



Detección del virus rábico en glándula parótida de ratones CD-1 inoculados con diferentes dosis de virus estándar de desafío (CVS)

Detection of rabies virus in the parotid gland of CD-1 mice inoculated with different doses of standard challenge virus (CVS)

*Artículo resultado de proyecto de investigación financiado por
La Universidad Cuenca*

*Juan Diego Quezada Alvarado
Universidad de Cuenca
<https://orcid.org/0000-0001-7661-076X>
juan.quezadaa@ucuenca.edu.ec
Cuenca - Ecuador*

*Jaime Maldonado Rivera
Universidad de Cuenca
<https://orcid.org/0000-0003-3751-8279>
jaime.maldonador@ucuenca.edu.ec
Cuenca - Ecuador*

<http://centrosuragraria.com/index.php/revista>

Publicada por: Instituto Edwards Deming
Quito - Ecuador
Julio - Diciembre vol. 1. Num. 4 2019

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

RECIBIDO: 13 DE SEPTIEMBRE 2018
ACEPTADO: 4 DE ENERO 2019
PUBLICADO: 4 DE JULIO 2019

RESUMEN

El presente trabajo titulado: "Detección del virus rábico en glándula parótida de ratones CD-1 inoculados con diferentes dosis de Virus Estándar de Desafío". Se realizó en el laboratorio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública- Leopoldo Izquieta Pérez - Regional Austro. El presente trabajo tiene como finalidad valorar el uso de tejido parotídeo para la detección del virus rábico mediante inmunofluorescencia directa en ratones CD-1 tras la inoculación experimental en cerebro con varias dosis de virus estándar de desafío. Para el diagnóstico del virus rábico se usó la técnica estándar de inoculación intracebral con Virus Estándar de Desafío. Se formaron cuatro grupos de 20 ratones con distintas dosis de antígeno; la detección del virus en improntas de tejido cerebral y parotídeo se realizó mediante inmunofluorescencia directa. Para determinar la asociación de los factores en estudio (tejido, tiempo y dosis de virus estándar), se realizaron los siguientes cálculos: Chi-cuadrado, prueba exacta de Fisher y regresión logística binaria. El tipo de tejido, las dosis de antígeno y el tiempo de detección del virus rábico, no mostraron diferencia significativa alguna. Lo que permitió concluir que es posible usar tejido parotídeo para la detección de virus rábico en ratones

PALABRAS CLAVE: virus rábico, impronta en cerebro, impronta en tejido parotídeo.

ABSTRACT

The present work is entitled "Detection of rabies virus in the parotid gland of CD-1 mice inoculated with different doses of Standard Challenge Virus". It was carried out in the laboratory of the National Institute of Public Health Research - Leopoldo Izquieta Pérez - Austro Regional. The present work aims to evaluate the use of parotid tissue for the detection of rabies virus using direct immunofluorescence in CD-1 mice after experimental inoculation in the brain with several doses of standard challenge virus. The standard technique of intracerebral inoculation with Standard Virus of Challenge was used for the diagnosis of rabies virus. Four groups of 20 mice were formed with different doses of antigen; detection of virus in imprints of the brain and parotid tissue was performed by direct immunofluorescence. To determine the association of factors under study (tissue, time and dose of standard virus), the following calculations were performed: Chi-square, Fisher exact test and binary logistic regression. The type of tissue, the antigen doses and the time of detection of the rabies virus did not show any significant difference. This led to the conclusion that it is possible to use parotid tissue for the detection of rabies virus in CD-1 mice.

KEY WORDS: rabies virus, imprint in brain, imprint in parotid tissue

INTRODUCCIÓN

La agricultura y la producción de alimentos en el mundo actualmente reciben una De acuerdo a la Organización mundial de la salud (OMS) la rabia es una enfermedad zoonótica viral que ataca al sistema nervioso central (SNC) generalmente aguda, cuyo agente causal es un virus. Todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre son susceptibles en mayor o

menor grado, pudiendo ser transmitida por mordedura o el arañazo profundo de un animal infectado.

