

Wright in Bull. W.H.O. 20(4) 532-539, 1959

## COLORACION CON ANTICUERPOS FLUORESCENTES DE ANTIGENOS DE VIRUS DE LA RABIA EN LAS GLANDULAS SALIVALES DE ANIMALES RABIOSOS\*

R. A. GOLDWASSER†

R. E. KISSLING, T. R. CARSKI

*Centro de Enfermedades Transmisibles, Servicio de Salud Pública, Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de Estados Unidos, Montgomery, Ala., Estados Unidos*

T. S. HOSTY

*Director de Laboratorios, Departamento Estatal de Salud Pública, Montgomery, Ala., Estados Unidos*

Se ha informado de que las técnicas de anticuerpos fluorescentes pueden utilizarse para colorear antígenos de virus de la calle y de virus fijo en los cerebros de ratones infectados experimentalmente (1). Se indicó también que las mismas técnicas podían utilizarse para descubrir antígenos de rabia en las glándulas salivales de animales infectados. Son evidentes las ventajas de estos procedimientos, si resultan dignos de confianza en grado suficiente para decidir sobre la vacunación consecutiva a la exposición a animales sospechosos de rabia.

El presente informe amplía el informe preliminar relativo a la coloración de antígenos de virus en las glándulas salivales de animales rabiosos y presenta los resultados de un estudio de campo en tejidos presentados para el diagnóstico de rabia en el estado de Alabama, durante un período de cinco meses.

### MATERIALES Y METODOS

#### *Antisueros y rotulación*

Los antisueros utilizados para producir conjugados fueron sueros antirrábicos de origen equino (Lederle). Estos sueros se diluyeron directamente en una solución salina isotónica a la que se añadió estabilizador ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  0,5 M) en una proporción de una parte de estabilizador por 9 de suero

\* Publicado en inglés en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 20, No. 4, 1959.

† Dirección actual: Jefe del Departamento de Virología y Director Científico Adjunto, Instituto de Israel para Investigaciones Científicas, Ness-Ziona, Israel.

diluido. El total de solución salina y de estabilizador se ajustó en cada caso para obtener una concentración final de proteína de 2,5 %. La mencionada mezcla se enfrió en un baño de hielo y se le añadió isotiocianato de fluoresceína (2), proporcionado generosamente por el Baltimore Biological Laboratory, en forma de polvo, en una proporción de 1 mg. de isotiocianato de fluoresceína por 20 mg. de proteína. La mezcla se agitó durante toda la noche en frío, después de lo cual el conjugado se dializó a través de varios cambios de solución salina fría estabilizada con  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,01 M, pH 7,4-7,6) hasta que no se descubrió ninguna fluorescencia en el fluido dializante. La recuperación de proteína fue de 98 % aproximadamente, y la razón fluoresceína:proteína, determinada en la forma expuesta en otro lugar (3), osciló entre  $15 \times 10^{-3}$  y  $18 \times 10^{-3}$ . Los conjugados, antes de ser utilizados, se diluyeron en una solución salina que contenía proteína al 1 % y luego fueron absorbidos, una vez con polvo de hígado de ratón y otra, con polvo de cerebro de ratón (4).

#### *Suspensiones de cerebro de ratón*

Se prepararon suspensiones de cerebro de ratón normal (CRN) y de ratones infectados con cepa 11 CVS de virus rábico fijo (CRR). Una parte por peso de cerebro de ratón se homogeneizó en 4 volúmenes de yema al 10 % de huevos embrionados de 6 a 7 días en 0,05 M de agua estabilizada de fosfato de sodio, pH 7,6-7,8. Las suspensiones se centrifugaron a razón de 1.000 revoluciones por

minuto (r.p.m.) durante 10 minutos y se recogieron los sobrenadantes y se guardaron a la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Recolección y tratamiento de especímenes*

El material utilizado en este estudio consistió en especímenes sometidos para examen de rabia al Departamento de Sanidad del Estado de Alabama, Oficina de Laboratorios. En el laboratorio que recibía la muestra se examinaron frotis de cerebro para determinar la presencia de cuerpos de Negri. Se enviaron a Montgomery porciones de cerebro y de glándulas salivales en glicerol, y allí se trató de aislar el virus en el Laboratorio de Virus del Centro de Enfermedades Transmisibles y en el Laboratorio Central del Estado.

