Transmisión vertical del virus de la rabia cría-madre, fenómeno que podría mantener al virus en especies reservorios de vida silvestre

Nidia Aréchiga-Ceballos,[1] Cenia Almazán-Marín[2] y Álvaro Aguilar-Setién[2]

[1]*Secretaría de Salud, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Departamento de Virología, Laboratorio de Rabia;* [2]*Instituto Mexicano del Seguro Social, Coordinación de Investigación Médica, Unidad de Investigación Médica en Inmunología. Ciudad de México, México*

Resumen

Introducción: *La prueba biológica establecida por la Organización Mundial de la Salud para aislar y amplificar el virus de la rabia consiste en inocular vía intracraneal ratones lactantes para detectar signos de rabia en un periodo de 21 días.* **Objetivo:** *Constatar el contagio viral en las madres de ratones lactantes inoculados con virus de la rabia.* **Método:** *Veintisiete aislados mexicanos de virus de la rabia se inocularon vía intracraneal en ratones lactantes, los cuales fueron observados por 21 días y sus madres, por 60 días. El diagnóstico se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia en cerebro. El virus se caracterizó por secuenciación y anticuerpos monoclonales.* **Resultados:** *Todas las camadas presentaron rabia entre siete y 15 días posinoculación (p. i.); tres de las 27 hembras (11 %), a los días 33, 37 y 39 p. i. de sus crías. La caracterización viral mostró que las madres se infectaron con la misma variante de sus crías, dos procedían de murciélago hematófago y una de perro. Las camadas que trasmitieron rabia a sus madres fueron nueve individuos.* **Conclusiones:** *En la naturaleza, el virus de la rabia podría preservarse mediante la transmisión de los neonatos (más susceptibles de contraer y amplificar el virus) a sus madres.*

PALABRAS CLAVE: *Virus de la rabia. Transmisión vertical cría-madre. Pruebas biológicas.*

Abstract

Introduction: *The biological test established by the World Health Organization to isolate and amplify the rabies virus consists in inoculating lactating mice by intracranial route and detecting rabies signs for 21 days.* **Objective:** *To verify viral transmission in mothers of rabies virus-inoculated lactating mice.* **Method:** *Twenty-seven Mexican rabies virus isolates were inoculated by intracranial route in lactating mice, which were observed for 21 days. The mothers were observed for 60 days. The diagnosis was established by immunofluorescence in brain tissue. The virus was characterized by sequencing and with monoclonal antibodies.* **Results:** *All litters showed rabies at between 7 and 15 days post-inoculation (p. i.). Three of the 27 females (11 %) had developed rabies at days 33, 37 and 39 p. i. of their litters. Viral characterization showed that the mothers were infected with the same variant of their offspring, two of them stemming from hematophagous bat and one from dog. The liters that transmitted rabies to their mothers were nine individuals.* **Conclusions:** *In nature, the rabies virus could be preserved by transmission from neonates (more susceptible to contracting and amplifying the rabies virus) to their mothers.*

KEY WORDS: *Rabies virus. Litter-to-mother vertical transmission. Biological tests.*

Correspondencia:
José Álvaro Aguilar-Setién
E-mail: balantiopterix@gmail.com

Fecha de recepción: 20-01-2019
Fecha de aceptación: 21-02-2019
DOI: 10.24875/GMM.19005013

Gac Med Mex. 2019;155:249-253
Disponible en PubMed
www.gacetamedicademexico.com

Introducción

La prueba biológica estándar de la rabia recomendada desde hace mucho tiempo por la Organización Mundial de la Salud es el aislamiento y amplificación del virus inoculando camadas de ratones de alrededor de tres días de nacidos.[1] El uso de animales lactantes fue establecido debido a su mayor susceptibilidad, ya que su sistema inmune no está completamente desarrollado.[1]

Actualmente, por el bienestar animal, los organismos internacionales han recomendado abandonar gradualmente la utilización de ratones y limitarse a la utilización de cultivos celulares. Sin embargo, la prueba biológica es aún práctica común, pues además de aislar e incrementar el título viral permite reproducir los postulados de Koch.

En México, las campañas de vacunación antirrábica canina han sido exitosas y desde 2005 no se han registrado casos de rabia humana transmitida por perros. De 2000 a 2018 se presentaron 52 casos de rabia humana, de los cuales 48 (92 %) fueron transmitidos por animales silvestres (quirópteros y mustélidos principalmente) y solo cuatro (8 %) por perro (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, datos no publicados). Esto hace necesario estudiar más la permanencia y diseminación del virus de la rabia (VR). En la fauna silvestre, las peleas intra e interespecies, el aseo comunitario, compartir la alimentación por regurgitación y la secreción de aerosoles parecen ser vías de diseminación del virus.

