

ASLAMIENTO DEL VIRUS RÁBICO DEL RIÑÓN, CORAZÓN Y CEREBRO DEL BOVINO EN CONDICIONES NATURALES*

RENATO AUGUSTO DA SILVA**

ARY MOREIRA DE SOUZA***

ALTAIR CORREA LIMA****

RESUMEN

De una vaca mestiza cebú, atacada de rabia, en el Municipio de Sao Fidelis en el Estado de Río de Janeiro, aislamos virus de rabia del riñón, corazón y cerebro, por inoculación intracerebral de las emulsiones de estos tejidos, en ratones lactantes (4 días de edad) y adultos (21 días de edad).

Las muestras de virus aisladas de los diferentes tejidos, fueron identificadas como virus rábico por la presencia de corpúsculos de Negri en el citoplasma de las células nerviosas de los cerebros de los ratones inoculados y por la prueba de suero-neutralización, utilizándose para esta prueba un suero antirrábico de reconocida capacidad neutralizante.

SUMARIO

De uma vaca mestiça zebú, acometida de raiva, no Município de São Fidelis no Estado do Rio de Janeiro, isolamos vírus da raiva do rim, coração e cérebro, por inoculação intracérebro das emulsões desses tecidos, em camundongos lactantes (4 dias de idade) e adultos (21 dias de idade).

As amostras de vírus isoladas dos diferentes tecidos, foram identificadas como vírus rábico pela formação de Corpúsculos de Negri no citoplasma das células nervosas dos cérebros dos camundongos inoculados e pela prova de soro-neutralização, utilizando-se para esta prova um soro anti-rábico de reconhecida capacidade neutralizante.

ABSTRACT

We isolated rabies virus from kidney, heart, and brain of a cow naturally infected in the Municipio of São Fidelis, State of Rio de Janeiro (Brazil), by intracerebral inoculation in baby and adult mice.

The strains of the virus isolated from different tissues were identified as rabies virus by presence of Negri bodies in the cytoplasm of the nervous cells of the brains of the mice inoculated and by neutralization test using a standardized rabies serum.

*Comunicación presentada a la Sociedad Brasileira de Medicina Veterinaria en la Sesión del día 22 de agosto de 1966.

**Jefe de la Sección de Zoonosis por Virus del Instituto de Investigaciones y Experimentaciones Agropecuarias del Centro Sul —DPEA— Ministerio de Agricultura y Profesor Adjunto de la Escuela Nacional de Veterinaria de la Universidad Rural del Brasil.

***Veterinario de la Sección de Zoonosis por Virus del Instituto de Investigaciones y Experimentaciones Agropecuarias del Centro Sul —DPEA— Ministerio de Agricultura.

****Jefe del Puesto de Sanidad Animal de la "Defensa Sanitaria Animal" en Campos —Estado de Río de Janeiro — DDIA— Ministerio de Agricultura.

INTRODUCCIÓN

La presencia del virus rábico en tejidos no nerviosos ha dado oportunidad a diversos trabajos por parte de los especialistas en rabia. Estos trabajos han sido orientados hacia determinados portadores naturales del virus, principalmente murciélagos y carnívoros silvestres. Así, Johnson (4), en 1959, al estudiar casos naturales de rabia en zorrillo o mofeta (Spotted Skunk), aisló virus rábico de los tejidos mamarios y renales.

En murciélagos *Tadarida b. mexicana*, experimentalmente infectados, Sulkin *et. al.* (10), en 1957, demostraron el lipotropismo del virus rábico aislándolo de la glándula interescapular (brown fat) y glándulas de murciélagos aparentemente sanos.

El virus rábico ha sido aislado del pulmón y otros tejidos de murciélagos, conforme demostraron claramente los trabajos de Bell *et. al.* (1), cuando en 1962 obtuvieron el virus del corazón, riñones, pulmón y bazo de los murciélagos insec-

tívoros *Eptesicus fuscus*, y posteriormente Girard *et. al.* (3) en 1965, comunicaron el aislamiento del virus rábico de los riñones, cerebro y glándulas inter-escapulares (brown fat) de murciélagos *Eptesicus fuscus* y *Myotis lucifugus*. En el Brasil, la primera notificación sobre el asunto resultó de los trabajos de Silva y Souza (9), cuando en 1966 aislaron virus rábico de pulmón, corazón, riñones, vejiga y otros diferentes tejidos de murciélagos *Desmodus rotundus*.