En cuanto se recibían las muestras, se trituraban con alundo estéril en agua estabilizada para formar una suspensión al 10 %. La suspensión se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante cinco minutos y el líquido sobrenadante de cada espécimen se inoculó en ratones por vía intracerebral. Las glándulas salivales de cada animal se dividieron en dos partes. Una de ellas se trató de manera similar a los especímenes de cerebro y se inoculó a ratones. Todos los ratones se tuvieron bajo observación durante 21 días y los que murieron durante este período fueron examinados para determinar la presencia de cuerpos de Negri. Sólo aquellos que mostraron las típicas inclusiones se consideraron infectados de rabia. En los casos en que fue indicado, se procedió a la titulación de virus mediante la inoculación intracerebral de ratones con diluciones seriadas décuples de la suspensión de glándula salival.

La otra porción de la glándula salival se utilizó para preparar frotis para la coloración con anticuerpos fluorescentes. Se cortaron de diversas regiones de cada glándula pequeñas porciones de tejido de un grosor de 2-3 mm. y se enjuagaron en dos cambios de solución salina estabilizada durante media hora o una hora para quitar la mayor parte del glicerol. Después de esta operación, se sacaron de la solución salina las porciones, se secaron en papel de filtro y se extendieron sobre por-

taobjetos de vidrio. Muchas glándulas no ofrecieron frotis satisfactorios al ser tratadas de esta manera, y más tarde se observó que si las porciones de glándula se dejaban secar en papel secante durante media hora o una hora, permitían generalmente obtener frotis de impresión satisfactorios. En todos los casos se hicieron frotis duplicados en cada portaobjetos y se prepararon de dos a seis portaobjetos de cada animal; para cada portaobjetos se utilizó un pedazo distinto de tejido.

#### *Frotis de impresión de cerebro de ratón*

Se prepararon frotis de impresión de cerebros de ratones infectados con virus de la calle para que sirvieran de testigo de los desconocidos del estudio experimental. Se sacrificaron ratones inoculados por vía intracerebral cuando presentaban signos definidos de la enfermedad; se les extrajeron los cerebros y se prepararon frotis de impresión a base de un corte transversal que abarcaba los hipocampos. Se hicieron dos frotis en cada portaobjetos. Los frotis muy ligeros dieron los mejores resultados, y se pudo preparar 50 o más portaobjetos de una sola sección de cerebro de ratón. Después de la fijación, estos portaobjetos se guardaron a la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . durante varios meses, sin que se alteraran sus cualidades de coloración.

#### *Fijación de los portaobjetos*

Ya se indicó que el método de fijación es muy importante para la coloración satisfactoria de los antígenos de rabia (1). Una ligera variación del método descrito anteriormente dio todavía mejores resultados. Los frotis de glándulas salivales y de cerebros de ratón se dejaron secar a la temperatura ambiente. Se colocaron en frascos de Coplin con acetona, a una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ . a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A las 4 horas de fijación, los portaobjetos se sacaron de la acetona, se escurrieron y se secaron sin sacarlos del congelador.

#### *Coloración de los portaobjetos*

En este trabajo se empleó exclusivamente el método de coloración directa de Coons y

Kaplan (5). Sobre cada portaobjetos se depositó un frotis con el conjugado, preparado en la forma antes descrita y diluido a razón de 1:5 en CRN, y el otro con el conjugado diluido a razón de 1:5 en CRR. Para evitar que las dos suspensiones se mezclaran en el portaobjetos, alrededor de cada frotis se trazó una línea de gelatina mineral disuelta en éter. Los portaobjetos se incubaron a la temperatura de 37°C. durante media hora en una cámara húmeda, se lavaron durante 10 minutos en dos cambios de solución salina estabilizada, se secaron y se montaron en glicerol estabilizado. En cada grupo de portaobjetos coloreados desconocidos se incluyó otro portaobjetos con cerebro de un ratón infectado con virus de la calle, que se preparó en la forma antes expuesta. Cuando se procedió a la coloración en la forma adecuada, el frotis del cerebro de control, tratado con conjugado diluido en CRN, mostró cuerpos brillantemente fluorescentes (Fig. 1) y de diversos tamaños, desde los apenas visibles, hasta otros cuyo diámetro era mayor de 20 $\mu$  (1), mientras que los frotis tratados con el conjugado diluido en CRR mostraron sólo la autofluorescencia azul-gris uniforme, normal en los tejidos no coloreados.

