Rev. Col. Cienc. Pec. Vol. 5 Nos. 1 y 2 Diciembre 1985

RABIA EN MURCIELAGOS NO HEMATOFAGOS DE ANTIOQUIA COLOMBIA 1982

Oscar Gallo, Biol*; Carlos Jaramillo, M.D.**; Fabio Pineda, Biol*.

RESUMEN

En el período comprendido entre septiembre de 1981 y septiembre de 1982, se capturaron 150 murciélagos pertenecientes a cinco familias, 13 géneros y 13 especies. De estos especímenes se aislaron cinco virus pertenecientes a la familia *Rhabdoviridae* y al género *Lyssavirus;* tres aislamientos correspondieron a *Carollia perspicillata* (frugívoro), uno a *Phyllostomus hastatus* (carnívoro) y uno a *Uroderma bilobatum* (insectívoro).

Los virus aislados fueron comparados con varias capas de referencia utilizando inmunodifusión y contrainmunoelectroforesis. Estos estudios serologicos indicaron que los virus aislados pertenecen al género Lyssa, pero los serótipos parecen ser diferentes al virus rábico clásico.

INTRODUCCION

La Rabia es una enfermedad infecciosa, cuyos agentes etiológicos pertenecen a la familia *Rhabdoviridae* y al género *Lyssavirus,* (aunque a serotipos diferentes) (8, 11, 29).

Todos los animales de sangre caliente son susceptibles de sufrir la enfermedad. La mayor incidencia de rabia transmitida por murciélagos se da en América Latina, en donde abundan los murciélagos hematófagos o vampiros, que son muy importantes vectores y reservorios del virus en esta zona (10).

El papel que desempeñan los muerciélagos en la transmisión de este enferme-

* Departamento de Biología - Facultad de Ciencias Naturales y Exactas - U. de A.
** Servicio Seccional de Salud de Antioquia.

dad comenzó a documentarse a principio del siglo veinte por Carinini en Brasil, (1911) cuando observó la sintomatología característica en el ganado vacuno y llamó la atención sobre el papel de los murciélagos (7). En 1921, Haupt y colaboradores dieron un paso significativo en las investigaciones sobre el tema, al demostrar epidemiológicamente la importancia del muerciélago en la "Rabia paresiante" y observar corpúsculos de Negri en el cerebro de murciélagos. Ellos fueron capaces de reproducir la Rabia en caballos, conejos y cobayos e hicieron el primer aislamiento del virus de un murciélago no hematófago. Estos trabajos fueron confirmados más adelante por Queiroz Lima y Torres y colaboradores en Brasil (16).

En 1932 en la isla de Trinidad, Pawan hizo estudios de gran trascendencia, al presentarse una gran epizootia en el ganado vacuno y 17 casos humanos; la enfermedad cursó en forma paralítica tanto en los animales como en las personas (21). Desde entonces, a la "Rabia paresiante" se le conoce también como "Rabia de Trinidad".

El primer caso registrado de Rabia transmitido por muerciélagos en la América del Norte, se presentó en 1940 y afectó a una jirafa que murió de Rabia en el zoológico de San Diego (E.U.). El episodio se relacionó con una incursión de numerosos murciélagos insectívoros. Sin embargo, en los Estados Unidos nunca se consideró en serio la presencia de murciélagos infectados de Rabia hasta 1953, cuando se aisló el virus rábico del tejido cerebral de un muerciélago insectívoro que en plena luz del día, había mordido a un niño de Tampa (Fla.). Luego del incidente, son numerosos los casos descritos de seres humanos mordidos por murciélagos insectívoros y positivos para Rabia, entre los cuales se incluyen más de 50 especies de los Estados Unidos y varias de países de América Latina (1,4).

En Colombia no se había informado de ningún aislamiento de virus rábico a partir de murciélagos hasta 1963, cuando se encontró positivo un especimen capturado en San Vicente de Chucurí, Santander, que fue identificado como *Carollia perspicillata* y otros en 1966, en Pavarandocito, Mutatá, Antioquia, en un grupo de cerebros que procedían de un lote con las especies *Myotis nigricans* y *Lasiurus ega;* en este sitio se presentaba un brote de "Rabia paresiante" al momento de la captura de los murciélagos (18).

En el departamento de Antioquia, no se ha informado de nuevos aislamientos del virus rábico a partir de murciélagos, después de los trabajos de Morales, Osorno y colaboradores ya mencionados, a pesar de que la Rabia sigue siendo un problema de primer orden en los sitios donde se detectó por primera vez el virus, así como en otras regiones del departamento. Ahora es más preocupante aún la situación, puesto que no solamente ha resultado afectado el ganado bovino, sino que también se ha informado de casos confirmados de rabia humana transmitida por la mordedura de murciélagos (13).

Por las razones anteriores, se consideró de gran importancia, identificar en las áreas de alta circulación del virus, las especies de murciélagos presentes y determinar cuáles estaban infectados con el virus rábico. Además, determinar si los virus aislados de los murciélagos del departamento de Antioquia pertenecen al Sero-

tipo de virus clásico, o si están relacionados con los nuevos aislados de murciélagos de otras partes del mundo (8, 23).