Sobre la base de los trabajos citados, orientamos nuestras investigaciones hacia diferentes tejidos de bovino, en casos naturales de infección rábica. Recientemente relatamos el aislamiento del virus rábico del riñón, corazón y cerebro de una vaca atacada de rabia en condiciones naturales, siendo el propósito de la presente publicación describir con más detalles los trabajos de aislamiento e identificación del virus rábico aislado del riñón, corazón y cerebro de bovino naturalmente infectado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales que dieron origen al presente trabajo fueron obtenidos de una vaca mestiza cebú, de aproximadamente 4 años de edad, perteneciente a una hacienda del Municipio de Sao Fidelis (21° 38' 48" de latitud Sur, 41° 44' 44" de longitud oeste de Greenwich y 24 metros de altitud), en el Estado de Río de Janeiro, sacrificada en la mañana del día 20 de julio de 1966.

El animal presentaba síntomas de rabia, y lo que más llamó nuestra atención fue el hecho de haber estado por 3 días sin poder levantarse, mientras su psiquismo parecía normal. Era el único caso de rabia observado en el rebaño de más de 300 cabezas.

El rebaño de la hacienda estaba vacu-

nado contra la rabia y esta vaca había sido comprada hacía cerca de 3 meses, sin haber sido vacunada en el lugar de origen.

Sacrificamos el animal por chuzamiento y sangría total. Colectamos fragmentos de cerebro, cerebelo y bulbo, así como también el riñón derecho, fragmentos de hígado, corazón y pulmón. La sangre periférica fue colectada adicionándosele glicerina en partes iguales. La orina fue pipeteada y colocada en frasco esterilizado.

Los materiales así recogidos, fueron debidamente acondicionados en saco plástico y colocados en caja térmica refrigerada, y llevados el mismo día al laboratorio, donde fueron guardados a temperatura de menos de 20°C.

Procedimos inicialmente a la técnica de Faraco (2) en los fragmentos de cuernos de Ammon de la vaca sacrificada.

1. *Aislamiento del virus.* Preparamos emulsiones individuales a 20% de cerebro, riñón, pulmón, corazón e hígado. Estos tejidos fueron pesados, después de lavarlos previamente en suero fisiológico estéril para eliminación de la sangre. El riñón fue separado de su camada grasosa y cápsula, siendo finamente macerado en licuadora. De este tejido obtuvimos un volumen de 400 ml de emulsión.

La orina fue medida y tratada con antibióticos y después de centrifugada fue inoculada en ratones.

La sangre coagulada fue pesada y macerada en mortero, adicionándose suero fisiológico para obtener la concentración de 20%.

De la emulsión del riñón, se tomaron 10 ml, tratándolos con 1000 UI de penicilina potásica y un miligramo de dihidroestreptomicina para cada mililitro. Las demás emulsiones fueron también tratadas con los antibióticos citados. Centrifugamos las emulsiones obtenidas a 2,500 r.p.m. durante 10 minutos, separando los sobrenadantes de los sedimentos. Después de esta operación, incubamos las emulsiones por 30 minutos a temperatura de 4°C. El control bacteriológico en caldo simple y agar sangre de cada emulsión fue realizado antes de proceder a las inoculaciones intracerebrales en los ratones.

Los resultados de estas inoculaciones están resumidos en el cuadro I.

Pasados 12 días, descongelamos la emulsión de riñón al 20% con cerca 400 ml, dividiéndola en dos partes. Centrifugamos nuevamente; inoculamos con cada parte, ratones lactantes de 4 días de edad, cuyos resultados están demostrados en las fichas 7083 y 7084.

Las emulsiones fueron inoculadas en ratones de 4 y 21 días de edad por vía intracraneana en la dosis de 0.03 ml.

A continuación congelamos las diferentes emulsiones a temperatura de menos 20°C para ser utilizadas de acuerdo con las necesidades del desarrollo del trabajo.

2. *Identificación del virus.* Para la identificación de las muestras de virus aisladas del riñón, corazón y cerebro, realizamos los siguientes exámenes:

a) Histopatológico

b) Prueba de suero-neutralización

a) El examen histopatológico consistió en hacer frotis en láminas de los cerebros de los ratones adultos y lactantes, sacrificados después que presentaron los síntomas de la enfermedad, utilizándose para tal fin la técnica de Faraco (2).

b) En la prueba de suero-neutralización utilizamos las muestras de virus aisladas del bovino sacrificado. Estas muestras correspondían al primero, segundo y tercer pasajes respectivamente para cerebro, riñón y corazón en ratones.

Utilizamos un suero inmune con alto título de anticuerpos para el virus rábico, proveniente del Instituto Oswaldo Cruz y un suero normal de caballo.

