



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**EVALUACION DEL BENZOATO DE SODIO, PROPIL PARABEN Y
METIL PARABEN COMO CONSERVADORES DE ENCEFALOS
PARA EL DIAGNOSTICO DE RABIA UTILIZANDO EL
METODO DE LOS ANTICUERPOS FLUORESCENTES
EN RATONES.**

T E S I S

Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a
MARIA GRACIELA AGUILA NORIEGA

Asesorado por: **M. V. Z. AURORA VELAZQUEZ E.**
M. V. Z. MARIO MARTELL D.

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVO.....	8
MATERIAL Y METODO....	9
RESULTADOS.....	12
DISCUSION.....	25
CONCLUSIONES.....	29
RECOMENDACIONES.....	31
LITERATURA CITADA....	32

"EVALUACION DEL BENZOATO DE SODIO, PROPIL PARABEN Y METIL PARABEN COMO CONSERVADORES DE ENCEFALOS PARA EL DIAGNOSTICO DE RABIA UTILIZANDO EL METODO DE LOS ANTICUERPOS FLUORESCENTES EN RATONES".

AGUILA NORIEGA MARIA GRACIELA.

Asesores: M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ E.

M.V.Z. MARIO MARTELL D.

Con el fin de conocer el grado de efectividad de algunos compuestos químicos utilizados como preservativos para mantener los encéfalos de animales rabiosos se empleo la cepa de virus rábico CVS, titulada en razón de 21 días por vía intracerebral (I.C.) con 0.03 ml la cual tuvo un título de $10^{-6.6}$ dosis letal (D.L.) 50% con dicha cepa se procedió a inocular 500 ratones adultos con 0.1 ml de una dilución $10^{-2.6}$ por vía intramuscular (I.M.), sacrificandolos al presentar los primeros signos de rabia, posteriormente obtuvimos los encéfalos y se hicieron 5 grupos con 100 encéfalos cada uno, manteniéndolos en diferentes preservativos.

PRESERVACION.

- A.- Temperatura Ambiente.
- B.- Glicerina 50%.
- C.- Benzoato de Sodio.
- D.- Metil Paraben.
- E.- Propil Paraben.

Cada 24 hrs. se tomaron 5 encéfalos de cada lote sometiéndolos a la técnica de Inmunofluorescencia (I.F.) además también se tomaron

cada 24 hrs. 4 encéfalos de cada grupo y se hizo una suspensión - al 20% la cual fue inoculada por vía (I.C.) con una dosis de 0.03 ml en ratones de 21 días para detectar la viabilidad del virus rábico.

El valor diagnóstico de la reacción del antígeno rábico con el - conjugado fluorescente empezó a disminuir de la siguiente manera en cada grupo:

En las muestras mantenidas a temperatura ambiente disminuyó a partir del 6º día, con glicerina al 8º día, con propil paraben al 7º día, con el metil paraben al 10º día y con el benzoato de sodio al 11º día.

La viabilidad del virus se mantuvo a temperatura ambiente hasta - el 2º día, con el propil paraben al 7º día, con el Benzoato de Sodio al 14º día, con el Metil Paraben y la glicerina hasta el 15º día.

noviembre 1982

INTRODUCCION

La rabia es una enfermedad infecciosa, de etiología viral que -- afecta a los mamíferos, en la mayoría de los casos es mortal pero ocasionalmente se han reportado casos de recuperación total - de los individuos afectados (1,11).

En México la rabia es un problema grave de salud pública, reportándose anualmente de 70 a 100 casos en humanos y de 6 a 7 mil - casos en pequeñas especies. De estos casos la mayoría corresponde a perros, en algunos casos en gatos y ocasionalmente en algunos animales silvestres. En bovinos aproximadamente un millón de animales son afectados anualmente, (11). En México no obstante - contar con la mayoría de los recursos necesarios para su control la rabia continúa siendo uno de los problemas importantes de salud pública.

El diagnóstico constituye un importante aspecto esencial en el - control de esta enfermedad. En México hay aproximadamente 60 laboratorios (S.A.R.H.) que proporcionan el servicio de diagnóstico por Imunofluorescencia, técnica que a la fecha está considerada como la más sensible y eficaz para el diagnóstico de rabia. - Sin embargo la prueba biológica continúa siendo un apoyo para - la comprobación de la eficiencia diagnóstica del técnico de laboratorio.

En la práctica a menudo se encuentran problemas por la forma en la cual son recibidas en el laboratorio las muestras para diagnóstico. Los encéfalos en ocasiones llegan en total o parcial descom

posición, no obstante venir en conservadores, como refrigeración o glicerina al 50% que son los recursos más utilizados.

La refrigeración posee el inconveniente de que no en todos los lugares es fácil obtener el material necesario para enviar las muestras en estas condiciones, o a pesar de contar con las cajas de unisel y el hielo para enviarlas, el retraso en el transporte puede causar problemas que impiden que las muestras lleguen con rapidez a los laboratorios de diagnóstico. (11).

La glicerina al 50% es el producto más conocido y más sencillo para conservar el virus rábico, pero tiene como inconveniente la infiltración en el tejido que dificulta la preparación de impresiones satisfactorias en los portaobjetos, e impiden la fácil lectura de los casos al aumentar la fluorescencia inespecífica (6,11). Esto constituye un gran problema para el técnico que trabaja en el diagnóstico de rabia, se ve en la necesidad de reportar casos sin un diagnóstico, o en caso de no ser responsable dar diagnósticos negativos de poca confiabilidad. En trabajos realizados con anterioridad se ha demostrado que los encéfalos con o sin preservativo van gradualmente perdiendo su utilidad como muestra para la técnica de A.F. Vester y Lewis, 1974, en encéfalos de ratones infectados con virus rábico y dejados a temperatura ambiente observaron que a partir del 5º día eran negativos a rabia por la técnica de Anticuerpos Fluorescentes (A.F.) (12), posteriormente Villa y Cols. en 1975 utilizando encéfalos de casos de rabia en caninos que enfermaron naturalmente, observaron-

que al preservar las muestras en glicerina y refrigerarlas a 2 y 7°C, a partir del 3er día se reducía la utilidad de la muestra para el diagnóstico por I.F. mientras que cuando utilizaron el tejido fresco mantenido a temperatura ambiente (18 a 22°C) a partir del 4º día la muestra resultaba inadecuada para la técnica de los A.F. (13). Estos antecedentes demuestran claramente que la preservación de los encéfalos es un factor de gran importancia en el diagnóstico de rabia, pues debido a la mala preservación de las muestras se corre el riesgo de obtener un diagnóstico equivocado.

