

REDUCCION DEL TIEMPO DEL METODO CLASICO PARA EL DIAGNOSTICO DE RABIA POR INMUNOFLOURESCENCIA

M.V.Z. MARIO A. MARTELL^{1 a}

M.V.Z. DIÓDORO BATALLA^{1 b}

D.V.M. M. PH. GEORGE M. BAER^{1 c}

Resumen

Se realizaron 948 diagnósticos de rabia haciendo un estudio comparativo entre el método clásico de anticuerpos fluorescentes (con duración aproximada de 2 horas) y un método rápido (7-9 minutos de duración).

Sólo hubo 6 casos donde se obtuvieron resultados diferentes (0.63%) contra 942 donde hubo correlación (99.3%).

La técnica de los anticuerpos fluorescentes desarrollada por Coons *et al.* (1941), marca el inicio de la inmunofluorescencia como una nueva rama diagnóstica en las ciencias biológicas.

Esta técnica ha sido aplicada con éxito en bacteriología por Biegeleisen (1964); Bergman *et al.* (1966); Chadwick *et al.* (1960); Barile *et al.* (1962); Cole (1964) y Cherry y Moody (1965); en micología por Al Doory y Gordon (1963); en parasitología por Goldman (1953); así como en virología por Coons (1964).

En el diagnóstico de la rabia se le utiliza desde hace tiempo (Goldwasser y Kissling, 1958), siendo valorada y aceptada su eficacia tanto en animales naturalmente infectados (Carski *et al.* 1962; McQueen *et al.*, 1960 y Goldwasser y Kissling, 1958) como para la detención del crecimiento del virus rábico en cultivo de tejido (Allen *et al.* 1964; Fernández *et al.*, 1964 y Wiktor *et al.*, 1964).

La duración del método de preparación de laminillas para el diagnóstico de rabia por la

técnica de los anticuerpos fluorescentes (A. F.) es de 1 hora y media a 2 horas. Tomando en consideración que la rapidez de obtención del diagnóstico es de particular interés en la rabia, se decidió acortar el tiempo de las fases del método clásico para obtener un diagnóstico lo más rápido posible utilizando la técnica de los A.F. aceptada como la mejor técnica actual de diagnóstico de la rabia (Atanasiu, 1967).

Material y métodos

Se examinaron por la técnica de los A.F. 948 encéfalos pertenecientes a animales sospechosos de rabia debido a inoculaciones experimentales y casos clínicos; incluyendo en céfalos de bovinos, perros, gatos, ratones, ratas, cuyes, conejos, caballos, cabras, cerdos, coyotes, hamsters y murciélagos.

En cada caso se prepararon 4 laminillas con impresiones del material nervioso sospechoso, dos de ellas se trabajaron de acuerdo al método clásico y las otras dos por el método rápido (cuadro 1).

Las observaciones fueron hechas por dos personas; el microscopio utilizado fue una marca Zeiss con lámpara de rayos ultravioleta HBO 200 W OSRAM y se usó el BG 12 como filtro de excitación.

En todos los casos se observaron primero las laminillas preparadas por el método rápido y posteriormente se corroboraron con las preparadas por el método clásico.

Resultados y discusión

Del total de 948 casos sólo en 6 hubo discrepancias (cuadro 2); cuando se observaron las laminillas preparadas por el método

Recibido para su publicación el 10 de enero de 1970.

¹ Laboratorios de Microbiología Experimental Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G. Km. 15½ Carr. México-Toluca, Palo Alto, México 10, D. F.

^a Actualmente: Jefe del Laboratorio Central Nacional de Diagnóstico Km. 15½ Carr. México-Toluca, Palo Alto, México 10, D. F.

^b Actualmente Proyecto de Investigación sobre la Rabia Parálitica Bovina, Km. 15½ Carr. México-Toluca, Palo Alto, México 10, D. F.

