

Confirmación del virus rábico transmitido por murciélagos en bovinos del nordeste argentino mediante seroneutralización en ratón *

Miranda, A.O.¹; Acosta, R.S.¹; Laffont, H.M.¹; Báez, E.N.¹;
Marder, G.²; Jacobo, R.A.³; Núñez, S.E.¹

Cátedras de Inmunología ⁽¹⁾, Patología Comparada y Salud Pública ⁽²⁾ y Enfermedades Infecciosas ⁽³⁾, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel/Fax 03783–5753, Email: inmuno@vet.unne.edu.ar

Resumen

Miranda, A.O.; Acosta, R.S.; Laffont, H.M.; Báez, E.N.; Marder, G.; Jacobo, R.A.; Núñez, S.E.: Confirmación del virus rábico transmitido por murciélagos en bovinos del nordeste argentino mediante seroneutralización en ratón. Rev. vet. 16: 1, 36–39, 2005. Brotes epizooticos de rabia pareasiente en el nordeste argentino, extendidos ininterrumpidamente desde 1997 a 2003, indujeron al grupo de trabajo a tratar de confirmar la presencia de virus rábico en los bovinos afectados, mediante pruebas serológicas específicas. Muestras de encéfalo bovino fueron diagnosticadas como positivas a rabia por medio de la técnica habitual de anticuerpos fluorescentes e inoculación intracerebral en ratón lactante. Mediante la técnica de seroneutralización en ratón se confirmó que se trataba de virus rábico, al neutralizar más de 100 veces la DL₅₀ en 6 muestras analizadas en el año 2003.

Palabras clave: bovino, rabia pareasiente, seroneutralización, nordeste argentino.

Abstract

Miranda, A.O.; Acosta, R.S.; Laffont, H.M.; Báez, E.N.; Marder, G.; Jacobo, R.A.; Núñez, S.E.: Confirmation by seroneutralization of rabies virus transmitted by bats in northeastern Argentina. Rev. vet. 16: 1, 36–39, 2005. Due to continuous rabies outbreaks from 1997 to 2003 in cattle from Corrientes and Formosa, northeastern Argentina, specific serological tests were run to confirm the presence of the rabies virus in the affected animals. Bovine brain samples were diagnosed as positives by means of immunofluorescence techniques and inoculation in suckling mice. Confirmation of the rabies virus was achieved using seroneutralization in mice, with neutralization values of more than 100 times the LD₅₀ in 6 samples analyzed during 2003.

Key words: cattle, bat rabies, seroneutralization, northeastern Argentina.

INTRODUCCIÓN

La rabia transmitida por murciélagos hematófagos se conoció a partir de las primeras expediciones colonizadoras a América y hay suposiciones de su existencia en la era precolombina. Por siglos esta enfermedad ha causado brotes y defunciones aisladas en seres humanos, además de pérdidas elevadas de ganado vacuno ¹. La rabia transmitida por murciélagos constituye un problema complejo, al involucrar factores ambientales capaces de brindar el hábitat favorable para la diseminación viral entre distintas especies de murciélagos y otros animales, tanto de hábitos urbanos como silvestres ⁸. Los qui-

rópteros pueden también transmitir otras enfermedades como arbovirosis, histoplasmosis, tripanosomiasis, leptospirosis, rickettsiosis y criptococosis ¹².

Las dimensiones del virión, que morfológicamente posee forma bala o proyectil, son 180 nm de longitud por 75 nm de diámetro. El virus está envuelto por una bicapa lipídica, cuya composición es semejante a la de la membrana neuronal. Dicha envoltura posee glicoproteína G y hacia el interior se encuentra la proteína de matriz (M), la nucleocápside constituida por tres proteínas (N, P y L) y el ácido nucleico, que es un RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa ^{2,11}. La información genética del virus está contenida en 11.932 nucleótidos determinados en la cepa PV del virus de la rabia. La posición de los genes en el RNA de cadena negativa es N, P, M, G y L en sentido 3' a 5' ¹¹.