Por este motivo se consideró importante la evaluación de algunos compuestos químicos utilizados como preservativos de alimentos o medicamentos que pudieran servir como conservadores del tejido nervioso y que permitieran mantener este tejido útil por un mayor tiempo para poder hacer las pruebas de diagnóstico por la técnica de A.F. y por la inoculación en ratones.

Los compuestos utilizados fueron el Benzoato de sodio, el propil paraben y el Metil paraben cuyas propiedades fisicoquímicas son las siguientes:

a) Benzoato de sodio-sodibenzoa, *Benzocium Nutrium*. $C_6H_5CO_2$

Su peso molecular es de 144.1, su composición es de C 3,50% - Na 16 96%, O 22, 21% (9).

Es un polvo blanco, amorfo, granular y generalmente inodoro con una sensación astringente (9).

Tiene propiedades antibacterianas y fungicidas. En concentraciones del 0.1% es usado como preservativo en lugar del ácido --

benzónico porque tiene gran solubilidad en agua, sin embargo es efectivo en preparaciones con un pH de 5 ó de menos, es usado en solución como inhibidor de efectos corrosivos en instrumentos quirúrgicos, fue empleado anteriormente como antiséptico urinario en disfunciones hepáticas. También es usado como preservativo especialmente de productos alimenticios, el benzoato de sodio como preservativo es mejor en medio de acidez ligera en medios alcalinos es casi nulo su efecto (3,9,10),

El Benzoato de Sodio tiene un costo de \$150.00 Kg, pero las concentraciones a las que es usado lo reducen a un costo mínimo.

b) Metil Paraben, Metil hidroxibenzoa, Metil Parahidroxibenzoa, Metil hidroxibenzoa, Metil paraoxibenzoa, Metagin, Nipagin N. $C_8H_8O_3$. Su peso molecular es de 152.1, su composición C 63.15%, O 31.55%, alcohol etílico 21.06, ácido de hidróxido 90.78. Es un polvo blanco cristalino casi inodoro de sabor insípido provocando una ligera sensación de quemadura.

En concentraciones del .2% es usado en alimentos, pero la sensación de quemadura en la boca puede ser una desventaja. También es usado en medicamentos sobre todo en soluciones.

El Metil Paraben tiene un costo de \$.1235.00 Kg pero las concentraciones que se usan en la industria farmacéutica y alimentos lo reducen a un costo mínimo.

c) El Propil Paraben, Acido p-hidroxibenzoa, propil hidroxibenzoa, propil paraoxibenzoa, propagén. $C_{10}H_{11}O_3$.

Su peso molecular es de 180.2, su composición es C 66.65%, H 6.7%, O 26.64%, alcohol propílico 33.55%, ácido hidroxibenzoico 76.63% (9).

Es un polvo blanco cristalino e insipido e inodoro.

En profilaxis y tratamiento de infecciones por hongos así como -
preservativo en algunas preparaciones farmacéuticas, (2,3,8,10).

El Propil Paraben tiene un costo de \$ 1235.00 Kg pero las concentraciones
usadas en la industria farmacéutica lo reducen a un -
costo mínimo.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es evaluar la utilidad del Benzoato de sodio, del metil paraben y del propil paraben al emplearlos comparativamente con la glicerina como conservadores de encéfalos destinados para el diagnóstico de rabia por la técnica de los anticuerpos fluorescentes o por la inoculación en ratón.

MATERIAL Y METODO.

Se utilizó una cepa de virus rábico estandarizado (C.V.S.) la cual se tituló en ratones albinos suizos por vía I.C. con 0.03 ml la cual se calculó de acuerdo al método de Reed & Muench.

Con dicha cepa se inocularon 600 ratones albinos suizos adultos, I.M. con 0.1 ml (39,810 dosis infectantes x DL 50% IC en ratones de 21 días) de la dilución $10^{-2.6}$. Estos animales fueron sacrificados con eter al observarse los primeros signos nerviosos, pelorizado y parálisis. Posteriormente se extrajeron 500 encéfalos y fueron divididos en 5 grupos de 100 encéfalos cada uno, correspondiendo dos a grupos controles; uno dejado a temperatura ambiente y otro conservado en glicerina, los 3 restantes a cada uno de los conservadores utilizados. Los conservadores se prepararon con dilución salina bufferada a una concentración de 8.5 y con un pH de 7.2, se pusieron 100 encéfalos en frascos con cada uno de los conservadores.

CUADRO 1

CONSERVADORES UTILIZADOS EN LOS DIFERENTES LOTES DE EN- CEFALOS DE RATON

LOTE A - Temperatura ambiente a 22' C (control)

LOTE B - Glicerina 50% a temperatura amb. 22' C (control)

LOTE C - Propil Paraben .05% a temperatura ambiente 22' C

LOTE D - Metil Paraben .02% a temperatura ambiente 22' C

LOTE E - Benzoato de sodio 0.6% a temperatura ambiente 22' C

Cada 24 hrs se obtuvieron 5 encéfalos de cada uno de los conservadores, estos eran sometidos al diagnóstico de rabia de acuerdo a la técnica de los anticuerpos fluorescentes: Se realizaron impre

siones dobles en portaobjetos y se fijaron en acetona durante 20 minutos, se secaron a temperatura ambiente, se delimitaron las impresiones y se les agregó una gota de suspensión de cerebro normal (S.C.N.) al 20% más conjugado. En la 2^a impresión se puso una gota de suspensión de cerebro infectado (C.V.S.) al 20% más conjugado, se incubaron las muestras a 37 C durante 30 minutos en cámara húmeda y se lavaron varias veces las laminillas con solución buffer con pH de 7.2

La lectura se hizo en un microscopio Richter con condensador de campo oscuro y lámpara de halógeno. Se consideró como positivos aquellos que presentaban una fluorescencia clara, brillante y fácil de interpretar y como negativo aquellos casos francamente negativos o que presentaran dificultad diagnóstica.

