

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD: SERIE
DE MONOGRAFÍAS

INDEXED

**TECNICAS DE LABORATORIO
APLICADAS A LA RABIA**

Por
Varios Autores



OFICINA SANITARIA PANAMERICANA
Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud
Washington 6, D. C., E. U. A.

TECNICAS DE LABORATORIO
APLICADAS A LA RABIA

por
Varios Autores

Organización Mundial de la Salud
Serie de Monografías
No. 23

TECNICAS DE LABORATORIO
APLICADAS A LA
RABIA

COLABORADORES

D. d'Antona—P. Atanasiu—R. Béquignon—E. Falchetti—Karl Habel
George A. Hottle—Harald N. Johnson—Martin M. Kaplan
A. Komarov—Hilary Koprowski—Pierre Lépine—Thomas
F. Sellers—Ernest S. Tierkel—C. Vialat

Publicaciones Científicas
No. 23

Diciembre, 1956

OFICINA SANITARIA PANAMERICANA
Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud
1501 New Hampshire Avenue, N. W.
Washington 6, D. C., E. U. A.

NOTA

Los únicos responsables de las opiniones expresadas
en la Serie de Monografías de la Organización
Mundial de la Salud son sus propios autores

La mención de productos de una dada marca de fábrica no supone que la Organización Mundial de la Salud los sanciona o recomienda de preferencia a otros productos análogos que no se mencionan.

COLABORADORES

- D. D'ANTONA
Director, Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno Toscano, Siena, Italia
- P. ATANASIU
Institut Pasteur, París, Francia
- R. BÉQUIGNON
Jefe del Laboratorio de la Sección de Virus del Instituto Pasteur, París, Francia
- E. FALCHETTI
Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno Toscano, Siena, Italia
- KARL HABEL, A.B., M.D.
Jefe del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Microbiología, Servicio de Salud Pública, Bethesda, Maryland, E.U.A.
- GEORGE A. HOTTLE, Ph.D.
Jefe de la Sección de Control de Productos Biológicos, Laboratorio de Control de Productos Biológicos, Instituto Nacional de Microbiología, Servicio de Salud Pública, Bethesda, Maryland, E.U.A.
- HARALD N. JOHNSON, M.D.
División de Salubridad Internacional del Instituto Rockefeller de Investigaciones Médicas, Nueva York, N. Y., E.U.A.
- MARTIN M. KAPLAN, V.M.D., M.P.H.
Veterinario Jefe de Salud Pública de la División de Servicios de Enfermedades Transmisibles, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza
- A. KOMAROV, M.Sc., V.M.D.
Director del Laboratorio del Estado para las Enfermedades Producidas por Virus, Haifa, Israel
- HILARY KOPROWSKI, M.D.
Subdirector de la División de Investigaciones de Virus y Rickettsias de los Laboratorios Lederle, American Cyanamid Company, Pearl River, N. Y., E.U.A.
- PIERRE LÉPINE
Jefe de la Sección de Virus del Instituto Pasteur, París, Francia
- THOMAS F. SELLERS, M.Sc., M.D.
Director del Departamento de Salud Pública del Estado de Georgia, Atlanta, Ga., E.U.A.
- ERNEST S. TIERKEL, V.M.D., M.P.H.
Director de Programas de Control de la Rabia, Centro de Enfermedades Transmisibles, Servicio de Salud Pública, Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de los Estados Unidos, Atlanta, Georgia, E.U.A.
- C. VIALAT
Sección de Rabia, Instituto Pasteur, París, Francia

INDICE

	<i>Página</i>
Prólogo.....	9
PARTE I. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	
Sección 1. Envío de muestras y métodos de preparación de tejidos animales para el diagnóstico de laboratorio.....	15
Sección 2. Examen microscópico rápido para determinar si existen corpúsculos de Negri—técnicas sencillas con impresión y preparación de muestras para las pruebas biológicas.....	24
Sección 3. El diagnóstico histopatológico.....	41
Sección 4. Prueba de inoculación en ratones.....	57
Sección 5. Prueba de neutralización de suero-virus.....	70
PARTE II. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE VACUNA	
Sección 6. Vacuna fenolizada: tipo Simple.....	79
A. Vacuna de cerebro de carnero: método del Instituto Pasteur de París..	79
B. Vacuna de cerebro de conejo; método recomendado para cumplir con los requisitos de los Institutos Nacionales de Higiene de los Estados Unidos..	87
Sección 7. Vacuna irradiada con luz ultravioleta.....	95
Sección 8. Vacuna de embrión de pollo.....	102
PARTE III. PRUEBAS DE POTENCIA DE LA VACUNA	
Sección 9. Consideraciones generales.....	111
Sección 10. Factores que influyen en la estandarización de las pruebas de potencia de la vacuna antirrábica en ratones.....	113
Sección 11. Prueba de potencia de Habel.....	116
Sección 12. Modificación de la prueba de potencia de Habel.....	120
Sección 13. Requisitos establecidos por los Institutos Nacionales de Higiene de los Estados Unidos para la prueba de potencia.....	121
Sección 14. Una prueba de la potencia en conejos.....	130
Sección 15. Prueba de potencia para vacuna de embrión de pollo.....	133
PARTE IV. PRODUCCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE	
Sección 16. Método empleado en el Instituto Pasteur de París.....	141
Sección 17. Método empleado en el Instituto Toscano de sueros y vacunas, Siena.....	143
Sección 18. Prueba de la potencia del suero antirrábico.....	145
PARTE V. ANIMALES DE LABORATORIO	
Sección 19. Cría y cuidado de los animales de laboratorio.....	149

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

PROLOGO

La Organización Mundial de la Salud ha recibido numerosas consultas sobre las técnicas de laboratorio relacionadas con diversos aspectos de la rabia. En atención a la necesidad de esta información en los países que integran las Regiones de la OMS en el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y Pacífico Occidental, en julio de 1952, se organizó una reunión para dichos países, que tuvo lugar en Coonoor, en el Instituto Pasteur de la India Meridional. Durante la reunión se dieron conferencias, se celebraron discusiones y demostraciones y se facilitó adiestramiento de laboratorio, asistiendo 55 funcionarios médicos y veterinarios, entre los que figuraban 7 directores de debates, procedentes de 23 países. Varios consultores de la OMS, expertos en rabia, actuaron como directores de debates y dirigieron los trabajos de laboratorio. Los documentos técnicos, especialmente las instrucciones de laboratorio preparadas por reconocidos especialistas, resultaron de máxima utilidad, por lo que se decidió ampliarlos y revisarlos para su publicación. En su segunda reunión, celebrada en Roma, en septiembre de 1953, el Comité de Expertos de la OMS sobre la Rabia, examinó detalladamente el proyecto del manual y se refirió al mismo repetidas veces en su informe. Los informes* del comité tratan de los problemas de la rabia, en general, incluyendo la profilaxis en los seres humanos y el control en los animales, pero la presente publicación se refiere exclusivamente a los aspectos de laboratorio de la enfermedad.

No se pretende que este manual sea un tratado completo de la materia; por el contrario, su contenido se ha limitado ex profeso a uno o dos de los procedimientos empleados en cada uno de los principales aspectos de la técnica de laboratorio aplicada a la rabia. Se pidió a los colaboradores que, basándose en su propia experiencia, seleccionaran y presentaran procedimientos que, sin reducir los patrones mínimos indispensables, fueran seguros y prácticos, y que, al mismo tiempo, se pudieran adaptar a las limitaciones de recursos y personal de muchos laboratorios de rabia en diferentes partes del mundo. Las técnicas se seleccionaron también con el criterio de que sirvieran para fomentar y facilitar el empleo de métodos uniformes que permitiesen una comparación más justa de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios.

Ciertos aspectos de las diversas secciones merecen explicación.

