

La inmunofluorescencia en el diagnóstico de la rabia.

FRANCISCO SALIDO-RENGELL*
MA. DE JESUS SOSA

LOS PROBLEMAS DIAGNÓSTICOS en relación con la rabia radican precisamente en aquellos casos en los cuales las técnicas destinadas a la demostración de cuerpos de inclusión son ineficaces. En efecto, la ausencia de cuerpos de Negri en un espécimen no descarta el diagnóstico de rabia; y en estos casos (20%), debe recurrirse a la inoculación intracerebral de ratones con una suspensión del cerebro sospechoso; los roedores, en el mejor de los casos, morirán a consecuencia del virus inoculado en 7 días; en otras ocasiones se recomienda observarlos cuidadosamente por 45 días cuando menos. Por otra parte, la demostración del virus en las glándulas salivales de un animal se hacía difícil dado que, necesariamente, debía recurrirse a la inoculación de ratones por vía intracerebral.

En la actualidad el método de los anticuerpos fluorescentes¹, ha demostrado ser la mejor técnica aplicable, no sólo para la demostración rápida y segura de los cuerpos de Negri, sino también para el 20% de los casos en los que dichas estructuras no aparecen y para demostrar al virus de la rabia en las glándulas salivales de los animales enfermos².

El presente trabajo tiene por objeto verificar la eficacia de las técnicas de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la rabia evaluando los resultados por comparación con otras técnicas ampliamente usadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Virus.* Se seleccionó un cerebro de perro rabioso, que demostró tener cuerpos de Negri en gran cantidad, tanto en el asta de Amon como en el cerebelo y la corteza cerebral. Con la mezcla de estas tres por-

* Jefe de Histopatología: Instituto Nacional de Virología de la S.S.A.

ciones se hizo una suspensión al 20% en solución de fosfatos con 20% de suero normal de conejo. Se centrifugó a 200 g. durante 20 min. y se repartió en tubos de Kahn en alicuotas de 0.5 ml. Con 0.03 ml. de esta suspensión se inocularon 50 ratones por vía intracerebral y con los cerebros de los ratones inoculados que murieron de rabia, se preparó una suspensión similar a la inicial que después se utilizó como control de inhibición de la tinción específica. Con cerebros normales se hizo otra suspensión similar que mezclada con el conjugado habría de teñir los cúmulos de virus, si el cerebro por examinar era positivo.

2. *Conjugado Antirábico.* Con suero hiperinmune antirábico preparado por el Instituto Nacional de Higiene se preparó un conjugado con Isotiocinato de Fluoresceína* de acuerdo con la técnica señalada por Mellors³, precipitando con solución saturada de sulfato de amonio las globulinas y posteriormente redisueltas en solución salina isotónica⁴. A la solución de globulina así preparada se le determinó la cantidad de proteínas contenidas por el método de Biuret para agregar la cantidad adecuada de fluoresceína⁵.

Con resinas de intercambio iónico se purificó el conjugado⁶ y se dializó con solución salina amortiguada con fosfatos⁵.

3. *Cerebros Estudiados.* Se seleccionaron 34 cerebros procedentes de perros y personas sospechosos de haber padecido rabia.

4. *Técnica de Tinción.* De cada cerebro se hicieron impresiones dobles muy delgadas tanto de cerebelo y corteza cerebral, como de asta de Amon. De las mismas porciones de cada cerebro se hicieron mezclas por separado para preparar 34 suspensiones al 20% en solución amortiguadora de fosfatos con 20% de suero normal de conejo, destinadas a inocular por vía intracerebral, grupos de 6 ratones con cada una de ellas.

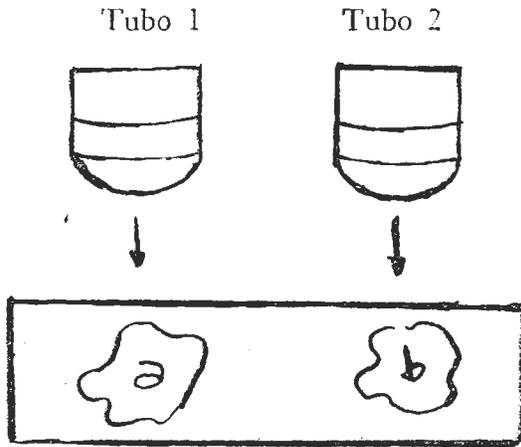
Las impresiones no fijadas se tiñeron con el colorante de Seller, mientras que las que se fijaron en acetona se tiñeron como sigue:

En dos tubos de Kahn se pusieron 0.2 ml. de conjugado; a uno de ellos se le agregó 0.2 ml. de suspensión de cerebro de ratón normal (Tubo 1) y al otro se le agregó 0.2 ml. de suspensión de cerebro de ratón rabioso (Tubo 2). La mezcla del tubo 1, se depositó sobre una de las impresiones de una laminilla, en tanto que la mezcla del tubo 2, se puso sobre la impresión gemela de la misma laminilla (Cuadro 1).

