

DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA ESPECÍFICA A RABIA ANTES DE LA APARICIÓN DE SIGNOS EN RATONES INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE CON 5 CEPAS DE VIRUS RÁBICO CON Y SIN DIMETIL-SULFOXIDO (DMSO)

M.V.Z. MARIO A. MARTELL D.^{1, 2}
M.V.Z. DIÓDORO BATALLA C.¹
JAVIER LÓPEZ R.³

Resumen

Se inocularon intracerebralmente ratones de 21 días de edad con 5 cepas de virus rábico (3 de cerebro de perro, 1 bovino y 1 vampiro) solas y adicionadas con dimetil sulfóxido (DMSO); se sacrificaron grupos de 3 a 5 ratones cada 3 horas haciéndose impresiones de material cerebral que fueron teñidas con anticuerpos fluorescentes. Se titularon las cepas de virus, solas y con DMSO. Con las cepas de origen canino se observó fluorescencia de 90 a 96 horas antes de la aparición de los primeros signos, la adición de DMSO disminuyó el período de incubación en 24 horas. Con la cepa de origen bovino se observó fluorescencia 87 horas antes de la aparición de signos rábicos y con virus de origen vampiro se hizo la observación de fluorescencia 264 horas antes de la aparición de signos.

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda mortal (Hutyra *et al.*, 1959); sin embargo, algunos autores mencionan que animales inoculados experimentalmente presentaron signos clínicos de rabia y posteriormente se recuperaron (Johnson, 1965; Baer, 1968; Pawan, 1948; Koprowski, 1952; Constantine, 1966). El virus rábico ha sido incluido entre un grupo de agentes clasificados como rabdovirus y se le considera un virus lento (Koprowski, 1967). Los métodos clásicos para el diagnóstico de rabia son tres: *a*) la tinción para la búsqueda de corpúsculos de Negri, (O.M.S., 1959); *b*) la técnica de anticuerpos fluorescentes, y *c*) la inoculación intracerebral en ratones (Goldwasser y Kissling, 1958). Por lo que toca a este último método, la Organización Mundial de la Salud recomienda observar los ratones inoculados por un período mínimo de 21 días. A cada animal que muera dentro de ese lapso de tiempo, se le extrae el cerebro y se hacen impre-

siones que se tiñen con el método de Sellers o con anticuerpos fluorescentes para corroborar la presencia de virus.

Dependiendo del tipo de cepa, los ratones generalmente empiezan a morir, a partir de los 5 días de la inoculación, ocurriendo la mayor mortalidad entre el 6º y el 12º días. Sin embargo, se observan períodos de incubación hasta de 30 días en ratones inoculados con cerebros de bovinos y vampiros rabiosos. Con una cepa de origen vampiro, se observaron períodos de incubación de 80 días en ratones inoculados intraplantarmente (Baer, 1968).

En vista de los datos anteriores se diseñó el presente experimento, para conocer en qué momento es posible detectar antígeno rábico por el método de inmunofluorescencia en los cerebros de ratones inoculados con virus de diferentes orígenes, solos y adicionados con dimetil-sulfóxido (DMSO), antes de la aparición de signos clínicos.

El DMSO es un compuesto de conocidas propiedades de penetración y de difusión en tejidos orgánicos (Stanley *et al.*, 1964; Rossembaum y Stanley, 1964; Stanley *et al.*, 1965; Keil, 1967; Walters *et al.*, 1967). El objeto fue conocer si el DMSO aceleraba o no la aparición de fluorescencia en los cerebros de los ratones inoculados, si reducía los períodos de incubación y si incrementaba el título de las cepas utilizadas.

Recibido para su publicación: Marzo 5, 1969.

¹ Departamento de Microbiología Experimental, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Carretera México-Toluca Km. 15½, México, D. F.

² Actualmente Lab. Central Nacional de Diagnóstico Dir. Gral. Sanidad Animal. Km. 15½, Carr. México-Toluca, Palo Alto, México 10, D. F.

³ Pasante de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México.