También cada 24 hrs se tomaron 4 encéfalos de ratón de cada uno de los 5 grupos con el fin de observar la viabilidad del virus. Para esto se maceraron los encéfalos y se les agregó una solución albúmina bovina fosfatada (BAPS) haciendo una suspensión al 20% la cual se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante que fue inoculado en ratones de 21 días por vía I.C. con .03 ml se mantuvieron en observación hasta que murieran, se les extrajo el encéfalo para ser sometidos a la técnica de los A.F., los ratones que no murieron solo se dejaron en observación 21 días y se sacrificaron para ser desechados (b).

Cada 24 hrs se observó también la conservación de los encéfalos lo cual se baso en la forma, el color y el olor de los encéfalos.

CUADRO 2

Titulación del C.V.S. por el método de Reed-Muench (6)
Inoculación intracerebral 0.03 ml. Ratón de 21 días.

DILUCION	VIVOS	MUERTOS	T.VIVOS	T.MUERTOS	NC	%
1	0	7	0	48	48	100
2	0	8	0	41	41	100
3	0	8	0	33	33	100
4	0	8	0	25	25	100
5	0	8	0	17	17	100
6	3	5	3	9	12	75
7	5	3	8	4	12	33
8	0	1	9	1	10	11

$$D.L. = 50-33 = 17 = .4$$

$$75-33 = 42$$

$$D.M. = 70 \cdot .4 = 6.6$$

$$D.L._{50\%} = 6.6 = 10^{-6.6} \times .03 \text{ ml}$$

I.C. ratón de 21 días.

RESULTADOS.

En los cuadros 3,4,5 y en las figuras 1,2,3,4,5,6,7, y 8 podemos observar los resultados obtenidos con los diferentes conservadores.

En el cuadro 3, se observa claramente cuantos encéfalos son positivos de los encéfalos estudiados y hasta cuando se considera que es un buen conservador para la técnica de los anticuerpos fluorescentes.

En la figura 1, se observa hasta que día se presentan el 100% de encéfalos estudiados positivos a la técnica de los A.F.

En el cuadro 4, se observa cuantos ratones se enferman de rabia - después de haber sido inoculados con encéfalos dejados en los diferentes conservadores y cuando empiezan a morir los ratones por contaminación bacteriana.

En la figura 2, se observa hasta cuando los encéfalos dejados en temperatura ambiente y los dejados en conservadores son capaces - de conservar la viabilidad del virus.

En las figuras 3,4,5,6 y 7, se observa un estudio comparativo de la técnica de A.F. y de la prueba biológica en cada uno de los -- grupos, en la cual vemos como empieza a caer la efectividad de -- los conservadores.

En el cuadro 5, se observa hasta cuando se presenta una buena conservación del encéfalo basandonos en los cambios de consistencia - olor y color, marcando cuando realmente pierde forma el encéfalo - y nos dificulta el manejo para poder hacer las dos pruebas mencio

nadas con anterioridad.

En la figura 8, se observa hasta que día se presenta la consistencia de los encéfalos dejados en cada conservador.

CUADRO 3

ENCEFALOS DEJADOS A TEMPERATURA AMBIENTE Y EN CONSERVADORES.

GRUPOS	DIAS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
*TEMPERATURA	+	+	+	+	+								
AMBIENTE	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5						
*GLICERINA	+	+	+	+	+	+	+						
	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5			
PROPILOPARABEN	+	+	+	+	+	+							
	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5					
METILPARABEN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	
BENZOATO DE SODIO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5

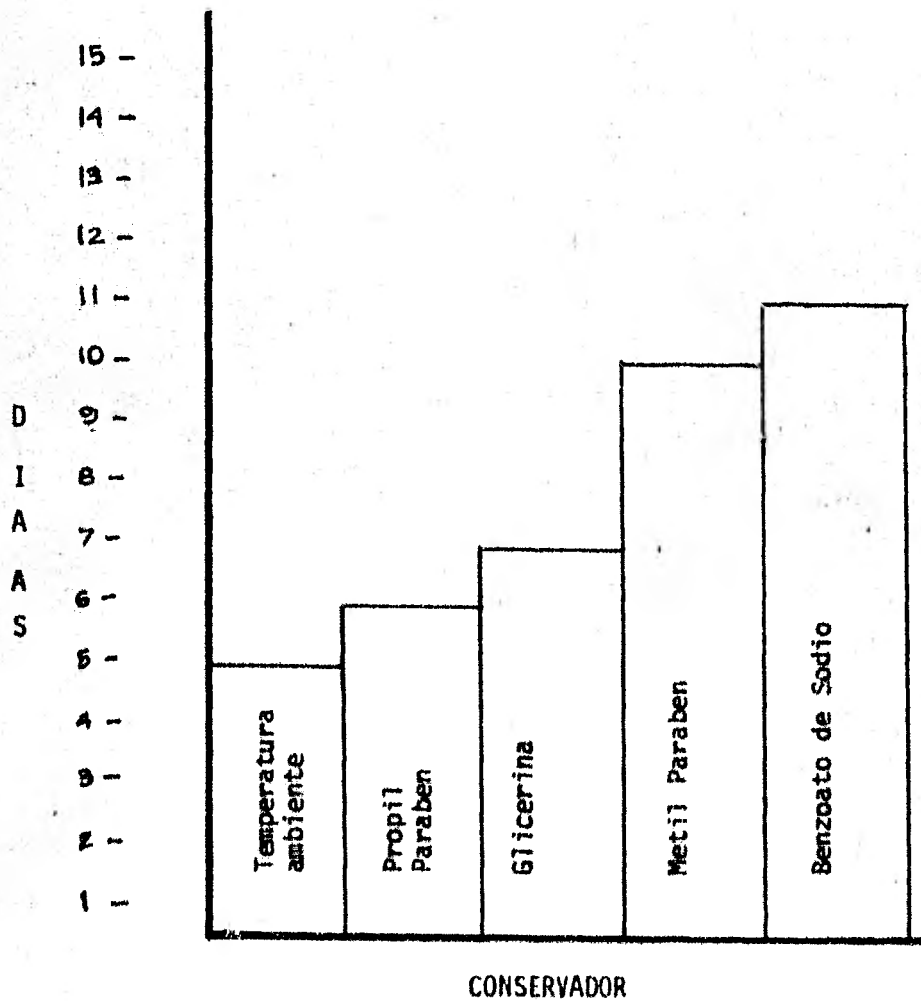
Encéfalo Positivo/ No. de Estudiados.