^c Actualmente: Department of Health Education and Welfare Public Hlth. Service Nat Com. Disease Center, Atlanta, Ga. 30333 U.S.A.

CUADRO 1

Reducción del tiempo del método clásico y método rápido para el diagnóstico de rabia por la técnica de los A. F.

| Fases | Método clásico | Método rápido |
|--|--|----------------|
| Fijación en acetona a 20°C | 10 minutos a 1½ hora (Temp. ambiente) | 5 minutos |
| Incubación a 37°C | 30 minutos | |
| Incubación a 40°C | | 2 a 5 minutos |
| Lavado con solución salina buferada pH | 10 minutos | |
| Lavado con agua buferada pH 7.6 | 10 minutos | |
| Lavado con agua destilada corriente | | 1 minuto |
| Montaje con glicerina fosfatada pH 7.8 | 1 minuto | |
| Totales | de 51 min. a 141 min. | de 8 a 11 min. |

rápido se dieron por negativos y al hacer la corroboración por el método clásico fueron positivos; este número de casos corresponde al 0.63% de error contra un 99.3% de acierto.

El diagnóstico de la rabia en animales que mordieron a personas tiene una gran utilidad. La técnica de Sellers es sumamente buena y rápida; sin embargo, se sabe que exis-

ten cepas que no forman corpúsculos de Negri detectables por este método (Crandell, R. A., 1965). La técnica de los anticuerpos fluorescentes sí detectan a las partículas antigénicas que pueden escapar al Sellers, pero el diagnóstico se obtiene casi en 2 horas. Tomando en consideración esto: la utilización del método rápido es de mucha utilidad no usándolo como único recurso. Se recomienda

CUADRO 2

Número de casos examinados para el diagnóstico de rabia utilizando el método clásico de inmunofluorescencia y acertando el tiempo de las fases de dicho método

| Especie | Caso (+) | Caso (-) | Totales |
|-------------------------------------|----------|----------|---------|
| Perro (Canis familiaris) | 182 * | 134 | 316 |
| Ratón (Mus mus culus) | 46 | 255 | 301 |
| Bovino (Bos taurus) | 156 | 36 | 192 |
| Vampiro (Desmodus rotundus murinus) | 14 | 47 | 61 |
| Gato (Felis catus) | 10 | 30 | 40 |
| Caballo (Equus caballus) | 4 | 5 | 9 |
| Cerdo (Sus scrofa) | 5 | 3 | 8 |
| Ovino (Ovis aries) | 1 | 1 | 2 |
| Conejo (Sylvilagus floridanus) | 0 | 2 | 2 |
| Burro (equus acinus) | 2 | 1 | 3 |
| Rata (Rattus norvegicus albinus) | 0 | 6 | 6 |
| Coyote (Canis latrens) | 0 | 1 | 1 |
| Hamster (Mesocricetus auratus) | 0 | 6 | 6 |
| Cuye (Cavia purcelus) | 0 | 1 | 1 |
| | 420 | 528 | 948 |

* Seis de estos casos al observarse por el método rápido se dieron como negativos y al corroborarlos por el método clásico fueron positivos.

hacer dos preparaciones, una por el método rápido y otra por corroborar con el método clásico; la utilidad práctica es que, si es utilizado el método rápido y el caso es observado positivo, ya se puede emitir el diagnóstico en forma efectiva y se obtendrá antes de una hora. En caso de que sea negativo, se corroborará con la preparación hecha por el método clásico.

Conclusiones

a) Las laminillas se fijan bien al sumergirlas en acetona durante 5 minutos tanto a temperatura ambiente como a 20°C.

b) La tinción del antígeno rábico por los anticuerpos fluorescentes puede efectuarse en 2-4 minutos si las laminillas son incubadas a 40°C.

c) La omisión del lavado con solución sa-

lina buferada y el montaje con glicerina no interfiere en lo absoluto con la observación de fluorescencia.

d) La utilización del método rápido aquí propuesto permite obtener el resultado del diagnóstico en forma rápida y efectiva. Las laminillas que resultan negativas a este método, deben ser corroboradas con laminillas preparadas por el método clásico.