El objetivo de todo laboratorio de diagnóstico de rabia es el descubrimiento, por técnicas rápidas, de corpúsculos de Negri; para ello, es necesario elegir entre los múltiples métodos descritos por diferentes especialistas. Se considera que la mayoría de los técnicos de laboratorio pueden, fácilmente,

* *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.* 1950 28; 1953, 82

llegar a dominar el método de impresión que aquí se expone. En lo que se refiere a los cortes histopatológicos, hace falta una mayor especialización en patología, por lo que esta parte del manual se destina a aquellas personas que tengan tal preparación.

En los laboratorios de diagnóstico de rabia, frecuentemente se limita el examen a los tejidos del sistema nervioso central sin prestar ninguna atención a las glándulas salivales. Se ha dicho con razón que "los animales no muerden con el cerebro", y que el verdadero peligro de contraer la rabia depende de la presencia del virus en la saliva del animal mordedor. Aunque no se ha llegado a determinar su proporción, hay un considerable número de casos en que el virus no aparece en la saliva, pero se puede recuperar, o determinar su presencia, en el cerebro del animal. Por lo tanto, siempre que sea posible, se debe examinar la glándula salival submaxilar, a la vez que se examina el tejido nervioso, para determinar la presencia de virus mediante la inoculación en ratones.

Debe destacarse especialmente la necesidad de las pruebas de inoculación en ratones durante los trabajos que ordinariamente se realizan para formular el diagnóstico. Cuidadosos estudios han demostrado que hasta un 20% de los animales con resultados negativos en el examen de corpúsculos de Negri dieron resultados positivos, de rabia, en la prueba de inoculación en ratones.

Se describe la preparación de la vacuna de tipo fenicado de Semple, por ser la más usada de las vacunas "muertas". Ello no quiere decir que las otras vacunas de virus inactivados o vivos, tales como las de Hempt, Högges, Fermi o Harris, por mencionar solamente unas cuantas, no sean igualmente eficaces, siempre que se compruebe su potencia de modo adecuado. Se describen dos métodos para la producción de la vacuna de tipo Semple: uno de acuerdo con el procedimiento que se emplea en el Instituto Pasteur de París, y el otro según los requisitos de los Institutos Nacionales de Higiene de los Estados Unidos de América. Se han escogido estos métodos porque a ellos se refiere la mayoría de las consultas recibidas en la OMS. Ahora bien, en muchos países se emplean, con resultados satisfactorios, otras modalidades de estos métodos.

Se describen también los métodos de producción de la vacuna inactivada por rayos ultravioleta y la vacuna de virus modificado, preparada en embriones de pollo, por el interés que ha despertado la efectividad de estos productos, relativamente nuevos. La preparación comercial o en gran escala de vacunas antirrábicas potentes, de las cuales se haya eliminado el factor paralizante, no se ha logrado todavía, por lo que en este manual se ha omitido su descripción.

Por mucho que se diga, no se puede exagerar la necesidad de comprobar

la potencia de cada lote de vacuna, pues una amplia experiencia ha demostrado que, aun cuando se siga fielmente el mismo procedimiento en la preparación de lotes sucesivos de vacuna, no existe seguridad de que, automáticamente, el producto sea potente. En la actualidad, las pruebas de potencia en los animales de laboratorio constituyen la única base para determinar, con alguna seguridad, si una vacuna posee suficiente inmunogenicidad para dar buenos resultados en el hombre o en animales. Se describen varias pruebas de potencia, de variada complejidad, a fin de que cada laboratorio pueda escoger, o desarrollar, la que mejor se adapte a las circunstancias y recursos locales. En este último caso, se recomienda que los resultados de la vacunación se comprueben mediante la reinfección con virus de la calle, utilizando un número suficiente de animales testigos. El perro es el animal preferible para este fin. En las pruebas de control de las vacunas rábicas el factor importante es la demostración de la inmunogenicidad, y no solamente de la inocuidad, como se hace equivocadamente con bastante frecuencia.

En la profilaxia de la rabia en el hombre y los animales el suero hiperinmune viene a ser una nueva ayuda. Tomando esto en cuenta, la Parte IV de este manual está dedicada a la descripción del método de preparación y de las pruebas de potencia. Es de esperar que los trabajos de laboratorio que se están llevando a cabo, coordinados por la OMS, nos brinden mayor información sobre el valor profiláctico del suero hiperinmune en el curso de los próximos dos años. El Comité de Expertos de la OMS sobre la Rabia se ocupó de este asunto en su segunda reunión (véase la nota al pie de la página 9).

La Parte V está dedicada a algunos de los problemas de más importancia, relacionados con el empleo de animales pequeños de laboratorio en los trabajos de rabia, que, en muchos países, es con frecuencia causa de dificultades. La sección es necesariamente breve y se refiere sólo a los aspectos mas importantes, especialmente las enfermedades que afectan a estos animales y que puedan influir en los resultados de la experimentación. En las obras citadas en la página 153 se puede obtener mayor información sobre este tema, y sobre las cuestiones tratadas en otras partes del manual.

El trabajo con virus es una disciplina muy desarrollada que no permite gran latitud, si se quieren obtener resultados constantes. Sin embargo, es de esperar que la opinión de los técnicos difiera en lo que respecta a los detalles de los métodos empleados. Las técnicas que se recomiendan en este manual se han elaborado especialmente para su aplicación en trabajos de rabia, aunque es evidente que algunas de ellas, tales como la prueba de neutralización suero-virus y la prueba de inoculación en ratones, se pueden aplicar, quizá con ligeras modificaciones, a otras enfermedades causadas por

virus. Debe advertirse, además, que en la descripción de las diversas técnicas los colaboradores insisten en la necesidad de seguir un criterio racional y sistemático con el fin de evitar errores que, de otra manera, podrían anular un trabajo excelente. Se puede citar, por ejemplo, en las pruebas de potencia y efectividad de la vacuna, la conveniencia de inyectar con reinfectantes los animales vacunados, antes o al mismo tiempo que los animales testigos.

La investigación de la rabia dista mucho de ser estática y es de esperar que algunos de los métodos descritos se modifiquen en un futuro próximo. Creemos, sin embargo, que las técnicas expuestas en este manual continuarán siendo útiles todavía durante algunos años, pues son fruto de una amplia y bien probada experiencia.

* *

*

La OMS agradece a los autores de este trabajo el esfuerzo y el esmero dedicados a su preparación. Gran parte del material que aparece en estas páginas no había sido publicado todavía o no se disponía de él, en forma abreviada, en las publicaciones científicas. Muchos de los que han colaborado en este manual son miembros del Cuadro de Expertos que asesora a la OMS en las cuestiones relacionadas con la rabia, y su aportación a este manual no refleja, sino fragmentariamente, los valiosos servicios que vienen prestando a la Organización en sus esfuerzos para lograr mayores éxitos en el control de tan temible enfermedad.

Parte I

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

ENVIO DE MUESTRAS Y METODOS DE PREPARACION DE TEJIDOS ANIMALES PARA EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Envase y Envío de la Muestra

Si se sospecha que un animal tiene rabia hay que capturarlo y mantenerlo en observación durante 10 días, siempre que sea posible, dejando que la enfermedad siga su curso hasta producir la muerte. El sacrificio prematuro reduce la exactitud del diagnóstico de laboratorio, toda vez que el desarrollo de los corpúsculos de Negri en el cerebro está en relación directa con la duración de la enfermedad. Si las circunstancias requieren el sacrificio del animal, conviene matarlo de un tiro en el corazón, ya que un disparo en la cabeza lesionaría el cerebro, y éste se debe conservar intacto para el diagnóstico. No es aconsejable el empleo de venenos químicos, porque éstos pueden dificultar la ulterior inoculación de los animales de laboratorio.

