



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**INMUNODIAGNOSTICO PARA RABIA
CON PEROXIDASA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

Ma. Dolores González Vega y Aguirre

México, D. F.

7786

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

SR. JUAN GONZALEZ VEGA CAMPOS

SRA. JOSEFINA AGUIRRE DE GONZALEZ

*Con profundo cariño, gratitud y admiración
por los beneficios que recibí; pongo
en sus manos el presente trabajo
fruto de la labor desarrollada en mi -
vida de estudiante siempre
apoyada y sustentada en ustedes.*

PADRES, GRACIAS.

A DANIEL

*Quién con su gran amor, confianza
y comprensión me ayudo a llegar a
una de las metas anheladas.*

*A mi Hija por quien siento el deseo
de continuar superandome, con todo
mi amor y cariño le dedico este traba
bajo.*

SRA. MAGDALENA AGUIRRE B.

TIA: Quiero agradecerte infinitamente el cariño y apoyo que de tí recibo.

CON CARINO A MIS HERMANOS

ANISITA (Q.E.P.D.)

RAFAEL LUCIANO

CRISTY

CARMEN

CHEPINA

JUAN ANTONIO.

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN
LA SECCION DE VIROLOGIA DEL PROYECTO
DE RABIA PARALITICA (I.N.I.P.-FAO) -
PALO ALTO, MEXICO, -BAJO LA DIREC---
CION Y ASESORAMIENTO DEL M.V.Z. ELI-
SEO HERNANDEZ B. A QUIEN AGRADEZCO -
INFINITAMENTE SU ATENCION, CONOCI---
MIENTOS Y FACILIDADES BRINDADAS EN -
MI BENEFICIO.

EN AGRADECIMIENTO AL
M.V.Z. RICARDO MORENO CHAN
POR SU COLABORACION EN LA
REALIZACION DEL PRESENTE
TRABAJO.

Con admiración y respeto a mis

MAESTROS y COMPANEROS

A MI ESCUELA

AL HONORABLE

JURADO.

T E S I S

INMUNODIAGNOSTICO

PARA RABIA

CON PEROXIDASA

INDICE

I INTRODUCCION

II MATERIAL Y METODOS

III RESULTADOS

IV DISCUSIONES

V CONCLUSIONES

VI BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda producida por un virus neurotrópico mortal, casi sin excepción y transmitida en los animales y el hombre por mordedura de un animal enfermo a otro sano - susceptible. Por su gravedad, ha sido una de las enfermedades que se han estudiado desde tiempos remotos. Demócrito 500 años A.C., Aristóteles 322 años A.C., ya nos hablan de ella.

Galeno 200 años A.C., ya recomendaba la resección quirúrgica del área herida. Zink en 1804 (30) fue el primero en transmitir la enfermedad a un perro sano con inoculación de saliva, pero quien en realidad inicia los trabajos sobre Rabia fue Pasteur (26) quien aisló el virus en conejo en donde posteriormente creó su famosa vacuna de tejido nervioso.

Los métodos de diagnóstico de la rabia se han basado por mucho tiempo en la búsqueda de los corpúsculos descritos por Negri (21) en el año de 1903, quien lo hizo posible al descubrir la presencia de corpúsculos intracitoplásmicos en las neuromas de animales muertos de rabia. Estos corpúsculos se conocen hoy en día como corpúsculos de Negri y continúan considerándose de valor diagnóstico.

Actualmente las técnicas de diagnóstico en rabia deben reunir condiciones óptimas de seguridad, rapidez y economía, ya que el problema tanto de rabia urbana como el de rabia paraltica bovina --- (Derriengue) en el campo, tienen repercusiones tanto en salud pública como en la economía ganadera y frenan el desarrollo nacional.

El diagnóstico clínico no es confiable ni definitivo; las manifestaciones de la enfermedad se caracteriza por síntomas prodrómicos que incluyen malestar, ansiedad e hiperestesia alrededor de la herida, notable principalmente en el hombre. Se presentan espasmos musculares muy dolorosos y es notable el espasmo de los músculos faringeos cuando el enfermo intenta deglutir, lo que origina la hidrofobia en las personas. Otros signos como: apetito pervertido, ataques furiosos, parálisis y muerte, conforman frecuentemente los cuadros clínicos de la enfermedad.

Cruz Islas en 1973 (6) llegó a la conclusión de que tanto en perros como en bovinos, el 5.1 y el 6.7% respectivamente de los casos positivos pueden presentar síntomas que no coinciden con las descripciones clínicas tradicionales que se encuentran en la literatura.

Los cambios patológicos de rabia en el encefalo están restringidos casi exclusivamente a una ligera encefalitis caracterizada-

por infiltraciones perivasculares principalmente submeníngicas y neurofagia ocasional. Estas lesiones son evidentes con cualquier técnica de coloración histológica (hematoxilina-eosina, etc.) La búsqueda de corpúsculos de Negri se hace con colorantes específicas como la de Seller, Schlefstein, Romanovski, etc. Estos corpúsculos se localizan -- con mayor facilidad en el cuerno de Ammón (hipocampo mayor) y también en las células piramidales de la corteza cerebral así como en las células de Purkinge del cerebro. Se encuentran también en menor número, en el puente de Varolio, el bulbo raquídeo, la médula espinal y los ganglios sensoriales. (19).

Cuando no se encuentran corpúsculos de Negri en el cerebro de los animales supuestamente muertos de rabia, no se debe descartar la posibilidad de que se trate de esta enfermedad y se debe practicar una prueba Biológica de inoculación intracerebral de material sospechoso en ratones para el aislamiento de virus. Se ha comprobado en investigaciones que del 10 al 15% de los casos negativos a corpúsculos de Negri son positivos por inoculación en ratones. (27).

Las pruebas inmunológicas, por otra parte, usan la especificidad de los anticuerpos por su antígeno, para fines diagnósticos.

La técnica que hoy en día se considera como la más precisa-

y se recomienda como de elección es la de inmunofluorescencia, teniendo como limitante el costo del equipo necesario para efectuarla, como son el microscopio de luz UV., el conjugado de buena calidad y el personal calificado.

Hopkins y Wasmall [13] en 1933, tuvieron la idea de reaccionar las moléculas proteínicas con el fenil isocianato. Más tarde, --- Greech y Jones [11] en 1941, obtuvieron conjugado de proteínas con -- isocianato de hidrocarburos. En 1942 Coons y Col. [4] aplicaron por -- primera vez en Microbiología el método de anticuerpos fluorescentes, -- demostrando que el antígeno, un polisacárido soluble del neucomococo, podría ser coloreado sobre cortes de tejido de ratones infectados. Esta técnica y los resultados obtenidos fueron descritos en detalle por Coons y Col. [5] en 1950.

La reacción de inmuno-precipitación es un ensayo sensitivo- que puede emplearse tanto para identificación de antígenos como para -- titulación de anticuerpos.

Las pruebas hechas por Oudin en 1946 y Ouchterlony en 1949- sobre técnicas de difusión en gel marcaron la pauta para aplicaciones importantes en el diagnóstico de enfermedades virales. [17]

Bajo ciertas condiciones, es necesario hacer una rápida -- identificación de un suero o de un virus de rabia; sin embargo, es -- necesario que el antígeno que toma parte en la reacción tenga cierta cantidad de virus completos y que los anticuerpos se encuentren en -- alta concentración para que se presente una precipitación visible en la zona de equivalencia [17].

De esto se deduce que:

- a) Si se trata de identificar anticuerpos en un suero, se requerirá de un antígeno rábico concentrado.
- b) Si se trata de identificar un virus desconocido entonces es necesario obtener un suero hiperimmune preparado de un animal donador con un virus de rabia obtenido de un animal de diferente especie, de aquel que se va a investigar.

Villemont y Provost en 1958 [28] fueron los primeros en de mostrar la presencia de fracciones precipitantes en tejidos conte--- niendo virus de rabia.

Otras pruebas son, la hemoaglutinación e inhibición de la- hemoaglutinación del virus de la rabia.

El primer reporte sobre hemoaglutinación con el virus de la rabia fue publicado por Halonen y Colaboradores, en 1968, [12] quienes reportaron que la cepa CVS aglutinó eritrocitos de ganso, (Anser cinerius) y de pollo (Gallus gallus) de 2 días de edad, siempre y cuando se comprobara que el virus hubiese crecido en ausencia de inhibidores de la hemaglutinación presentes en todos los sueros normales (es decir que el virus hubiese sido cultivado en ausencia de suero).

