

METODO PARA ACELERAR LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA EL DIAGNOSTICO DE LA RABIA¹

Oscar P. Larghi² y Edwin Jiménez Ch.³

Se describe una modificación de la técnica de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la rabia que acorta el tiempo de realización de la prueba a 45 minutos aproximadamente. La modificación consiste en eliminar la fijación en acetona y en teñir las impresiones con conjugado durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Introducción

La prueba de anticuerpos fluorescentes (AF) es sensible y específica para el diagnóstico de la rabia (14). El único inconveniente que tiene cuando se la compara con el método de Sellers es el tiempo requerido para su realización.

Se han usado distintos fijadores, diferentes tiempos de fijación y combinaciones de diversas temperaturas con tiempos de incubación (4, 6-8, 11, 17). Sin embargo, el método aceptado como estándar de AF requiere: secado al aire durante 30 minutos, 4 horas de fijación en acetona y 30 minutos de incubación de la reacción conjugado-impresión (8), lo que significa una demora total de 5-1/2 horas.

Se conocen otros antígenos para los que no se necesita fijación para la prueba de AF (2, 3, 16) y, por otra parte, se ha demostrado que la combinación de las reacciones antígeno-anticuerpos no demora más que unos pocos segundos (13). Por lo tanto, se consideró de interés tratar de aplicar estos principios a la prueba de AF para la rabia, a fin de acelerar el proceso de la diagnosis de laboratorio.

En este estudio se compararon los resultados obtenidos variando los programas de

fijación e incubación, con los obtenidos con la técnica estándar de Goldwasser, Kissling y Carski (8) y con la prueba de inoculación en ratones (10).

Materiales y métodos

Muestras de cerebros

Estas muestras se obtuvieron de cabezas recibidas en este laboratorio para diagnóstico de la rabia, de acuerdo con la técnica descrita por Tierkel (18).

Se obtuvieron 246 muestras de cerebro de 195 perros, 41 gatos, 4 ratones de laboratorio, 2 humanos y 1 de bovino, cabra, mono y conejo, respectivamente, que se usaron para estudiar el efecto de la alteración del método de fijación en la prueba de AF para la rabia.

Se usaron 161 muestras de cerebros provenientes de 128 perros, 28 gatos, 2 ratones de laboratorio y 1 de bovino, cabra y conejo, respectivamente, para estudiar el efecto de la variación de los períodos de incubación en la prueba de AF.

Prueba de AF

Se preparó un conjugado de acuerdo con la técnica de Lennette *et al.* (11), con un título de 1:80. Se empleó la técnica estándar de AF descrita por Goldwasser *et al.* (8), y los resultados se compararon con los obtenidos empleando las siguientes modificaciones a este método:

¹Este trabajo se publicó en inglés en *Applied Microbiology* y un informe preliminar sobre el mismo se presentó en las II Jornadas Argentinas de Microbiología, celebradas en Buenos Aires, Argentina, del 22 al 26 de noviembre de 1970.

²Virólogo, Centro Panamericano de Zoonosis, Ramos Mejía, Argentina.

³Becario de la OPS/OMS.

a) Método de fijación. Con el cuerno de Ammón de cada cerebro se prepararon dos portaobjetos con dos impresiones cada uno, los que se dejaron secar al aire. Un portaobjeto se dejó sin fijar mientras que el otro se fijó en acetona a -20°C , durante 4 horas, tal como lo recomendaron Goldwasser *et al.* (8). Posteriormente, ambos portaobjetos se tiñeron usando la técnica estándar de tinción, durante 30 minutos a 37°C .

b) Método de incubación. Se obtuvieron dos pares de impresiones de cada cerebro en la misma forma descrita en a), las que se mantuvieron sin fijar. Uno de los portaobjetos fue teñido con conjugado empleando la técnica estándar de tinción y el otro con el método rápido de tinción, a temperatura ambiente ($22-25^{\circ}\text{C}$) durante 10 minutos.

Los portaobjetos teñidos se enjuagaron como de costumbre, se montaron y se identificaron por código, de manera que la persona que los observó al microscopio no conocía ni su origen, ni los métodos de fijación o tinción usados.