El objetivo de esta investigación fue constatar si el contagio cría-madre podría ser un medio de diseminación viral al realizar la prueba biológica de VR con varias muestras de un banco histórico, para lo cual se alargó el periodo de observación de las madres (hasta 60 días).

Método

Se trabajaron 27 muestras de VR procedentes de diferentes lugares de México y de distintas especies (Tabla 1).

Se inocularon camadas de ratonas BALB/C de cuatro a siete días de edad, una camada por muestra (n = 27), siguiendo la metodología descrita por la Organización Mundial de la Salud para la prueba biológica,[1] con algunas modificaciones. Los lactantes fueron inoculados por vía intracraneal con 0.03 mL de una suspensión al 20 % (peso/volumen) del macerado de la muestra de VR en solución amortiguadora de fosfatos. Los lactantes inoculados se dejaron con sus madres y fueron observados durante 21 días. Cada camada inoculada permaneció en condiciones de aislamiento.

Los que presentaban signos de rabia (parálisis, emaciación, pelo hirsuto, etcétera) fueron sacrificados humanitariamente, colectándose el cerebro y glándulas salivales para el diagnóstico y posterior caracterización del virus. Una vez que todos los lactantes se sacrificaron se conservaron las madres de cada camada y se mantuvieron en observación por 60 días, después de los cuales fueron sacrificadas.

El diagnóstico de rabia en los animales se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia directa en improntas del cerebro, utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la nucleoproteína del VR, siguiendo la metodología estándar descrita por la Organización Mundial de la Salud.[2]

A fin de constatar si la variante antigénica de rabia con la que fueron infectadas las hembras que enfermaron era la misma que la inoculada en sus crías, se hicieron pruebas de inmunofluorescencia indirecta utilizando un panel de ocho anticuerpos monoclonales (AcM) estandarizado por el Center for Disease Control and Prevention de Atlanta, Georgia, Estados Unidos, para identificar las variantes del virus de la rabia más importantes que circulan en América Latina y el Caribe, siguiendo la metodología descrita por Díaz *et al.*[3]

Adicionalmente, se realizó la detección del ARN viral a partir de los encéfalos de los ratones lactantes y sus madres, así como de las glándulas salivales de los lactantes. La retrotranscripción se llevó a cabo empleando ARN total y el oligonucleótido correspondiente, usando la enzima Superscript® (Invitrogen). Se utilizaron los iniciadores diseñados específicamente para amplificar el gen de la nucleoproteína: Jw12* Forward 5´ ATGTAACACCYCTACAATG 3´ 55- 73 y Jw6* Reverse 5´ CARTTVGCRCACATYTTRTG 3 660-641. Los productos de amplificación por PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa con el estuche QIAquick Gel Extraction® (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se prepararon para ser secuenciados a 25-100 fmol de producto de la reacción en cadena de la polimerasa y 3.2 pmolas de los oligonucleótidos correspondientes de cada gen.

El producto eluído se secuenció en el secuenciador Beckman Coulter Sequencing Ceq 8800 Genetic Analysis System® (Beckman Coulter).

Las secuencias se ensamblaron por concatenación y se comprobaron tanto la secuencia directa como la reversa por duplicado empleando el programa CEQ incluido en el equipo secuenciador. La edición de las

Tabla 1. Resultados de la observación durante 60 días de las madres de ratones BALB/C lactantes inoculados con diferentes aislados mexicanos del virus de la rabia