El virus de la rabia pertenece a la clase V (virus *ARN mono catenario negativo*), familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*, especie *Rabbies virus*. Teniendo como característica la forma de una bala. Es una enfermedad de distribución mundial, de elevada prevalencia en África y Asia. En América Latina la presencia de rabia silvestre, ocasiona graves pérdidas en el sector ganadero. Se han presentado brotes en ganado bovino en zonas donde se ha identificado la presencia de murciélagos hematófagos, que son el reservorio natural del virus. La toma de muestras para el diagnóstico presenta cierta dificultad para el Médico Veterinario, ya que el examen se ha limitado al uso de tejido cerebral donde el virus de la rabia es particularmente abundante. Pero presenta cierta dificultad de acceso y mayor riesgo de contaminación.

Esta investigación permitió el uso de tejido parotídeo en el diagnóstico de virus rábico. Contribuyendo con el estudio de una variante que implica evitar la posibilidad de una infección en las personas que abren las cabezas de los animales. La rabia se considera una de las enfermedades de mayor impacto para la salud pública y animal, el nombre de esta enfermedad proviene del Latín *Rabbas* que traducida al castellano significa “actuar con violencia”; además a la rabia, también se la conoce como hidrofobia, es la zoonosis viral de mayor importancia causada por un virus que afecta a animales domésticos y salvajes, y se propaga a las personas a través del contacto con la saliva infectada, mordeduras o arañazos (1).

La rabia es una enfermedad inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2). La rabia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártida, pero más del 95% de las muertes humanas por rabia se registran en Asia y África. Una vez que aparecen los signos y síntomas, la enfermedad del humano es casi siempre mortal. La transmisión se produce casi exclusivamente por la mordedura de un animal rabioso, con la probabilidad de inocular el virus rábico contenido en la saliva del animal infectado; es menos frecuente a través de arañazo, lamedura de mucosa o de piel lesionada; excepcionalmente penetra por vía respiratoria al inhalarse en ambientes cargados con altas concentraciones de virus rábico, el cual se puede encontrar suspendidos en el aire (efecto aerosol), debido a falla de bioseguridad en centros de zoonosis, consultorios y clínicas veterinarias, bioterios, laboratorios de diagnóstico o de producción de vacunas para rabia

La eficiencia de transmisión varía con la especie hospedadora y la presentación de la rabia. Los animales con la presentación furiosa de la rabia son más propensos a difundir la rabia que los animales con la forma paralítica. Antes de que aparezcan los primeros signos clínicos el virus se puede transmitir (periodo de transmisibilidad). Los gatos excretan el virus durante 1 a 5 días antes de que los signos aparezcan; el ganado en 1 a 2 días, en los zorrillos en un máximo de 14 días y murciélagos durante 2 semanas. La propagación del virus en los perros se suele decir que se limita de 1 a 5 días antes de la aparición de signos clínicos

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue de carácter experimental controlada en laboratorio del Centro de Referencia Nacional en Zoonosis Regional Austro del Instituto Nacional de Investigación en

Salud Pública – Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP) en la provincia del Azuay del cantón Cuenca ubicado en la parroquia Cañaribamba.

Metodología para la investigación experimental:

Factor de estudio:

Fue en tejido parotídeo, cerebral de ratones CD-1 inoculados con diferentes dosis de CVS y se preparó 140 improntas para su examinación por IFD.

Métodos de laboratorio

Análisis de las muestras:

Las muestras fueron obtenidas, procesadas y analizadas en el Centro de Referencia Nacional en Zoonosis Regional Austro del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP).

Obtención, procesamiento, y análisis de las improntas de tejido cerebral y tejido parotídeo en el laboratorio:

Protocolo analítico para el uso de tejido parotídeo en el diagnóstico de rabia.

Inoculación intracerebral del ratón.