Ultimo día en que todos los encéfalos trabajados se mantuvieron positivos a la Técnica de Anticuerpos Fluorescentes.

* Grupo Control.

FIGURA 1

DIA EN QUE CADA CONSERVADOR RESULTO POSITIVO A LA
TECNICA DE INMUNOFLOURESCENCIA



La valoración se hizo hasta el día en que todos los encéfalos (5) trabajados se mantenían positivos a la técnica de los Anticuerpos Fluorescentes.

CUADRO 4

ENCEFALOS DEJADOS A TEMPERATURA AMBIENTE Y EN CONSERVADORES
Ratones inoculados para ver la viabilidad del virus rábico (Prueba Biológica).

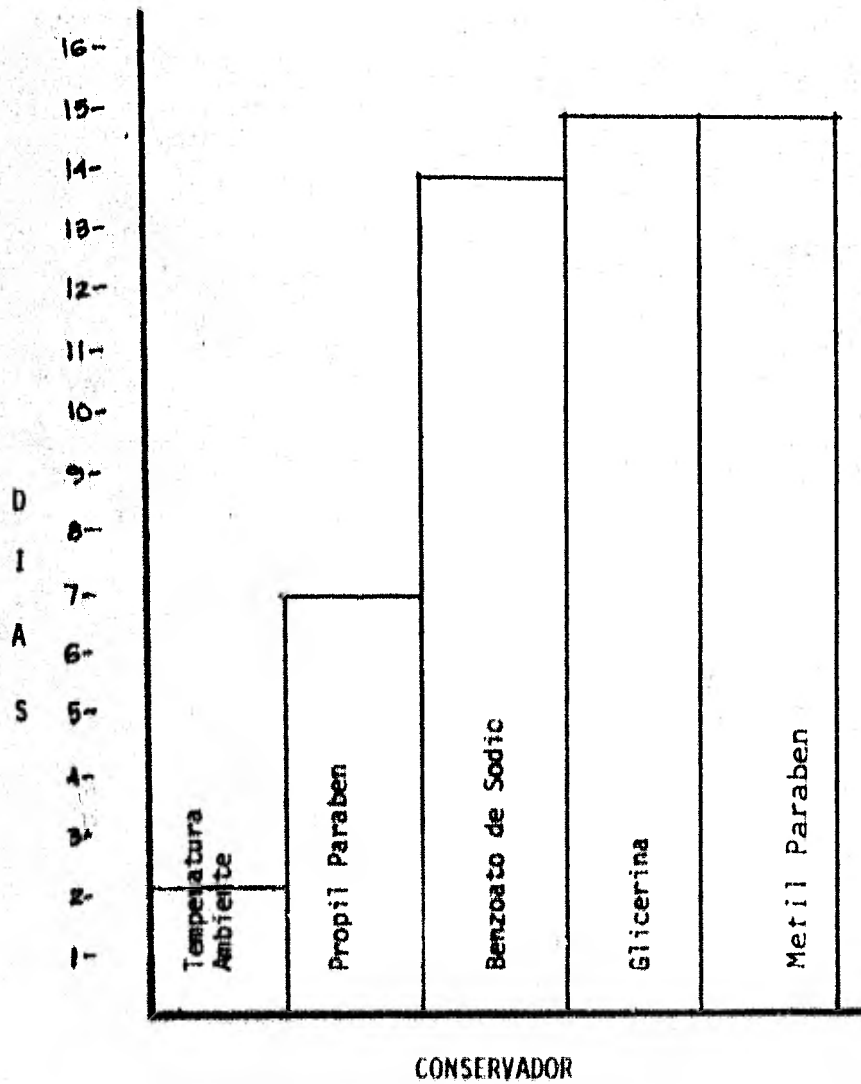
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
*Temperatura Ambiente	+	+	Mc												
	4/4	4/4													
* Glicerina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	2/2	1/4
Propil Paraben	+	+	+	+	+	+	+	Mc							
	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4								
Metil Paraben	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4	2/4	2/4
Benzoato de sodio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Mc
	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4	2/4	

Mc. Muerte de los ratones por posible contaminación bacteriana.

* Grupo Control.