La intensidad de la tinción específica así como la cantidad de antígeno presente en las impresiones positivas se clasificaron en una escala de 1 a 4. Se empleó un microscopio monocular Leitz, modelo SM, provisto con una lámpara HBO 200, filtros excitadores UG1 de 2 mm y BG 38 de 4mm y filtro barrera K430.

Prueba de inoculación de ratones

Se prepararon suspensiones de cada cerebro tal como lo describió Koprowski (10), las que fueron inoculadas intracerebralmente en 10 ratones de 3 a 4 semanas. En una ocasión se usaron ratones lactantes.

Resultados

Método de fijación

Se encontró una correspondencia completa entre las pruebas de inoculación en ratones y AF, tanto con las impresiones fijadas como con las sin fijar, en 245 muestras de cerebros de las 246 usadas en esta parte del estudio; ciento cinco cerebros fueron positivos y 140 negativos (cuadro 1). El cerebro restante fue negativo por inoculación en ratones adultos y por la prueba de AF con la impresión fijada en acetona,

CUADRO 1—Comparación de los resultados para AF de rabia obtenidos con impresiones sin fijar y fijadas con acetona.^a

		Sin fijar		Total
		+	-	
Fijadas ^b	+	105	0	105
		1 ^c	140	141
Total	-	106	140	246

^a Teñidas a 37°C durante 30 minutos.

^b Acetona a -20°C , 4 horas.

^c Negativo por inoculación en ratones adultos; positivo por inoculación de ratones lactantes.

mientras que esta última prueba realizada con la impresión sin fijar fue positiva. La suspensión de este cerebro fue inoculada en 10 ratones lactantes, dos de los cuales murieron de rabia posteriormente. La prueba de AF realizada en los cerebros de estos dos animales fue positiva.

Se encontró tanto o más antígeno demostrable por AF en las impresiones sin fijar que en las fijadas por acetona en todos los casos positivos, excepto en dos.

Método de incubación

De las 161 muestras usadas en esta parte del estudio, 73 fueron positivas y 88 negativas tanto para ambos métodos de AF (cuadro 2) como para la inoculación de ratones.

La intensidad de la fluorescencia y la cantidad de antígeno detectado con el método rápido fueron algo menor que con el método

CUADRO 2—Comparación de los resultados para rabia obtenidos con dos métodos de incubación de la prueba de AF.^a

		Temperatura ambiente, 10 minutos		Total
		+	-	
37°C	+	73	0	73
30 minutos	-	0	88	88
Total		73	88	161

^aImpresiones sin fijar.

estándar de tinción, en 40% de las impresiones positivas.

Discusión

Se describe un método para reducir el tiempo de realización de la prueba de AF para rabia. Se encontró que impresiones de cerebro sin fijar, podían ser teñidas con conjugado antirrábico a temperatura ambiente durante 10 minutos, obteniendo la misma sensibilidad y especificidad que con las pruebas de AF estándar y de inoculación en ratones.

En general se observó más antígeno en las impresiones sin fijar que en las fijadas. Además, en un caso se obtuvo resultado positivo con la impresión sin fijar mientras que la fijada fue negativa. La especificidad de aquel resultado se demostró inoculando la suspensión de cerebro en ratones lactantes, de los que se sabe que son más sensibles al virus rábico que los adultos (1, 15). No se sabe la razón por la cual se encontró menos antígeno en las impresiones fijadas, pero se estima que podría deberse a que la acetona altera de algún modo el antígeno rábico.

En algunos casos se observó menos antígeno y menor intensidad de fluorescencia en las impresiones positivas teñidas a temperatura ambiente durante 10 minutos que en las teñidas a 37°C durante 30 minutos. A pesar de que esa menor intensidad podría ocasionar un diagnóstico erróneo, nunca se tuvo problemas para diferenciar las muestras positivas de las negativas. No se ha hecho un estudio de cinética de la reacción antígeno-anticuerpo para rabia, pero aquí podría presentarse una situación similar a la encontrada por Meyer y Heidelberg (13) para polisacáridos de pneumococos. En el estudio de esos autores, el 95% de la reacción se completó en 3 segundos mientras que el resto "se realizó a velocidad que decrecía progresivamente".