MATERIALES Y METODOS

Areas de Estudio. En el período comprendido entre septiembre de 1981 y septiembre de 1982, se estudiaron cuatro áreas ecológicamente diferentes, entre las cuales se seleccionaron varias localidades procurando hacer las capturas de los ejemplares en los sitios donde se tenían informes previos de casos confirmados de Rabia humana y/o animal en los cinco años anteriores a la investigación.

Las áreas y localidades estudiadas aparecen en el Cuadro 1, con sus características ecológicas más importantes. En el Mapa se ubican geográficamente (6).

CAPTURA DE MURCIELAGOS

En campo abierto. Al caer la noche se procedió a la instalación de redes de nylon B.W.E.* tipo 50d/2Ply , de dimensiones 7 ft x 42 ft, en sitios previamente seleccionados de acuerdo con las características físicas, topológicas y ecológicas del lugar y siguiendo las indicaciones del calendario lunar. Depende de la especie que se pretenda capturar; para murciélagos vampiros (principalmente *Desmodus rotundus*), se coloca la red 5 cms del nivel del piso, y para murciélagos no vampiros a 50 cms del piso o más.

Para las instalaciones de las redes se utilizan vallas plegables de material liviano y resistente; preferiblemente de aluminio, templadas de manera que en cada hilo horizontal queden suficientemente profundas para que los especímenes queden atrapados y con la seguridad adecuada para que no se escapen al caer en el compartimiento. Luego se procede a hacer revisiones seriadas cada 20 minutos aproximadamente, procurando hacer el menor ruido posible y agilizando la recolección en las canastas de transporte. Las manos se protegen con guantes de cuero, asbesto u otro material resistente, para evitar mordeduras accidentales.

En Cuevas. Luego de conocer la ubicación de las cuevas que sirven de refugio a los murciélagos, se procede a la exploración preliminar de los alrededores, tratando de despejar la vegetación que pueda obstaculizar la recolección y al mismo tiempo con el fin de reconocer cualquier peligro eventual. Estas visitas se hacen a la luz del día. Aprovechando la permanencia de los murciélagos en su habitat.

Después del reconocimiento exterior se hace una minuciosa exploración interior, cuidando de llegar a todos los sitios de la cueva y no más de dos personas adecuadamente equipadas, con las manos libres y dispuestas a retroceder ante cualquier hecho inesperado, ya que es muy común que estos refugios sirvan de guarida a varios animales salvajes, incluyendo serpientes. A continuación del sondeo preliminar, se tapan lo posibles sitios por donde pueden fugarse los animales, se instala una red en la entrada y no más de tres personas se introducen en la cueva con redes entomológicas (Jamas), linternas, cascos protectores y guantes de cuero. En el exterior debe quedar el resto del personal encargado de situar los murciéla-

* BLEITZ WILD LIFE FOUNDATION. 5334 Hollywood Boulevard Hollywodd, California 90027.

CUADRO 1. AREAS Y LOCALIDADES DE ESTUDIO

CON SUS CARACTERISTICAS ECOLOGICAS

Area *	Localidad	Altura s.n.m. (m)	Temp. °C	Precipit. anual (mm).	Caract. Ecológica **
1	Chigorodó	34	28	2.778	Bmh–T
	Arboletes	4	29	–	bs–T
2	Caucasia	50	28	4.215	bh–T
	Tarazá	108	28	1.888	bh–T
3	Retiro	2.175	16	2.120	bmh–PM
	Granada	2.050	18	3.848	bmh–MB
	Cocorná	1.300	23	4.883	bp–PM
	Pto. Triunfo	150	27	2.500	bh–T
4	Jardín Botánico	1.538	22	1.535	bmh–PM
	Centro Suramericna	1.538	22	1.535	bmh–PM
	Itaguí	1.550	21	1.755	bmh–PM
	Bello	1.450	22	1.486	bh–PM

* 1 Urabá
2 Bajo Cauca
3 Oriente y Magdalena Medio
4 Valle de Aburrá

** Símbolos Ecológicos:

bhm–T: bosque muy húmedo tropical
bs–T: bosque seco tropical
bh–T: bosque húmedo tropical
bmh–PM: bosque muy húmedo premonyano
bmh–MB: bosque muy húmedo montano bajo
bp–PM: Bosque pluvial premontano

FUENTE: Instituto Colombiano de Hidrología y adecuación de tierras – Himat.

gos adecuadamente en las canastas de transporte.

El hábito alimenticio de las especies de murciélagos predominantes en un refugio, se establece en forma preliminar por el examen macroscópico de los excrementos y el material superficial del piso. Es común encontrar suelos con apariencia sanguinolenta, con olor característico que evidencia la presencia de vampiros. También es frecuente encontrar semillas, res-

tos de frutos o de insectos cuando hay murciélagos frugívoros o insectívoros. Puede llegar a encontrarse en un hábitat tantos vampiros como murciélagos de otros hábitos alimenticios, distribuidos en colonias y formando verdaderos "nichos".