FIGURA 2

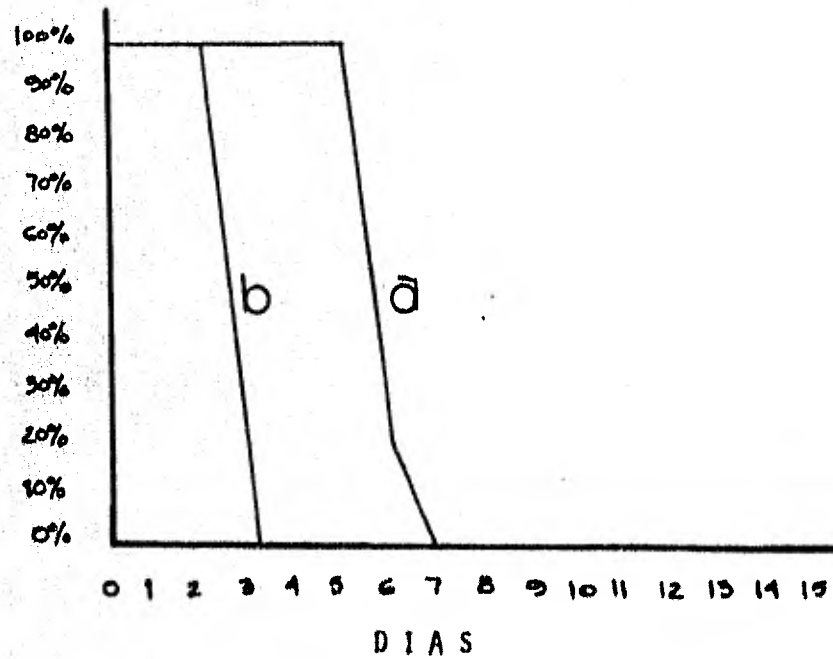
DIA EN QUE CADA CONSERVADOR RESULTO POSITIVO A LA PRUEBA BIOLÓGICA



La valoración se hizo cuando 1 raton de 4 inoculados resultara con signos de rabia.

FIGURA.3

LOTE A.-Estudio comparativo de la técnica de los Anticuerpos Fluorescentes y de la Prueba Biológica de encéfalos mantenidos sin conservador a Temperatura Ambiente.

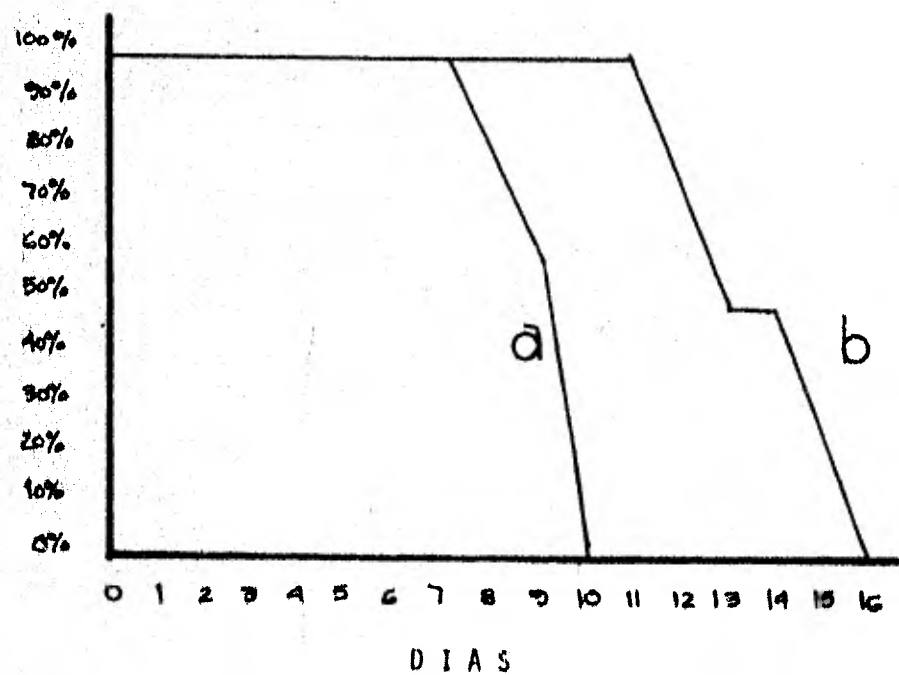


a. -ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

b. -PRUEBA BIOLÓGICA.

FIGURA 4

LOTE B.-Estudio comparativo de la técnica de los Anticuerpos Fluorescentes y de la Prueba Biológica de encéfalos infectados mantenidos en Glicerina 50% a temperatura ambiente.

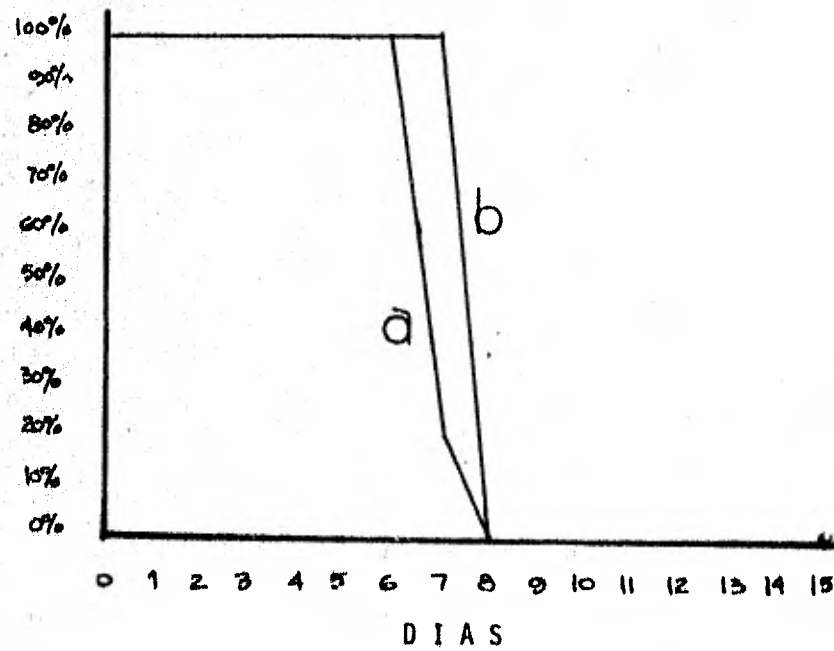


a. -ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

b. -PRUEBA BIOLÓGICA.

FIGURA 5

LOTE C.-Estudio comparativo de la técnica de los Anticuerpos Fluorescentes y de la Prueba Biologica de encéfalos infectados mantenidos en Propil Paraben a temperatura ambiente.