Se trabajó con 4 grupos de 20 animales cada grupo, a los tres de cuales se les aplicó diferentes dosis de virus estándar de desafío más el grupo control (suero equino).

Sujeción al ratón, con la mano libre sostener la jeringuilla con la dosis de inóculo correspondiente al grupo experimental, manteniendo el bisel hacia arriba.

Inocular en el punto medio de una línea imaginaria trazada mentalmente del ojo a la oreja. Introducir la aguja dentro del cráneo en ángulo recto, e inocular la cantidad de inóculo según el grupo experimental, después de inoculado, observar que una gota del inóculo aparezca en el sitio de la inoculación.

Terminada la inoculación se procede a desechar la aguja en el guardián y el cuerpo de la jeringuilla en el recipiente correspondiente.

Mantener en observación a los ratones; aquellos que mueren dentro de las primeras 24 a 48 horas se consideran fuera de la investigación experimental, ya que éstos pudieron haber muerto por traumatismo.

Dejar que el proceso patológico del virus rábico concluya con la muerte de los animales, tomando en cuenta que cada grupo tiene lapso de tiempo de muerte experimental.

RESULTADOS

De un total de 100 ratones utilizados en la presente investigación, 10 resultaron muertos por traumatismo durante la inoculación intracerebral con virus estándar de desafío (CVS) al 140%=0,04ml, 20 se usaron como grupo testigo (inoculación de suero equino) y los 70 restantes fueron analizados en la investigación.

Tabla N°2. Presencia de virus rábico tras inoculación intracerebral de virus estándar de desafío en base a los diferentes grupos de dosificación con virus estándar de desafío.

PAROTIDA			CEREBRO		
GRUPO 1 (100%=0.03ml)	VIRUS RABICO	NO	CASOS	3	0
%		15,0%	0,0%		
SI	CASOS		17	20	
%		85,0%	100,0%		
TOTAL	CASOS		20	20	
GRUPO 2 (40%=0.01ml)	VIRUS RABICO	NO	CASOS	1	1
%		5,0%	5,0%		
SI	CASOS		19	19	
%		95,0%	95,0%		
TOTAL	CASOS		20	20	
GRUPO 3 (70%=0.02ml)	VIRUS RABICO	SI	CASOS	20	20
%		100,0%	100,0%		
TOTAL	CASOS		20	20	
GRUPO 4 (140%=0.04ml)	PRESENCIA DE VIRUS RABICO	NO	CASOS	0	1
%		0,0%	10,0%		
SI	CASOS		10	9	
%		100%	90%		
TOTAL	CASOS		10	10	

Grupo 2 (40%=0.01ml) 19 casos positivos en impronta de tejido parotídeo y cerebro. Grupo 3 (100%=0.03ml) 20 casos positivos tanto en tejido parotídeo como en cerebro. Grupo 4 (140%=0.04ml) 10 casos positivo en impronta de tejido parotídeo y cerebro mientras que los otros 10 casos murieron por traumatismo.

Presencia de virus rábico tras inoculación intracerebral de virus estándar de desafío

Del total de 70 individuos analizados, se obtuvo 70 improntas de tejido parotídeo y 70 de tejido cerebral; se detectó la presencia de virus rábico en 66 improntas de tejido parotídeo vs las 68 de tejido cerebral.

Resultados no significativos ($p>0.05$) según Prueba de Chi – Square Test y Prueba exacta de Fisher por ende no hay diferencias estadísticas para la detección de virus rábico tanto en tejido parotídeo como cerebral.

El modelo anterior expresa la relación entre la presencia o no de virus rábico de acuerdo a las variables del tipo de impronta y de la cantidad de inóculo (%/grupo). En una evaluación general, a pesar de que no existe evidencia estadística para expresar que las diferencias entre los valores observados y los valores esperados (Test Hosmer y Lemeshow, $p>0.05$, Anexo 6), los valores del ajuste del modelo no son elevados (R_2 de Cox y Snell y Nagelkerke = 7% y 2,3% respectivamente, Anexo 7). Esto se corresponde con los resultados no significativos para cada variable del modelo estimado (Anexo 8), lo que indicaría como el modelo no fue significativo de manera global debido a que todos los resultados salieron $p>0.05$.