Cuando un animal sea decapitado en el lugar de su captura, la cabeza se debe refrigerar rápidamente y conservarla en frío, enviándola al laboratorio con un mensajero, siempre que sea posible. Si no existe tal posibilidad, hay que envasarla para remitirla en servicio expreso, por ferrocarril, avión o camión. La cabeza se debe colocar en una lata u otro receptáculo de metal herméticamente cerrado, que, a su vez, se depositará dentro de otro mayor, que también se cerrará herméticamente tras haber rellenado con hielo picado el espacio comprendido entre ambos (véanse las figs. 1 y 2). El paquete se ha de rotular con la mayor claridad y debe ser enviado al laboratorio con toda rapidez.

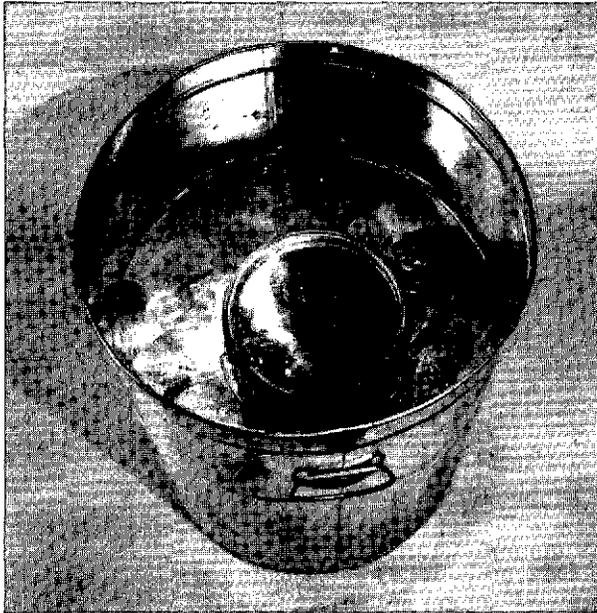
Nota: No se debe emplear hielo seco (dióxido de carbono solidificado) al envasar la cabeza. Aunque la congelación de la muestra conserva el virus, no se puede hacer el examen microscópico inmediatamente porque hay que esperar a que el cerebro se deshiele. En ocasiones, el diagnóstico no es posible porque en el examen microscópico el tejido cerebral aparece deformado, lacerado y aun desintegrado. Más aún, al descongelarse el tejido cerebral, éste se reblandece tanto que resulta difícil de manipular. En el caso de que en un laboratorio se reciba una cabeza congelada, tan pronto

* Colaboración de Ernest S. Tierkel, Director del Programa de Control de la Rabia, Centro de Enfermedades Transmisibles, Servicio de Salud Pública, Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de los E.U.A. (Atlanta, Georgia)

como se descubra el hecho, se deberán extraer el cerebro y las glándulas salivales; el cerebro congelado debe permanecer a la temperatura ambiente hasta que se descongele y se pueda hacer su disección.

Cuando se reciben las cabezas de los animales para su examen es conveniente obtener la siguiente información: especie y raza del animal y si estuvo en contacto con otros animales; si el animal murió o fué muerto y en qué forma fué sacrificado; si el animal estuvo en observación durante un

FIG. 1. RECEPTACULO DOBLE, CON HIELO, PARA EL ENVASE DE MUESTRAS



Por cortesía del Centro de Enfermedades Transmisibles del Servicio de Salud Pública, de la Secretaría de Salud, Educación y Asistencia de los Estados Unidos (US DHEW-PHS-CDC)

período adecuado antes de su muerte, y, en caso afirmativo, por cuánto tiempo; síntomas de rabia, si los hubo, y antecedentes de vacunación anti-rábica.

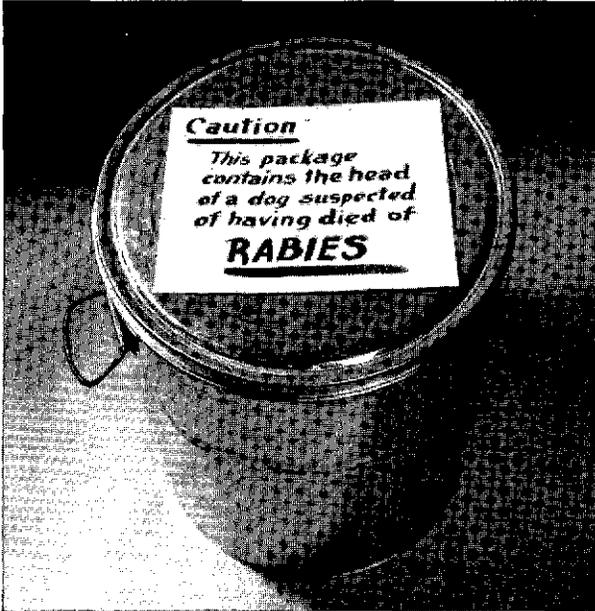
Extracción del Cerebro del Animal

Se debe tomar toda clase de precauciones, especialmente una técnica operatoria cuidadosa y la protección de las manos con guantes gruesos de

autopsia, a fin de evitar la posibilidad de una infección en las personas que abren las cabezas de los animales.

La cabeza debe sujetarse bien sobre una mesa firme, y puede inmovilizarse debidamente con un forceps para huesos, de los llamados de "quijada de león", aplicándolo firmemente al maxilar. En muchos casos, se han obtenido buenos resultados con medios improvisados tales como el empleo de un tornillo de banco.

FIG. 2. RECEPTACULO CERRADO Y ROTULADO



(Traducción del rótulo: ¡Precaución! Este envase contiene la cabeza de un perro que se sospecha murió de rabia) Por cortesía del US-DHEW-PHS-CDC

Con un cuchillo de secciones o escalpelo grande se hace una incisión en la línea media a través de la piel, fascia y los músculos del cráneo, comenzando, anteriormente, a nivel de los ojos y extendiéndola, posteriormente, hasta la base del cráneo (véase fig. 3). A continuación, se separa lateralmente la piel, las aponeurosis y los músculos temporales, descubriendo el hueso. La bóveda craneana se separa mediante una sierra, escoplo o un corta-hueso de carnicero. La mayoría de los laboratorios prefieren la sierra. Al aplicar este procedimiento, el cráneo se corta en ambos lados con una sierra para secciones óseas, esterilizada, comenzando en el foramen magnum y aserrando hasta el hueso frontal. Los cortes longitudinales se unen, en-

tonces, con un corte transversal en la lámina frontal, a muy poca distancia de los ojos (véase fig. 4), y con una pinza corta-hueso o escoplo se levanta la bóveda del cráneo (véase fig. 5).

Con otro juego de instrumentos estériles se retira el cerebro del cráneo. Las meninges y el tentorium que separan el cerebro del cerebelo se cortan y se apartan, ya sea con una pinza de diente de ratón y un escalpelo o una

FIG. 3. CORTE INICIAL DE LA PIEL A LO LARGO DE LA LÍNEA MEDIA DE LA CABEZA DEL PERRO



Por cortesía del US DHEW-PHS-CDC

tijera de puntas muy agudas. Luego, haciendo llegar el escalpelo o la tijera hasta la parte posterior del cerebro, se separa éste de la base del cráneo cortando la médula, los nervios craneales y la extensión anterior del tálamo. Hecho esto, se saca todo el cerebro de la caja del cráneo y se deposita en un plato de cartón o una caja de Petri (véase fig. 6).