#### *Microscopía*

La luz que se utilizó para este trabajo fue una lámpara "Fluorex" de Reichert, provista de un filtro de vidrio Corning 5840. El microscopio utilizado estaba provisto de un objetivo de fluorita de inmersión en aceite

de 40  $\times$  (Bausch y Lomb), abertura 1,0, sin montura de corrección, y de un ocular de 10  $\times$ . Se utilizó como filtro ocular un filtro de vidrio Wratten 2B o Corning 3-73. Esta combinación de lentes permitió la visibilidad de partículas fluorescentes más pequeñas que las que se pueden ver en un objetivo de inmersión en aceite de 97  $\times$  y permitió también el examen de un campo del frotis mayor.

#### RESULTADOS

##### *Aspecto microscópico*

En el microscopio de fluorescencia se observó considerable variación del aspecto que presentaban los antígenos de rabia, así como el material que los rodeaba. Los elementos de tejido salival mostraron una tendencia a dar una alta autofluorescencia azul-gris. Por lo común, se observaron también diversas cantidades de residuos amorfos dispersos que presentaban un color tostado brillante o una autofluorescencia blanca (Fig. 2). En algunos casos se observaron *coccus* o bacterias en forma de baston que, con el conjugado utilizado, mostraron un grado de coloración desde débil hasta bueno. No obstante, cuando ocurría esta coloración, el conjugado diluido en CRR se coloreaba de la misma manera que el conjugado diluido en CRN, evitando así la confusión con los antígenos de rabia (1). También se encontró un pequeño grado de coloración no específica en algunos frotis de glándula, pero normalmente

FIG. 1.—*Frotis de impresión preparado con cerebro de ratón infectado en laboratorio.*

Las partículas fluorescentes verde-amarillas mayores corresponden a cuerpos de Negri. Las partículas fluorescentes verde-amarillas menores son también antígenos de rabia específicamente coloreados. Aumento: 370  $\times$ .

FIG. 2.—*Frotis de impresión preparado con glándulas salivales de perro rabioso.*