La prueba consistió en colocar partes iguales de las diluciones del virus, que variaron de 10^{-6} a 10^{-1} para el suero normal de caballo, y de 10^{-6} a 10^{-1} para el suero patrón. Agitamos bien los tubos, permaneciendo las mezclas suero más virus, en baño-maría a 37°C por una hora. Después de este periodo, los tubos que contenían las mezclas eran transferidos a un baño de hielo, procediéndose a las inoculaciones en los ratones de 21 días de edad, en la dosis de 0.03 ml. Para cada dilución utilizamos un lote de 6 ratones observándose esos animales por un periodo de 21 días.

Para el cálculo del título del virus y de las dosis neutralizantes nos basamos en el método de Reed y Muench (8), y consideramos la neutralización de 100 DL₅₀ suficiente para establecer la identidad del virus (12).

RESULTADOS

Las diferentes emulsiones no revelaron micro-organismos en los medios de caldo simples y agar-sangre.

Los resultados de las inoculaciones de las diversas emulsiones en ratones están resumidos en el cuadro I.

Emulsión de cerebro. Los ratones adultos con 7 días de inoculados, presentaron síntomas de rabia, siendo sacrificados y sus cerebros colectados para investigación de corpúsculos de Negri y pasajes posteriores en ratón.

Emulsión del riñón. La inoculación de la emulsión del riñón en ratones de 4 días determinó la presencia de síntomas de rabia en el 8º día, en dos ratones. Sacrificamos uno de ellos, sometiendo el cerebro al Faraco y nuevas inoculaciones (ficha 7123)). El otro ratón enfermo fue también sacrificado, colectándose el cerebro para la investigación de corpúsculos de Negri y trabajos posteriores.

Un tercer ratón enfermó 21 días después de inoculado, siendo el cerebro colectado para la investigación de corpúsculos de Negri y nuevos pasajes.

Los ratones adultos inoculados con la emulsión de riñón antes de la congelación, nada digno de nota presentaron en el periodo de observación de 30 días.

De la emulsión del riñón descongelado, después de 12 días de permanencia a menos 20°C, obtuvimos el siguiente resultado:

Porción I. Pasados 11 días de la inoculación en los ratones lactantes, uno de ellos se enfermó, siendo sacrificado. Parte del cerebro fue sometido al Faraco y la otra transformada en emulsión para la inoculación en ratones lactantes (ficha 7150).

Al 18º día de la inoculación muere un ratón, en el 25º día mueren dos ratones más y finalmente el 27º día mueren dos ratones más después de presentar síntomas de la enfermedad.

Porción 2. Con 11 días de incubación en ratones lactantes, amanece un ratón enfermo, siendo sacrificado y su cerebro sometido al Faraco. En el 21º día después de la inoculación, un ratón más enfermo, siendo sacrificado para estudios posteriores.

Las porciones 1 y 2 corresponden a la emulsión de riñón; después de la congelación fueron inoculadas en ratones lactantes.

Las fichas 7076 y 7150 representan los segundos pasajes del virus contenido en la emulsión de riñón del bovino sacrificado, en ratones lactantes. Estos ratones se enfermaron en un periodo que varió de 7 a 9 días.

Emulsión del corazón. La lectura de la ficha 7055, correspondiente a la inoculación en ratones de 4 días de edad de la emulsión de corazón, nos da la siguiente interpretación: en el 7º día de inoculación enferma un ratón; este animal es sacrificado, siendo el cerebro emulsionado para nueva inoculación, lo que es hecho con resultado negativo. En el 11º día de inoculación, muere otro sin presentar síntomas, siendo despreciado. En el 14º día de la inoculación, muere otro ratón sin presentar síntomas, siendo el cerebro colectado para pasajes y evidenciación de corpúsculos de Negri. En el periodo de 30 días de observación no muere ningún otro ratón.

La ficha 7118, relativa a la inoculación del cerebro del ratón muerto en el 14º día, en ratón de 21 días de edad, no nos deja en duda en cuanto al aislamiento del virus. En el periodo de incubación de 8 a 11 días enferman y mueren la mayoría de los ratones con síntomas de rabia. Los cerebros son colectados para Faraco y nuevos pasajes. La orina y las demás emulsiones, representadas por la sangre, pulmón e hígado, resultaron negativas en las inoculaciones en ratón.