* Nutritional Biological Corp.

CUADRO No. 1

TINCION DE FROTIS GEMELOS CON ANTICUERPOS FLUORESCENTES



Impresiones gemelas de cerebro rabioso

Incubar y lavar
Montar y cubrir.

Suspensión de cerebro normal.
Suspensión de cerebro rabioso.
Globulinas antirábicas conjugadas a la fluorescencia.

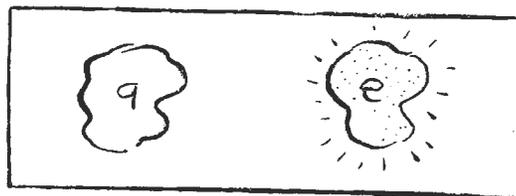
TINCION ESPECIFICA

a) El anticuerpo antirábico, queda libre, pues no hay antígeno correspondiente en la suspensión de cerebro normal. El anticuerpo antirábico conjugado con la fluoresceína se une con el antígeno correspondientes a la impresión de cerebro que se estudia. Al ser observada la impresión al microscopio de L.U.V., se observa la fluorescencia específica debida a la reacción antígeno anticuerpo que se verifica en la impresión sobre laminilla.

INHIBICION

b) La reacción antígeno anticuerpo se lleva al cabo en el Tubo 2. Se unen el virus rábico de la suspensión de cerebro rabioso y el anticuerpo ya unido al antígeno respectivo de la suspensión, no puede unirse ahora al antígeno presente en la impresión de la laminilla y no se ve al microscopio la fluorescencia específica.

Esta prueba testigo es indispensable para descartar falsas positivas (no se han reportado).



Hay fluorescencia

No hay fluorescencia.

Después de incubar las laminillas así tratadas a 37° C, durante media hora dentro de una cámara húmeda se secaron al aire y se cubrieron con glicerina amortiguada⁵, y cubreobjetos.

Equipo de fluorescencia. Se utilizó un equipo Zeiss con microscopio monocular provisto de condensador cardioide de campo obscuro 1.2/1.4 y lámpara a presión de mercurio equipada con filtros excitadores BG 12 de 4 mm. (Schott) y filtro inhibidor GG-4 (Schott).

RESULTADOS

De los 34 cerebros estudiados, en 14 se encontraron cuerpos de Negri después de teñir los frotis con el colorante de Seller. La inoculación intracerebral de grupos de 6 ratones demostró que de los 34 cerebros, 18 eran positivos a la rabia y uno más se clasificó como dudoso puesto que murieron 2 de los 6 ratones al 14o. día y otro murió a los 27 días de la inoculación.

Con la técnica de anticuerpos fluorescentes 20 de los cerebros estudiados resultaron positivos. En la figura 1, puede observarse la presencia de dos masas esféricas de contorno brillante y centro ligeramente opaco (a), que en el microscopio de luz ultravioleta se apreciaban de color verde pistache, destacando sobre un fondo verde limón mucho menos brillante.

Por su tamaño, su forma y sus propiedades antigénicas (se tiñeron con el anticuerpo específico marcado con la fluoresceína) dichas masas corresponden a cuerpos de Negri. Alrededor de ellas y dispersos por la impresión de cerebro se encontraron numerosos puntos brillantes de color verde pistache que destacaban claramente del fondo verde limón (b), y que se designaron como polvo antigénico. También en la figura 2, se observan cuerpos de Negri.

Las figuras 3 y 4 corresponden a dos de los cerebros que resultaron negativos al teñirse con la técnica de Seller y la imagen observada se designó como "en cielo estrellado" que demostró ser específica por el color verde pistache característico destacando sobre el fondo mate.

En el cuadro No. 2, se comparan los resultados obtenidos por las 3 técnicas. Se puede ver claramente que los resultados obtenidos por la técnica de Seller son inferiores a las otras dos y que la que demostró mayor sensibilidad fue la técnica de inmunofluorescencia.

CUADRO 2.

RESULTADOS OBTENIDOS POR TRES METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA RABIA

No. de casos estudiados	NUMERO DE POSITIVOS					
	Seller		Inoculación		Anticuerpos Fluorescentes	
34	Positivos	14	Positivos	18	Positivos	200
	Negativos	20	Negativos	16 (*)	Negativos	14
	Dudosos	0	Dudosos	1 (*)	Dudosos	0
	% Positivos comparando con		% Positivos comparando con 1		% Positivos	100%
	A. F.	70%	A. F.	90-95%		

(*) El 2o. pase de 1 dudoso y 1 negativo resultaron positivos dando el 100% de positivos comparando con A. F., debido a factor de resistencia individual en los ratones.