En árboles huecos. Los murciélagos también suelen establecer sus guaridas en árboles huecos, muy altos y viejos, En éstos se procede inicialmente como en el punto anterior, pero se varia la técnica ante la imposibilidad de penetrar al interior de los árboles. Entonces se coloca la red en la abertura principal y también en otras adicionales si las hay, introduciendo un recipiente al interior, que contenga material moderadamente inflamable, de manera que al encenderse se produzca buena cantidad de humo para sofocar a los murciélagos y así obligarlos a evacuar el árbol. (Se utiliza comúnmente A.C.P.M.)

TOMA DE MUESTRAS Y COLORACION DE SELLERS.

Los murciélagos vivos se llevaron al laboratorio en canastas de transporte debidamente marcadas con las tarjetas preliminares. Allí se enumeraron de acuerdo al orden de llegada y se clasificaron según la clave internacional recomendada por O.P.S. (5, 12).

Los resultados de esta clasificación se anotaron en las hojas de registro previamente diseñadas, y luego se procedió al sacrificio, mediante una campana de vacío, con algodón impregnado de éter etílico, dejándolos por tres minutos aproximadamente en el interior.

Una vez muerto el animal, se procedió a inicidir longitudinalmente la piel del dorso a nivel de la zona interescapular. Expuestos los músculos, se localizó y se extrajo la grasa parda o interescapular en condiciones de asepsia. La muestra así obtenida se dividió en dos partes, una de las cuales se utilizó como muestra de trabajo y la otra se conservó en frascos estériles y sellados a $-20^{o}C$ y debidamente rotulados.

Después de extraída la grasa parda, se continuó la línea de incisión sobre la piel en sentido ascendente hasta llegar al cerebro y con pinzas y tijeras de disección, se obtuvo totalmente la masa encefálica, procediendo con la muestra en forma similar a la grasa, es decir diviéndola en dos partes y luego conservando una en congelación a $-20^{o}C$.

Para el examen directo de las muestras por coloración de Sellers, se tomaron placas portaobjetos previamente lavadas, sobre las cuales se hicieron impresiones seriadas con las muestras de trabajo, cuidando de marcarlas con el número del código correspondiente a la procedencia de la muestra. Inmediatamente se aplicó el colorante, a los 2 - 3 segundos se lavaron con abundante agua corriente, dejándolas secar al ambiente. La lectura para búsqueda de corpúsculos de Negri se hizo con objetivo de inmersión (100X), en un microscopio Leitz, modelo HM siempre en duplicado.

Anticuerpos Fluorescentes. La prueba directa de anticuerpos fluorescentes (A.F.), se hizo en placas portaobjetos debidamente diseñadas para hacer la impresión a partir de las muestras de trabajo, tanto de la grasa interesescapular como del cerebro. Las impresiones se hicieron tocando ligeramente con un trozo de te-

jido que se manejaba con pinzas atraumáticas, una zona previamente demarcada; removiendo luego el exceso de muestra con papel de filtro. A continuación, se dejaron secar al ambiente y se fijaron en vasos de Koplin con acetona pura fría por un mínimo de diez minutos. Finalmente se procedió a la tinción, por un procedimiento igual al descrito por Larghi y Cols. y se aplicó el líquido de montaje y las laminillas cubreobjetos, procediéndose a la lectura. En cada prueba se incluyeron siempre dos controles, uno positivo y otro negativo para antígeno rábico procedentes del "stock" del Laboratorio Departamental, Servicio de Virología. (cerebros bovinos y caninos).

La lectura de las preparaciones para A.F. fue hecha en un microscopio Leitz modelo SM, tubo monocular, con lámpara de luz ultravioleta fluorolume, modelo HB–200 Osram, usando estos filtros: anticalórico K G1 – 2mm, excitador UG1 – 1mm, de barrera K430 y antirrojo BG38 – 4mm. Siempre se hizo una primera inspección de la placa usando ocular 10x, objetivo 10x y luego 100x. En todos los casos la lectura fue confirmada, examinando primero los controles positivos y negativos para antígeno rábico. Se interpretaron como positivas todas las pruebas en las cuales apareció una coloración verde manzana, en forma de gránulos definidos de tamaño variable o en forma de polvo fino. Se interpretaron como negativas cuando no se observaba fluorescencia o cuando se observaban manchas verdosas o azules indefinidas, correspondientes a la fluorescencia inespecífica.

Prueba biológica. La prueba biológica (P.B.) a pesar de su sencillez, es muy sensible y específica para el aislamiento del virus rábico (14). Su fundamento radica en la alta susceptibilidad del tejido cerebral de los ratones albinos suizos, tanto lactantes como jóvenes y adultos a la infección por el virus de la Rabia, que les causa incefalitis mortal. Los resultados se confirman con la prueba de A.F. en cerebros de los animales enfermos o muertos.