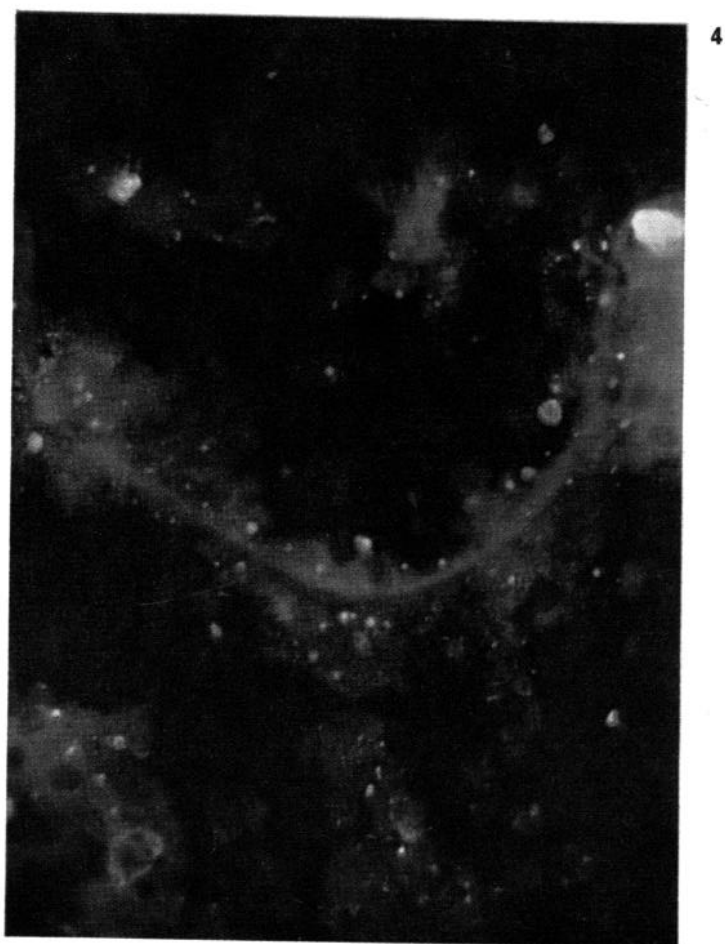
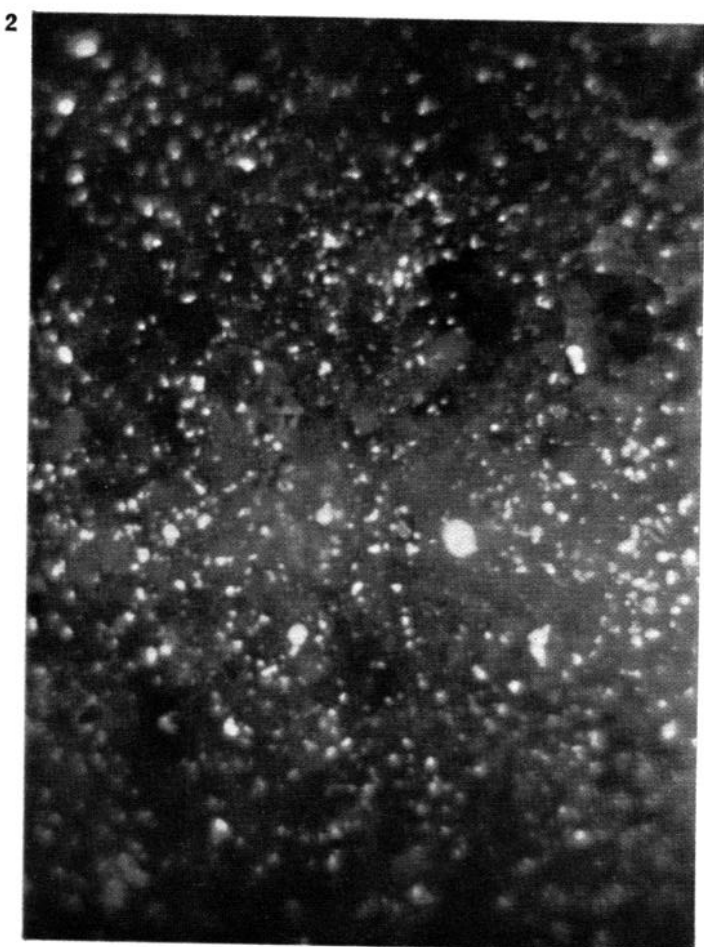
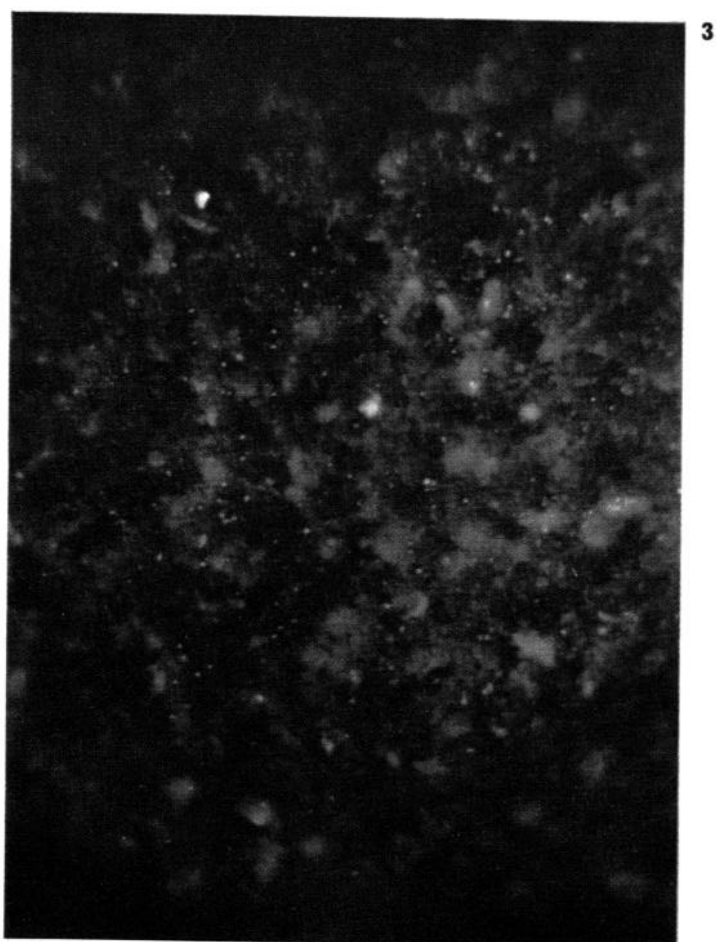
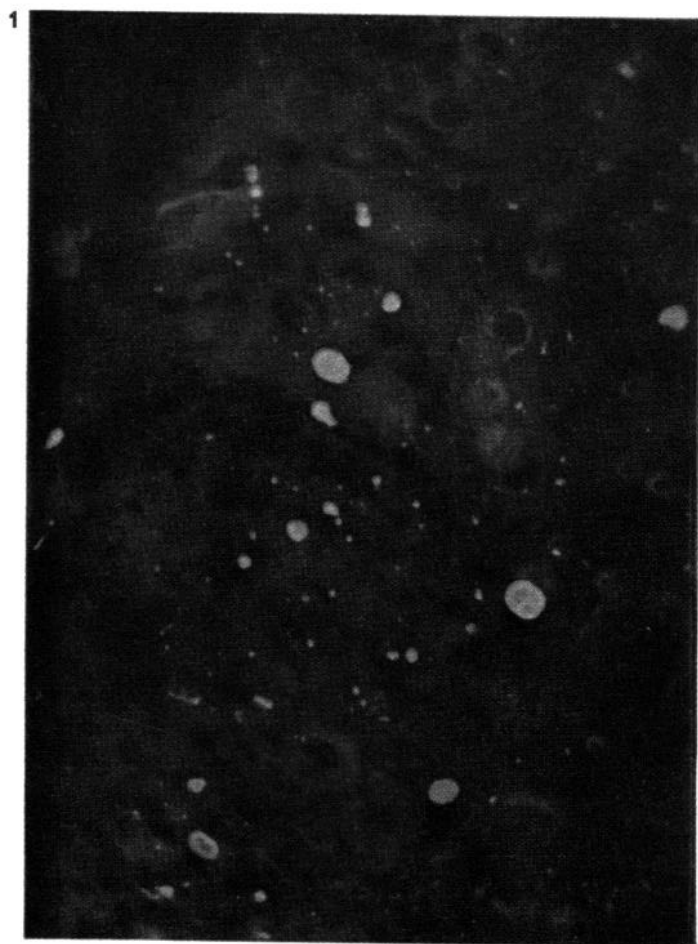
Nótese la presencia de gran cantidad de material sumamente autofluorescente y de algunas partículas de antígeno de rabia específicamente coloreadas (verde-amarillo). El material gris-azulado son residuos. Aumento: 370  $\times$ .