Los murciélagos hematófagos, principales transmisores de la rabia, habitan exclusivamente la región de América Latina, desde el norte de México hasta el norte y centro de Argentina ⁶. Si bien los murciélagos no hematófagos también son portadores de la rabia, los casos

Recibido: 15 marzo 2005 / Aceptado: 30 mayo 2005

* PI 692 UNNE. Trabajo realizado en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico de Rabia (Convenio FCV–UNNE, Ministerio de Salud Pública de Corrientes y CONICET). Presentado en la Sesión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Corrientes, y en la VI Jornada Internacional de Enfermedades Transmisibles, Posadas, Argentina, 2004.

humanos por ellos transmitidos ocurrieron en forma accidental, no agresiva, y en baja proporción ⁷. En 1995 se reportó que dos casos ocurridos en áreas urbanas de Brasil pudieron haber sido transmitidos por murciélagos no hematófagos ¹¹.

En los dos últimos casos de rabia humana registrados en Chaco (1997) y Corrientes (2001), en los que se involucró a murciélagos como responsables de la transmisión, los quirópteros se identificaron en principio como variante 4 de *Tadarida sp.* y posteriormente se rectificó la información afirmando que correspondía a variante 3 procedente de *Desmodus sp.* ⁹.

Los murciélagos tienen una vida media de 12 años. Cuando se presenta algún cambio en su habitual fuente alimentaria buscan otras alternativas para sobrevivir, lo cual no implica que eventualmente los vampiros no se alimenten de sangre humana, sino que ésta no es la primera opción ³. Los murciélagos constituyen la segunda mayor familia de mamíferos del mundo, con un total de casi 1.000 especies, y la primera en cuanto a la amplitud de distribución. Sólo tres especies son hematófagas: *Diphylla ecaudata*, *Diaemus youngi* y *Desmodus rotundus* ⁶. Es probable que esta última, la más común, sea la responsable de los brotes de rabia aparecidos durante el período 1997–2003 en la provincia de Corrientes ¹⁰.

Desde febrero de 1997, en que se detectó el primer caso de rabia pareasante (*desmodina*) en Corrientes, ocurrieron brotes epizooticos anuales en bovinos y equinos hasta septiembre de 2003, los cuales fueron diagnosticados en nuestro laboratorio, al confirmarse positividad en 60 muestras de encéfalo analizadas mediante pruebas de anticuerpos fluorescentes e inoculación intracerebral en ratón albino lactante ¹⁰. Históricamente la rabia bovina es endémica en Corrientes y los brotes epizooticos se presentan en ciclos con intervalos fluctuantes de más o menos seis años. Iniciados los brotes, las medidas sanitarias habituales (vacunaciones, control poblacional de colonias de *Desmodus sp.* y otras), logran controlar la enfermedad en aproximadamente 18 a 24 meses.

El objetivo del trabajo, ante el hecho inusual que el brote epizootico aparecido en 1997 se extendiera hasta 2003, fue confirmar la presencia de virus rábico y determinar el poder infectivo de la/s cepa/s actuante/s, así como posteriormente examinar variantes antigénicas asociadas a otros brotes, a través de la caracterización genética de los diferentes aislamientos de campo, señalar la circulación de dicha variante y sus posibles reservorios, a efectos de generar información epidemiológica capaz de contribuir con las estrategias de control y prevención de la rabia ^{5,8}.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el transcurso de 2003, seis muestras de encéfalo bovino (5 procedentes de Corrientes y 1 de Formosa) fueron diagnosticadas como positivas a rabia mediante técnicas de anticuerpos fluorescentes (IFD) e inoculación intracerebral en ratón lactante albino (IR), confirmándose por la prueba seroneutralización en ratón

(SNr) ⁴. Esta última técnica permite determinar, por la acción neutralizante de un suero antirrábico conocido, la presencia de virus rábico en material infectado, así como verificar que no ha habido contaminación por otros virus (coriomengitis linfocitaria, encefalomielitosis del ratón, ectromegalia) de las cepas de virus rábico mantenidas en el laboratorio.

Se emplearon ratones albinos sanos de ambos sexos, 3–5 semanas de edad y 12–15 g de peso al momento de la inoculación, pertenecientes a una misma línea genética para eliminar las diferencias individuales. El material de inoculación fue un macerado de masa encefálica de los bovinos muertos por infección sospechosa de rabia. Todos los sueros, tanto específicos como normales fueron conservados 4°C e inactivados en baño–maría a 50°C durante 30 minutos.

El material infeccioso se preparó en suspensión al 20% en agua destilada estéril con 2% de suero equino o de cobayo inactivado y posteriormente fue centrifugado a baja velocidad (1.000–2.000 rpm) durante 5–10 minutos. El sobrenadante se decantó cuidando de no remover el residuo depositado. Se realizaron 7 diluciones seriadas de razón 10 de la suspensión al 20%, agregando a cada una de las diluciones una cantidad igual ya sea de suero normal o de suero antirrábico, llevando la dilución final al 10%, neutralizadas por cantidades constantes de suero.