Las condiciones óptimas para la demostración de la hemaglutinación en rabia incluyen baja temperatura (4°C) p.H. 6.2 y uso de eritrocitos de ganso. La hemoaglutinación no se observa a temperatura ambiente o a 36°C . Estas observaciones fueron confirmadas y extendidas por Kuwert en 1973 [15]. Cualquier cepa de virus de la rabia sin importar en que tipo de células fue propagado, aglutinará a los eritrocitos de ganso bajo las condiciones indicadas anteriormente.

La hemoaglutinación y la inhibición de la hemoaglutinación pueden ser llevadas a cabo en un sistema macro en tubos y en un micro, en microplacas.

El radioinmunoensayo es una nueva técnica inmunológica utilizada para detectar y evaluar anticuerpos específicos contra la ra--

bia por su capacidad de reaccionar específicamente con el antígeno de rabia marcado con ^{125}I radioactivo. Este método parece ser el más sensible para la detección de anticuerpos tempranos después de la aplicación de vacunas purificadas o preparadas en cultivos de tejidos, así como de anticuerpos que no puedan ser detectados con métodos serológicos convencionales como los de sueroneutralización de virus, fijación de complemento, o técnica de inmunofluorescencia.

La técnica de radioinmunoensayo se basa en el marcado radioactivo del antígeno viral, ya sea cultivando el virus en presencia de ^{14}C o bien combinando virus purificado con ^{125}I o con ^{132}Cr en las condiciones apropiadas para que ocurra la conjugación sin desnaturar el antígeno. La técnica detecta la combinación primaria antígeno-anticuerpo, en tanto que otras técnicas detectan acciones secundarias de la combinación, es decir, que la combinación del anticuerpo con su antígeno (Ag) neutraliza la infectividad viral. Para efectuar esta técnica es posible emplear cantidades muy pequeñas de reactivos. Dado que la producción de virus rábico radioactivo es costosa, puede emplearse una técnica alterna que consiste en saturar los anticuerpos del suero problema con un virus rábico no radioactivo. El virus no radioactivo compite por los anticuerpos con el virus radioactivo. Solo en caso de que hayan quedado anticuerpos rábicos libres ocurrirá la combinación de éstos con el virus radioactivo. De esta forma la canti

dad de virus radioactivo que se usa por cada prueba es mucho menor, -
haciéndola más económica. [18]

Hasta hace poco ha sido posible la detección de los antígenos virales en células y tejidos por medio de dos técnicas principales: La Inmunofluorescencia, que es la técnica de elección hoy en día [5,20] y la inmunoferritina [7,14,18,26]. Desde 1950 Coons y col. [5] localizaron por primera vez el virus de las paperas en células infectadas, usando la tinción de anticuerpos fluorescentes. Esta técnica - ha ayudado en el avance de nuestros conocimientos acerca del ciclo infeccioso de varios virus.

El diagnóstico de las enfermedades virales ha sido simplificado por el uso de estas técnicas y como Casals [3], Spindlove [24], - Fraser [10] y Nair [20], han demostrado hasta ahora la técnica de inmunoferritina no ha sido usada en virología tan ampliamente como la - de inmunofluorescencia. La principal utilidad de la técnica de inmunoferritina ha sido para el estudio detallado de los antígenos virales en el microscopio electrónico. El gran tamaño de las moléculas de ferritina obliga a la congelación y descongelación de las células a fin de permitir la penetración del conjugado. Esta ha sido la más seria - limitante del empleo generalizado de esta técnica ya que la ultraestructura celular se destruye con la congelación y descongelación repe-

A pesar de las ventajas definidas, ambas técnicas tienen algunos inconvenientes en su aplicación práctica. En el caso de la inmunofluorescencia, el complejo anticuerpo-antígeno, requiere para detección de un microscopio de luz ultravioleta.

Los fluorocromos, aún los mejores como el isotiocianato de fluorescencia y otros, no son muy estables. Mas aún, la preservación de las características inmunoquímicas de las proteínas marcadas puede variar con las condiciones del marcado y la intensidad de transmisión de la fluorescencia está dada por el complejo marcado. Estos y otros factores, fueron descritos en detalles por Nair y colaboradores en 1969 (20). Las preparaciones tratadas con anticuerpos fluorescentes no pueden ser preservadas por largo tiempo para su examen subsecuente y también existe el problema de la autofluorescencia de tejidos (8).

En forma alternada se han empleado enzimas para marcar anticuerpos que son normalmente escasas o inexistentes en los tejidos animales, en virtud de que los complejos que forman pueden ser detectados histoquímicamente. El hecho de que la enzima no se altera durante la reacción con su substrato y también de que cada molécula de enzimas es capaz de producir productos de reacción, dependientes del tiempo que se deje reaccionar a la enzima con su substrato, las-

ha hecho útiles para la detección intracelular de antígenos.

La peroxidasa, las fosfatasa alcalina y ácida, la glucosa-oxidasa han sido usadas para marcar anticuerpos. Entre estas enzimas la peroxidasa de rábano es la más usada en virología. Así lo describen independientemente Abelson 1969 [2] y Leduc, Wirker y Avranneas - en 1969 [16].

La enzima, en este caso la peroxidasa de rábano, puede ser usada como ya se han usado las sustancias radioactivas o fluorescentes. La enzima es unida químicamente al anticuerpo específico contra ciertos virus, en este caso el de la rabia. Este conjugado se hace -- reaccionar con el antígeno intracelular homólogo.

La actividad catalítica de la enzima se revela por un proce-so de tinción apropiado. Las preparaciones pueden preservarse y mon--tarse para estudios subsecuentes en microscopio simple.

El producto de la reacción de la tinción histoquímica, es -- denso a los electrones, osmiofílico y por lo tanto se puede observar en el microscopio electrónico.

Propiedades de la peroxidasa de rábano (Raphanus sativus).

Entre varias enzimas, la peroxidasa de rábano es una de las más útiles para la técnica de inmunodiagnóstico enzimático, por su bajo peso molecular (40,000 daltons), comparada a 100,000 daltons para la fosfatasa alcalina y 150,000 para la gluco-oxidasa (9).

Debido al peso molecular relativamente bajo del complejo peroxidasa-anticuerpo, la penetración de estos anticuerpos marcados dentro de las células con su antígeno, es muy satisfactoria y mejor que los anticuerpos marcados con otras enzimas o con ferritina.

La peroxidasa de rábano es una proteína incolora (apoenzima) combinada con porfirina férrica de un café oscuro.

Su composición química, según Saunders (25), es la siguiente:

| | | |
|-----|----|-------|
| C: | 47 | .0% |
| N: | 13 | .2% |
| H: | 7 | .35% |
| S: | 0 | .43% |
| Fe: | 0 | .127% |

Es posible obtenerla comercialmente como un producto crista

lino. Es muy resistente a operaciones histológicas y por lo tanto puede tolerar calentamientos y disolventes como el tolueno y el benceno y no es alterada por el tratamiento de inclusión o por la sección con parafina. La peroxidasa puede ser fijada en alcohol o por una solución acuosa al 10% de formol.

Detección histoquímica de la actividad de la peroxidasa.

Esta puede ser demostrada en secciones de tejido, impresiones y cultivo de tejidos con varios reactivos como la benzidina, el alfa-naftol o una mezcla de alfa-naftol la p. fenileneclamina que también se llama reactivo de Nadi y el pirogalol.

Por ejemplo bajo la acción de la peroxidasa de rábano y en la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) la diaminobencidina llega a ser oxidada hasta un producto de color azul en el cual es visible en el microscopio de luz normal. La bencidina de color azul es oxidada y por lo tanto inestable y rápidamente se convierte en café sin intervención de la enzima. En general esta reacción no es afectada fuertemente por el pH., sin embargo, la acidificación del medio peróxido-bencidina, influencia la estabilidad y la uniformidad del color azul. [22]

La óptima concentración del H_2O_2 en la reacción es aproximadamente de 0.05 M o sea una gota de agua oxigenada al 10%.

Concentraciones más altas de peróxido pueden alterar la reacción debido a la destrucción de la enzima. El peróxido es reducido por los grupos amino libres presentes durante la reacción.

La localización de la actividad enzimática aparece bien determinada y el producto de reacción forma una masa densa y más o menos homogénea.

El objeto del presente trabajo es el de explorar la eficiencia del método de la inmunoperoxidasa (peroxidasa de rábano) en la detección del antígeno rábico con fines diagnósticos utilizando diaminobencidina y el pirogalol con tinciones, haciendo observaciones importantes acerca de su confiabilidad, su especificidad y su economía, tanto desde el punto de vista del equipo requerido como de los reactivos necesarios para su ejecución.