FIG. 3.—*Frotis de impresión preparado con glándula salival de zorro rabioso.*

El antígeno de rabia aparece en forma de diminutas partículas difusamente esparcidas y coloreadas de verde-amarillo contra un fondo de residuos azul-gris. Aumento: 370  $\times$ .

FIG. 4.—*Frotis de impresión preparado con glándula salival de vaca rabiosa.*

Nótese la gran diversidad de tamaño de las partículas del antígeno de rabia (de color verde-amarillo). También están presentes algunos elementos de glándula salival, que muestran una autofluorescencia brillante. Aumento: 370  $\times$ .



podieron distinguirse de los antígenos de rabia por la morfología o color y la intensidad de coloración. Sin embargo, a veces fue necesario hacer comparaciones muy minuciosas de los dos frotis duplicados en el portaobjetos coloreado con la mezcla del conjugado CRN y la del conjugado CRR antes de poder decidirse sobre la presencia de antígenos de rabia. Por consiguiente, estas comparaciones se hicieron siempre en todos los portaobjetos en que se encontró la fluorescencia verde-amarilla de objetos coloreados con fluoresceína.

La morfología de los antígenos de rabia varió considerablemente. En cuanto a tamaño, se observaron diferencias desde puntos minúsculos hasta partículas de aproximadamente 6 a 8  $\mu$  de diámetro (Figs. 3 y 4). La forma de las partículas mayores era muy variada, aunque con tendencia a redonda con bordes suaves, y sin mostrar ninguna granulación como la que se observa a veces a consecuencia de la precipitación de material fluorescente procedente del conjugado. Con frecuencia se observaron antígenos en forma de hebras finas orientados bastante uniformemente en cualquier campo, lo que indica la probabilidad de que algunas de las partículas mayores habían sido alineadas en el portaobjetos durante el proceso de hacer el frotis.

#### *Estudio experimental*

Las glándulas salivales recibidas durante un período aproximado de tres meses, de marzo a junio de 1958, se incluyeron en la primera parte del estudio experimental. En esta serie figuraron 121 especímenes, procedentes de glándulas de 100 perros, 10 gatos, 5 zorros, 2 cerdos, 2 vacas, 1 ardilla y 1 rata. Se prepararon dos portaobjetos de cada espécimen de glándula salival antes de transcurrir 24 horas de su llegada. Los portaobjetos se manipularon como desconocidos, es decir, no se informó a quienes debían examinarlos sobre los resultados de la coloración para averiguar la presencia de cuerpos de Negri hasta que terminaron su examen y registraron los resultados.

Los resultados obtenidos mediante la coloración fluorescente fueron negativos en el caso de los 94 animales no rabiosos, es decir, los que eran Negri-negativos y de cuyos cerebros y glándulas salivales no se pudo aislar ningún virus.

Se aisló virus rábico del cerebro y glándulas salivales de 25 perros y zorros; dos de ellos resultaron Negri-negativos. Otros dos perros presentaron virus en el cerebro, aunque no en las glándulas salivales; uno de éstos fué Negri-negativo. En esta serie, en que sólo se prepararon dos frotis de glándulas salivales de cada animal, se encontró coloración de anticuerpos fluorescentes en 19 (76 %) de los 25 animales de los que se había aislado virus. En las glándulas que resultaron positivas mediante la coloración, los títulos de virus oscilaron entre  $10^{1.5}$  y  $10^{6.6}$   $DL_{50}$ , y en aquellas en que falló el diagnóstico, se observó una variación, desde indicios hasta  $10^{4.2}$ .

En varios casos se observó que un portaobjetos contenía antígeno coloreado con fluoresceína, mientras que otro preparado con la misma glándula no mostró antígeno, o en todo caso muy poco. Se pensó en la posibilidad de que se produjera una distribución desigual de virus en las glándulas, lo cual podría explicar los resultados negativos de algunos de los casos estudiados. Por consiguiente se hizo otra serie de preparaciones para comprobar esta posibilidad.

Se seleccionaron 42 juegos de glándulas de perro, constituidos por 6 juegos que en la primera serie habían fallado, 7 juegos procedentes de animales que se sabía que no estaban rabiosos y 29 extraídos de perros que habían sido diagnosticados como rabiosos de acuerdo con la coloración de anticuerpos de Negri o aislamiento de virus. Se prepararon seis portaobjetos de cada uno de los conjuntos de glándulas, utilizando para cada portaobjetos una porción aparte de tejido cortado de un lugar distinto de la glándula. Se fijaron los portaobjetos, se colorearon y se clasificaron de manera que se leyeran sin previo conocimiento. Si, al hacer el examen, uno de los primeros por-

CUADRO No. 1.—*Coloración con anticuerpos fluorescentes de antígeno de rabia en las glándulas salivales.*