Especie	Lugar	Año de recolección	Variante antigénica en los ratones	Número de ratones lactantes en la camada	Mortalidad por rabia en la camada*	Transmisión de rabia a la madre	Canibalismo**	Variante antigénica en la madre	Seroconversión de las madres sobrevivientes (60 días)***
Humano	Ciudad de México	1991	1	5	5				0.25
Bovino	Chiapas	1991	3	4	4				0
Bovino	Chiapas	1994	3	3	2		1		0
Bovino	Estado de México	1994	11	5	5				0
Bovino	Puebla	1994	1	3	3				0
Bovino	Veracruz	1991	11	9	9	Positiva		11	
Bovino	Hidalgo	1995	11	8	8				0
Bovino	Morelos	1994	11	9	9	Positiva		11	
Caprino	Michoacán	1991	3	2	2				0
Caprino	Puebla	1990	ND	5	4				0
Caprino	Tlaxcala	1991	1	6	6				0
Ovino	Estado de México	1994	11	7	7				0
Ovino	Estado de México	1994	11	6	6				0
Equino	Michoacán	1991	3	5	4		1		0
Equino	Ciudad de México	1994	1	4	4				0
Equino	Puebla	1990	3	6	6				0
Porcino	Ciudad de México	1994	1	1	1				0
Porcino	Ciudad de México	1994	1	9	7	Positiva		1	
Perro	Durango	1991	1	5	5				0
Perro	Oaxaca	Sin fecha	1	8	8				0
Perro	Puebla	Sin fecha	1	4	4				0
Gato	Michoacán	1991	1	4	4				0
Gato	Jalisco	1990	ND	6	4		1		0.28
Gato	Tlaxcala	1990	1	6	6				0
Gato montés	Chihuahua	Sin fecha	7	6	6				0
Gato montés	Sonora	1990	7	1	1				1.39
Zorrillo	BCS	1991	10	4	4				0

* Número de ratones lactantes muertos por rabia.
** Número de ratones lactantes muertos por canibalismo.
*** IU: Unidades Internacionales.
Todas las madres fueron seronegativas contra la rabia antes de la inoculación de los ratones lactantes.

secuencias, los alineamientos y la traducción nucleotídica de las secuencias se realizó con el programa BioEdit 5.0.9.[4] Las secuencias se sometieron a un análisis BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/credits.html). Los alineamientos múltiples se efectuaron en el programa Clustal W.[5]

Las hembras lactantes que permanecieron sanas a los 60 días posinoculación (p. i.) de las crías fueron sangradas de la vena marginal de la cola, para detectar seroconversión anti-VR mediante la técnica de reducción rápida de focos fluorescentes recomendada por la Organización Mundial de la Salud.[6]

Resultados

Diagnóstico y caracterización del virus

En todas las camadas inoculadas con las diferentes muestras de VR hubo lactantes con signos de rabia; solo en cuatro de las 27 muestras inoculadas sobrevivieron lactantes (Tabla 1). Todos los lactantes que presentaron signos de rabia fueron positivos en la prueba de inmunofluorescencia directa y por RT-PCR. Adicionalmente, se detectó el VR por RT-PCR en las glándulas salivales de los ratones lactantes que transmitieron la enfermedad a sus madres.

Mediante la utilización del panel reducido de ocho AcM se identificaron las variantes antigénicas de perro (V1), murciélago hematófago (V3 y V11), zorro de Arizona (V7) y zorrillo Baja California Sur (V10) (Tabla 1).

En total tres (11 %) de las 27 hembras lactantes que amamantaban a las crías inoculadas presentaron signos de rabia (parálisis, pelo hirsuto, etcétera.) a los 33, 37 y 39 días p. i. de las crías. Estas hembras fueron positivas por inmunofluorescencia directa y RT-PCR. El periodo de incubación de la rabia en las crías de las hembras que presentaron signos de rabia fue de 10, 14 y 15 días, a diferencia de las 24 hembras lactantes restantes, cuyo periodo de incubación en las crías fue en promedio 6.5 días (rango 5-10 días p. i.).

Las variantes del VR detectadas con el panel de ocho AcM en las hembras que adquirieron la enfermedad fue la misma que presentaron las crías inoculadas y correspondieron: dos a la variante 11 (vampiro) y una a la 1 (perro).

Los tres VR que se transmitieron de los lactantes a sus madres provenían de especies no reservorios (dos bovinos y un cerdo). El análisis de secuenciación de un fragmento del gen de la nucleoproteína reveló que los dos aislamientos del ganado bovino correspondían a virus de origen vampiro y el de porcino era de origen canino. Estos resultados fueron congruentes con la caracterización antigénica de los mismos. El análisis bioinformático corroboró que las hembras lactantes tenían el mismo virus que sus crías (100 % de similitud).

Prueba de anticuerpos neutralizantes contra el VR

Entre las 24 hembras lactantes que permanecieron sanas a los 60 días p. i. de sus crías, tres (12.5 %) mostraron la presencia de anticuerpos contra el VR con títulos de 0.25, 0.28 y 1.31 UI (Tabla 1). Debido a las condiciones físicas de las hembras y los lactantes enfermos no fue posible obtener sangre de estos animales.