CUADRO I

MATERIAL Nº 3399 — BOVINO SACRIFICADO EN LA FASE PARALÍTICA
EN EL MUNICIPIO DE SÃO FIDELIS

Tejidos inoculados	Día de la inoculación	Dosis en ML	Vía	Incubación		Relación de inoculados / muertos		Investiga- ción de los corpúsculos de Negri
				Lactante	Adulto	Lactante	Adulto	
Cerebro	21-7-66	0.03	I. CER.	—	7 días	—	9/9	Positivo
Corazón	25-7-66	0.03	I. CER.	14 días	—	+ 1/4	0/7	Positivo
Riñón	21-7-66	0.03	I. CER.	8-21 días	—	++ 3/8	0/7	Positivo
Pulmón	25-7-66	0.03	I. CER.	—	—	0/5	0/8	—
Hígado	27-7-66	0.03	I. CER.	—	—	0/9	—	—
Orina	21-7-66	0.03	I. CER.	—	—	0/8	0/7	—
Sangre	1-8-66	0.03	I. CER.	—	—	0/8	0/9	—

+ — Realizada en segunda pasaje — ficha número 7118
 ++ — Realizada en segunda pasaje — ficha número 7123

CUADRO II

SUERO NEUTRALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS
DE VIRUS AISLADAS

Órganos	Título en DL_{50} / 0.03 ML		DL_{50}
	Virus + Suero Padrón	Virus + Suero Normal	
Cerebro	10 -2.54	10 -5.44	794
Riñón	10 -1.00	10 -3.50	316
Corazón	10 -1.50	10 -3.50	100

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS

a) *Examen histopatológico.* El examen microscópico de los frotis correspondientes a los cerebros de la vaca y cerebros de los ratones inoculados con las diferentes emulsiones, reveló la presencia de numerosos corpúsculos de Negri en el citoplasma de las células nerviosas.

b) *Prueba de suero-neutralización.* El cuadro II, representativo de los resultados de la prueba de suero-neutralización de las diferentes muestras del virus aisladas

de los tejidos renal, cardíaco y nervioso, ofrecen las siguientes lecturas: el título de las muestras del virus fue dado por las muestras de las disoluciones del virus más suero normal de caballo, siendo de $10^{-1.0}$, $10^{-1.50}$ y $10^{-2.54}$ para las muestras correspondientes al riñón, corazón y cerebro respectivamente.

Las muestras de virus aisladas del riñón, corazón y cerebro, neutralizaron 316, 100 y 794 DL_{50} respectivamente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Demostremos en el presente trabajo el aislamiento del virus rábico de tejido nervioso (cerebro) y tejidos no nerviosos (riñón y corazón) de una vaca naturalmente atacada por rabia, por inoculación en ratones. Otros tejidos de este mismo animal, como la sangre, pulmón e hígado, dieron resultados negativos. Trabajamos en este caso con cantidad insuficiente de cada órgano. Suponemos que lo ideal sea el aprovechamiento de todo el órgano y una mayor cantidad de sangre. Extrañamos que el virus no haya sido aislado de la orina en las inoculaciones en ratones, por el hecho de estar presente en el tejido renal, conforme demostramos en el presente trabajo. En este caso se tornaba necesario la aplicación de la técnica de inmunofluorescencia, para evidenciar el virus rábico en la orina o en los otros tejidos negativos a la prueba de inoculación en ratones. Motivos independientes de nuestra voluntad nos impidieron realizar esta técnica.

La lógica nos permite llegar a la conclusión de que puede haber escape de virus rábico por la orina, cuando él se hace presente en el riñón. Según los trabajos de Girard *et. al.* (3), quedó demostrada la presencia del virus rábico en la orina de murciélago portador de rabia, por técnica de inmunofluorescencia.

La vejiga no fue utilizada por nosotros en este experimento y debido al resultado positivo obtenido con el tejido renal, torna indispensable su utilización.

Verificamos que las muestras de virus rábico aisladas de corazón y riñón, revelaron en el primer pasaje patogenicidad apenas para el ratón de 4 días de edad. El grado de mortalidad observado fue de 37.5% y 25% para las emulsiones de riñón y corazón, respectivamente. Ya la muestra aislada del cerebro se reveló 100% letal para los ratones adultos inoculados.

Pasajes subsecuentes de estas muestras, en ratones adultos, determinarán la muerte de todos los animales.

En lo que se refiere a la producción de corpúsculos de Negri, las muestras de virus rábico aisladas, determinaron en las células nerviosas de los cerebros de los ratones inoculados, la formación de innumerables corpúsculos, observados en los primeros como en los segundos pasajes. Estos datos correspondientes a las muestras de virus aislado de tejidos renal y cardiaco, en primer pasaje en cerebro de ratón, contrarían el punto de vista de Johnson (4), que al trabajar con una muestra de virus rábico aislada de tejido no nervioso de un zorrillo o mofeta (*Spotted Skunk*) explica la ausencia de corpúsculos de Negri en las células nerviosas de los ratones por él inoculados, como consecuencia de la falta de experiencia del virus al tejido cerebral de ratones del primer pasaje.