Material y métodos

Las cepas de virus de rabia, utilizadas en el presente experimento fueron: 1. Virus Núm. 68-688, aislado del cerebro de un perro, proveniente del D. F., Título $10^{4.1}$ DL50 en 0.03 ml./IC en ratones de 3 semanas; 2. Virus Núm. 68-760, aislado del cerebro de un perro, proveniente del D. F., Título $10^{4.8}$ DL50 en 0.03 ml./IC en ratones de 3 semanas; 3. Virus Núm. 68-938, aislado del cerebro de un perro, proveniente de Torreón, Coah.. Título $10^{4.3}$ DL50 en 0.03 ml./IC en ratones de 3 semanas; 4. Virus de origen bovino, obtenido a partir de una mezcla de cerebros de bovino de los cuales 5 provenían de Zacazonapan, Edo. de México, 5 de Río Grande, Oax., y 2 de Tuxtepec, Oax., Título $10^{4.7}$ DL50 en 0.03 ml./IC en ratón de 3 semanas; 5. Virus de origen vampiro. Este inóculo fue obtenido a partir de una mezcla de cerebros de vampiro, que previamente habían sido inoculados con material nervioso de un bovino muerto de derriengue, proveniente de Vicente, Oax., Título $10^{2.1}$ DL50 en 0.03 ml./IC en ratones de 21 días.

En cada caso, se pesaron 2 g. de material nervioso, el cual fue triturado hasta obtener una mezcla homogénea, a la que se le añadieron 8 ml. de diluyente (agua buferada p.H. 7.6, suero de equino inactivado al 2%, 2 mg. de estreptomycin y 100 unidades de penicilina por cada ml.). Con cada cepa de virus, se prepararon diluciones décuplas de

10^{-1} a 10^{-5} de virus solo, y con DMSO al 11.25%.

Se utilizaron ratones blancos de 3 semanas de edad con un peso de 8 a 12 g. Con las diluciones de 10^{-1} de cada cepa con y sin DMSO, se inocularon 75 ratones y en cada una de las diluciones de 10^{-2} a 10^{-5} se inocularon 5 ratones para titular los virus. En todos los casos, la vía de inoculación fue la intracerebral con dosis de 0.03 ml.

Los ratones de los lotes correspondientes a la dilución 10^{-1} fueron sacrificados en grupos de 3 a 5 animales a diferentes horas, según el tipo de virus; con el virus de origen canino los ratones empezaron a sacrificarse a las 24 horas, con el de origen bovino a las 72 horas y con el de origen vampiro a las 96 horas. Los ratones que quedaban en cada caso, fueron observados, para notar los primeros signos de enfermedad.

De cada cerebro de los ratones sacrificados, se hicieron impresiones para detectar el antígeno rábico por medio del método de anticuerpos fluorescentes (Goldwasser y Kissling, 1958). La evaluación de la fluorescencia fue hecha en base al número y tamaño de los corpúsculos. Clasificándose como puntiforme cuando eran agregados pequeños, y corpuscular cuando se observaban partículas de fluorescencia de mayor tamaño.

Resultados

Los resultados se muestran en los cuadros siguientes:

CUADRO 1

Virus Núm. 68-688 proveniente del Distrito Federal. Origen canideo

HORAS Posteriores a la inoculación en que se sacrificaron ratones	Sin DMSO		Con DMSO	
	Tipo de fluorescencia	Núm de ratones positivos	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos
24	...	0/5	Puntiforme	1/5
27	Puntiforme	2/5	"	3/5
30	"	2/5	"	4/5
33	"	4/5	"	5/5
36	"	3/5	"	5/5
39	"	4/5	"	5/5
42	"	3/5	"	5/5
45	"	5/5	"	4/4
Título DL 50%	"	$10^{4.16}$	"	$10^{4.31}$
Período de incubación (Promedio)				
Con la dilución 10^{-1}		5 días		4 días

CUADRO 2

Virus Núm. 68-760 proveniente del Distrito Federal. Origen canideo

HORAS	Sin DMSO		Con DMSO	
	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos
24	Puntiforme	1/5	Puntiforme	4/5
27	"	1/5	"	4/5
30	"	4/5	Corpuscular	5/5
33	"	4/5	Puntiforme	5/5
36	"	4/5	"	4/5
39	"	5/5	Corpuscular	5/5
42	"	3/5	"	5/5
45	"	5/5	Puntiforme	5/5
48	"	5/5	"	5/5
Título DL 50%		10 ^{4.83}	10 ^{4.55}	
Período de incubación (Promedio) Con la dilución 10 ⁻¹		7 días	7 días	

