cerebrales en ratones

Número de ratones	Inmuno - Fluorescencia Positivos	
	Córnea	Cerebro
14	14 (100%)	14 (100%)

sembraron 600,000 células por caja, suspendidas en 2 ml del medio de mantenimiento conservadas en estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

Se infectaron 2 cajas de monoestrato por muestra de saliva, depositando 1 ml del inóculo sobre el monoestrato, dejándolo durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  en  $\text{CO}_2$ ; después de este tiempo se quitó el inóculo y se procedió al lavado del monoestrato con PBS y se agregaron 2 ml de medio mantenimiento, incubándose nuevamente a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Los monoestratos infectados con saliva, fueron observados a las 48, 72 y 96 horas después de la inoculación, utilizándose en cada ocasión uno de los tres cubreobjetos colocados en las cajas de Petri.

Los cubreobjetos con el monoestrato celular, se montaron y tiñeron mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes. (Goldwasser y Risling, 1958).

A partir de los sobrenadantes de las cajas, que resultaron negativas en el primer pase de cultivo de tejidos, se dio un segundo pase ciego, para ver si era posible detectar el virus; sin embargo, este pase volvió a dar resultados negativos.

## Discusión

En los monoestratos infectados con las muestras de saliva, se encontró el 93% de efectividad en las técnicas, pues se identificó fluorescencia específica de rabia en 13 de las 14 muestras.

La muestra procedente del ratón marcado con el número 9 resultó siempre negativa, hecho que puede deberse a que este ratón no eliminó virus en la saliva.

Se observó que de todas las muestras mantenidas en congelación se aisló el virus con facilidad, lo que permite deducir que el cambio físico de temperatura de la muestra, produce una mayor liberación de virus, hecho

<sup>5</sup> Falcón 3001 Tissue Cultivo dish, XX35X10 mm B.D.C., Los Angeles, California, E.U.A.



CUADRO 2

Inoculación	Tiempo de incubación en horas	Número de muestras inoculadas	Número de muestras positivas	% de muestras positivas
Una hora después de tomada la muestra	48	14	4	28.57
	72	14	9	64.1
	96	14	11	78.4
Con 24 horas de congelación	48	14	12	85.2
	72	14	12	85.2
	96	14	13	92.8
Con 48 horas de congelación	48	14	12	85.2
	72	14	12	85.2
	96	14	12	85.2

que explica el mayor número de resultados positivos en las muestras congeladas.

La eliminación de virus en la saliva del ratón número 10 sólo se detectó a partir de la muestra sometida a 24 horas de congelación y después de una incubación de 96 horas. Al darle un segundo pase al sobrenadante de la caja que contenía el inóculo de saliva del mismo ratón, también fue necesario esperar 96 horas de incubación para detectar el virus, lo que indicó la poca cantidad de material infectante presente en la muestra.

### Conclusiones

Con base en estos resultados, puede concluirse que es conveniente la congelación durante 24 horas a partir de la toma de la muestra para hacer la identificación del virus con mayor facilidad.

De acuerdo con los hechos hasta ahora discutidos, se concluye que esta técnica de diagnóstico del virus rábico es sensible y mediante una ampliación de estos estudios podría tener

varias y útiles aplicaciones como puede ser el reconocimiento de virus rábico en saliva de vampiros, para la localización de zonas endémicas y la detección de virus rábico en saliva de perros y gatos sospechosos, lo que aportaría nuevas soluciones al problema del tratamiento de la rabia en el hombre mordido por estos animales.

### Literatura citada

- GOLDWASSER, R. A. and R. E. KISSLING, 1958, Fluorescent antibody staining street and fixe rabies virus antigens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98: 219-223.
- MACPHERSON and M. STOKER, 1962, Polyoma transformation of hamster cells clones and investigation of genetic factors affecting cells competence, *Virology*, 16: 147-151.
- MARTOS L. and P. ATANASIU, 1961, Presence d'inclusions spécifique dans les cellules de rein de hamster on culture des tissus infectés par le virus de la rage fixe, *Ann. Inst. Pasteur*, (Paris), 101:448.
- SCHNEIDER LOTHAR G., 1968, The Cornea Test; a New Method for the Intra-Vitam Diagnosis of Rabies, *Fed. Res. Inst. Anim. Dis.*, 24-31.