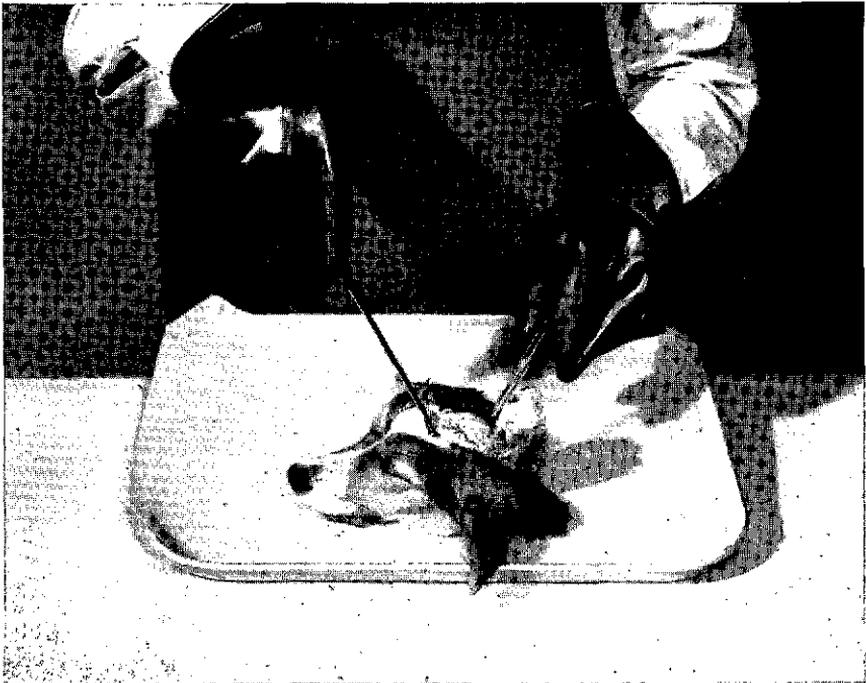
Si se dispone del cadáver del animal y no se han encontrado corpúsculos de Negri típicos en los frotis, se debe hacer una autopsia completa, con el objeto de determinar la causa de la enfermedad o del extraño comportamiento del animal. Después, el cadáver debe ser envuelto en papel e incinerado. La mesa se lava con una solución de cresol al 10%. Con una

FIG. 4. EMPLEO DE LA SIERRA PARA SECCIONES OSEAS AL HACER EL CORTE TRANSVERSAL EN EL HUESO FRONTAL AL NIVEL DE LOS OJOS



Por cortesía del US-DHEW-CDC

FIG. 5. SEPARACION DE LA BOVEDA CRANEANA



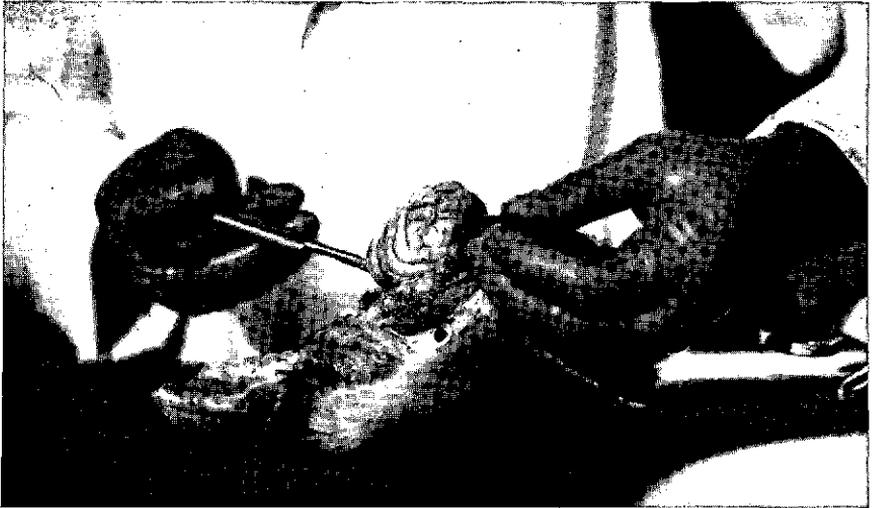
Por cortesía del US-DHEW-CDC

esponja, mojada en una solución igual, se lavan los guantes, antes de quitárselos, y se esterilizan, por ebullición, junto con los instrumentos.

Es conveniente anotar siempre el aspecto macroscópico del cerebro, señalando especialmente su estado de conservación, la presencia o ausencia de adherencias o exudado y si los vasos sanguíneos se encuentran congestionados. No hay ninguna modificación patológica macroscópica que pueda considerarse como síntoma para diagnosticar la rabia.

Aún en el campo, se deben tomar precauciones para evitar la contamina-

FIG. 6. EXTRACCION DEL CEREBRO



Por cortesía del US-DHEW-CDC

ción bacteriana del cerebro del animal, empleando instrumentos estériles en la extracción y la disección del cerebro.

Excisión de las Glándulas Salivales

El examen de las glándulas salivales, para la determinación de la presencia de virus, tiene un valor manifiesto como prueba definitiva de si una mordedura entraña peligro o no. La infección del sistema nervioso central no indica siempre que la saliva sea infectante.

Si existe virus en las glándulas salivales, las glándulas submaxilares (mandibulares) contendrán la mayor parte. Para extraer las glándulas submaxilares se voltea la cabeza en forma que su parte ventral quede hacia arriba.

Con el escalpelo o cuchillo de autopsia se hace una incisión en la línea media de la piel entre las ramas de la mandíbula. La incisión debe comenzar en el labio inferior y continuar hasta el cuello. Luego se separa la piel lateralmente, descubriendo los músculos y los tejidos superficiales blandos de la mandíbula inferior.

FIG. 7. LA PIEL Y EL TEJIDO SUBCUTANEO SE HAN RETIRADO PARA EXPONER LA GLANDULA SUBMAXILAR



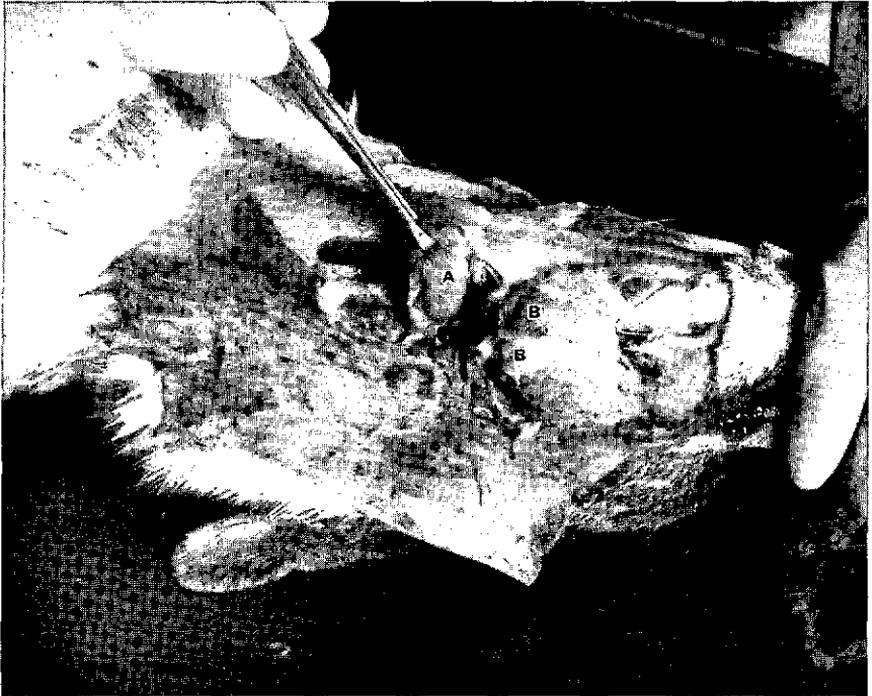
A Glándula salival submaxilar
B Nódulos linfáticos submaxilares

La glándula salival submaxilar se encuentra, en ambos lados, superficialmente, y, después de separar la piel, se puede ver cerca del borde posterior de la mandíbula, detrás y debajo de las glándulas submaxilares linfáticas, con las que no se debe confundir (véanse las fig. 7 y 8). La glándula submaxilar es de forma elíptica y tiene aproximadamente 5 cm. de largo y 3 cm. de ancho; su forma es redondeada, su color amarillo grisáceo o anaranjado y está cubierta por una cápsula fibrosa.