No. del espécimen	Aislamiento de virus		Cuerpos de Negri	Coloración de las glándulas salivales**
	Glándula salival	Cerebro		
19, 24, 34, 38,				
49, 68, 80,* 81,				
84, 135, 136,				
137, 142, 166,				
176, 191, 195,				
204, 206, 209,				
212, 213, 214,				
223				
3	+	+	+	++
5	+	+	+	+±
59	+	+	+	---±±-+
67	-	+	-	+-+ ++
90	+	+	+	--
105	+	+	+	±±+-+
112	-	-	-	---+---
121	-	+	+	-----
131	+	+	+	---±±++
141	+	+	+	---+ ++±
154	+	+	+	---±+-±
157	+	+	-	---±±-+
158	-	+	+	-----
159	-	+	+	-----
161	+	+	+	---±-±+
163	+	+	+	±+
164	-	+	+	-----
186	-	+	+	-----
198	+	+	+	-+
210	+	+	+	±±+ +-+
221	+	+	+	-----±+
Total 45 glándulas	38/45	44/45	42/45	39/45

\* Glándulas salivales de zorro; el resto de las que se indican en este cuadro eran de perro.

\*\* En esta columna, cada signo indica los hallazgos en un portaobjetos (- = no se encontró antígeno coloreado; ± = se encontraron cantidades muy pequeñas de antígeno; + = se encontraron cantidades de antígeno desde moderadas hasta considerables).

taobjetos de cualquier grupo de seis resultaba decididamente positivo, no se trataba de averiguar más. Se exceptuó el caso del espécimen 112, porque, después de una lectura positiva, se consideró que probablemente se trataba de un falso resultado positivo. Por

consiguiente, se leyeron otros seis frotis, también como desconocidos, que resultaron negativos. Cuando ninguno de los dos primeros portaobjetos de cualquier grupo dio una lectura positiva, se examinaron los cuatro restantes del mismo grupo.

En los cuadros Nos. 1 y 2 se resumen los resultados de este estudio, en el que se incluyen solamente los animales que resultaron rabiosos según una o varias de las pruebas indicadas. Ambos cuadros indican la probable falta de uniformidad en la distribución del virus en las glándulas salivales de los animales rabiosos. En el caso de 24 de los animales que se indican en el cuadro No. 1, se encontraron cantidades, desde moderadas hasta considerables, de antígeno de virus en cada uno de los dos portaobjetos examinados. En el caso de siete animales, dos o más de los seis portaobjetos examinados resultaron totalmente negativos y el resto de los portaobjetos correspondientes a estos animales mostraron cantidades de antígeno desde muy pequeñas hasta considerables. En el cuadro No. 2 se echa de ver que estos hallazgos no

CUADRO No. 2.—*Coloración con anticuerpos fluorescentes de antígenos de rabia en glándulas salivales comparada con títulos de virus.*

No. del espécimen	Título de virus de la glándula salival (Log DL <sub>50</sub> )	Cuerpos de Negri	Coloración de las glándulas salivales**
1	1,5	+	++
2	Indicios	-	-----
7	3,2	+	--±+
8	4,2	+	---±±-+
9	5,6	+	++
10	6,6	+	++
12	1,5	+	++
20*	4,3	+	++
70	4,3	+	-----+
74	6,3	+	++
77	3,5	-	---±++

\* Glándulas salivales de zorro; todas las demás que figuran en este cuadro, eran de perro.

\*\* En esta columna, cada signo indica los hallazgos en un portaobjetos (- = No se encontró antígeno coloreado; ± = se encontraron cantidades muy pequeñas de antígeno coloreado; + = se encontraron cantidades de antígeno desde moderadas hasta considerables).

dependían totalmente de los títulos de virus. En cuanto a las dos glándulas que mostraron títulos de sólo  $10^{1.5}$   $DL_{50}$ , los dos primeros portaobjetos examinados revelaron cantidades moderadas de antígeno, mientras que varias glándulas con títulos de  $10^{3.2}$  a  $10^{4.3}$   $DL_{50}$  dieron dos o más portaobjetos negativos.

Con excepción de un caso, se obtuvieron resultados positivos en todas las glándulas de las que se había aislado virus, incluso en las que habían fallado en series anteriores. La única excepción ocurrió en un conjunto de glándulas que contenía tan poco virus vivo que sólo contrajeron rabia 2 de los 5 ratones inoculados con su suspensión al 10 %.