Los ratones albinos suizos usados en el estudio, procedían del bioterio del Laboratorio Departamental del Servicio Seccional de Salud en Antioquia.

Para preparar los inóculos, se usó la muestra que previamente había sido guardada en congelación a –20ºC. En un cubilete de seguridad se procedió al macerado y homogenización en mortero estéril, agregando como solución de suspensión, P. B. S. pH = 7.2, con suero equino libre de anticuerpos antirrábicos al 2%, en proporción 1:4 por peso. Por seguridad no se centrifugó, sino que se, dejó sedimentar el preparado por gravedad a 4 – 8ºC en tubos de centrífuga debidamente sellados, durante 24 horas. Luego se separó el líquido sobrante con propipeteador y pipeta pasteur y fue envasado en "Viales" estériles. A continuación se agregó al sobrenadante solución de Hank's pH = 7.2, más solución de antibióticos (Garamicina – Penicilina – Nistatina), proporción de 0.8 ml por cada 10 ml de macerado. Se incubó por 60 minutos en estufa a 37ºC, para luego continuar con la filtración por filtro de Swinny* con membrana clarificante de 0.45 milimicras y esterilizantes de 0.22 milimicras. Una vez filtrado el sobrenadante, se envasó en frascos esterilizados y sellados con el ró-

* SWINNY, R. Milipore Corporation, Bedford, Massachusetts 01730, U.S.A.

tulo respectivo, usando luego una parte para la inoculación y el resto se conservó a –20ºC.

Para la inoculación fueron empleadas jeringas de tuberculina estériles, de 1 c.c. y agujas número 26–27 de 0.45 x 13 mm., con las cuales se inoculó por vía intratecal 0.01–0.03 ml de los inóculos ya preparados.

Para desinfectar la zona de inoculación, se utilizó alcohol yodado al 3º/o. Una vez inoculados los ratones se ubicaban en cajas debidamente marcadas con el número de orden, cepa del virus inoculado, fecha y el número de ratones inoculados. El sobrante del material utilizado para la preparación de los inóculos, como para la inoculación fue desechado en solución de hipoclorito de sodio al 1º/o. La vidriería se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, se lavó y se resterilizó. El material metálico, se desechó en una solución de benzalconio y luego se esterilizó.

Los ratones fueron observados diariamente a mañana y tarde, a partir del día de la inoculación. Las evoluciones fueron registradas en hojas previamente diseñadas, por un período hasta de 60 días. En los animales se buscaba alguno (s) de los siguientes signos: pelo erizado, cola en bandera, incoordinación para el movimiento de las patas posteriores, convulsiones, parálisis, postración o muerte.

Cuando un animal se encontró muerto y al menos apareció la cabeza, se consideró para el estudio; si solamente se encontraba el cuerpo, se consideraba devorado y no se tuvo en cuenta.

La muerte de los ratones no se estimó significativa cuando ocurrió en las 24–48 horas siguientes a la inoculación, pues se acepta que la mayoría de las veces se deba a trauma de inoculación. No obstante, cuando esto ocurrió a todos los ratones, se repitió la inoculación diluyendo el inóculo 1/10 en P.B.S. con suero equino al 2º/o.

Los ratones que enfermaron, se sacrificaron con éter y tanto éstos como los que murieron, se conservaron en recipientes estériles. Con los cerebros se realizaron pruebas confirmatorias por A.F. y reinoculación.

Este primer inóculo de ratones se llamó pase (cero).

INMUNODIFUSION Y CONTRAINMOELECTROFORESIS

A los virus aislados de ratones, se les practicaron pruebas inmunológicas de comparación antigénica por inmunodifusión radial (I.D.) según la técnica de Atanasiu et al. (3) y por contrainmunoelectroforesis (CIEF), según técnica de Pessendoorffer et al. (22) usando como controles los virus vacunales de las vacunas C.R.L. canina y humana de uso oficial en Colombia.

RESULTADOS

En el período de capturas mencionado, se obtuvieron 150 muerciélagos pertenecientes a cinco familias, 13 géneros y 13 especies, procedentes de 12 localidades de las cuatro áreas estudiadas. En el Cuadro 2 se detalla el número de especies capturadas, por localidad y área; en el Cuadro 3, se incluye la clasificación a partir de la familia.