Con un escalpelo y una pinza de diente de ratón, esterilizados, las glándulas se separan de los tejidos adyacentes y se colocan en una caja de Petri.

Con una tijera estéril se corta una pequeña sección de cada glándula salival, y se mezclan en un mortero para preparar la suspensión destinada a la prueba de inoculación en ratones (véase sección 4, página 58). Las secciones se pesan antes de hacer la emulsión, con el fin de calcular la concentración de la suspensión de tejidos (véase la información sobre el ganglio de Gasser, en la página 47).

FIG. 8. GLANDULA SALIVAL SUBMAXILAR IZQUIERDA PUESTA DE MANIFIESTO



A Glándula salival submaxilar
B Nódulos linfáticos submaxilares

Muestras Glicerizadas

Quando no se dispone de los elementos necesarios para la inoculación, en animales de laboratorio, de los cerebros sospechosos o negativos al examen de corpúsculos de Negri, se pueden enviar porciones del cerebro o de las glándulas salivales a un laboratorio que haga la prueba de inoculación.

Con tal fin se prepara una solución estéril de glicerina en suero fisiológico al 50 %, agregando partes iguales de glicerina químicamente pura a la solu-

ción salina fisiológica. La solución se envasa luego en pequeños frascos, con tapón de rosca, se esteriliza en autoclave y se conserva a la temperatura ambiente.

Las porciones de cerebro o de glándula salival que se hayan de enviar deben ser de suficiente tamaño, por lo menos como el cerebro de un ratón (0,3 g. o más), para proporcionar al laboratorista material suficiente. En las muestras del cerebro deben figurar porciones de ambos lados del hipocampo, del cerebelo y de la corteza cerebral. También se debe tomar una muestra de la médula o del eje cerebroespinal. Las muestras se depositan en un frasco de glicerina y suero fisiológico al 50 %. De este modo, si hubiere virus rábico, se conservará durante el transporte, sin necesidad de refrigeración.

Generalmente las muestras de cerebro glicerinado no producen impresiones satisfactorias, pues es difícil conseguir que se adhieran a la lámina porta-objeto. Es más, las propiedades de pigmentación de estos tejidos se modifican, haciendo difícil el reconocimiento de los cuerpos de inclusión. Por este motivo, lo más conveniente es preparar y pigmentar frotis de los cerebros sospechosos antes de glicerinarlos, incluyéndolos en el envío junto con los cerebros glicerinados. En otro caso, se pueden preparar frotis sin pigmentar del cerebro y, para fijarlos, se sumergen las láminas inmediatamente en alcohol metílico químicamente puro (libre de acetona); al sacarlos se dejan secar a la temperatura ambiente. Los frotis, ya fijados, se pueden colorear en el laboratorio a donde se remitan.

Al recibirse en el laboratorio las muestras glicerinadas se deben sacar inmediatamente del frasco en que fueron enviadas, colocándolas en una caja de Petri estéril. Luego se lavan bien con solución salina fisiológica, vertiendo continuamente la solución, agitando con suave movimiento de rotación la caja de Petri y tirando el líquido ya usado. Esto se repite varias veces. Después, se debe hacer un frotis de las muestras de cerebro lavadas, pigmentándolas para el examen microscópico de corpúsculos de Negri. La calidad del frotis dependerá de la cantidad de glicerol que se haya logrado eliminar. El resto de la muestra queda dispuesto para la emulsificación y la inoculación en ratones. Para triturar glándulas salivales en un mortero se hace indispensable usar una pequeña cantidad de arena estéril o alúndum, pero estos materiales son innecesarios en la preparación de suspensiones de tejido cerebral.

Nota: Se aconseja conservar en solución de glicerina las porciones de la muestra que no se hayan empleado, hasta que la prueba de inoculación resulte positiva o hasta que transcurra el período de observación (por lo menos 21 días) y se dé un dictamen negativo de rabia.

EXAMEN MICROSCOPICO RAPIDO PARA DETERMINAR SI EXISTEN CORPUSCULOS DE NEGRI—TECNICAS SENCILLAS CON IMPRESION Y PREPARACION DE MUESTRAS PARA LAS PRUEBAS BIOLOGICAS

Las técnicas empleadas en el diagnóstico de la rabia en el laboratorio deben reunir las condiciones óptimas de exactitud, rapidez y economía. Se ha podido comprobar que estas condiciones se satisfacen con el examen microscópico, para determinar si existen corpúsculos de Negri, mediante la aplicación del tejido cerebral a la lámina y el empleo del método de coloración de Seller.

Se ha encontrado que los corpúsculos de Negri, cuando existen, se revelan con mayor facilidad en el cuerno de Ammón (hipocampo mayor), así como en las células piramidales de la corteza cerebral y en las células de Purkinje del cerebelo; se encuentran también, en menor número, en las neuronas del tálamo, el puente de Varolio, el bulbo raquídeo, la médula espinal y los ganglios sensoriales.

Disección del Cerebro

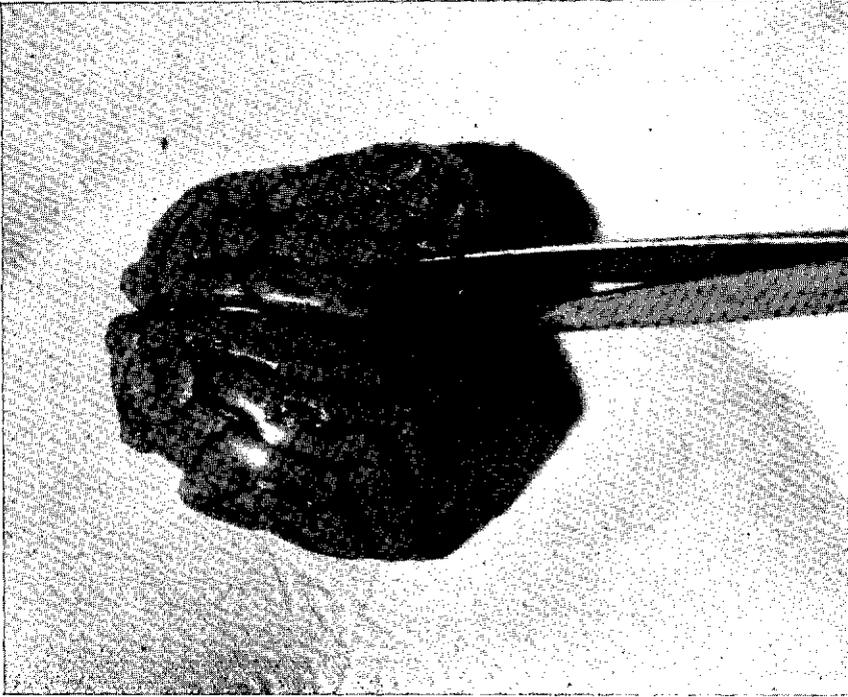
Basta una sencilla operación para exponer el cuerno de Ammón, que, en la mayoría de las especies de animales rabiosos, constituye, generalmente, la mejor área para averiguar si existen corpúsculos de Negri. Con una tijera estéril se hace una incisión longitudinal en la superficie dorsal de cada hemisferio cerebral, a unos 2 cm. de la cisura intercerebral (véase fig. 1). La incisión se inicia en el polo occipital del hemisferio, continuándose hacia adelante de 3 a 5 cm.; se corta hacia abajo la materia gris y luego la sustancia blanca hasta alcanzar un espacio estrecho, el ventrículo lateral. Al separar las dos partes de la porción cortada aparece el cuerno de Ammón como un cuerpo semicilíndrico, blanco y reluciente que sobresale lateralmente del suelo del ventrículo (véanse figs. 2 y 3). Tiene una forma retorcida y, en corte transversal, presenta una superficie espiral característica.