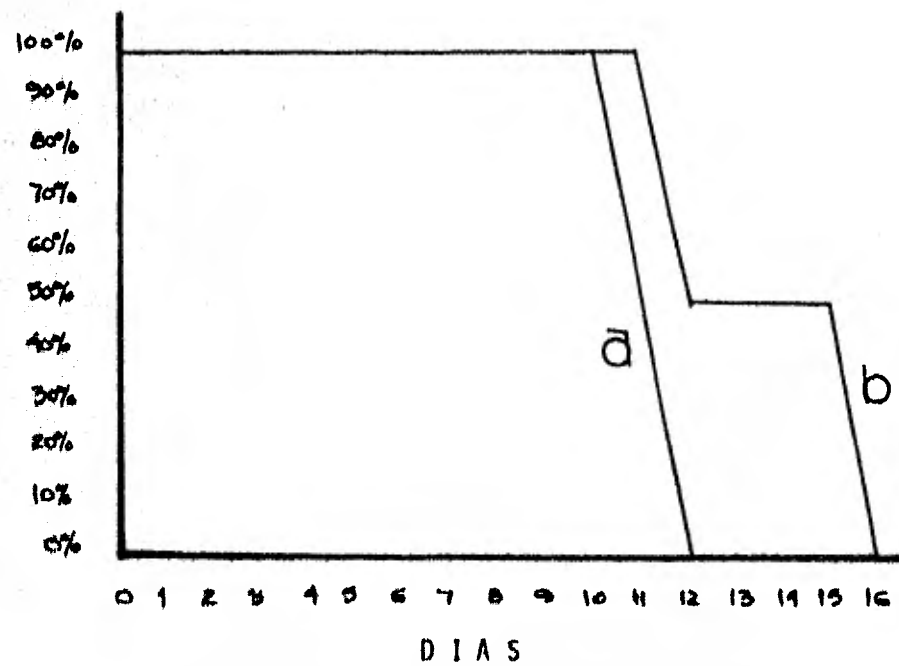


a. -ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

b. -PRUEBA BIOLÓGICA.

FIGURA 6

LOTE D.-Estudio comparativo de la técnica de Anticuerpos Fluorescentes y de la Prueba Biologica de encéfalos infectados mantenidos en Metil Paraben a temperatura ambiente.

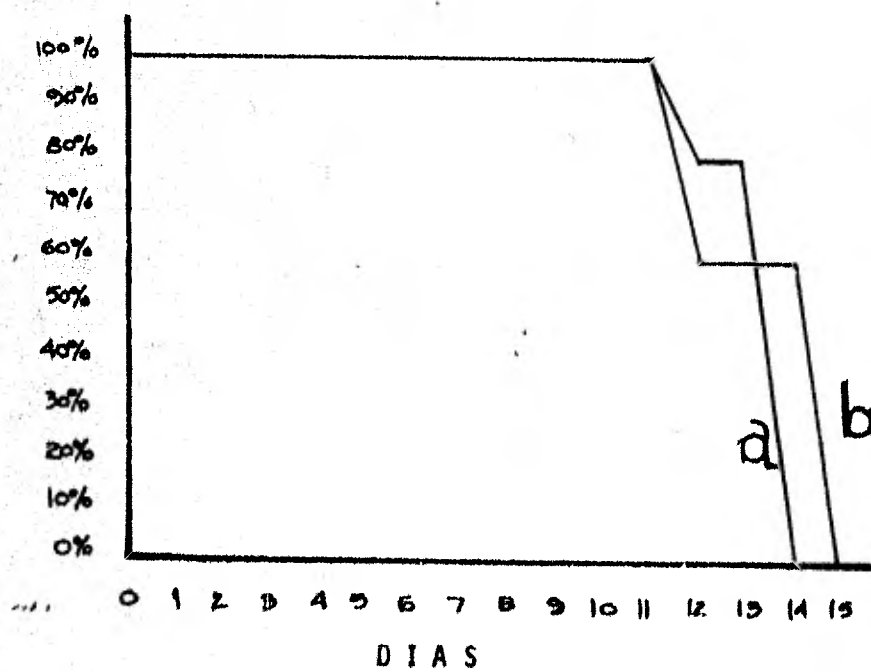


a.-ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

b.-PRUEBA BIOLOGICA.

FIGURA 7

LOTE E.-Estudio comparativo de la técnica de Anticuerpos Fluorescentes y de la Prueba Biológica de encéfalos infectados mantenidos en Benzoato de Sodio a temperatura ambiente.



a. - ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

b. - PRUEBA BIOLÓGICA.

CUADRO 5

CONSERVACION DEL ORGANO

D I A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
TEMPERATURA AMBIENTE	-----P*															
GLICERINA	-----P*															
PROPILOPARABEN	-----P*															
METILPARABEN	-----P*															
BENZOATO DE SODIO	-----P*															