CUADRO 2. MURCIELAGOS CAPTURADOS POR LOCALIDAD Y AREA DE ESTUDIO

Area *	Localiad	Especie	Cap_1	Resultado Rab.
1	Chigorodó	Noctilio leporinus	1	–
		Carollia perspecillata	3	–
		Desmodus rotundus	2	–
		Phylostomus hastatus	3	–
		Rhogeessa sp.	1	–
		Uroderma bilobatum	1	–
2	Arboletes Caucasia	Molossus molossus	2	–
		Myotis migricans	2	–
		Noctilio leporinus	3	–
		Carollia perspicillata	13	–
		Sturnira lillium	1	–
		Artibeus lituratus	3	–
		Vampyressa ninphaea	2	–
		Uroderma bilobatum	5	–
		Desmodus rotundus	13	–
	Tarazá	Uroderma bilobatum	1	1 +
		Tadarida braziliensis	3	–
3	El Retiro	Carollia perspicillata	4	–
		Desmodus rotundus	3	–
	Granada	Desmodus rotundus	1	–
	Cocorná	Carollia perspicillata	10	2 +
	Pto. Triunfo	Phyllostomus hastatus	2	2 +
		Mimon creculatum	2	–
4	Jardín Botánico	Carollia perspicillata	39	1 +
	Medellín	Artibeus lituratus	3	–
		Phyllostomus discolar	9	–
		Glosophaga soricina	1	–
		Molossus molussus	2	–
	Centro Suramericana	Artibens lituratus	5	–
	Medellín	Glosophaga soricina	1	–
	Itagüí	Molossus molossus	6	–
	Bello	Desmodus rotunds	2	–
		Carollia perspicillata	1	–

* 1 Urabá
2 Bajo Cauca
3 Oriente y Magdalena Medio
4 Valle de Aburrá

CUADRO 3. CLASIFICACION DE LOS MURCIELAGOS CAPTURADOS

Familia	Género	Especie	Capt. No.	%
Phyllostomatidae	Mimon	creculatum	2	1.3
	Phyllostomus	discolor	9	6.0
	Phyllostomus	hastatus	5	3.3
	Glosophaga	soricina	2	1.3
	Carollia	perspicillata	70	46.6
	Sturnira	lillium	1	0.6
	Uroderma	bilobatum	7	4.6
	Vamoyressa	ninphaea	1	1.3
	Artibeus	lituratus	11	7.3
Noctilionidae	Noctilio	leporinus	4	2.6
Desmontidae	Desmodus	rotundus	21	14.0
Vespertilionidae	Myotis	nigricans	2	1.3
	Rhogeessa	sp.	1	0.6
Mollosidae	Molossus	molossus	10	6.6
	Todarida	braziliensis	3	2.0

De los 150 murciélagos capturados, 6 (4%) fueron positivos para virus rábico. Estos procedían de las localidades de Cocorná, Puerto Triunfo y Tarazá, pertenecientes a las áreas 2 y 3 (Ver Mapa), en donde frecuentemente se han presentado brotes de Rabia con casos confirmados en humanos y animales en los tres últimos años (13). En el Cuadro 4 se ubican las localidades con los casos positivos por las pruebas de A.F., Sellers y P. B. de cerebro, incluyendo las especies y su régimen alimenticio.

Por primera vez en las investigaciones sobre "Rabia paresiante" en Colombia, se asiló el virus de la especie *Uroderma bilobatum*, en la localidad de Tarazá, en un ejemplar capturado en un refugio de la zona rural de ese municipio y que se hallaba conviviendo con otras especies insectívoras y hemotófagas. Esta característica ecológica fue observada también cuando se capturaron dos ejemplares de la especie carnívora *Phyllostomus hastatus* en la región de San Miguel – Puerto Triunfo y que también resultaron ser positivos para virus rábico al examen microscópico por A.R. y por P. B.

En ninguno de los casos positivos se encontró virus por P.B., antígenos por A. F. o corpúsculos de Negri por Sellers en la grasa parda.

MAPA. Situación geográfica de las localidades donde se hicieron las capturas en el dpt. de Antioquia

En la región de San Miguel – Puerto Triunfo, fue hallado muerto un murciélago identificado como *Carollia perspicillata*, el cual fue rescatado de una corriente de aguas negras, que al ser examinado en el laboratorio resultó positivo para virus rábico, por las pruebas de A.F. y P.B.

Las cinco cepas aisladas de los seis murciélagos se denominaron de acuerdo a su lugar de procedencia, el número de orden por localidad y año de aislamiento, con excepción de la última, aislada de la especie insectívora *Uroderma bilobatum*, denominada con el apellido de quien hizo el aislamiento, número de orden y el año de aislamiento (cepa Gallo – 1–82).

El Cuadro 5 muestra las diferentes cepas, su nomenclatura y características conocidas hasta ahora.

La única cepa aislada que presentó corpúsculo de Negri al examen microscópico por Sellers, tanto en el cerebro de los murciélagos como en de los ratones fue la cepa CO–1–81, como se aprecia en el Cuadro 5, estos corpúsculos de Negri eran de forma redondeada, bordes definidos, con matriz acidófila, componente interno basofilo y tamaño más pequeño de los usualmente observados en cepas de origen canino y bovino.

Los períodos de incubación en ratones fueron largos y comprendidos entre 6 y 40 días con una media en días, variables según el número de pases y de acuerdo con la cepa del virus inoculada, como muestra también el Cuadro 5.