II. MATERIAL Y METODOS

1. - Material Biológico.

a) Virus Cepa "ERA" (Alto Pasaje). El virus original proveniente de un perro rabioso y adaptado a ratón fue denominado SAD4 (Street Alabama Dufferin), y pasándolo a cultivos celulares de riñón de Hamster por Fenje fue llamado SAD4-HK25. Después de 10 pases en embrión de pollo, el virus fue adaptado a cultivos celulares de riñón de cerdo por Abelseth, resultando así suficientemente atenuado para su uso - en varias especies animales (1). Fue denominado cepa "ERA" hasta -- después de 35-45 pases más, en que se usó para producir una nueva - vacuna que lleva el nombre de vacuna cepa "ERA". El virus fue adaptado a células BHK-21 por Koprowski, llegando a obtenerse títulos - hasta de $10^{9.0}$ como máximo. La cepa "ERA" alto pasaje fue obtenida del Instituto Wistar de Filadelfia, E.U.A.

b) Virus "V-319". Esta cepa fue aislada de un vampiro (Demodus rotundus) que fue capturado en el rancho San Ricardo, localizado a tres kilómetros al Suroeste de la Estación San Vicente municipio de Acatlán de Pérez Figueroa, Oax. El vampiro fue capturado con una red -

colocada alrededor de un corral donde se encontraban bovinos mordidos por dichos quirópteros. El vampiro murió cuando era trasladado al Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías (I.N.I.P.) ---- "SAG" el 14 de febrero de 1969 y congelándose a -30°C . Tres días después el cerebro y las glándulas salivales fueron examinados, resultando positivos a rabia por el método de Inmunofluorescencia.

Esta cepa fue adaptada a cultivos celulares mediante 5 pases en células de embrión de vampiro y posteriormente se le dieron 5 pases en células BHK-21, tomándose de este último pase una placa; la número 476, para purificar el virus, dando después 3 pases más en estas mismas células donde se alcanzó el título de 10^9 , --- UFP-ml*.

Esta cepa es utilizada actualmente para elaborar una vacuna antirrábica en el Departamento de Producción del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías, de la Secretaría de Agricultura y Ganadería.

c) Virus de cerebro de perro del Centro antirrábico de la ciudad de México,** confirmados como positivos a rabia, por el método de In-

* Unidades formadoras de placa.

** Dirección: Calle de la Salud, San Francisco Culhuacan, D.F.

munofluorescencia.

d) Suero.

- 1.- Suero antirrábico de origen mular, del Instituto Butantan* lote No. R-3-66-128.
- 2.- Suero Antirrábico del Instituto Nacional de Higiene.**

e) Células.

- 1.- BHK-21.- Esta línea se obtuvo de embrión de riñón de Hamster; - y el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, la adquirió del Instituto Wistar de Filadelfia, E.U.A.
- 2.- 13S.- Esta línea celular es una clona de la línea BHK-21 y fue adquirida por el I.N.I.P., del Instituto Wistar de Filadelfia, - E.U.A., y las clonas 3 y 1 fueron preparadas en el laboratorio del I.N.I.P.

f) Laminillas con células BHK-21 y 13SCL₃

- 1) Preparación de Monoestratos.

* Dirección: Caixa Postal 655.- Sao Paulo, -S.P. -Brasil.

** Dirección: Mariano Escobedo No. 20 - México, D.F.

A una botella de cultivo (milk dilution bottle) con monoestratos de células 13SCL_3 y después de extraer el medio de crecimiento, se le agregó 1 ml. de tripsina al .25% permitiendo que hiciera contacto con las células del monoestrato durante unos minutos -- hasta que estas empezaron a desprenderse. Luego se inhibió el -- efecto de la tripsina, agregando 5 ml. de medio de mantenimiento y con una pipeta de 10 ml. provista de una perilla de hule en su extremo superior se procedió a desprender las células de la pared de la botella, aspirando líquido en la pipeta y ejerciendo -- ligera presión sobre el monoestrato, logrando así una suspensión de células que se contaron en un hemocitómetro para determinar -- la cantidad de células por mililitro. Para botellas de cultivo -- (milk dilution bottle) se usaron 15 ml. de medio de crecimiento -- con 2 a 3 millones de células aproximadamente. A los tubos de -- Leighton se les puso un cubreobjetos y se les adicionó 1 ml. de -- medio de crecimiento con aproximadamente 100,000 a 200,000 célu-- las por ml. Las células cultivadas se incubaron a 37°C durante -- 72 horas en las cuales se forma generalmente un monoestrato celu-- lar.

Para la formación de monoestratos en caja de Petri de 50 mm. se colocaron los cubreobjetos y se depositaron 5 m. de medio, -- con aproximadamente 1.5 millones de células.

Estas cajas de Petri se incubaron a 37°C, en una estufa para cultivos celulares con flujo continuo de aire con 5% de CO₂ y una humedad relativa al 75% revisándolas cada 24 horas para la exploración del crecimiento de las células, haciendo las observaciones con un microscopio invertido.

2) Infección del monoestrato con virus rábico.

El medio de crecimiento de los monoestratos celulares contenidos en los tubos o cajas de petri, fue desechado, enjuagando con solución salina bufferada (PBS), con el objeto de lavar el monoestrato mediante movimientos rotatorios y de esta forma eliminar las posibles células muertas que estuviesen en la superficie del monoestrato. La cepa ERA o la V-319 previamente adicionada de DEAE Dextrán, con medio de mantenimiento, se inoculó en -- cantidades de 0.2 y 0.5 ml. a los tubos de Leighton y a las cajas de petri, respectivamente. Los monoestratos celulares fueron incubados 1 hora a 36°C, al final de la cual se retiró el sobrenadante lavando el monoestrato con PBS, para eliminar el exceso de virus que hubiese quedado. El PBS fue extraído, adicionando como medio de mantenimiento, 1 ml. a cada tubo de Leighton y 5 ml. a cada caja de petri.

Después de 30 a 48 horas de infectados los monoestratos, se-

retiró el medio de cultivo de los tubos de Leighton y de las cajas de petri, montando el cubreobjetos en una laminilla de vidrio, la cual se pegó mediante el uso de cemento para plástico (lodela tipo S) y se procedió a la tinción.

II.- Substancias.

1.- Peroxidasa de rábano (Horseradish)*

En este trabajo se usaron los tipos I y VI.

2.- Derivados de p, p, - Difluoruro m-m Dimitrodi - pheny Sulfone - (FNPS)**

III.- Soluciones.

1.- Buffer, solución salina fosfatada (PBS).

a) Solución "A".

NaCl 8.0 g.

KCL 0.2 g.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g. (Si: Na_2HPO_4 1.15 g. o $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$, 1.38 g.)

KH_2PO_4 0.2 g.

Agua bidestilada 800 ml.

* Sigma chemical Company dirección: Division of Sigma International L.T.D. - P.O. Box 14508, St. Louis, MO. 63178 U.S.A.

** General Biochemicals dirección: Grand Island, New York, U.S.A.

b) Solución "B".

| | |
|-------------------------------------------|---------|
| CaCl_2 | 0.1 g. |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g. |
| Agua bidestilada | 200 ml. |

Estas 2 soluciones se esterilizan por separado en el auto-clave a 10 libras de presión durante 10 minutos y se dejan enfriar a temperatura ambiente.

Cuando se desea hacer solución libre de Ca y Mg la solución "B" no se hace y solo se ponen 1000 ml. de agua bidestilada.

2.- Buffer fosfatado al 0.5 M con un p.H 7.2 conteniendo 4.5% de - sacarosa.

| | |
|----------------------------------------------|-----------|
| a) Na_2HPO_4 | 8.8995 g. |
| b) NaH_2PO_4 | 6.8995 g. |
| c) $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ | 45. g. |

En 1000 ml. de H_2O bidestilada.

3.- Solución salina bufferada al 0.05 M a un p.H 7.2 que fue la -- más usada.

| | |
|------------------------------|-----------|
| a) NaHPO_4 | 8.8995 g. |
| b) NaH_2PO_4 | 6.8995 g. |
| c) NaCl | 8.5 g. |

En 1000 ml. de H_2O bidestilada.

4.- Buffer Tris* (P.M. 121,14)

Solución al .05 M con un p.H 7.6 C_4H_4 No. 3

En H_2O bidestilada.