Fischman y Ward (5) han encontrado virus rábico infectante en impresiones fijadas con acetona; teniendo en cuenta que el de rabia es

un virus sensible a los solventes orgánicos (9), es más probable que aquello ocurra en impresiones sin fijar, que en impresiones fijadas con acetona. Si se desea, este problema podría obviarse exponiendo las impresiones a la luz ultravioleta antes de teñirlas y mientras se están secando, tal como lo describieron Lépine y Gamet (12).

El uso de la técnica descrita en este trabajo permitiría al laboratorio de diagnóstico informar los resultados más rápidamente, ayudando así al médico que debe aplicar tratamiento antirrábico a las personas mordidas.

Resumen

El tiempo necesario para realizar la técnica de inmunofluorescencia para rabia se acortó eliminando la fijación de la impresión de cerebro en acetona e incubando la reacción conjugado-impresión a temperatura ambiente durante sólo 10 minutos. La eliminación de la fijación preliminar en acetona no tuvo ningún efecto en la diagnosis de impresiones de 246 cerebros por inmunofluorescencia, entre los que se encontraron 106 positivos.

Se encontró que tanto la tinción a 37°C durante 30 minutos como a temperatura ambiente durante 10 minutos eran igualmente efectivas en el examen de impresiones obtenidas de 161 muestras de cerebro. El procedimiento así modificado, acorta el tiempo necesario para hacer el diagnóstico de la rabia por inmunofluorescencia de aproximadamente 5-1/2 horas a 45 minutos. □

Agradecimiento

Los autores agradecen a la Dra. Laura Astarloa, del Hospital Muñiz, Buenos Aires, por las muestras humanas y al personal del Instituto Antirrábico, Morón, Argentina, por las muestras de animales usadas en este estudio. También agradecen la eficiente asistencia técnica de los Sres. Juan C. Areitio y Luis Lázaro.

REFERENCIAS

- (1) Bagnaroli, R.A., Larghi, O.P. y Marchevsky, N. "Susceptibilidad de ratones lactantes y adultos al virus rábico demostrada por inmunofluorescencia". *Bol Ofic Sanit Panamer* 68:388-392, 1970.
- (2) Beutner, E.H., Sepúlveda, M.R. y Barnett, E.M. "Quantitative studies of immunofluorescent staining. Relationship of characteristics of unabsorbed antihuman IgG conjugates to their specific and non-specific staining properties in an indirect test for antinuclear factors". *Bull WHO* 39:587-606, 1968.
- (3) Biegeleisen, J.Z., Moody, M.D., Marcus, B.B. y Flynt, J.W. "The use of fluorescein-labeled anti-*Brucella suis* globulin for demonstrating *Brucella* antigen in animal tissues". *Amer J Vet Res* 23:592-595, 1962.
- (4) Etchebarne, M., Bernal, P.G. y Reyton, G.R. "Purification of rabies antibodies in horse serum and diagnostic importance of the fluorescent antibody technique". *J Immunol* 84:6-10, 1960.
- (5) Fischman, H.R. y Ward, F.E. "Infectivity of fixed impression smears prepared from rabies virus-infected brain". *Amer J Vet Res* 30:2205-2208, 1969.
- (6) Gipsen, R. y Sasthof, B. "Neutralizing and fluorescent antibody response in man after anti-rabies treatment with suckling rabbit brain vaccine". *Arch Ges Virusforsch* 15:377-386, 1965.
- (7) Goldwasser, R.A. y Kissling, R.E. "Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens". *Proc Soc Exp Biol (N.Y.)* 98:219-223, 1958.
- (8) Goldwasser, R.A., Kissling, R.E. y Carski, T.R. "Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals". *Bull WHO* 20:579-588, 1959.
- (9) Kissling, R.E. y Reese, D.R. "Antirabies vaccine of tissue culture origin". *J Immunol* 91:362-368, 1963.
- (10) Koprowski, H. "Mouse inoculation test". En Atanasiu *et al. Laboratory techniques in rabies*. 2a ed., World Health Organization, Ginebra, págs. 69-80, 1966.
- (11) Lennette, E.H., Woodie, J.D., Nakamura, K. y Magoffin, R.L. "The diagnosis of rabies by fluorescent antibody method (FRA) employing immune hamster serum". *Health Lab Sci* 2:24-34, 1965.
- (12) Lépine, P. y Gamet, A. *La rage*. Paris: L'Expansion Editeur, pág. 73, 1969.
- (13) Meyer, M. y Heidelberger, M. "Velocity of combination of antibody with specific polysaccharides of pneumococcus". *J Biol Chem* 143:567-574, 1942.
- (14) McQueen, J.L. "Rabies diagnosis. Special application of fluorescent antibody techniques". *Proc U.S. Livestock Sanitary Ass* 63:356-363, 1960.
- (15) Nillson, M.R., Sugay, W., Pasqualin, O.L. y Müller, S.B.K. "Rabies diagnosis. Comparative study on susceptibility of adult and suckling mice". *Arch Inst Biol (São Paulo)* 35:43-47, 1968.
- (16) Sulzer, A.J., Wilson, M. y Hall, E.C. "Indirect fluorescent antibody tests for parasitic disease. V. An evaluation of a thick smear antigen in the IFA test for malaria antibodies". *Amer J Trop Med* 18:199-205, 1969.
- (17) Serokawa, D., Krawczyński, K. y Brzosko, W. 1967. "The use of immunofluorescence for the detection of street rabies virus in the central nervous system of mice in the incubation period of the disease". *Exp Med Microbiol* 19:204-216, 1967.
- (18) Tierkel, E.S. "Shipment of specimens, and techniques for preparation of animal tissues". En Atanasiu *et al. Laboratory techniques in rabies*. 2a ed. World Health Organization, Ginebra, págs. 17-25, 1969.