Tiempo requerido para el diagnóstico.	½ hora	de 12 a 27 días	5 a 6 horas
Seguridad	70%	90-95%	100%

Aunque quedaron un caso dudoso y otro negativo por la inocuación de ratones, a diferencia de la técnica de fluorescencia, el paso de los cerebros cosechados de los roedores inoculados a nuevos ratones, dió como resultado la comprobación de la positividad de estos dos casos; sin embargo, no se incluyen en la casuística por tomarse únicamente los que resultaron positivos de primera intención. La microscopia de fluorescencia los siguió dando como positivos en los pases subsecuentes. Esta discrepancia entre la inoculación y la inmunofluorescencia se debe a cierto factor de resistencia individual de algunos ratones.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Al hacer posible la visualización de los anticuerpos sin destruir sus propiedades inmunológicas, incorporando en el grupo epsilon amino de la fracción globulínica un compuesto fluorescente, como isotiocianato de fluoresceína, se ha logrado obtener una técnica de incalculable valor en histopatología virológica. En efecto, lo que antes se lograba en pocas ocasiones con técnicas tediosas y sólo por patólogos experimentados (la localización de cuerpos de inclusión constituidos por partículas infectantes), ahora puede hacerse con toda facilidad por medio de una reacción antígeno anticuerpo que puede ponerse de manifiesto con un microscopio iluminado con luz ultravioleta.

La localización de cuerpos de Negri por medio de otras técnicas sólo puede lograrse en el 75 a 85% de los casos. Este porcentaje en el cual no aparecen los cuerpos de Negri es muy alto, tratándose de un padecimiento que alcanza un 100% de mortalidad y que del diagnóstico depende la institución del tratamiento con vacuna antirábica.

De no encontrarse cuerpos de Negri se hace necesario recurrir a la inoculación intracerebral de ratones. Este procedimiento resulta efectivo en un 97 a 99% de los casos (Cuadro No. 3). El inconveniente es la espera de los resultados que pueden tardar 3 semanas.

La rapidez de la técnica de Seller con la efectividad de la inoculación de ratones se logra con el método de anticuerpos fluorescentes que es efectivo en el 100% de los casos. En efecto, la reacción antígeno anticuerpo, cuando el antígeno es un virus, es altamente específica y por lo tanto la posibilidad de error es prácticamente nula.

De lo dicho se desprende que: en la actualidad el diagnóstico de la rabia debe hacerse por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes

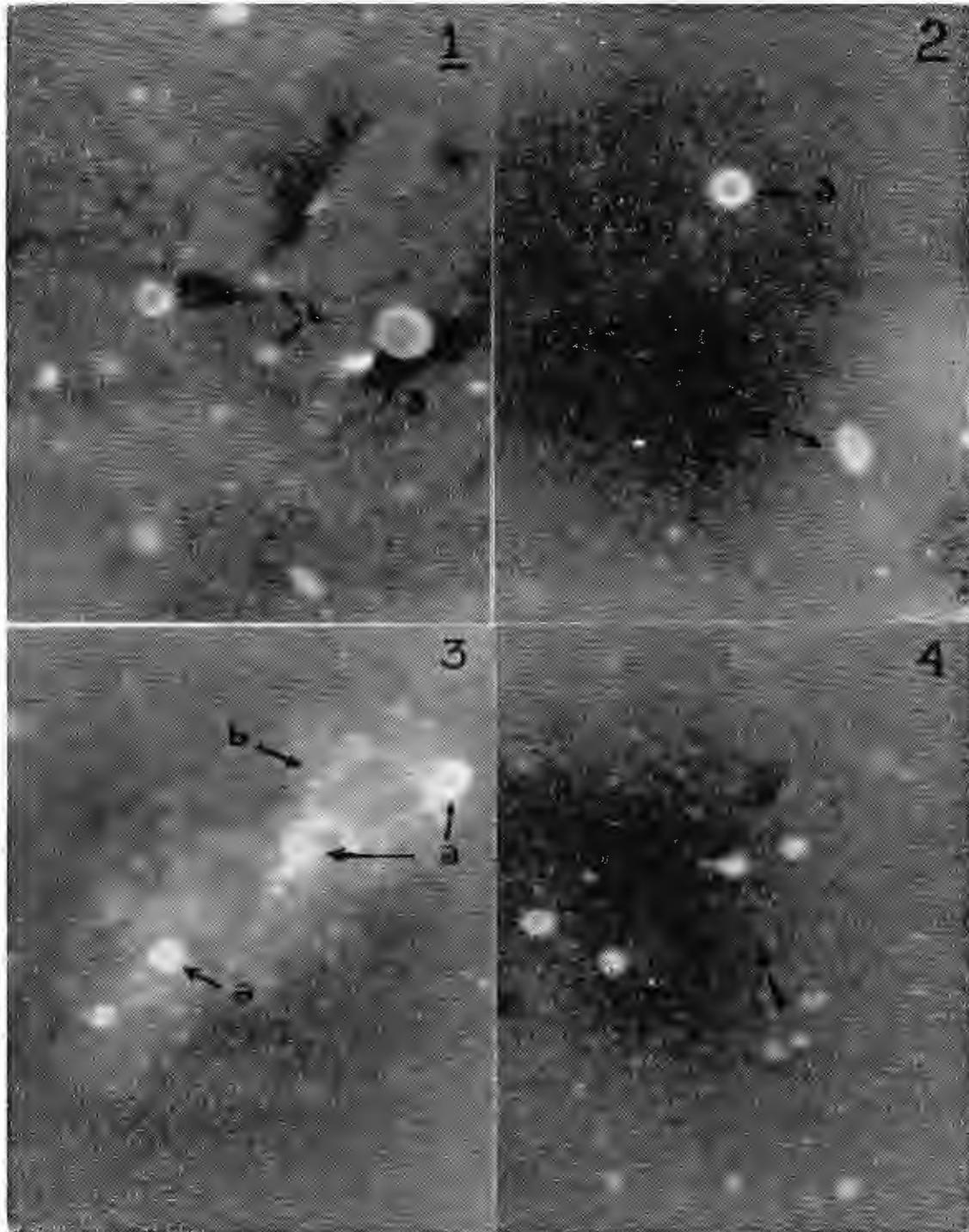


Fig. 1

que no sólo asegura el diagnóstico sino que elimina los resultados positivos falsos por su especificidad. La rapidez con que puede desarrollarse la técnica y la facilidad con que se hace la lectura son razones suficientes para que esta técnica sea llamada a sustituir a las anteriores.

En lo que se refiere a la rabia, numerosos estudios se han realizado para valorar las técnicas de anticuerpos fluorescentes como método de diagnóstico microscópico. En el presente trabajo se ha logrado hacer una evaluación que permite decidir en favor de la microscopía de fluorescencia.

La urgencia de instituir un tratamiento de vacunación antirábica ante un caso de mordedura por un animal sospechoso, no debe dejar lugar a indecisiones que pueden ser fatales. La técnica de anticuerpos fluorescentes da el diagnóstico seguro en unas cuantas horas.

RESUMEN

Se estudiaron 34 cerebros sospechosos de rabia con las técnicas de inmunofluorescencia y se demostró la efectividad de éstas. Se discuten

CUADRO 3.

EFFECTIVIDAD, EXPRESADA EN POR CIENTO DE LAS TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE LA RABIA (*)

TECNICA	POR CIENTO DE EFECTIVIDAD
Seller	75 a 85%
Inoculación al ratón	95 a 97%
Anticuerpos fluorescentes	100%

(*) Comunicado por Lenete (XVIII) Reunión de la Asociación Fronteriza México-Norteamericana de Salud Pública.

los resultados y se recomienda el uso de los anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico de la rabia, en vista de la rapidez, efectividad y especificidad de la técnica que en realidad es una prueba de neutralización microscópica cuyo indicador es la fluoresceína.

REFERENCIAS

1. Goldwasser, R. A. & Kissling, R. E. (1958).: *Fluorescent Antibody Staining of Street and fixed rabies virus antigens*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.; 98: 219-223.
2. Goldwasser, R. A.; Kissling, R. E.; Carski, T. R. & Hosty, T. S. 1959).: *Fluorescent antibody staining of rabies virus in the salivary glands of rabid animals*. Bull. W.H.W., 20: 579-588.
3. Mellors, R. C. (Edit.) (1959): *Fluorescent Antibody Method*. Analytical Cytology. pp. 1-67, New York.
4. Kirsch, D. (1962). Comunicación Personal.
5. Cherry, B. W.; Morris, G.; Carski, T. R. & Moody, M. D. (1960): *Fluorescent Antibody Techniques in the Diagnosis of Communicable Disease*; Publicación del D.C.C. Atlanta, Ga.
6. Riggs, J. L. 1960): *A simple fractionation method for preparation of fluorescein-labelled gamma globulin*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 105: 655.