5.- Solución 2% de Tetróxido de Osmio (O_8O_4) en PBS.**

6.- Solución Pirogallol ($C_6H_6O_3$) al 5% en H_2O bidestilada.***

7.- Solución bufferada fosfatada al 0,1 con p.H 6 en H_2O bidestilada.

a) Na_2HPO_4 0.1 N, 5 partes con peso molecular 177.99

b) NaH_2PO_4 0.1 N, 2 partes con peso molecular 137.99

Cantidades usadas:

Na_2HPO_4

66,70 g.

NaH_2PO_4

20,68 g.

H_2O

Bidestilada

52.2 l.

8.- Buffer carbonatado al 0.5 M a un p.H 10.0 a 10.5 (se usó p.H 10.0)

$NaHCO_3$

8.401 g.

* Mann Research Laboratories Inc., New York.

** Merck Sharpe & Dohme, calle 5 # 7, Naucalpan, Edo. México.

*** General Biochemical Gand Island New York, U.S.A.

Na_2CO_3 10.59 g.

Cantidades usadas.

| | | |
|------------------|--------------------------|----------------------------------|
| NaHCO_3 | Na_2CO_3 | H_2O bidestilada |
| 4.2005 g. | 5.2885 | 2 lt. |

9.- Solución p.p, difluoruro m-m demetildifenilsulfone al 0.5% en acetona*.

Esta solución se puede guardar por muchos meses en refrigeración.

10.- Solución neutra saturada de sulfato de amonio.

a) Disolver 78 g. de sulfato de amonio en 100 ml. en agua destilada.

b) Ajustar el p.h a 7.0 con hidróxido de sodio al 0.1 N.

c) Puede mantenerse indefinidamente a temperatura ambiente en una botella tapada.

11.- Solución salina al 0.85%

a) Disolver 8.5 g. de cloruro de sodio en un litro de agua destilada.

* General Biochemicals. Grand Island, New York. U.S.A.

12.- Cloruro de bario.

- a) Disolver 5 g. de cloruro de bario en 100 ml. de agua destilada.

13.- Solución salina tamponada con fosfato 0.01 M.

- a) Preparar solución salina al 0.85% (8.5 g. de NaCl) Preparar 18 lt. en un volumen conveniente.
- b) Agregar a esos 18 litros de solución salina 4.08 g. de fosfato monopotásico anhidro y 26,2 g. de fosfato dipotásico-anhidro.
- c) Esta solución salina tamponada se usó también para lavar - portaobjetos y para preparar polvo de tejido.

IV. Medios de Cultivo.

1.- BHK-21*. Se ajustó a un p.H de 7.1 utilizando HCl 0.1 N.

Posteriormente se esterilizó por filtración (filtros millipore 0.22 micras), envasándose en volúmenes de 500 o 1000 ml. y conservándose a 4°C.

2.- Caldo de triptosa fosfatada (TPB) ** 29,5 g. en 1,000 ml. de -

* BIGCO Grand Island, Biological Company, Grand Island, New York, USA.
 ** DIFCO (Detroit, Michigan U.S.A.)

agua bidestilada estéril y deionizada. La esterilización se efectuó en el autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos conservándose a 4°C.

3.- Tripsina 1:300* al usarse se diluye a 0.25%

Un gramo de esta tripsina se disolvió en 100 ml. de PBS libre de Ca y Mg y esterilizando por filtración (filtro millipore -- 0.22 micras) y envasándose en volúmenes de 5 ml. que se congelaron a -20°C.

4.- Penicilina y Estreptomina,

Penicilina G, Procaínica 1,000.000 U.I.

Sulfato de Estreptomina 1 g.

H₂O Bidestilada esterilizada 50 ml.

Un mililitro de esta solución contiene 20,000 U.I., de penicilina y 20 mg. de estreptomina. Esta solución es preservada a -20°C.

5.- Micostatina,

Nistatina (Squibb)** 2,400,000 U.I.

H₂O bidestilada estéril 48 ml.

* Mann Research Laboratories Inc. New York.

** Squibb. Av. Revolución 1267, z.p.20. México, D.F.

6.- DEAE Dextrán* al 0.50%

DEAE Dextrán 0.50 g.

PBS Libre Ca y Mg 100.0 ml.

Se esteriliza por filtración (millipore 0.22 micras) conservándose en congelación a -20°C y envasándose en volúmenes de 5 ml. quedando 5,000 g. en 1 ml.

7.- Suero Fetal Bovino**

Este suero fue adquirido en forma líquida y se mantuvo congelado a -20°C .

Antes de usarse fue inactivado en baño maría a 56°C . durante 30 minutos. Se dejó a temperatura ambiente y posteriormente se conservó en refrigeración a 4°C .

8.- Medio de Crecimiento.

Medio BHK-21 80%

Suero fetal bovino 10%

Caldo de triptosa fosfatada 10%

Penicilina 50 U.I./ml.

Estreptomina 50 U.I./ml.

* Sigma Chemical Company. Division of Sigma International L.T.D.
P.O. Box 14508, St. Louis, MO. 63178. U.S.A.

** Flow Laboratories. New York.

9.- Medio de Mantenimiento.

Medio BHK-21 98.00%

Suero fetal bovino 2.0%

Penicilina 50 U.I./ml.

Estreptomina 50 mg/ml.

MÉTODOS

En la preparación de los cinco conjugados que se utilizaron en este estudio se usaron cinco distintos sueros hiperinmunes con distinta procedencia como sigue:

1. Suero Hiperinmune de caballo del Instituto Nacional de Higiene No. 73.
2. Suero Hiperinmune de caballo del Instituto Nacional de Higiene No. 84.
3. Suero Hiperinmune de mula, del Instituto Butantan, lote R-366-128.
4. Suero Hiperinmune de mula, del Instituto Butantan, lote R-366-128.

5. Suero Hiperimmune de caballo, Instituto Nacional de Higiene No. 51.

Preparación del conjugado para peroxidasa de rdbano.

Procedimiento para preparación de Gama Globulinas.

1. Medir 5 ml. de suero immune y ponerlo en un vaso de precipitado pequeño. Poner el vaso sobre un agitador magnético en la heladera.
 - a) En un periodo de aproximadamente 2 minutos, agregar al suero que se está agitando el mismo volumen de solución saturada de sulfato de amonio.
 - b) Agitar la mezcla durante una hora.
2. Centrifugar la mezcla a 3,000 r.p.m, durante 15 minutos y descartar el sobrenadante.
3. Disolver el precipitado con agua destilada en la mitad del volumen descartado. Reprecipitar con un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio.

4. Centrifugar nuevamente el precipitado a 3,000 r.p.m. durante 15 minutos y descartar el sobrenadante.
5. - Resuspender el precipitado, en un volumen de agua destilada -- igual a la mitad del volumen original de suero (2.5 ml.).
6. Esta solución de globulinas se puso en un saco membrana de --- didlisis al que se le ató una barra magnética. Las globulinas-- se dializaron contra un litro de solución fosfatada fría sobre un agitador magnético, en refrigeración.

Cambian la solución fosfatada cada 4 horas y después a la solu-- ción salina. Controlar si la didlisis se ha completado, mez--- clando en un tubo de ensayo, partes iguales de solución salina y solución de cloruro de bario. La didlisis se ha completado - cuando no se forma precipitado de sulfato de bario.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Método de Biuret para determinación de proteínas.

Reactivo de Biuret.

1. Solución saturada de hidróxido de sodio. Agitar 110 g. de hi-- dróxido de sodio en 100 ml. de agua destilada, usando un fras-

co de 300 ml. y dejando que los carbonatos sedimenten durante varios días, sin agitar el precipitado.

Llevar 92 ml. de esta solución a 300 ml. usando agua destilada. Agregar 100 ml. de una solución al 1% de sulfato de cobre. Conservar en una botella con tapa bien ajustada, pudiendo mantenerse a temperatura ambiente durante varios meses. La aparición de un precipitado ligero no afecta al reactivo.

2. Construcción de la curva Patrón,

Se hizo de la siguiente manera:

- a) Solución estándar de Albúmina bovina en 1 ml. H_2O bidestilada y deionizada adicionando 10 mg. de albúmina fracción V.
- b) Se procedió a hacer el estándar de albúmina bovina y se les adicionó a cada tubo 4 ml. de reactivo de Biuret como se ilustra en el cuadro No. 1. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se procedió a leer en el espectrofotómetro a 560 m μ , ajustando a cero con el blanco; la curva patrón se construyó tomando en cuenta la densidad óptica que proporciona una muestra en la cual la concentración de proteínas es conocida, para posteriormente poder determinar la concentración de una muestra problema.