Discusión

En este trabajo se demostró en un modelo murino la posibilidad de transmisión vertical de la rabia de los lactantes a sus madres, ya que tres de las 27 hembras que amamantaron a sus camadas infectadas con VR enfermaron y los análisis mostraron que estas tenían el mismo virus que su respectiva camada. Es probable que la inoculación del VR de los lactantes a las hembras se haya producido a través de laceraciones causadas durante la lactancia, pues los ratones neonatos poseen dientes pequeños y afilados. Se detectó el VR por RT-PCR en las glándulas salivales de los ratones lactantes que transmitieron la enfermedad a las hembras.

Un denominador común en los tres casos fue que las camadas eran numerosas (nueve individuos), por lo tanto, asumimos que esta condición aumenta las probabilidades de infección de la hembra debido a mayor contacto, aunado a que los tres casos presentaron periodos de incubación de la enfermedad largos (10 a 15 días). De acuerdo con nuestros resultados, el tamaño de la camada fue aparentemente más importante que el canibalismo, puesto que en algunas hembras lactantes se observó canibalismo y ninguna contrajo la enfermedad (Tabla 1).

Los signos de rabia en las madres infectadas aparecieron después de los 21 días de observación recomendados para la prueba biológica,[1] lo que explica por qué el fenómeno no se había reportado.

Tres de las 24 hembras lactantes que estaban sanas a los 60 días p. i. de las crías presentaron seroconversión contra el VR (Tabla 1), lo que demuestra que las madres estaban siendo sometidas a estímulos con el VR por sus crías infectadas. Varios artículos muestran alta prevalencia de anticuerpos contra el VR con muy baja o nula presencia del virus, particularmente en quirópteros, hienas, zorros y también en el ser humano.[7-9] Esto puede ser debido a una exposición a dosis subletales del VR.

La transmisión vertical de la rabia en el sentido madre-hijo se ha descrito como poco probable, ya que el virus se limita al tejido nervioso y no circula en la sangre. En casos humanos, Aguèmon *et al.*[10] en 2016 describieron bebés sanos que fueron paridos por mamás con rabia que sucumbieron a la enfermedad.

Los neonatos podrían actuar como amplificadores del VR; se ha observado que dosis subletales para los adultos pueden afectar a los lactantes dada su alta susceptibilidad, además de que cepas vacunales atenuadas, inocuas para adultos, pueden enfermar a los lactantes.[11] Así, podríamos establecer un mecanismo hipotético de

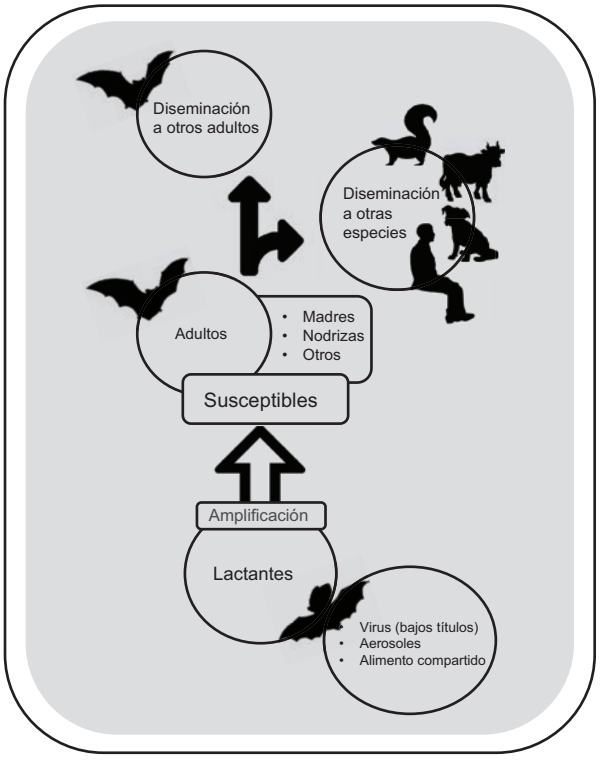

Figura 1. *Hipótesis de la transmisión vertical de crías a madres. En este modelo se propone que el virus de la rabia podría conservarse en la naturaleza por medio de la transmisión de los neonatos (susceptibles de contraer la rabia, por ejemplo, vía aerosoles, y que funcionarían como amplificadores del virus) a las hembras, también susceptibles durante la lactancia.*

preservación del VR en una población reservorio, en el cual los neonatos amplificarían bajas dosis de virus y podrían diseminarlo con mayor éxito entre congéneres susceptibles, en un proceso representado en la Figura 1. Apoyando esta hipótesis está el hecho de que en los quirópteros la prevalencia de anticuerpos contra los *Lyssavirus* coincide con la época reproductiva.[12] Además, Streicker *et al.*,[13] en 2012, llegaron a la conclusión de que la eliminación de murciélagos hematófagos adultos utilizando anticoagulantes aumentaba la diseminación del VR, al seleccionar a una población de animales jóvenes susceptibles que amplifican eficazmente el VR.