Estas cepas se mantienen por pases seriados en ratones albinos del mismo tipo y origen del usado para el aislamiento inicial, preparando inóculos del cerebo del ratón en forma similar a la ya descrita. Igualmente, con muestras de los distintos pases, se realizaron pruebas inmunológi-

cas para comparar las 5 cepas con la cepa C.V.S. (Virus fijo estandar de confrontación, las cepas vacunales usadas para las vacunas C.V.S., 91 de origen humano y 51 de origen canino) así como con las cepas Titi–1–82 y Acandí, de origen bovino. En efecto se prepararon inóculos frescos en la forma ya descrita y como si se fueran a usar para pruebas de microneutralización. Se procedió luego en cubilete de seguridad a inactivar el virus por tratamiento con una solución de formaldehido al 4°/o dejando luego el material en refrigeración (4–6°C) por 4–8 días, al cabo de los cuales se hicieron pruebas de viabilidad en ratones. En un primer experimento se montó una prueba de inmunodifusión radial doble con diferentes esquemas en forma similar al sistema descrito por Atanasiu et al.(3) usando como antisuero una muestra de suero equino I.N.S.* preparado en mulos y que según el fabricante tiene un título por neutralización frente a C.V.S. de 1/2.820, correspondiente a 170 U.I./ml (lote 9, vencimiento febrero 1982). Como antígeno control se usaron Vacunas C.R.L. humana y canina, también I.N.S. (lotes 241, 247), que contienen los virus C.V.S. (60.95°/o) y 51 canina (39.04°/o) y C.V.S., 51 y 91, y la de uso humano (53.65°/o, 37.66°/o, 8.68°/o). A pesar de que se mantuvieron por 72 horas en cámara húmeda las placas con vacunas y las cepas, no se obtuvo ninguna banda en varias pruebas.

CUADRO 4. MURCIELAGOS POSITIVOS PARA RABIA POR LOCALIDAD Y SUS REGIMENES ALIMENTICIOS

Localidad	Especie	Régimen Alimenticio	Resultados Lab. Sell.	A.F	P.B.
Cocorná	Carollia perspicillata	frugívoro	+	+	+
	Carollia perspicillata	frugívoro	–	+	+
Puerto Trinfo	Phyllostomus hastatus	carnívoro	–	+	+
	Phyllostomus hastatus	carnívoro	–	+	+
	Carollia perspicillata	frugívoro	–	+	+
Tarazá	Uroderma bilabatum	insectívoro	–	+	+

* INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Colombia, Sección Productos biológicos. Av. El Dorado, Cra. 50, D.E. Colombia.

CUADRO 5. CEPAS DE VIRUS AISLADOS Y ALGUNAS DE SUS CARACTERISTICAS

Cepa	Especie de origen	C. de Negri en cereb. murciel.		C. de Negri en Po		C. de Negri en otros pases (Px)		P. de In. prom. en Po.	P. de I prom. en Po
		SI	NO	SI	NO	SI	NO		
CO–1–81	*Carollia perspicillata*	X		X		X		36	19
CO-2–82	*Carollia perspicillata*		X		X		X	16	36
PT–1–81	*Carollia perspicillata*		X		X		X	16	24
PT–2–82	*Phyllostomus hastatus(*		X		X		X	6	24
Gallo–1–82	*Uroderma bilabatum*		X		X		X	21	28

Se procedió entonces a repetir el experimento, cambiando el antisuero por otro lote (11), vencimiento septiembre de 1984), título 1/3.091, equivalente a 154.7 unidades internacionales/ml. y se obtuvo un resultado similar. Entonces se montó una prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF) discontinua, según el método de Pessedorffer, Krostnetzky y Wewalaka (22) usando agar-agar lavado por el procedimiento de Drohult (22) y un aparato de C.I.E.F. tipo Beheringwerke con dispositivo de enfriamiento* en un sistema similar al ya descrito.

Se hizo una primera prueba con suero puro y una segunda con dilución 1/40 en P.B.S. pH = 7,2. La prueba se "corrió" durante 30, 60 y 90 minutos, haciendo lecturas cada vez con luz blanca de incidencia oblícua y una lupa de filatelista.

Después de 90 minutos aparecieron dos bandas de precipitado con las vacunas C.R.L. y el antisuero puro, de forma y posición similar a los descritos por Atanasiu et al (3), los cuales fueron sometidos a la prueba del Citrato de Sodio (9) y luego coloreados con amidoschwartz con resultado positivo.

En ninguna de las cinco cepas aisladas de murciélagos se obtuvo banda de precipitado al enfrentarlas al antisuero puro y diluido 1/40 en diversas pruebas, aunque se incubaron las placas en cámara húmeda por 24 horas; se trataron para revelar las bandas (3) y se colorearon con amidoschwartz en forma similar a las pruebas con las vacunas.

Otros estudios de protección cruzada con antisueros heterólogos y con otros lotes de antisuero equino, están actualmente en curso.