**Method for accelerating the fluorescent antibody test
for rabies diagnosis (Summary)**

The time required to perform the immunofluorescent antibody test for rabies was reduced by eliminating acetone fixation of the brain impressions and by incubating the conjugate-impression reaction at room temperature for only 10 minutes. Elimination of the preliminary acetone fixation had no effect on the diagnosis on impression smears from 246 mammalian brains by immuno-

fluorescence. Staining, at 37°C for 30 minutes or at room temperature for 10 minutes were found to be equally effective in the examination of impression smears from 161 brain samples. The procedure, as modified, shortens the time required for the diagnosis of rabies by immunofluorescence from about 5-1/2 hours to approximately 45 minutes.

**Método para acelerar a técnica de imuno-fluorescência
para o diagnóstico da raiva (Resumo)**

Foi encurtado o tempo necessário para realizar a técnica de imuno-fluorescência para o diagnóstico da raiva eliminando a fixação da impressão de cérebro em acetona e incubando a reação conjugado-impressão à temperatura ambiente durante 10 minutos. A eliminação da fixação preliminar em acetona não teve efeito algum no diagnóstico de impressões de 246 cérebros por imuno-fluorescência, entre os quais

se acharam 106 positivos.

Verificou-se, também, que tanto a tinação a 37°C durante 30 minutos como à temperatura ambiente durante 10 minutos eram igualmente efetivas nos exames de impressões obtidas de 161 amostras de cérebros. O procedimento assim modificado encurta de 5-1/2 horas para 45 minutos o tempo necessário para fazer o diagnóstico da raiva por imuno-fluorescência.

**Méthode visant à accélérer la technique de l'immunofluorescence
dans le diagnostic de la rage (Résumé)**

On diminue le temps nécessaire pour diagnostiquer la rage par la technique de l'immunofluorescence en éliminant la fixation à l'acétone de l'impression du cerveau et en laissant incuber à température ambiente pendant 10 minutes seulement la réaction conjuguée avec l'impression. L'élimination de la fixation préliminaire à l'acétone n'a jamais affecté le diagnostic relatif à 246 cerveaux impressionnés par l'immunofluorescence, dont 106 donnaient une

réaction positive.

Il se trouve qu'aussi bien le maintien à 37°C pendant 30 minutes que pendant 10 minutes à la température ambiente ont été tout aussi efficaces pour l'examen d'impressions obtenus sur 161 échantillons de cerveaux. Le procédé ainsi modifié ramène de 5h-1/2 à 45 minutes le temps nécessaire pour diagnostiquer la rage par l'immunofluorescence.