* Colaboración del Dr. Ernest S. Tierkel, Director del Programa de Control de la Rabia, Centro de Enfermedades Transmisibles, Servicio de Salud Pública, Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de los E.U.A. (Atlanta, Georgia)

Preparación de las Láminas

Primero se deben hacer láminas del cuerno de Ammón, después de la corteza cerebral y, por último, del cerebelo. No se debe declarar negativo un cerebro sin haber sometido previamente a examen microscópico, por lo

FIG. 1. SITIO DE LA INCISION PARA LOCALIZAR EL CUERNO DE AMMON



Por cortesía del US. DHEW-PHS-CDC

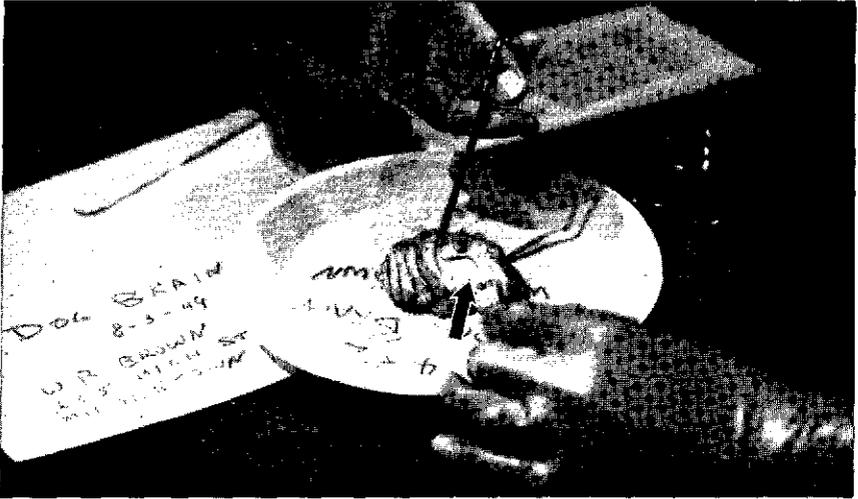
menos seis pruebas de cada lado de estas tres regiones. Siempre es conveniente examinar otra zona de cada hipocampo.

Se recomiendan, a continuación, tres métodos de preparación de láminas para el examen del cerebro.

Método de impresión

Con un par de tijeras se cortan pequeñas secciones transversales (de 2 a 3 mm. de espesor) de tejido cerebral (cuerno de Ammón, cerebro o cerebelo) y se colocan en una tira de papel secante limpio o en un bajalengua de madera, con la superficie cortada hacia arriba (véanse figs. 4 y 5). Con una

FIG. 2. INCISION DEL VENTRICULO LATERAL PARA DESCUBRIR EL CUERNO DE AMMON*



Por cortesia del US DHEW-PHS-CDC

FIG. 3. EL CUERNO DE AMMON* SOBRESALE DEL SUELO DEL VENTRICULO LATERAL

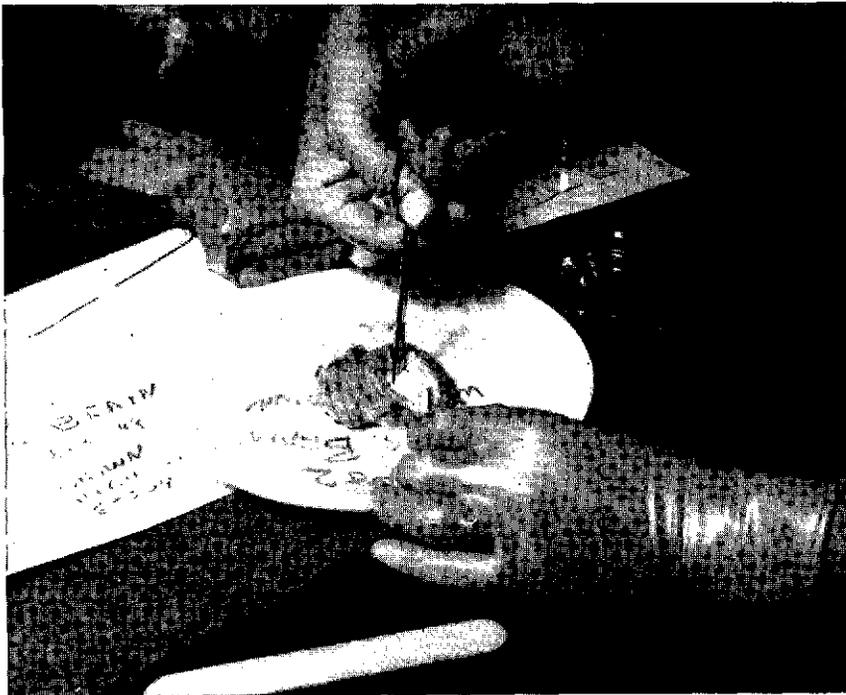


Por cortesia del US DHEW-PHS-CDC

* Señalado por la flecha

lámina portaobjeto limpia se ejerce una leve presión sobre la superficie de la sección, lo suficiente para que ésta deje su huella en la lámina de vidrio. Se pueden hacer tres o cuatro impresiones en una misma lámina, de acuerdo con el tamaño de la sección (véanse figs. 6 y 7). *Antes de que la impresión se seque*, se baña en el colorante de Sellers (véase fig. 8) durante varios segundos; se enjuaga en agua corriente y se seca a temperatura ambiente,

FIG. 4. TOMANDO UNA MUESTRA DEL CUERNO DE AMMON PARA HACER LA PREPARACION DE UNA LAMINA



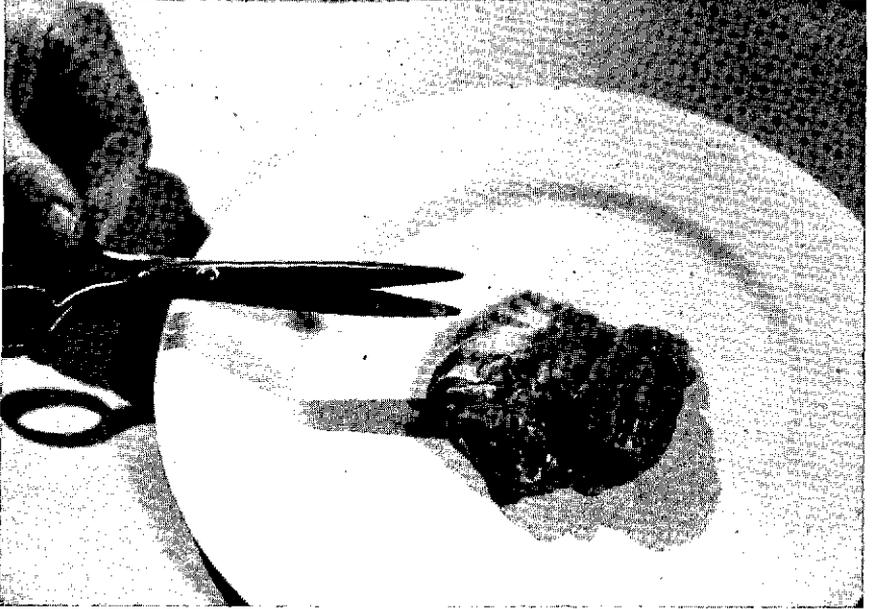
Por cortesia del US DHEW-PHS-CDC

sin usar papel secante. La preparación queda lista para el examen. Este se puede hacer directamente con aceite de inmersión o protegiendo la impresión con un cubreobjetos montado en bálamo. Este método se prefiere a los otros porque permite concentrar en una superficie pequeña la mayor cantidad de tejido nervioso, con un mínimo de destrucción celular.