DISCUSION

De la totalidad de murciélagos capturados, la especie más frecuentemente en-

* DNSK LABORATORIENDSTYR A/S Copenhagen – Denmark.

contrada *Carollia perspicillata* (46.6%), concuerda con los datos obtenidos del inventario de murciélagos de Colombia y Antioquia (19). Esta especie fue encontrada desde los 50 metros sobre el nivel del mar hasta los 3.000 mts, tanto en áreas urbanas como rurales y compartiendo los más diversos hábitos con murciélagos de otras especies y de diferentes regímenes alimenticios.

Estos murciélagos se pudieron haber infectado por mordeduras durante riñas en sus "nichos" o por aerosoles formados en competencia por su hábitat en sitios de alta población o hacinamiento. Esto se evidencia por las inspecciones hechas durante las visitas a los refugios. Por otra parte, es común en el comportamiento de los quirópteros la limpieza de la piel y membranas entre sus congéneres lo que propicia la infección cruzada. (2,10).

Por primera vez fue encontrada en el departamento de Antioquia la especie insectívora *Mimon creculatum*, en la zona rural de la región de San Miguel–Puerto Triunfo. En esta misma región fue hallado muerto, flotando sobre una corriente de aguas negras otro *Carollia perspicillata* que al ser examinado en el latoratorio por pruebas biológociaa y anticuerpos florescentes resultó positivo para Rabia. Este hallazgo está en favor de la infección letal por el virus, aunque no se descartan otras causas que explicarían su muerte, como serían otros agentes infecciosos no estudiados.

El aislamiento de virus rábico por primera vez en la especie insectívora *Uroderma bilobatum* (cepa Gallo 1–82), es preocupante, puesto que se agrega a la lista de murciélagos no hematófagos ya descrita en la literatura, que juegan un papel importante en la transmisión y epidemiología de la Rabia en Colombia.

Las regiones San Miguel – Puerto Triunfo, Tarazá y Cocorná, de donde procedían los murciélagos positivos para Rabia, son sitios de permanentes brotes de Rabia humana, bovina, canina desde hace muchos años (13), lo cual hace pensar que estos animales juegan papel preponderante como reservorios y transmisores de la Rabia en esos sitios, especialmente por el hecho de que, aunque los murciélagos insectívoros no atacan al hombre ni a los animales, cuando aparecen con los síntomas de la Rabia cambian de comportamiento lo que implica la pérdida de temor a las especies mayores y al hombre, con eventuales ataques a los mismos y transmisión del virus.

En estudios previos realizados en el departamento de Antioquia, como el de Morales y colaboradores en Urabá (18), se encontraron virus rábico por pruebas de Sellers y P.B., pero estos autores no hicieron observaciones suficientemente largas de los ratones inoculados, ni inmunofluorescencia, ni pruebas inmunológicas, para comparar las cepas que aislaron con otras conocidas de virus rábico; por ésto, resulta difícil a los autores establecer si los virus que ellos encontraron eran similares o no, a los que se aislaron en nuestra experiencia, existiendo por supuesto además, las posibilidades de que algunas de las especies que nosotros encontramos positivas para Rabia, no fueran detectadas en aquel trabajo, por diferencias en la metodología empleada.

Las cinco cepas de virus aisladas a partir de los cerebros de los murciélagos ya

mencionados y que se encontraron positivos por inmunofluorescencia, por el hecho de reaccionar con un conjugado que contiene un antisuero específico contra la nucleocápside del género *Lyssa* (8), se pueden considerar como pertenecientes a este género de la familia *Rhabdoviridae*, pero por no haber reaccionado con el antisuero equino preparado por inmunización con antígeno de C.V.S., puede decirse que por lo menos no es un virus del mismo tipo, es decir, que probablemente pertenecen a un serotipo diferente, puesto que el mismo antisuero enfrentado a un virus rábico de origen canino (cepa 51) y aun virus de origen humano (cepa 91), si reacciona. Sin embargo, como se sabe, el serotipo de un miembro de la familia *Rhabdoviridae* y el género *Lissavirus* se establece con precisión cuando se hacen pruebas como neutralización o con anticuerpos monoclonales (8) y en las cuales se maneja el antígeno de la Glicoproteína y no el de la nucleocápside. Por supuesto, no se puede todavía descartar que el antígeno detectado por la prueba que utilizamos (C.E.E.F.) sea el de la glicoproteína, caso en el cual ya estaría probado que estos virus corresponden a serotipos diferentes del género *Lyssa*.

Por otra parte, con los estudios de las cepas aisladas que se han hecho hasta el momento, no es posible establecer si estos virus son semejantes o no a otros aislados de murciélagos en Africa, Australia y Norte América, y que recientemente se ha propuesto, inclusive agrupar o bien dentro de un nuevo subgrupo del género *Lyssa* formando serotipos, o un nuevo género de la familia.

Los estudios de inmunidad cruzada, neutrolización homóloga y heteróloga, así como anticuerpos monoclonales y los estudios comparativos inmunoquímicos que se van a realizar en el futuro, serán definitivos al respecto.