Summary

We made a comparative study of 948 rabies diagnoses with two different methods: the classic method of fluorescent antibodies (which takes approximately 2 hours) and a quick method (which takes 7-9 minutes).

Results were different in only 6 cases (0.63%) vs. 942 where correlation was found (99.3%).

Literatura citada

- AL DOORY Y GORDON, M. A., 1963. *Application of fluorescent antibody procedures to the study of pathogenic dematiaceous fungi. I. Differentiation of Cladosporium carrioni and Cladosporium bantianum.* J. of Bact. (86), 332-338.
- ALLEN, R. SIMS, R. A. Y SULKIN, S. E., 1964. *Studies with cultured brown adipose tissue. I. Persistence of rabies virus in bat brown fat.* Am. J. of Hyg. (80), 11-24.
- ATANASIN, A., 1967. *Diagnóstico de la rabia e identificación morfológica del virus rábico.* Primer Seminario Int. sobre Rabia en las Américas. Lepanzo. Buenos Aires, Argentina, p. 195-213.
- BARILE, M. F., MALIZIA, W. F. Y RIGGS, D. B., 1962. *Incidence and detections of pleuropneumonia-like organisms in cell cultures by fluorescent antibody and cultural procedures.* J. of Bact. (84), 130-136.
- BERGMAN, S., FORSGREN, A. Y SWAHN, B., 1966. *Effect of normally occurring rabbit antibodies on fluorescent antibody reactions.* J. of Bact. (91), 1664-1665.
- BIEGELEISEN, J. Z., 1964. *Inmunofluorescent technique in retrospective diagnosis of human listeriosis.* J. of Bact. (87), 1257-1258.
- CARSKI, T. R., WILSNACK, R. E. Y SIKES, R. K., 1962. *Pathogenesis of rabies in Wildlife. II. Fluorescent antibody studies.* Am. J. Vet. Res. (23), 448.
- COLE, R. M., 1964. *Cell wall replication in salmonella typhosa.* Science (143), 820-822.
- COONS, A. H., 1964. *Labeling techniques in the diagnosis of viral diseases.* Bact. Rev. (28), 397-399.
- COONS, A. H., CREECH, H. J. Y JONES, R. N., 1941. *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (47), 200-202.
- CRANDELL, R. A., 1965. *Laboratory investigation of arctic strains of rabies virus.* Act. Path. Escandinav. (63), 587-596.
- CHADWICK, P. Y SLADE, J. H. R., 1960. *Identification of bacteria by specific antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate.* J. Hyg. (58), 147-156.
- CHERRY, W. B. Y MOODY, M. D., 1965. *Fluorescent antibody techniques in diagnostic bacteriology.* Bacteriol. Rev. (29), 222-250.
- FERNÁNDEZ, M. V., WIKTOR, T. V. Y KOPROWSKI, H., 1964. *Endosymbiotic relation ships between animal viruses and host cells. A study of rabies virus in tissue culture.* J. of Exp. Med. (120), 1099-1116.
- GOLDMAN, M., 1953. *Cytochemical differentiation of Endamoeba histolytica and Endamoeba coli by means of fluorescent antibody.* Am. J. of Hyg. (58), 319-328.
- GOLDWASSER, R. A. Y KISSLING, R. E., 1958. *Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigen.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (98), 219.
- MCQUEEN, J. L., LEWIS, A. L. Y SCHNEIDER, N. J., 1960. *Rabies diagnosis by fluorescent antibody. II. Its evaluation in a public laboratory.* Am. J. Pub. Health (50).
- WIKTOR, T. J., FERNÁNDEZ, A. V. Y KOPROWSKI, H., 1964. *Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain W138.* J. of Immunol. (93), 353.