Método de frotis

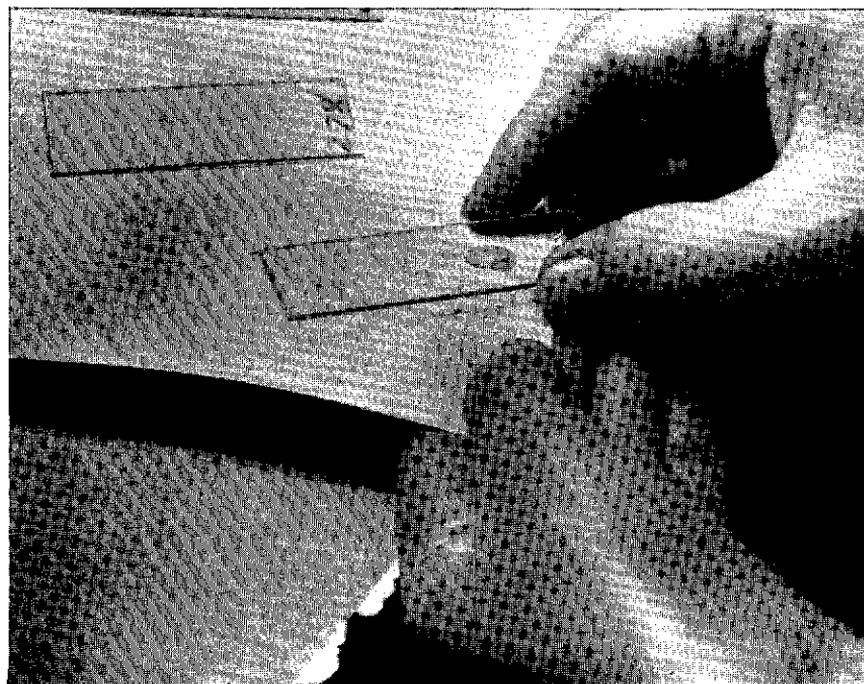
El método de frotis consiste en colocar una pequeña sección de tejido cerebral en un extremo del portaobjetos. Con otro portaobjetos se aplasta

FIG. 5. PASE DE LA SECCION A LA ESPATULA DE MADERA ANTES DE HACER LAS IMPRESIONES



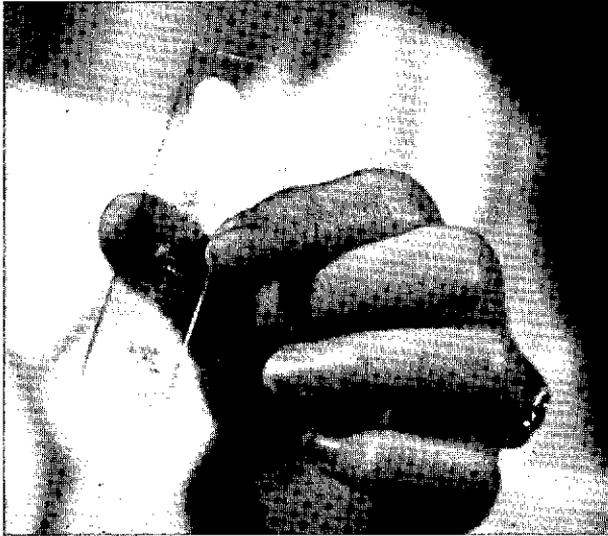
Por cortesía del US DHEW-PHS-CDC

FIG. 6. PREPARACION DE UNA IMPRESION



Por cortesia del US DHEW-PHS-CDC

FIG. 7. ASPECTO DE LAS IMPRESIONES EN UN PORTAOBJETOS



Por cortesía del US DHEW-PHS-CDC

FIG. 8. LA PREPARACION SE SUMERGE EN EL COLORANTE DE SELLERS MIENTRAS ESTA FRESCA

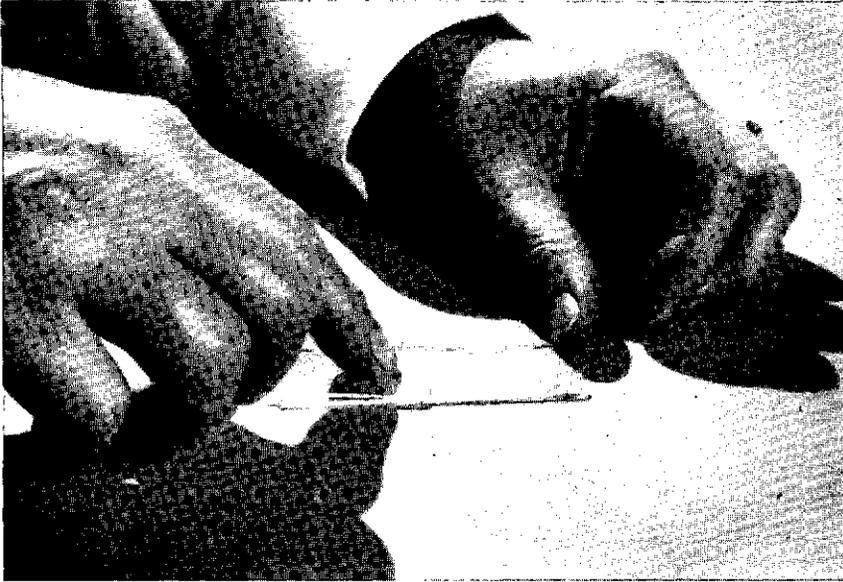


Por cortesía del US DHEW-PHS-CDC

primero la sección y luego se desliza aquél rápidamente, extendiendo el tejido (véase fig. 9). De esta forma, una delgada capa de tejido cubre uniformemente cerca de tres cuartas partes del portaobjetos.

Con el método de frotis se dispone de una abundante concentración de tejido y una extensa superficie para el examen. Se debe tener cuidado de no usar demasiado tejido, ya que esto produce una capa muy gruesa, con

FIG. 9. PREPARACION DE UN FROTIS



Por cortesía del US DHEW-PHS-CDC

lo que la coloración apropiada y el examen microscópico resultan imposibles. De todas formas, el método de impresión da resultados superiores.

Método de "rodaje"

Este último método consiste en cortar una porción de tejido cerebral del tamaño de un guisante y hacerla rodar o empujarla con un palillo de dientes o una espátula de madera, de forma que las superficies cortadas se deslicen sobre la superficie del portaobjetos.

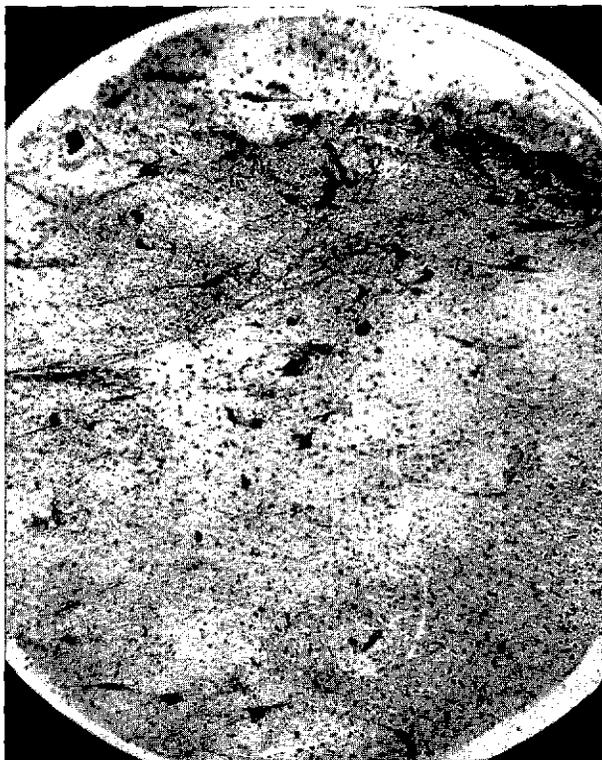
Se recomienda la coloración de Sellers por su precisión y sencillez. Este método es uno de los más rápidos, pues no requiere fijación preliminar, ya que el tejido se fija y colorea simultáneamente.