CUADRO No. 1

Preparación de soluciones estándar de Albúmina bovina mediante el método de Biuret para la determinación de proteína.

| TUBOS | ESTANDAR Sol. Albúmina | H ₂ O en ml. | BIURET 4.0 ml | CANTIDAD de albúmina |
|-------|---------------------------|----------------------------|------------------|-------------------------|
| 1 | 0 | 1 | " | 0 |
| 2 | 0 | 1 | " | 0 |
| 3 | 0.1 | 0.9 | " | 1 mg. |
| 4 | 0.2 | 0.8 | " | 2 " |
| 5 | 0.3 | 0.7 | " | 3 " |
| 6 | 0.4 | 0.6 | " | 4 " |
| 7 | 0.6 | 0.4 | " | 6 " |
| 8 | 0.8 | 0.2 | " | 8 " |
| 9 | 1.0 | 0 | " | 10 " |

| TUBOS PROBLEMA | Diluciones Muestra Problema | H ₂ O | BIURET |
|-------------------|--------------------------------|------------------|--------|
| 10 | sin diluir 1/1 | 1 | 4.0 |
| 11 | 1/3 | 1 | 4.0 |
| 12 | 1/9 | 1 | 4.0 |
| 13 | 1/27 | 1 | 4.0 |

CONJUGADOS

*Procedimiento para la conjugación de la peroxidasa de rábano -
Gama-Globulina*

1. *Pesar 50 mg. de peroxidasa de rábano y 50 mg. de gama globulina.*
2. *Disolver los materiales mencionados en 2 ml. de buffer 0,5 M - carbonato a un pH a 10.5 (se usó p.H 10.0)*
3. *A la mezcla anterior añadir 0.25 ml. de solución de p.p. de -- fluoro-m-m dimetildifenil sulfona,*
4. *Agitar lentamente a 4°C durante 4 horas, la reacción de conjugación se completa y durante este tiempo la mezcla se dializa durante 2 a 3 días contra un buffer fosfatado de 0.05 M a un pH 7.2 Este buffer puede ser fosfatada salina 0.05 M a un p.H- 7.2 de 4.5% de sacarosa; Usamos buffer fosfatado salino.*

El anticuerpo marcado con la enzima y el anticuerpo no reaccionante pueden ser separados de la peroxidasa no reaccionante por -- precipitación con una cantidad igual de solución saturada de sulfato-

Método "A" para dianinobencidina.

Se probaron a distintos tiempos a saber: 10', 15', 20', 25', 30', 40', 50' y 60 minutos, en el tiempo variable para diaminobencidina; antes de teñir se fijó en acetona fría durante 10 minutos o al 10% de formalina fosfatada, o en alcohol etílico absoluto, -- etc. (secar al aire).

1. En las laminillas ya sea de cultivo de células o impresiones, se depositan 1 o 2 gotas de anticuerpos marcados durante 30 minutos de la reacción, a temperatura ambiente.
2. Lavar en tres cambios por 10 minutos en solución salina fosfatada.
3. Fijar con formol al 5% por 10 minutos.
4. Lavar en cambios durante 10 minutos en solución salina fosfatada.
5. Incubar a temperatura ambiente una solución saturada de 3,3 diaminobencidina, base libre. (-20 a 30 mg./100 ml.)
Colocar en un buffer de tres de 0.05 M a un p.H. 7.6 durante 30 minutos.

6. *Tiempo variable: Incubar a temperatura ambiente una solución saturada de 3,3 diaminobencidina base libre. (20 a 30 mg./100 ml.) Colocar en un buffer de tris de 0.05 M a un p.H 7.6 con 0.001% de piróxido.*
7. *Lavar en 3 cambios en H₂O destilada por 10 minutos.*
8. *Poner en las laminillas de 1 a 2 gotas de solución al 2% de Tetraóxido de Osmio durante 10 minutos.*
9. *Lavar en H₂O destilada durante 10 minutos en tres cambios.*

Método "B" para pirogalol.

Como tiempo variable se probó para pirogalol a 10", 15", -- 30" segundos, 1', 5', 10', 30 minutos y antes de teñir se fijó en acetona fría durante 10 minutos o al 10% de formalina fosfatada o en alcohol etílico absoluto etc. (secar al aire).

1. *En las laminillas ya sea de cultivo de células e impresiones, se depositan 1 o 2 gotas de anticuerpos marcados, durante 3 horas de reacción, a temperatura ambiente.*

2. Lavar en tres cambios con solución salina bufferada, fosfatada.
3. En el tiempo variable preparar a temperatura de 20°C, la siguiente reacción.
 - a) 2.0 ml. de pirogalol al 5% de una preparación fresca en agua -- destilada.
 - b) 1.0 ml. de H₂O al 01,47 M en una preparación fresca diluyendo - 1.61 ml. de peróxido de hidrógeno al 30% y aforar a 100 ml. --- H₂O destilada.
 - c) 2,0 ml. de buffer fosfatado de pH 6.0
 - d) 14 ml. H₂O destilada por último.
4. El tiempo variable que se probó a temperatura ambiente fue de 10, - 15, 30 segundos y 1, 5, 10 y 30 minutos. Se incubaron las prepara- ciones.
5. Lavar en tres cambios con solución salina bufferada, fosfatada.
6. Secar al aire.

Tanto para diaminobencidina como para pirogalol.

 - 1.- Se montaron en laminillas con elvanol.
 - 2.- Se montaron con bálsamo de Canadá y se procedió a su observa- ción en el microscopio simple.

III. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentan ilustrados en doce cuadros. Los diez primeros se refieren a los métodos "A" y "B", que corresponden a las tinciones con Diaminobencidina y Pirogalol, respectivamente.

En los últimos cuadros (11 y 12) se presenta un resumen general de los resultados obtenidos.

Como puede observarse en los distintos cuadros presentados (1-10), los testigos sin conjugado y sin colorantes, siempre dieron resultados negativos y en los resultados positivos, a los cuales se aplicó un tiempo óptimo, se encontraron productos de reacción antígeno-anticuerpo, enzima-colorante.

Posteriormente al determinar el tiempo óptimo para localizar los productos de la reacción se observó lo siguiente:

- a) Que para el método "A" (Diaminobencidina), los mejores resultados se obtuvieron a los 30 minutos de reacción con el conjugado, siendo el tiempo variable de la tinción de 15 a 20 minutos.

b) Para el método "B" (con pirogalol) se obtuvieron los mejores resultados a las tres horas de la reacción con el conjugado y a los 15-30 segundos de la coloración.

CUADRO No. 1

Resultados obtenidos con el conjugado No. 1 y con diaminobencidina como substrato de la peroxidasa teniendo como estratos de células infectadas e impresiones de cerebros positivos y negativos a rabia.

| Testigos preparaciones en impresiones y cul- tivos celulares | Tiempo de la reacción en minutos | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 5' | 10' | 15' | 20' | 25' | 30' | 40' | 50' | 60' |
| Con conjugado Muestra positiva | - | + | ++ | +++ | + | + | - | - | - |
| Con conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin diaminobencidina Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin diaminobencidina Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de las laminillas según su especificidad.

- + Regular
- ++ Bueno
- +++ Muy bueno
- Negativo

Nota: Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.
Suero de Caballo utilizado del, I.N.H., No. 73.
Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con resultados positivos.

CUADRO No. 2

Resultados obtenidos con el conjugado No. 2 y con diamino-bencidina como sustrato de la peroxidasa teniendo monoes-tratos de células infectadas e impresiones de cerebros po-sitivos y negativos a rabia.

| Testigos preparaciones en impresiones y cul- tivos celulares | Tiempo de la reacción en minutos | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 5' | 10' | 15' | 20' | 25' | 30' | 40' | 50' | 60' |
| Con conjugado muestra positiva | - + | + | ++ | - + | - + | - + | - + | - | - |
| Con conjugado muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin diaminobencidina Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin diaminobencidina Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de laminillas según su especificidad,

- + Regular
- ++ Bueno
- +++ Muy Bueno
- Negativo

Nota: Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.
Suero de caballo utilizado, del I.N.H. No. 84

Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con resul-tados positivos.

CUADRO No. 3

Resultados obtenidos con el conjugado No. 3 y con Diaminobencidina como substrato de la peroxidasa teniendo monoestratos de células infectadas e impresiones de cerebros positivos y negativos a rabia!

| Testigos Preparaciones teñidas en impresiones y cultivos celulares | Tiempo de la reacción en minutos | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | 5' | 10' | 15' | 20' | 25' | 30' | 40' | 50' | 60' | |
| Con conjugado Muestra positiva | - | ++ | +++ | ++ | + | - | + | - | - | - |
| Con conjugado Muestra Negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin diaminobencidina Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin diaminobencidina Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de laminillas según su especificidad.