No logramos éxito en las inoculaciones de sangre, pero creemos en la presencia del virus en este tejido. Los aislamientos obtenidos de riñón y corazón permiten esta afirmativa. En las condiciones experimentales la presencia de virus rábico en la sangre ha sido demostrada por diversos investigadores. Pacheco y Proenca (6) demostraron la presencia del virus rábico en la sangre circulante de conejos inoculados por diferentes vías. Reagan *et. al.* (7) inoculando muestras de virus rábico por la vía intraperitoneal en murciélagos, observó la infecciosidad de la sangre en las primeras 48 horas y Koprowski y Cox (5) inoculando la muestra Flury, vía saco vitelino en el embrión de gallina de 7 días de edad, recuperaron el virus de la sangre en el 3º y 15º días después de su inoculación por pasajes intracerebrales en el ratón.

Las pruebas de suero-neutralización realizadas para cada una de las muestras de virus aisladas del riñón, corazón y cerebro, demostraron que estas muestras correspondían al virus de la rabia, pues neutralizaron respectivamente 316, 100 y 194 DL₅₀.

Por lo expuesto en la presente investi-

gación, concluimos por el aislamiento del virus rábico del riñón y del corazón de bovino en condiciones naturales de infec-

ción, y hasta donde conocemos, ésta es la primera vez que se aísla virus de rabia de tales órganos en el bovino.

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestra gratitud al doctor Joaquín Leures, Jefe del "Laboratorio de Rabia del Instituto Oswaldo Cruz", por la donación del suero antirrábico hiperinmune; a los dedicados laboratoristas de la Sección de Virus, señor Argemiro Lourenço y Adhemar Lourenço por la colaboración prestada en el desarrollo del trabajo y al académico de Veterinaria de la

"Escuela Nacional de Veterinaria", señor Oscar José Franco, de la República de Venezuela, por la colaboración prestada en la versión al español del trabajo, así como también al doctor Bernardo Villa-R. del Instituto de Biología, UNAM, por la revisión del trabajo en el idioma español y por su gestión para publicarlo en México.

LITERATURA

- BELL, J. F. *et al.* 1962. Characteristics of Rabies in Bats in Montana, *Am. Jour. Public Health*. 25: 1293-1301.
- BIER, O., 1961. *Bacteriología e Inmunología*. Décima Edición. Edições Melhoramentos. São Paulo, Brasil. Pg. 821-822.
- GIRARD, K. F. *et al.*, 1965. Rabies in Bats in Southern New England, *New England Jour. Med.*, 272 (2): 75-80.
- JOHNSON, H. N., 1959. The Role of the Spotted Skunk in rabies. Proc. 63rd. Annual Meetind U.S. Livestock Sanit. Assoc. 267-274.
- KOPROWSKI, H. AND COX, H. R., 1948. Occurrence of Rabies Virus in the Blood of Developing Chick-Embryos, *Proc. Soc. Biology*, 68 612-615.
- PACHECO, AND PROENÇA, M. C., 1936. O Virus Da Raiva Bovina Do Brasil Circula No Sanguê E Se Pode Transmitir Per Via Sanguinea. (Nota previa). *Brasil Médico*, 31, (Ano L): 661.
- REAGAN, L. R., *et al.* 1955. Early Appearance of Rabies Virus in the Blood of Cave Bats Exposed by Intraperitoneal Infection, *Cornell Vet.*, 45:153-156.
- REED, L. Y. AND MUENCH, R., 1938. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent End-Points, *Am. Jour. Hyg.* 27:493-497.
- SILVA, R. A. AND M. A. SOUZA, 1966. *Aislamiento de Virus Rábico del Pulmón, Corazón, Vejiga y Otros Diferentes Tejidos de Murciélagos Hematófagos de la Especie Desmodus rotundus*, V Congreso Panam. Med. Vet. y Zootec., Venezuela.
- SULKIN, S. E. *et al.*, 1957. Role of Brown Fat in Pathogenesis of Rabies in Insectivorous Bats (*Tadarida b. mexicana*), *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 96(2):461-464.
- VILLA, R. B., *et al.*, 1963. Presencia y Persistencia del Virus de la Rabia en la Glándula Inter-escapular de algunos Murciélagos Mexicanos, *Ciencia* (Revista Hispano Americana de Ciencias Puras y Aplicadas), 22 (5):137-140.
- World Health Organization, 1954. Laboratory Techniques in Rabies. 23:69-74.