En una gradilla se dispusieron 3 filas de 7 tubos cada una. Los tubos de la primera fila se marcaron con números (1 al 7). Los tubos de la segunda fila se identificaron con la letra “A” (suero anti) y las tasas de dilución final 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . Los tubos de la tercera fila se marcaron con la letra “N” (suero normal) y las tasas de dilución de 10^{-1} a 10^{-7} . La neutralización se realizó agregando a todos los tubos de la segunda fila 0,2 ml de suero inmune, y a los de la tercera fila 0,2 ml de suero normal inactivado de la misma especie animal. Tras ser mezclados por agitación, se incubaron durante una hora y media a 37°C en estufa, agitándose nuevamente otras dos veces durante la incubación. Extraídos de la estufa, las mezclas virus–suero se introdujeron en un baño de hielo, para luego ser inoculados a ratones por vía intracerebral.

Se dispusieron jaulas para cada una de las 7 diluciones del virus neutralizado con el suero antirrábico y del suero normal respectivamente. La inoculación se inició por la dilución más alta de virus neutralizado por el antisuero. Los ratones inoculados se depositaron en cajas rotuladas con el número de ratones, dilución del suero neutralizante (suero antirrábico) y fecha. De igual forma se procedió con las restantes diluciones neutralizadas terminando con la 10^{-1} , así como con la mezcla de virus–suero normal. Los ratones se observaron diariamente durante 21 días, registrando su estado en planillas, una por cada lote de 7 ratones inoculados con la misma dilución de virus y el mismo suero.

La escala de resultados se estableció en función de la dilución, en forma separada para los ratones que recibieron virus neutralizado por el suero específico y para

los que recibieron virus con suero normal. A través del método estadístico de Reed y Muench, se determinó la DL_{50} del virus neutralizado por el suero específico y la del suero normal, para lo cual el punto de partida fue la dilución que produjo una mortalidad (M) inmediatamente inferior al 50%, aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{50\% M - M \text{ inmediate. } > \text{ al } 50\%}{(M \text{ inmediate. } > \text{ al } 50\% - M \text{ inmediate. } < \text{ al } 50\%)} \times \text{logaritmo del factor de dilución}$$

Al interpretar los resultados, la confirmación del antígeno viral se estableció si el suero antirrábico ejerció una protección significativa, es decir, si existió una diferencia suficiente entre los muertos en el grupo tratado con suero normal y los del grupo tratado con suero antirrábico. La DL_{50} se calculó separadamente para el virus neutralizado y para el virus con suero normal. Si la diferencia resultó mayor que 2, es decir, si el suero antirrábico neutralizó más de 100 veces la DL_{50} del virus, se confirmó la presencia de virus rábico, si no hubo diferencia o si el antilogaritmo fue menor que 10, no hubo neutralización y se validó como ausencia de virus rábico. Si la diferencia correspondió a un antilogaritmo entre 10 y 49, el resultado fue considerado no satisfactorio y la prueba debió repetirse. Con el material sospechoso de las 6 muestras se preparó una suspensión al 20% y se realizaron diluciones progresivas al décimo para inocular intracerebralmente a seis ratones albinos por muestra, a los efectos de determinar el poder infectivo.

RESULTADOS

Los resultados se muestran en Tabla 1. El diagnóstico de rutina arrojó resultados positivos tanto para IFD (efectuado a las 24 horas de recepcionada la muestra) e IR (sacrificio de ratones a los cinco días post-inoculación). Los ratones no sacrificados manifestaron síntomas compatibles con rabia a los siete y nueve días post-inoculación, muriendo entre los 8 y 12 días. La confirmación vírica de las seis muestras encefálicas dio como diferencia entre logaritmos de 2,14 a 2,71 y el título infectivo expresado en logaritmo desde 3,16 a 3,95 como menor y mayor respectivamente.

DISCUSIÓN

La SNr arrojó una diferencia entre logaritmos superior a 2 para todas las muestras procesadas, indicando que el suero antirrábico neutralizó más de 100 veces la DL_{50} del virus, confirmándose como virus rábico los casos diagnosticados mediante IFD e IR.