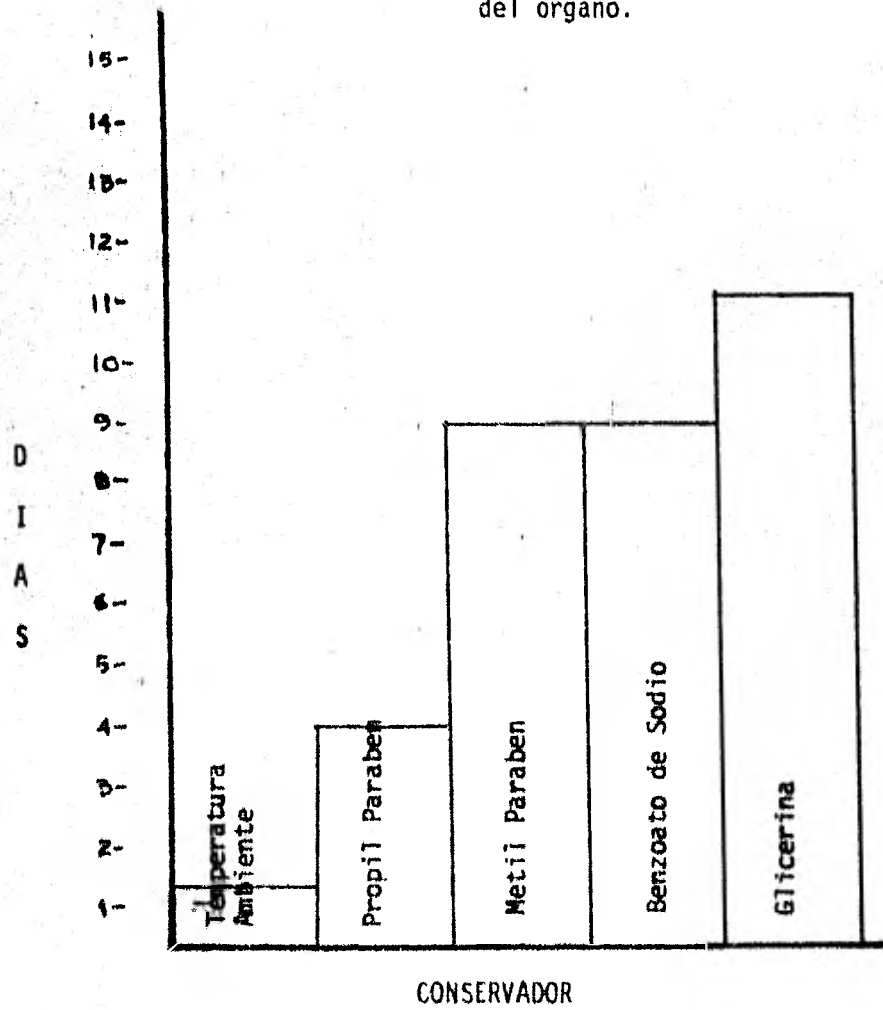
* = Pierde forma el tejido encefálico.

' Grupo Control.

1
2
3
1

FIGURA 3

Día hasta que permanece bien la consistencia del organo.



La valoración se hizo tomando en cuenta la consistencia, olor, color y aspecto general del encéfalo.

DISCUSION.

Para el diagnóstico de rabia, en los laboratorios se reciben desde animales completos o en su defecto cabezas completas, encéfalos y glándulas salivales, los métodos de preservación usados son la refrigeración o en el caso de los encéfalos la glicerina al 50% a temperatura ambiente o en refrigeración. Ocasionalmente se utiliza la congelación del tejido.

Con mucha frecuencia se reciben encéfalos de animales que llegan en decomposición o en condiciones que no permiten un diagnóstico confiable, en casos excepcionales no obstante estar el tejido en decomposición es factible ver la positividad del caso por el método de los A.F. (7,10).

En el presente trabajo se evaluaron los métodos que se utilizan con mayor frecuencia que es el de enviar los órganos a temperatura ambiente y en glicerina 50%, además de otros compuestos como el Benzoato de sodio, Metil paraben y propil paraben.

Se tomaron en cuenta los órganos como muestras útiles para el diagnóstico de rabia cuando el 100% de las muestras (5 por conservador) eran positivas a la técnica de los A.F.

En los encéfalos mantenidos a temperatura ambiente para el 6º día únicamente 1 de 5 encéfalos resultó positivo y a partir de ese momento se redujo la utilidad de la muestra, para esa fecha el material encéfalico se encontraba en total estado de decomposición, la cual se inició desde las 24 hrs. esto demuestra que ocasionalmente muestras de encéfalos en estado de decomposición pueden --

presentar positividad para la técnica de anticuerpos fluorescentes (7,10).

La viabilidad del virus rábico permanece hasta el 2º día, posteriormente mueren los ratones antes de las 24 hrs. posinoculación debido con toda seguridad al estado de los encéfalos ya que después de 24 hrs. los encéfalos empiezan a sufrir cambios en su consistencia olor y color y por la contaminación bacteriana, esto no implica que el cerebro deje de ser infectante.

Según el trabajo realizado por Vester y Lewis, se observa que los encéfalos a temperatura ambiente son positivos a la prueba de A.F. hasta el 5º, 6º, y 14º día con 3 cepas rábicas, esta diferencia con nuestro trabajo pudo deberse a que dichos investigadores utilizaron encéfalos de ratón inoculados por vía intracerebral y con seguridad los títulos del virus en los encéfalos fueron mayores (12) a los utilizados en el presente trabajo, ya que se utiliza una cepa con un título de $10^{-6.6}$ y que produce la enfermedad en 90% de animales inoculados. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Villa Sandoval, quién trabajó con encéfalos de caninos y detectó positividad hasta el 3er. día (13). Sin embargo los 2 días de diferencia obtenidos en nuestro trabajo pudieron deberse al uso de un virus fijo C.V.S. que dió un mayor título en encéfalos y haber trabajado en condiciones controladas de laboratorio.

La glicerina 50% facilita el mantenimiento del tejido encéfalico y por tanto debería ser de más utilidad diagnóstica sin embargo-

como se puede observar en los resultados (cuadro 2 y gráfica 1) y para el 8° día tenemos el 80% de positivos por lo que se considera hasta el 7° día en donde se tuvo el 100% de positivos en la prueba de A.F.

Villa Sandoval observó positividad en el 100% de las muestras -- únicamente hasta el 2° día y a partir del 3er día se fue reduciendo gradualmente el número de muestras positivas. Debido al título del virus rábico en encéfalos en los diferentes casos de rabia en perros.

Al utilizar la glicerina observamos cambios físicos a partir del 11° día, sin embargo estos no afectaron la viabilidad del virus. Con el propil paraben hasta el 6° día observamos positividad adecuada, a partir de este momento se pierde la utilidad de la muestra.

En cuanto a la viabilidad el virus puede detectarse hasta el 7° día posteriormente los ratones utilizados para la prueba Biológica comienzan a morir, evitando la posibilidad de continuar aislado el virus, con este preservativo los encéfalos comenzaron a -- perder su estructura y cambios físicos a partir del 4° día.

Con el Metil Paraben obtuvimos mejores resultados puesto que los encéfalos permanecieron útiles a la prueba de los Anticuerpos -- fluorescentes hasta el 10° día.