+ Regular

++ Bueno

+++ Muy Bueno

- Negativo

Nota:- Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.
Suero de mula utilizado, del Instituto Butantan.
Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con resultados positivos.

CUADRO No. 4

Resultados obtenidos con el conjugado No. 4 con Diaminobencidina como substrato de la peroxidasa tiñendo monoes-tratos de células infectadas e impresiones de cerebros - positivos y negativos a rabia.

| Testigos Preparación teñida en impresiones y cultivos celulares. | Tiempo de la reacción en minutos | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 5' | 10' | 15' | 20' | 25' | 30' | 40' | 50' | 60' |
| Con conjugado Muestra positiva | - + | + | +++ | +++ | + | - + | - | - | - |
| Con conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin diaminobencidina Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin diaminobencidina Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de laminillas según su especificidad,

- + Regular
- ++ Bueno
- +++ Muy Bueno
- Negativo

Nota: - Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.
Suero de mula utilizado, del Instituto Butantan
Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con
Resultados positivos.

CUADRO No. 5

Resultados obtenidos con el conjugado No. 5 con Diaminobencidina como sustrato de la peroxidasa teniendo monoes-tratos de células infectadas e impresiones de cerebros - positivos y negativos a rabia:

| estigos reparación teñida n impresiones y ultivos celulares. | Tiempo de la reacción en minutos | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | 5' | 10' | 15' | 20' | 25' | 30' | 40' | 50' | 60' | |
| on conjugado uestra positiva | - | + | ++ | +++ | - | + | - | - | - | - |
| on conjugado uestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| in conjugado uestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| in conjugado uestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| in diaminobencidina uestra positiva | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| in diaminobencidina uestra negativa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

alificación de laminillas según su especificidad.

+ Regular

++ Bueno

+++ Muy Bueno

- Negativo

ota: - Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.

Suero de caballo utilizado, del I.N.H. No. 51

Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con resul-tados positivos.

CUADRO No. 6

Resultados obtenidos con el conjugado No. 1 y con pirogalol como sustrato de la peroxidasa, teniendo monoestratos de células infectadas e impresiones de cerebros positivos y negativos a rabia.

| Testigos Preparación teñida en impresiones y cultivos celulares | Tiempo de la reacción en minutos y segundos | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----|-----|----|----|-----|-----|
| | 10" | 15" | 30" | 1' | 5' | 10' | 30' |
| Con conjugado Muestra positiva | + | +++ | ++ | + | +- | - | - |
| Con conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin Pirogalol Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin Pirogalol Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de las laminillas según su especificidad.

- + Regular
- ++ Bueno
- +++ Muy Bueno
- Negativo

Nota: - Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.
Suero de Caballo utilizado, del I.N.H. No. 73
Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con resultados positivos.

CUADRO No. 7

Resultados obtenidos con el conjugado No. 2 con pirogalol como substrato de la peroxidasa, teniendo monoestratos de células infectadas e impresiones de cerebros positivos y negativos a rabia.

| estigos reparaciones en mpresiones y cul- tivos celulares | Tiempo de la reacción en min. y seg. | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| | 10" | 15" | 30" | 1' | 5' | 10' | 30' |
| on conjugado uestra positiva | + | +++ | ++ | + | + - | - | - |
| on conjugado uestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| in conjugado uestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| in conjugado uestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| in pirogalol uestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| in pirogalol uestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de laminillas según su especificidad.

+ Regular

++ Bueno

+++ Muy Bueno

- Negativo.

Nota: - Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.

Suero de caballo utilizado, del I.N.H. No. 84

Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con resultados positivos.

CUADRO No. 8

Resultados obtenidos con el conjugado No. 3 con pirogalol como substrato de la peroxidasa, teniendo monoestratos de células infectadas e impresiones de cerebros positivos y negativos a rabia!

| Testigos Preparación teñida e n impresiones y cultivos celulares | Tiempo de la reacción en min. y seg. | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| | 10" | 15" | 30" | 1' | 5' | 10' | 30' |
| Con conjugado Muestra positiva | + | ++ | +++ | + | - + | - | - |
| Con conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin pirogalol Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin pirogalol Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de laminillas según su especificidad,

- + Regular
- ++ Bueno
- +++ Muy Bueno
- Negativo

Nota: Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.

Suero de mula utilizado, del Instituto Butantan
Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia, con resultados positivos.

CUADRO No. 9

Resultados obtenidos con el conjugado No. 4 con Pirogalol como sustrato de la peroxidasa, teniendo monoestratos de células infectadas e impresiones de cerebros positivos y negativos a rabia.

| Testigos Preparación teñida en impresiones y cultivos celulares | Tiempo de la reacción en min. y seg. | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----|-----|----|----|-----|-----|
| | 10" | 15" | 30" | 1' | 5' | 10' | 30' |
| Con conjugado Muestra positiva | ++ | ++ | +++ | + | + | - | - |
| Con conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin pirogalol Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin pirogalol Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de laminillas según su especificidad.

- + Regular
- ++ Bueno
- +++ Muy Bueno
- Negativo

Nota: Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético.

Suero de mula utilizado, del Instituto Butantan
Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con resultados positivos.

CUADRO No. 10

Resultados obtenidos con el conjugado No. 5 con Pirogalol como substrato de la peroxidasa, teniendo monoestratos de células infectadas e impresiones de cerebros positivos y negativos a rabia.

| Testigos Preparación teñida en impresiones y cultivos celulares | Tiempo de la reacción en min. y seg. | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----|-----|----|----|-----|-----|
| | 10" | 15" | 30" | 1' | 5' | 10' | 30' |
| Con conjugado Muestra positiva | + | ++ | ++ | + | - | - | - |
| Con conjugado Muestra Negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin conjugado Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin pirogalol Muestra positiva | - | - | - | - | - | - | - |
| Sin pirogalol Muestra negativa | - | - | - | - | - | - | - |

Calificación de laminillas según su especialidad,

+ Regular

++ Bueno

+++ Muy Bueno

- Negativo

Nota: Se tomaron 5 muestras y se obtuvo su promedio aritmético

Suero de caballo utilizado del I.N.H. No. 51

Se realizó primero una prueba de Inmunofluorescencia con resultados positivos.

CUADRO No. 11

Resumen de los resultados obtenidos con los cinco conjugados empleando diaminobencidina como substrato para la reacción enzimática de la peroxidasa, Método "A".

| Conjugados | Tiempo óptimo variable | Sin conjugado | Sin diaminobencidina |
|-------------|------------------------|---------------|----------------------|
| Conj. No. 1 | 20 minutos | Negativo | Negativo |
| Conj. No. 2 | 15 minutos | Negativo | Negativo |
| Conj. No. 3 | 15 minutos | Negativo | Negativo |
| Conj. No. 4 | 15-20 minutos | Negativo | Negativo |
| Conj. No. 5 | 10-15 minutos | Negativo | Negativo |

CUADRO No. 12

Resumen de los resultados obtenidos con los cinco conjugados empleando pirogalol como substrato para la reacción - enzimática de la peroxidasa. Método "B".

| Conjugados | Tiempo variable óptimo. | Sin Conjugado | Sin diaminó ben- cidina. |
|-------------|----------------------------|---------------|-----------------------------|
| Conj. No. 1 | 15 segundos | Negativo | Negativo |
| Conj. No. 2 | 15 segundos | Negativo | Negativo |
| Conj. No. 3 | 30 segundos | Negativo | Negativo |
| Conj. No. 4 | 30 segundos | Negativo | Negativo |
| Conj. No. 5 | 15-30 segundos | Negativo | Negativo |

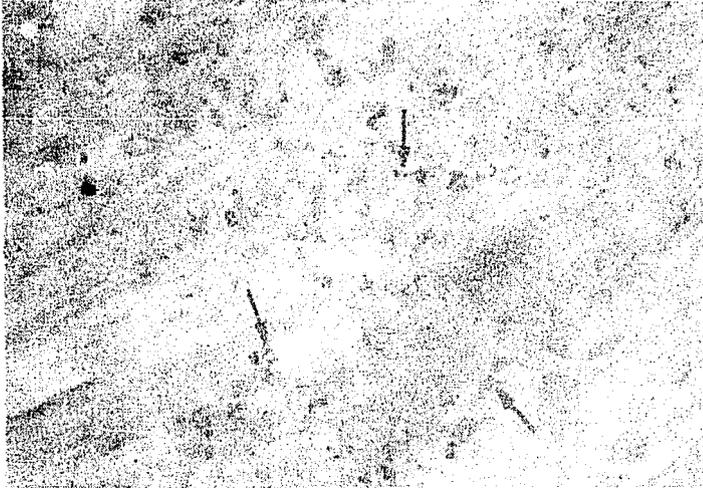


FOTO 1

Laminilla en cultivo de células

Filtros UG 138 azul

BG Naranja

Inersión 100 x 1—1

Las flechas indican

- 1) *Núcleo libre de inclusiones alrededor de este corpúsculo de Inclusión.*
- 2) *Células sin infectar*
- 3) *Inespecificidad.*