#### COMENTARIOS

Aunque el aislamiento del virus se considera como la prueba más fidedigna para el diagnóstico de la rabia, su técnica requiere demasiado tiempo para ser utilizada como base de la decisión respecto de la vacunación. Por consiguiente, la decisión de si hay que inmunizar o no, se basa de ordinario en la demostración de cuerpos de Negri en los tejidos cerebrales del animal sospechoso. No obstante, los cuerpos de Negri no pueden demostrarse en todos los animales de los que puede aislarse virus. Además, no todos los animales Negri-positivos demuestran necesariamente la secreción de virus en sus glándulas salivales. En consecuencia, la decisión debe basarse, muchas veces, en los resultados de laboratorio, clínicos y subjetivos, conjuntamente.

La técnica de anticuerpos fluorescentes reúne las ventajas de la rapidez y la especificidad. Los tejidos que lleguen al laboratorio por la mañana pueden ser elaborados, coloreados y examinados en el curso del mismo día. Se observó que el tiempo que requiere el examen de un portaobjetos es de un promedio de 10 minutos. En la mayoría de los casos en que el virus estaba presente en la glándula salival, este hecho se puso de manifiesto mediante el examen de unos pocos campos solamente. En el caso de un 25 % de las glándulas, fue necesario examinar varios

portaobjetos antes de que pudieran descubrirse los antígenos, y en pocos casos llegaron a examinarse hasta seis portaobjetos. En algunos especímenes en que la titulación de virus en ratones mostró bajas concentraciones de virus, se encontraron grandes cantidades de material coloreado fluorescente. En otros casos, en que las inoculaciones de animales mostraron elevados títulos, sólo pudo demostrarse una pequeña cantidad de antígeno de virus. Esto parece indicar que el virus no estaba distribuido uniformemente en el tejido de la glándula y que, por consiguiente, podía estar presente en concentración considerable en determinada área y faltar en otra. Este supuesto fue corroborado por el hecho de que, en varios casos, un portaobjetos preparado con una porción de la glándula mostraba poca o ninguna coloración, mientras que otro portaobjetos preparado con material de otra porción de la misma mostró contener considerable antígeno.

Los resultados del estudio del material recogido sobre el terreno indican que, con suficiente cuidado y experiencia, la técnica de anticuerpos fluorescentes puede ser utilizada con considerable rapidez y precisión para determinar la presencia de virus de rabia en las glándulas salivales de animales. De 300 portaobjetos, aproximadamente, preparados de animales no rabiosos o de animales cuyas glándulas salivales no pudo demostrarse por inoculación de animales que contuvieran virus, se hizo un solo diagnóstico positivo falso, y en este caso no puede descartarse la posibilidad de un error de técnica por parte de la persona que preparó el portaobjetos. En cambio, en el caso de 49 animales de cuyas glándulas salivales se aisló virus por inoculación de animales, 48 fueron diagnosticados por las técnicas de anticuerpos fluorescentes y el que falló contenía sólo indicios de virus.

De todos modos, se requiere una aplicación mucho más amplia de este método para saber si es conveniente o no sustituir por él los métodos de diagnóstico de la rabia que

actualmente se emplean en los laboratorios de salud pública. No obstante, el método de anticuerpos fluorescentes parece muy pro-

metedor y podría servir de valioso complemento de los actualmente en uso, aun si no llega a aventajarlos.

#### REFERENCIAS

- (1) Goldwasser, R. A., y Kissling, R. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.), 98:219, 1958.
- (2) Seiwald, R. J.; Riggs, J. L.; Burekhalter, J. H.; Downs, M., y Metcalf, T. G.: *Bact. Proc.*, 1958, p. 136.
- (3) Goldwasser, R. A., y Shepard, C. C.: *Jour. Immunol.*, 80:122, 1958.
- (4) Coons, A. H.; Leduc, E. H., y Connally, J. M.: *Jour. Exp. Med.*, 102:49, 1955.
- (5) Coons, A. H., y Kaplan, M. H.: *Jour. Exp. Med.*, 91:1, 1950.