En relación a la prueba de viabilidad fue factible aislar el virus rábico hasta el 15° día, dato que nos permite considerar al Metil Paraben como un excelente conservador del virus rábico en

encéfalos y una posible alternativa para la conservación de encéfalos destinados a la prueba biológica. Los cambios físicos de los encéfalos mantenidos en Metil Paraben se iniciaron a partir del 9º día, sin embargo estos no interfirieron en la técnica de los A.F. ni en la conservación de la viabilidad del virus.

El Benzoato de sodio proporciona los mejores resultados como conservador de tejido para la técnica de los A.F., en donde la inmunofluorescencia se observa más clara y más brillante que con los otros conservadores, este fue útil hasta el 11º día y como conservador de la viabilidad del virus rábico hasta el 14º día, al igual que el Metil Paraben, los encéfalos comenzaron a perder su estructura a partir del 9º día sin embargo esto tampoco afectó la técnica de los A.F. y la de la viabilidad del virus.

Los conservadores utilizados no produjeron toxicidad aparentemente en los ratones inoculados para la prueba Biológica, ya que no hubo ningún signo sugestivo de intoxicación.

CONCLUSIONES.

- 1.- Los encéfalos mantenidos a temperatura ambiente pueden ser -
útiles para el diagnóstico de rabia por la técnica de los An-
ticuerpos Fluorescentes, hasta el 6º día no obstante presentar
diferentes grados de descomposición.
- 2.- Cuando los encéfalos se mantienen a temperatura ambiente es
factible aislar el virus rábico durante las primeras 48 hrs.
- 3.- La glicerina al 50% permite el mantenimiento de los encéfa--
los de ratón infectados con virus rábico útiles para la téc-
nica de los A.F. hasta el 7º día y mantiene viable el virus-
hasta el 11º día.
- 4.- El propil paraben preserva los encéfalos de ratón infectados
con virus rábico hasta el 6º día útiles para la técnica de --
los A.F. y mantiene viable el virus rábico hasta el 7º día.
- 5.- El Metil paraben preserva la utilidad de los encéfalos de ra-
tón infectados con virus rábico hasta el 10º día, útil para -
la técnica de los A.F. y mantiene viable el virus por más -
de 15 días.
- 6.- El Benzoato de sodio conserva adecuadamente los encéfalos de
ratón infectado para la técnica de los A.F. hasta el 11º día-
y mantiene viable el virus hasta el 14º día.

- 7.- El Metil Paraben y Benzoato de sodio constituyen una alternativa para la preservación de los encéfalos para el diagnóstico de rabia para la técnica de los A.F.
- 8.- La glicerina 50% y el Metil paraben constituyen una alternativa para la preservación de la viabilidad del virus rábico.
- 9.- La glicerina 50% resultó ser el mejor conservador de la estructura de encéfalos de ratón.

RECOMENDACIONES.

- 1.- Cuando se reciban muestras encéfalicas para diagnóstico de ra
bia que hayan sido mantenidas a temperatura ambiente y tengan
más de 24 hrs. de obtenidas deberá considerarse la probabili-
dad de que dé un resultado negativo debido a la rapidez en --
que se presentan los cambios físicos, químicos o de otra índo
le que impidan que pueda detectarse con facilidad la reacción
Ag-Ac por el método de los A.F.
- 2.- Es conveniente investigar la causa por la cual con el tiempo-
se va perdiendo la facilidad para detectar la reacción antigen
o anticuerpo (método de los A.F.) tomando en consideración -
cambios de autólisis y contaminación bacteriana.
- 3.- Es de suma importancia correr juntas la prueba de A.F. y la -
prueba biológica (inoculación en ratón) ya que nos dan resul-
tados variables pues la contaminación y la autólisis de los -
órganos impide a veces que se lleve a cabo la reacción Antigen
ni-Anticuerpo para poder observar la inmunofluorescencia por-
la técnica de los A.F.
- 4.- Se recomienda experimentar más sobre el tema tratado utilizan-
do los mismos conservadores pero con cerebros que provengan -
de animales enfermos naturalmente con una cepa de calle para-
ver las posibles variaciones y así poder recomendar abierta-
mente estos conservadores.

LITERATURA CITADA.

- 1.- Baer M.G., The natural history of rabies, Academic Press, New York 1975.
- 2.- British Pharmaceutical Codex., The Pharmaceutical Press. 3er.- Ed. London 1973.
- 3.- Easton, Farmacopea de los Estados Unidos de América., Pharmaceutical Convention 1975.
- 4.- Goldman, M., Florescent Antibody Methods, Academic Press, New-York 1968.
- 5.- Goldwasser R.A., and Kislíng., Fluorescent Antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc. Soc. Exptl.- Biol. Med. 98: 219-223 (1958).
- 6.- Kaplan M. Koprowski H., Laboratory techniques in rabies, 3er. Ed. O.M.S. 1973.
- 7.- Martell. D.M. Comunicación personal 1982.
- 8.- Mc. Queen J.L., Lewis A.N. y Scheider N.T. Rabies diagnosed - by fluorescent antibody evaluation in a public health laboratory Amer. J. Pub. Health, 50:1743, (1960).
- 9.-Merck & Co. the merck Index, 8th, Ed. U.S.A. 1968.
- 10.- Rosestein E., Farmacopea, 24 Ed. Panamericana de libros de - Medicina. México 1974.
- 11.- Secretaría de Salubridad y Asistencia, Número Especial sobre Rabia, Salud Pública de México. México, D.F., (1974).

12.- Vester J.L. and Lewis (1973) Limitation of Deteriorated tissue for Rabies diagnosis. American health public Vol. II. No. I (1974).

13.- Villa S. J.J. Efectos del Mantenimiento de tejidos nerviosos con y sin refrigeración, preservativo a temperatura ambiente y en refrigeración a diferentes períodos de tiempo sobre el diagnóstico de rabia por el método de los A.F. Tesis Licenciatura U.N.A.M. México, D.F., 1975.