Es necesario considerar también que en las especies que tienen la capacidad de hibernar, el periodo de hibernación mantendría al VR latente por bajas en el metabolismo, reactivándose cuando los animales retoman su actividad.[12] Otro factor importante en la transmisión del virus es la presencia de anticuerpos maternos y su duración,[14] que en los quirópteros parece ser corta.[15] Observaciones en murciélagos hematófagos demostraron que las crías de estos animales lactan durante largos periodos (entre siete y nueve meses),[16] esto puede ser importante en la transmisión del virus ya que el contacto íntimo es prolongado.

Se ha descrito que algunos aislamientos de rabia de quirópteros pueden ser virulentos por inoculación epitelial en mayor proporción que por vía intramuscular.[17] En este trabajo, dos de los que causaron la muerte de las hembras procedían de quirópteros. Estas variantes podrían ser capaces de infectar epitelios. Además, los *Lyssavirus* pueden ingresar al sistema nervioso central vía cutánea mediante los nervios sensores.[18]

El fenómeno aquí descrito puede presentarse en la naturaleza y favorecer la perpetuación y establecimiento de enzootias en reservorios silvestres de *Lyssavirus*.

Bibliografía

1. Koprowski H. The mouse inoculation test. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koproaski H, editores. Laboratory techniques in rabies. Suiza: World Health Organization; 1996.
2. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koproaski H, editores. Laboratory techniques in rabies. Suiza: World Health Organization; 1996.
3. Díaz AM, Papo S, Rodríguez A, Smith JS. Antigenic analysis of rabies virus isolated from Latin America and the Caribbean. Zentralbl Veterinaer B. 1994;41:153-160.
4. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999;41:95-98.
5. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994;22:4673-80.
6. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull World Health Organ. 1973;48:535-541.
7. Belcher DW, Wurapa FK, Atuora DOC. Endemic rabies in Ghana. American J Am J Trop Med Hyg. 1976;25:724-729.
8. Malaga H, López-Nieto E, Gambirazio C. Canine rabies seasonality. Int J Epidemiol. 1979;8:243-245.
9. Ogunkoya AB, Beran GW, Umoh JU, Gomwalk NE, Abdulkadir IA. Serological evidence of infection of dogs and man in Nigeria by lyssaviruses (family Rhabdoviridae). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990;84:842-845.
10. Aguèmon CT, Tarantola A, Zoumènou E, Goyet S, Assouto P, Ly S, et al. Rabies transmission risks during peripartum -Two cases and a review of the literature. Vaccine. 2016;34:1752.
11. Arai YT. Virulence of chick embryo fibroblast-passaged flury HEP rabies virus and its revertants in mice. Microbiol Immunol. 1985;29:811-823.
12. George DB, Webb CT, Farnsworth ML, O'Shea TJ, Bowen RA, Smith DL, et al. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:10208-10213.
13. Streicker DG, Recuenco S, Valderrama W, Benavides JG, Vargas I, Pacheco V, et al. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. Proc Biol Sci. 2012;279:3384-3392.
14. Hayman DT, Luis AD, Restif O, Baker KS, Fooks AR, Leach C, et al. Maternal antibody and the maintenance of a lyssavirus in populations of seasonally breeding African bats. PloS One. 2018;13:e0198563.
15. Obregón-Morales C, Aguilar-Setién Á, Perea-Martínez L, Galvez-Romero G, Martínez-Martínez FO, Aréchiga-Ceballos N. Experimental infection of Artibeus intermedius with a vampire bat rabies virus. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2017;52:43-47.
16. Romero-Almaráz L, Aguilar Setién A, Sánchez-Hernández C. Gestación y nacimientos. En: Murciélagos benéficos y vampiros. Características, importancia, rabia, control y conservación. México: AGT; 2006.
17. Davis AD, Morgan SM, Dupuis M, Poulliott CE, Jarvis JA, Franchini R, et al. Overwintering of rabies virus in silver haired bats (Lasionycteris noctivagans). PLoS One. 2016;19;11(5):e0155542.
18. Begeman L, GeurtsvanKessel C, Finke S, Freuling CM, Koopmans M, Müeller T, et al. Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans. Lancet Infect Dis. 2017;18:e147-e159.