Teñidas con diamino bencidina

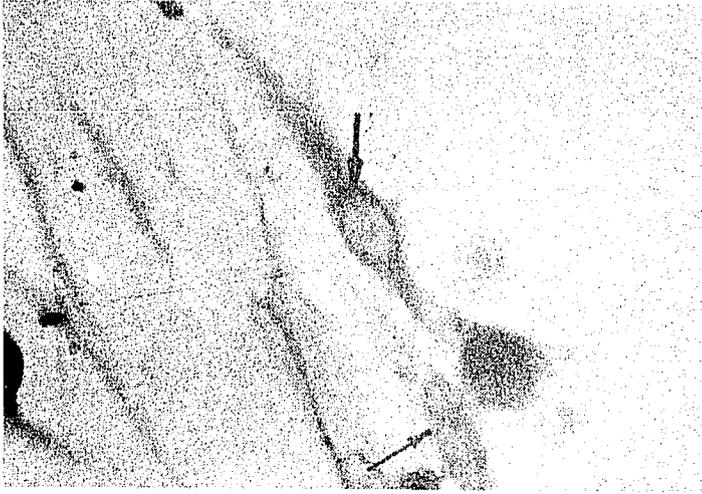


FOTO 2

Laminilla en cultivo de células

Filtros UG 138 azul

BG naranja

—|— 40x

La flecha indica corpúsculos múltiples.

Teñidas con diamino bencidina

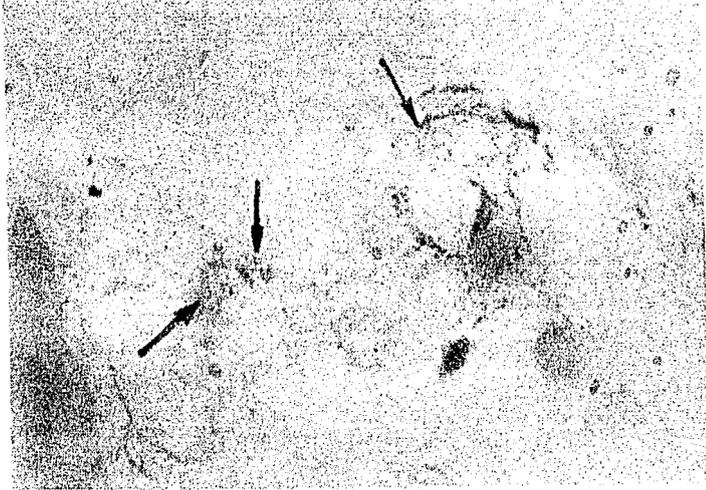


FOTO 3

Laminilla en Impresiones

Filtros UG 138 azul

BG naranja

 25x

Las flechas indican corpúsculos de Inclusión

Teñidas con bencidina

IV. DISCUSIONES

Los métodos empleados en el presente trabajo, con la finalidad de ser utilizados en el diagnóstico de laboratorio de la rabia -- por medio del sistema de la inmunoperoxidasa dieron buenos resultados..

Como puede notarse en los cuadros 11 y 12 del capítulo de resultados, los tiempos óptimos de incubación con el substrato, tanto en el caso de la diaminobencidina como con el pirogalol, no son iguales con los diferentes conjugados. El hecho de que existan tiempos -- óptimos, variables con los diferentes conjugados hacen indispensable una determinación de tiempo óptimo para cada conjugado nuevo que se prepare.

En el método A, en el que se empleó la diaminobencidina como substrato enzimático, los resultados obtenidos con los diferentes conjugados se presentan en los cuadros 1, 2, 3, 4 y 5 y se resumen en el cuadro 11. Con el primer conjugado el tiempo óptimo de reacción -- fue de 20 minutos y con el 2º y 3º de 15. El tiempo óptimo se determinó con base en un alto grado de especificidad. El grado de tinción es específica aumenta con el tiempo, como puede apreciarse en los cuadros-

1, 2, 3, 4 y 5. Se observó asimismo que aumentando el tiempo de la -- reacción la tinción inespecífica aumentaba hasta hacer imposible la - lectura de las laminillas positivas y para fines prácticos indiferen- ciables de las negativas. En los tiempos óptimos anotados en el cua-- dro 11 se obtuvo un alto grado de especificidad en las laminillas po- sitivas, en tanto que las preparaciones que se dejaron como control - sin conjugado o sin diaminobencidina, así como las laminillas negati- vas, los resultados fueron uniformemente negativos.

La reacción con la diaminobencidina deja un producto de re- acción también incoloro, pero osmiofílico y es necesario revelar la - posición del producto de reacción mediante una tinción con ácido ósmi- co. Algunas estructuras celulares normalmente son osmiofílicas como - es el caso de la cromatina en algunas fases del ciclo celular (vease- foto 3) y por otra parte el citoplasma se tiñe ligeramente con el --- ácido ósmico. Es decir el grado de dificultad en la lectura de las la- minillas es comparable a las dificultades que un inexperto encuentra- en las impresiones del cerebro teñidas con colorante de Seller. Exis- te también el aspecto técnico de la preparación de laminillas para su examen; Por tratarse de una reacción enzimática es necesario mantener en todo momento las condiciones de pH, osmolaridad y temperatura ---- [20°C] óptimas para que la reacción enzimática ocurra. Es una técni- ca que implica una secuencia más o menos compleja, de eventos a se--- guir.

En el método B, en el que se empleó el pirogalol es una técnica nueva que se desarrolló para la presente tesis. Esta técnica basada en la capacidad de la peroxidasa del rábano picante (raíz fuerte) - en transformar el pirogalol en purpurogalina, es decir en transformar a una molécula incolora (pirogalol) en un pigmento (purpurogalina). -- Los tiempos óptimos de reacción son considerablemente más cortos que los de la técnica con diaminobencidina, ya que la reacción es considerablemente más rápida. Los tiempos óptimos con los diferentes conjugados se presentan en el cuadro No. 12 y fueron en promedio de 15 a 30 segundos. Esta técnica también dió un alto grado de especificidad ya que no se observaron falsos positivos, en los testigos.

El uso del pirogalol, con el producto de reacción purpurogalina a pesar de su nombre no es de color púrpura sino roja y además el color es débil. A las concentraciones usadas en este trabajo experimental y bajo las condiciones de la reacción dió una coloración rosada pálida a los corpúsculos de inclusión, que inclusive fue imposible fotografiar. Cabe aclarar que las concentraciones usadas de pirogalol fueron bajas y no es una técnica que implique una secuencia compleja de pasos a seguir. La reacción es rápida y el riesgo de inespecificidad aumenta por un exceso de incubación. Lo que resulta útil ya que el --- producto de reacción, en este caso la purpurogalina, que es de molécula pequeña y liposoluble puede ser lavado de los tejidos en el proceso

de deshidratación de las muestras. Es decir que la muestra es sometida a un proceso corto y esto pudiera ser una ventaja de la técnica. El problema de esta técnica estriba en que a pesar de las ventajas evidentes, el contraste obtenido en las preparaciones es muy bajo.

El interés de trabajar con las técnicas de diagnóstico de la infección rábica por el método de la inmunoperoxidasa, es doble. En primer término se intenta proporcionar a los laboratorios regionales de la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico, una técnica que no use un equipo costoso como es el microscopio de fluorescencia y que les permita usar el microscopio simple con que cuentan para el inmunodiagnóstico de la rabia.

En segundo término consideramos que otro aspecto de interés de la técnica de inmunoperoxidasa estriba en el hecho de que el ácido ósmico es un colorante para microscopía electrónica que se fija preferentemente en los sitios de localización antigénica y esto podrá ser de suma utilidad para estudios de patogénesis de la rabia en animales infectados y para otros estudios. Esta posibilidad de empleo de la inmunoperoxidasa, no fue explorada en el presente trabajo.