CONCLUSIONES

De la investigación realizada se obtuvieron las siguientes conclusiones:

El uso de tejido parotídeo y tejido cerebral no presentan una diferencia significativa en la detección del virus rábico. La inoculación intracerebral con diferentes dosis de virus estándar de desafío en ratones CD- 1; no muestra diferencia significativa en cuanto a la detección de virus rábico, por lo cual, basándose en los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión que la dosis de 0.02ml (grupo número tres) es la que más presenta casos positivos para la detección del virus rábico en glándula parótida, mediante el uso de inmunofluorescencia directa, ya que utilizando dosis elevadas (0.04ml) se observó traumatismo y muerte instantánea.

La variación en el volumen de virus estándar de desafío no influye en el tiempo, así como la duración del período de supervivencia del animal infectado detección de virus rábico, esta investigación concluye que el número de días sugeridos para la detección de virus rábico en tejido parotídeo es de 8 a 9 días post inoculación intracerebral en ratones CD-1.

REFERENCIAS

Rabia [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [citado 27 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>

Código Sanitario para los Animales Terrestres [Internet]. 21st ed. París, Francia: Organización Mundial de Sanidad Animal; 2013 [citado 27 Septiembre 2017]. Disponible en : <https://www.oie.int/doc/ged/D12823.PDF>

López Santa Cruz Dámaza Irene, González Arrebato Jusayma, Morales Leslie Martha. Diagnóstico del virus rábico en quirópteros. Revista cubana Med Trop [Internet]. 2013 Abr [citado 2017 Septiembre 26]; 65(1): 119-124. Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000100013&lng=es.

Rabia [Internet]. Scribd. 2017 [citado 27 Septiembre 2017]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/77801591/RABIA>

- Delgado Cadena E, Guerrero Navarro I. Estudio epidemiológico retrospectivo de enfermedades zoonóticas de 2004 a 2008 en Colombia [Medico]. Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Medicina Veterinaria; 2010.
- Velasco Villa A. RABIA - Recursos en Virología - UNAM [Internet]. Facmed.unam.mx. 2017 [citado 27 Septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/rabia.html>
- Costa Rica M. Rabia protocolo de vigilancia y control en humanos [Internet]. 1st ed. San José, Costa Rica; 2014 [citado 27 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/rabia.pdf>
- Saad C, Martínez M. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública de la Rabia en humanos, perros y gatos [Internet]. 2nd ed. Bogotá, Colombia; 2014 [citado 28 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Rabia.pdf>
- Bolivia E. La rabia, enfermedad mortal en el mundo [Internet]. Lapatriaenlinea.com. 2017 [citado 28 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.lapatriaenlinea.com/?nota=148912>
- Correa Giron P. La Rabia, manifestaciones clínicas, transmisión, prevención y tratamiento [Internet]. 1st ed. Palo Alto, D.F. Mexico; 1981 [citado 1 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c04.pdf>
- Hernandez Baumgarten E. Patogenia de la rabia [Internet]. 2003 [citado 1 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol2/CVv2c3.pdf>
- Baer G. The natural history of rabies. New York: Academic Press; 1975.
- Lopez Ingunza R, Condori Condori R, Díaz Olivera A. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la rabia [Internet]. Lima: Leonid Lecca García; 2012 [citado 27 septiembre 2017]. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1047_INS-NT31.pdf
- OIE. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas) [Internet]. 5th ed. París, Francia; 2004 [citado 2 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
- Manual de rabia - Vigilancia de Laboratorio - Diagnostico [Internet]. New.paho.org. 2007 [citado 2 octubre 2017]. Disponible en: <http://new.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/cdmanualRabia/vigilancialaboratoriodiagnostico.html>