No sobra por todo lo anterior destacar la importancia que tiene, para el manejo de los accidentes rábicos en humanos, para los programas de vacunación humana y animal y para la producción de vacunas de uso en humanos y animales, el haber descubierto en Colombia virus en murciélagos que además de ser diferentes a los serotipos que contienen las dos vacunas de uso oficial en Colombia, son virus rábico que aparentemente no reaccionan con los anticuerpos de el suero antirrábico de uso oficial en Colombia.

BIBLIOGRAFIA

1. Acha, P.N. (1968). Epidemiología de la Rabia bovina paralítica transmitida por Quirópteros. Bol Ofic. Sanit. Panam. 64 (5): 411.
2. Atanasiu, P. (1965). Transmisión de la Rage, par la voie respiratiore aux animaux de laboratoire. C.R. Acad. Sci. París. 260: 277.
3. Atanasiu, P. (1971). Inmuno precipitation des diverses fractions antigéniques du virus rabique fixe et du virus des rues entretenus sur cerveau de souriceau. Rev. d'Inmunol. 35 (1-2): 7-16.
4. Baer, G.M. and D.B. Adams. (1970). Rabies in insectivoruous bats in the United States. 1953-65. Publ. Health. Rep. 85 (7): 637.
5. Cadena, A. Clave Taxonómica para Quirópteros. Museo de Ciencias Naturales. Universidad Nacional.

6. Calendario Metereológico (1982). Instituto Colombiano de Hidrología, Meteorología y Himat, Bogotá.
7. Carini, A. (1911). Sur une grande epizotie de Rage. Ann. Inst. Pasteur. 25: 843-846.
8. Cepanzo/O.P.S. (1981). Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas (Informe Trimestral) 13 (4-6): 1.
9. Crowle, A.J. 1961. Inmunodifusión. Academic Press. New York. U.S.A. p. 365.
10. De Diego, A.J. Valotta. 1979. Rabia Transmitida por muerciélagos. Bo. Ofic. Sanit. Panam. 86 (6): 495-508.
11. Fenner, F. (1976). The Classification and Nomenclature of Viruses. Samary of Results of Meeting of International Commite on Taxonomy of Viruses in Madrid. Virol. 71: 371-378.
12. Handley, Ch. O. (1975). Clave de los ordenes de mamíferos vivientes de Colombia. Adapt. de E. Barriga, A. Cadena y J. Hernández, Ed. U. N. Bogotá.
13. Jaramillo, C.J. de los Ríos, O. Suescún. (1980). Rabia en Antioquia. Bol. Epidemial de Antioquia. S.S.S.A. 5 (2): 25-40.
14. Kaplan M.M., H. Koprowski. (1976). La Rabia. Técnica de Laboratio, 3a. Ed. Ginebra, Ed. Q. M.S., o. 88. Laboratoey Techniques in Rabies).
15. Larghi, O.O. Jiménez Ch. (1971) Methods for aceleratin the fluorescent antibody test for rabies diagnosis. Appl. Microbiol. 21: 611-613.
16. Lima, E.Q.A. (1934). Transmissao de vaivados Herbivoros pelos morcégos hematoíagos de familia **Desmontidae**. Re. Dept. Nac. Prod. Anim. (Río de Janeiro). 1: 165-175.
17. Marinkelle, C.J. and E.S. Grose. (1972). A review of bat as carriers or organism which are capable of infecting man or dometic animals, Mitt. Inst. Col-Al. Invest. Cient. 6:31-51.
18. Morales, A.A., M.E. Osorno, C.C. Bernal y P.A. Lleras. (1968). Aislamiento de Virus rábico de murciélagos en Colombia. S.A. Caldasia, 10: (47): 167-177.
19. Muñoz, A.J. (1982). Frecuencia de C. **Perspicillata** en Antioquia. Inventario de murciélagos de Antioquia. Universidad de Antioquia, Medellín septiembre. (Com. personal, manuscrito en preparación).
20. O.M.S. (1973). Sexto Informe. Comité de expertos de la O.M.S. en Rabia. Inf. Tec. No. 523.
21. Pawan, J.L. (1936). Rabies in the vampire bat of Trinidad With special reference to the clinical course and latency of infection. Ann. Trop. Med. 30: 401-422.
22. Pesedorffer, O. Krostnisky and F. Wewalaka, (1970). Inmuno-electrophoretic Techniques. Vox. sang. 19: 200.
23. Wiktor, O.J. and H. Korpwwski. (1980). Antigenic variants of Rabies virus. Do present vaccines protect all exposed persons. Rabies Inform. exchange. 2: 33 - 24.

® Rintal

Para mayor producción

Para mayor producción de leche y mayor producción de carne, desparasite su ganado con **Rintal.**

Rintal mata los parásitos y cura el intestino.

Rintal es atóxico, por eso se puede administrar sin problemas en hembras preñadas y animales jóvenes.

Rintal tiene la presentación que usted necesita:

- Suspensión • Granulado
- Pasta (para equinos)

Rintal le ofrece biodisponibilidad mejorada y es más económico.

División Veterinaria

Bayer

BAYER