CUADRO 3

Virus Núm. 68-938 proveniente de Torreón, Coah. Origen canideo

HORAS	Sin DMSO		Con DMSO	
	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos
24	---	0/5	---	0/5
27	---	0/5	Puntiforme	1/5
30	Puntiforme	5/5	Corpuscular	5/5
33	"	5/5	Puntiforme	5/5
36	Corpuscular	5/5	"	5/5
39	Puntiforme	5/5	"	5/5
42	"	5/5	"	5/5
45	"	3/5	"	5/5
48	"	3/5	---	0/5
58	"	2/3	Puntiforme	3/3
60	---	0/1	"	1/1
68	Puntiforme	3/3	"	3/3
76	"	2/3	"	2/3
80	"	3/3	"	3/3
96	Corpuscular Grande	3/3	Corpuscular Grande	3/3
Título DL 50%		10 ^{4.36}	10 ^{4.6}	
Período de incubación (Promedio) Con la dilución 10 ⁻¹		6 días	4 días	

CUADRO 4
Origen "Derriegue".
Virus: Bovino. Mezcla de 12 cerebros de bovino: 5 del Edo. de México,
5 de Río Grande, Oax., y 2 de Tuxtepec, Oax.

Horas	Sin DMSO		Con DMSO	
	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos
72	---	0/5	---	0/5
75	---	0/5	---	0/5
78	---	0/5	---	0/5
81	Corpuscular	4/5	Corpuscular	4/5
84	Puntiforme	5/5	Puntiforme	5/5
87	"	4/5	"	4/5
90	"	4/5	"	5/5
93	"	4/5	"	5/5
96	Corpuscular	5/5	Corpuscular	4/5
108	Puntiforme	1/2	Puntiforme	3/3
120	Corpuscular	2/2	Corpuscular	3/3
144	"	2/2	"	5/5
Titulo DL 50%		10 ^{3.58}	10 ^{4.44}	
Período de incubación (Promedio)		8 días	7 días	
Con la dilución 10 ⁻¹				

CUADRO 5
Virus de origen vampiro. Mezcla de cerebros de vampiro, infectados artificialmente

Horas	Sin DMSO		Con DMSO	
	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos	Tipo de fluorescencia	Núm. de ratones positivos
96	puntiforme	3/5	Corpuscular	3/5
99	"	1/5	Puntiforme	3/5
102	"	3/5	"	5/5
105	"	5/5	"	5/5
108	---	0/1	"	1/1
111	"	1/2	"	2/2
114	---	0/5	"	3/5
117	"	1/3	"	3/3
120	"	3/5	"	3/3
144	"	1/1	"	1/1
192	Corpuscular	1/1	Corpuscular	1/1
Titulo DL 50%		10 ^{2.16}	10 ^{2.5}	
Período de incubación (Promedio)		15 días	14 días	
Con la dilución ¹				

Discusión

La aparición de fluorescencia fue variable, ya que hubo ocasiones en donde no todas las impresiones a diferentes horas presentaron fluorescencia.

La primera observación de fluorescencia fue a las 24 horas cuando se trabajó con la cepa de calle aislada de cerebro de perro, observaciones similares fueron hechas en un

estudio de cinética de virus fijo en cerebros de ratones de 3 semanas llevado a cabo también por el método de inmunofluorescencia (Salido y Rengell, 1968), pero con resultados diferentes al obtenido al utilizar cepas de calle aisladas de glándulas salivales y cerebro de perro rabioso e inoculadas intracerebralmente en ratones lactantes y de 21 días (Pilo Moron *et al.*, 1967). Dichos autores observaron fluorescencia desde el 5° día en cepas

con períodos de incubación de 7 a 15 días.

En lo que se refiere a períodos de incubación al utilizar virus solo de cerebros de perro, fueron de 5 a 7 días observándose fluorescencia de las 24 a las 30 horas o sea de 90 a 96 horas, antes de la aparición de los primeros signos de la enfermedad.

La adición de DMSO aceleró el período de incubación en aproximadamente 24 horas; sin embargo, la observación de fluorescencia fue similar a la obtenida sin DMSO. La adición de DMSO no incrementó significativamente el título obtenido.