Como nota de precaución se debe indicar que el empleo del ácido ósmico no es algo que pueda hacerse a la ligera. Independiente--

de que es un reactivo sumamente caro, (junto con el oro platino y el iridio se encuentra al osmio entre los metales preciosos) el ácido ósmico es un fijador eficiente en estado gaseoso. Un descuido en su uso puede fijar las células de la conjuntiva y del epitelio respiratorio del operador. La manera de usarlo es en una campana de extracción de las usadas en química y con sumo cuidado.

FE DE ERRATAS

| PAG. | DICE | DEBE DECIR |
|------|-------------------|-------------------|
| 1 | NEUROMAS | NEURONAS |
| 2 | CARACTERIZA | CARACTERIZAN |
| 2 | FARIGEOS | FARINGEOS |
| 3 | ESPECIFICAS | ESPECIFICOS |
| 4 | NEUCOMOCOCO | NEUMOCOCO |
| 6 | HEMAGLUTINACION | HEMOAGLUTINACION |
| 17 | DECRECOMIENTO | DE CRECIMIENTO |
| 29 | ESPECTROFOTOMETRO | ESPECTROFOTOMETRO |
| 33 | TRES | TRIS |
| 56 | INMYNOPEROXIDASA | INMUNOPEROXIDASA |

V. CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados obtenidos en el presente estudio, nos indican que tanto el método de la Inmunoperoxidasa-Diaminobencidina como el de la Inmunoperoxidasa-Pirogalol, pueden ser útiles para el diagnóstico de la rabia.
- 2.- Los resultados obtenidos con la diaminobencidina fueron satisfactorios, pero no se considera por el momento que sea una técnica fácil de realizar en laboratorios de diagnóstico en substitución de la inmunofluorescencia.
- 3.- Los resultados obtenidos con el pirogalo, aún teniendo algunas ventajas en cuanto a costo y tiempo óptimo de reacción, no dan suficiente contraste en las preparaciones para constituir un método práctico y es necesario refinar la técnica.
- 4.- Independientemente del método de coloración que se emplee, es necesario determinar el tiempo óptimo de reacción para cada conjugado que se prepare.

BIBLIOGRAFIA:

1.- ABELSETH, M. K.

"Attenuated Rabies Vaccine For domestic animals produced in tissue culture. Vet. J., 5:279, (1964)

2.- ABELSON, H.T.; SMITH, G.H; HOFF H.A. and ROWE, W.P.

The Immunoperoxidase Technique: Localization of vital antigens in cells Methods in Virology Vol. V.

Academic Press, New York and London. P. 423-442 (1971)

3.- CASALS, J.

Immunological Techniques for animal viruses.

In "Methods in virology" (K. Maramoroch and H. Koprowski, eds.)

Vol. III, Academic Press, New York. pp. 113-198 (1967).

4.- COONS, A.H.; GREECH, H.J.; JONES, RN; BERLINER E.

"The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody, J. Immunol; 45:159. 170 (1942),

5.- COONS, A.H; KAPLAN, M.H.

Localization of antigen in tissue cells.

II. Improvements in methods of the detection of antigen by means of fluorescent, antibody. *J. Exper. Med.*; 91:1-13 (1950).

6.- CRUZ ISLAS H. DE LA

Análisis comparativos de mil historias clínicas de animales afectados de rabia y animales sospechosos (bovinos y perros). Tesis de Médico Vet. Zoot. Biblioteca de la Facultad de Medicina Vet. y Zoot. (1973).

7.- DALES, S; GOMATOS, P.J; and Hsu, K.C.

Techniques of ferritin-Tagged Antibodies.

In "Methods in virology" (K Maramorosh and H. Koprowski, eds.) Vol. V Academic Press, New York and London P. 443-452 (1971).

8.- DE LERMA., B.

"Handbuch der Hislochemie"

(W. Graumann and K. Neumann; Eds.)

Gustav Fisher Verlag, Stuttgart. p.78 (1958).

9.- DIXON. M; and WEBB, E.C.

"Enzymes 2 nd, ed; Academic Press, New York. p. 950 (1964).

10.- FRASER, K.B.

Immunological Tracing; Viruses and Rickettsiae

In "Fluoresceint Protein Tracing".

(R.C.Nairn, ed.) E. And Livingstone, Ltd;

Edinburg and London p, 192-231 [1969]

11.- GREECH, H,J,JONES, R.N.

The conjugation of horse serum albumin with isocyanates of certain polynuclear aromatic hydrocarbons J. Amer. Chem. Soc. 63:1661-1669 [1941]

12.- HALONEN, P.E. MURPHY, F.A. FIELDS, U.N. and REESE D.M.

"Hemagglutinin of Rabies and Some other bullet shapad Viruses"
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 127; 1037. (1968).

13.- HOPKINS, S.J; WORWALL, A;

"Phenyl isocyanate protein compounds and their immunological reactions. J. Biochem., 27:740-753 [1933]

14.- HOWE, C., MORGAN, C., and Hsu., K.C.

Recent Virologic Applications of ferritin conjugates.
Prog. Med. Virol. 11, 307. [1965];

15.- KUWERT E; WIKTOR, T,j., SOKOL, F. y KOPROWSK, H.

Haemagglutination and Haemogglutination Inhibition test.

Laboratory techniques in Rabies Eds. by M. Kaplan M, and H. Koprowsky WHO Geneva p.135-146 (1973).

- 16.- Le DUC, H.E., WICKER, R; AVRRAMEAS, S., and BERNHARD, W.
 "Ultrastructural localization of antibody indifferentiating plasma cells. *J. Gen. Virol.* 4,609. (1969).
- 17.- LEPINE P.
 Gel-Diffusion techniques. *Laboratory techniques in Rabies.* Edited by Kaplan M. M. and H. Koprowski. W.H.O. Geneva. 151-157. (1973),
- 18.- MORGAN, C. RIFKIND R.A., and ROSE, H.M.
 The use of Ferritin-conjugated antibodies in electron microscopic, studies of influenza and vaccinia viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27,57, (1960).
- 19.- MARTELL, D. BATALLA, D. BAER, J;
 Estudios de inmunofluorescencia de diferentes segmentos de encefalos de bovinos muertos de rabia parálitica o Derriengue en -- forma natural e inoculados experimentalmente. *Técnica Pecuaria-en México* No. 12-13 pág. 28-32, Enero a Julio (1969).

- 20.- NAIR, R.C.
"Fluorescent Protein Tracing" 3 ed. Ed, E & S. Lovingsstone Ltd,
Edinburgh and London p. 502 (1969)
- 21.- NEGRI A.
Beitrag zum studium desaetiologie dertollurth.
Z. Hyg. Infektionskr. 43:507 (1903).
- 22.- PEARSE, A.G.E.
"Hislochemistry ; Theoretical and Applied";
Churchill, London. p. 998 (1961).
- 23.- PASTEUR, L;
Lillre sur La rege. Ann Inst. Pasteur (Paris)
p. 1:1 (1887).
- 24.- SPENDLOVE, R.S.
Microscopic Technique;
In "Methods in Virology" (K. Maramorosch, and H. Koprowski eds.)
Vol. III, Academic Press, New York. p. 475-520 (1967).
- 25.-- SAUNDERS. B.C. HOLMES-SIEDLE, A.G. and STARK, B.P.
"Peroxidase". Butterworth, London and Washington, D.C.
p, 271. (1964).

26.- SINGER, S.J.

"Preparation of an electron dense antibody conjugate".
Nature, London, p. 183, 1523 (1959).

27.- VILCHIS A.M.

Prueba de Seroneutralización curso teórico práctico sobre
 Laboratorio y Epidemiología de la Rabia por varios autores.
 Buenos Aires. p. 24-32. (1965).

28.- VILLEMOT, J.M. y PROVOST. A.

Precipitación spécifique du virus rabique en milieu gelifié
 selon la méthode d' Oudin; Ouchterlony (Technique de Mansini)
C.R. Acad. Sci. Paris, 246:2694, (1958).

29.- WIKOR, T.J.; KOPROWSI, H. y DIXON, F.J.

"Radioimmunoassay Procedure for Rabies Binding Antibodies"
J. Immunol.; 103-464, (1972).

30.- ZINK. G.G.;

Neue ansichten der Hundswuth, In nerusachen und forlgen, nebst
 einer sicheran behandlungsart der von tollten lieren gobissen
 mensch en für arzte und nichtarzte bestimmt. C.E. Gabler
 Publisher, Hehna, 16:212 (1804).