La rabia transmitida por murciélagos pone en riesgo la explotación pecuaria y las poblaciones humanas. En la mayoría de los países su control recae en el sector agrícola, que aplica diversas técnicas para limitar las poblaciones de murciélagos, aunque frecuentemente dicha tarea es difícil porque involucra factores naturales favorables para su existencia, posibilitando la circulación del virus rábico en el ciclo silvestre. Las caracterís-

Tabla 1. Identificación de virus rábico y título infectivo de muestras encefálicas de bovinos positivas a IFD e IR.

muestra	procedencia	diagnóstico		confirmación vírica (SNr)	título infectivo $DL_{50}/0,03 \text{ ml}$
		IFD	IR		
1	Corrientes	+	+	$10^{2,27}$	$10^{3,45}$
2	Corrientes	+	+	$10^{2,71}$	$10^{3,90}$
3	Corrientes	+	+	$10^{2,14}$	$10^{3,55}$
4	Corrientes	+	+	$10^{2,55}$	$10^{3,21}$
5	Corrientes	+	+	$10^{2,41}$	$10^{3,16}$
6	Formosa	+	+	$10^{2,23}$	$10^{3,95}$

IFD: inmunofluorescencia directa, IR: inoculación intracerebral a ratón, SNr: seroneutralización en ratón.

ticas topográficas y fitogeográficas de ciertas regiones del noroeste y noreste argentino tornan muy difícil el acceso a las guaridas de los murciélagos.

A manera de conclusión surge que, confirmada fehacientemente la epizootia de rabia pareasiente, que periódicamente se reitera a pesar de las medidas de control instauradas, resulta imprescindible estudiar los inmunógenos empleados en los establecimientos con casos de rabia, así como tipificar antigénica y genéticamente el virus actuante, a los efectos de poder establecer las características de los viriones y conformar un mapa epidemiológico para una mejor comprensión de su diseminación.

REFERENCIAS

1. **Baer G M.** 1991. *The Natural History of Rabies*, 2nd ed., CRC Press, Boca Ratón.
2. **Fekadu M.** 1991. Virus rábico de vampiros: histopatología y características antigénicas, protección contra los virus relacionados de la rabia tipo 4 aislados de murciélagos europeos. *Anales OPS de la Reunión de Consulta sobre la atención a personas expuestas a la rabia transmitida por vampiros, Washington.*
3. **Greenhall A.** 1991. Etología y ecología de los vampiros. *Anales OPS de la Reunión de Consulta sobre la atención a personas expuestas a la rabia transmitida por vampiros, Washington.*
4. **Kaplan MM, Koprowski H.** 1975. *La rabia. Técnicas de Laboratorio*, 3^o ed., OMS, Serie Monografías N° 23, Ginebra.
5. **Lord R, Fuenzalida E, Delpietro H, Larghi OP, Díaz AM, Lázaro L.** 1975. Observations on the epizootiology of vampire bat rabies. *PAHO Bull* 9: 43–45.
6. **Málaga A.** 1954. El vampiro portador de la rabia. *Bol OPS*: 53–65.
7. **Málaga A.** 1987. Morcegos hematófagos e a raiva dos herbívoros no Brasil. *An Semin Ci Fiube Uberaba* 1: 13–29.
8. **Miranda AO, Brunel CM.** 1991. Tres casos de rabia en "coati" (*Nasua sp.*) diagnosticados en la provincia de Formosa (Argentina). *Rev Vet* 3: 8–84.
9. **Miranda AO, Acosta RS.** 2003. Diagnóstico *ante mortem* de rabia mediante el uso de anticuerpos fluorescentes en impresión corneal de un humano de la ciudad de Corrientes. *Anales de la Reunión de Comunicaciones Científicas*

- y Tecnológicas de la UNNE, Corrientes, Argentina, <http://www.unne.edu.ar/cyt2003/cyt.htm>.
10. **Miranda AO, Acosta RS.** 2003. Persistente epidemia de rabia bovina (paresiante) en la provincia de Corrientes, período 1997–2003. *Anales Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE*, <http://www.unne.edu.ar/cyt2003/cyt.htm>.
 11. **Schneider MC, Burgoa–Santos C.** 1995. *Algunas consideraciones sobre la rabia humana transmitida por murciélagos*. <http://www.insp.mx/salud/37/374–10s.html>.
 12. **Velasco Villa V.** 2001. *Virus causantes de enfermedades prevalentes, emergentes y re–emergentes en México*. Rabia. Depto. Microbiol. Facultad de Medicina, UNAM, <http://www.facmed.UNAM.mx/deptos/microbiologia/librovir/rabia.html>.