Al utilizar la cepa de rabia de origen bovino sin DMSO se obtuvo un período de incubación de 8 días, observándose fluorescencia a las 81 horas antes de la aparición de signos. Con DMSO se observó fluorescencia también a las 81 horas con un período de incubación de 7 días, haciendo la observación de fluorescencia 87 horas antes de la aparición de los signos.

Cuando se trabajó con la cepa de origen vampiro con virus solo, los signos clínicos aparecieron a los 15 días (360 horas) y se hizo la observación de fluorescencia a las 96 horas, 246 horas (10 días 6 horas) antes de la aparición de signos: al adicionar DMSO

se obtuvo un período de incubación de 14 días y se observó fluorescencia también a las 96 horas, detectándose antígeno rábico en el cerebro 240 horas antes. Con la cepa de vampiro se detectó fluorescencia antes que al utilizar la cepa de bovino y perro, tomando como relación el período de incubación de 14 días.

Summary

Weanling mice were inoculated with 3 rabies isolates (canine, bovine, vampire) with and without addition of dimethyl sulfoxide (DMSO). Groups of 3-5 mice were sacrificed every 3 hours and brain impressions stained by the fluorescent antibody technique. The strains were titered with and without DMSO.

Fluorescent staining was detected before rabid signs.

Were noted fluorescence in mice inoculated with the canine strain was seen 90-96 hours before signs were noted. The addition of DMSO reduced the incubation period by the day.

The mice inoculated with the bovine strain fluorescence was seen 87 hours before signs, and with the vampire strain fluorescence was seen 267 hours before signs were noted.

Literatura citada

- BAER G. M., 1968. Comunicación personal.
- CONSTANTINE D. G., 1966. Transmission experimental bat rabies: Responses of certain carnivora to rabies virus isolated from infected by the non bite route. *A. J. Vet. Res.* 27, 13, 15.
- GOLDWASSER, R. A. y KISSLING, R. E. 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exptl. Biol.* 98: 219-223.
- HUTYRA, MAREK y MANINGER, 1959. Patology Terap. Esp. de los animales domésticos. Tom. 1. 8^a Ed. 7:401.
- JOHNSON, H. N., 1965. Viral and Rickettsial diseases laboratory. *Calif. State. Department of Public Health.* Berkeley, Calif. 20:335.
- KEIL H. L., 1967. Enhanced Bacterial Sport Control of Peach when Dimethyl Sulfoxide is combined with sprays of Oxtetracycline. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141: 131-138.
- KOPROWSKI H., 1952. Latent or dormant viral infection. *Am. N. Y. Sci.* 54:962-976.
- KOPROWSKI, H., 1967. Prelude in: Current Topics in Microbiology and Immunology. 40. *Springer Verlag N. Y. Inc. Edit.*
- O. M. S., 1959. Procedimientos de laboratorio aplicados a la rabia. P. 24.
- PILO MORON E.; J. VINCENT, FIERRE SUREAU y NOEL R., 1967. Diagnostic Rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous maxilaire aux souriceaux et par l'immunofluorescence. *Arch. L'institut Pasteur D'Algerie* 45: 5-10.
- PAWAN, J. L., 1948. Fruit eating bats and paralytic rabies in Trinidad. *Am. Trop. Med. Parasitol.* (30) 401-422.
- ROSEMBAUM, E. E. y W. J. STANLEY. 1964. Dimethyl Sulfoxide in acute muscle esquelatal. Injuries and Inflammations. *Northwest Med.* 63: 167-168.
- SALIDO y RENGELL, F., 1968. Estudio de la cinética del virus de la Rabia en Ratonos inoculados intracerebralmente. *Rev. Invest. Salud Pública de México.*
- STANLEY W. J., M. BISCHER y R. J. HIRSCHLER, 1964. Dimethyl Sulfoxide Effects on the permeability of biological membranes (preliminary report) *Current Therap. Res.* 6 (3) 196-198.
- STANLEY W. J.; R. J. HIRSHLER y E. E. ROSEMBAUM, 1965. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Laboratory and chemical Evaluation. *J.A.V.M.A.* 147 (12) 1350-1359.
- WALTERS M.; J. M. PAPAMMITHOW y K. B. SHILKIN, 1967. Inflammation Induced by Dimethyl Sulfoxide (DMSO); Ultrastructural Investigation of Preinflammatory phase. *Exp. and Mol. Path.* 6: 106-117.