Preparación del Colorante de Sellers*

Examen de la preparación

Se puede ahorrar tiempo en el examen microscópico si se inicia el estudio de la lámina a pequeño aumento, con aceite de inmersión, para localizar

FIG. 10. PREPARACION VISTA CON PEQUEÑO AUMENTO, MOSTRANDO UN CAMPO (PARTE SUPERIOR) RICO EN NEURONAS PARA SER EXAMINADAS CON GRAN AUMENTO



Por cortesía del US DHEW-PHS-CDC

Aumento: 200 veces

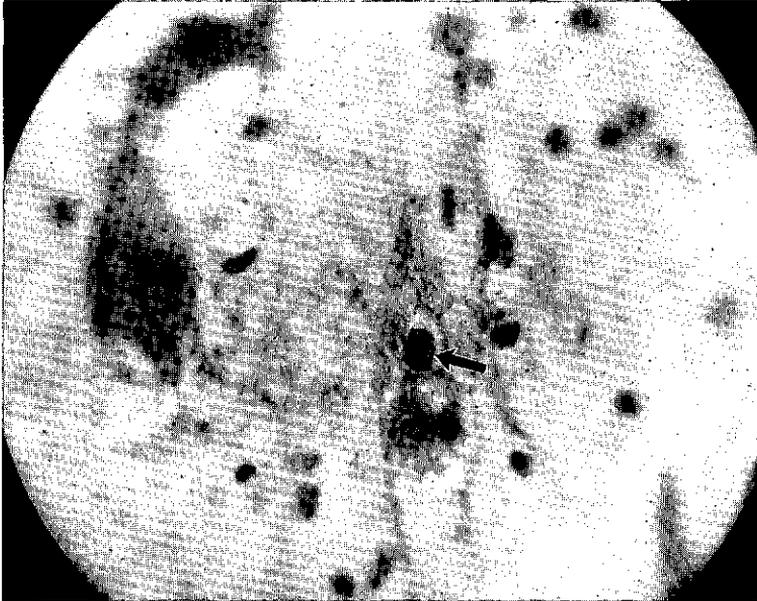
las partes ricas en grandes neuronas y buscar los corpúsculos de Negri (véanse las figs. 10 y 11).

El colorante de Sellers muestra los corpúsculos de Negri perfectamente diferenciados, en un color magenta o con una coloración que varía del heliotropo al rojo brillante, apareciendo los corpúsculos elementales de un color que va del azul oscuro al negro. Toda la célula nerviosa se colorea en

* Colaboración del Dr. Thomas F. Sellers, Director del Departamento de Salud Pública del Estado de Georgia, Atlanta (Georgia, E.U.A.)

azul y el tejido intersticial en color rosa. Los eritrocitos se presentan de color cobre (rojo anaranjado) y se pueden diferenciar fácilmente del rojo magenta de los corpúsculos de Negri (véase la lámina en colores, fig. 1, a la derecha de la pág. 40).

FIG. 11. VISTA DE UN CORPUSCULO DE NEGRI CON GRAN AUMENTO*



Por cortesía del US DHEW-PHS-CDC

* La flecha señala el corpúsculo de Negri

Aumento: 900 veces

Solución madre

- (1) Azul de metileno (Índice de Colores^{1, 2} No. 922, o Índice de Schultz³ No. 1038)..... 10 g.
- Alcohol metílico (absoluto, libre de acetona) para completar..... 1.000 c.c.
- (2) Fucsina básica (Índice de Colores No. 677 o Schultz No. 780)..... 5 g.
- Alcohol metílico (absoluto libre de acetona) para completar. . . 500 c.c.

¹ Sociedad de Teñidores y Coloristas (1924) F. Rowe, ed., *Índice de colores*, Bradford

² Sociedad de Teñidores y Coloristas (1928) F. Rowe, ed., *Suplemento al índice de colores*, Bradford

³ Schultz, G. (1928-1934) *Farbstofftabellen*, 7, Aufl., Leipzig

También se pueden emplear otros colorantes apropiados, tales como los de Gruebler and Co., de Leipzig, Gurd and Co. Ltd., de Londres, y National Aniline Co., de Nueva York.

La solución madre se debe conservar en frasco de vidrio con tapa esmerilada o con tapón de rosca. Se deben emplear, de preferencia, colorantes biológicos certificados. Para un elevado contenido de anilina se deben elegir los colorantes secos: de preferencia, el azul de metileno no debe contener menos del 85 % y la fucsina básica no menos del 92 %. Aunque se recomienda el uso del alcohol metílico absoluto, libre de acetona, en caso necesario se puede sustituir por alcohol metílico químicamente puro (Q.P.), de acuerdo con las especificaciones de la American Chemical Society.

Colorante

Azul de metileno (solución madre No. 1)	2 partes
Fucsina básica (solución madre No. 2)	1 parte

Las soluciones se deben mezclar bien, pero no se deben filtrar. Para envasarlas hay que usar recipientes de tapón esmerilado o de rosca. Este colorante mejora su calidad después de una maduración de 24 horas y se puede conservar indefinidamente si se evita la evaporación.

Ajuste del colorante

Cuando las soluciones madre se han preparado en medidas exactas, la proporción recomendada produce, generalmente, un colorante que da el contraste de color deseado; sin embargo, siempre es conveniente hacer una coloración de prueba y si los resultados obtenidos no son como los que aparecen en la fig. 1 (frente a la pág. 40) se puede ajustar el colorante rápidamente. Si las partes delgadas del estroma presentan un color rojo brillante, en vez de rosa, y toda la coloración en general es rojiza, domina demasiado la fucsina y se deben agregar pequeñas cantidades de solución madre de azul de metileno con una pipeta graduada. Después de agregar una cantidad de colorante se debe hacer una coloración de prueba hasta obtener el color deseado. Cuando domina el azul de metileno los corpúsculos de Negri aparecen de un color castaño oscuro y las células nerviosas se coloran intensamente. En este caso se debe hacer el reajuste con la solución madre de fucsina en la misma forma.

Si se evita que las soluciones madre se evaporen, se podrán preparar con ellas nuevas cantidades de colorante, usando la proporción encontrada en el reajuste.

Técnica de coloración

(1) Prepáranse las impresiones o frotis en la forma acostumbrada (véase pág. 25). No se necesita fijación.

(2) Inmediatamente, *mientras la preparación esté fresca*, sumérgase en el colorante, de 1 a 5 segundos, de acuerdo con el espesor del frotis.

(3) Lávese rápidamente en agua corriente y séquese al aire sin usar secante.

En algunas regiones el agua corriente no es buena para estas operaciones de lavado. La calidad del agua se puede determinar comparando preparaciones lavadas con agua corriente y agua destilada estabilizada al pH. 7,0.

Cuando no se emplea el colorante se debe conservar en recipientes herméticamente cerrados, a fin de evitar la evaporación, pues ésta tiende a destacar la coloración de la fucsina. La adición de alcohol metílico absoluto restituirá el equilibrio apropiado. Para uso diario, es conveniente poner el colorante en una jarra Coplin con tapón de rosca. Si esto no es posible, se debe guardar el colorante en un frasco cuentagotas con tapón esmerilado y la coloración se hará cubriendo totalmente la preparación con el colorante. La operación se debe hacer en pocos segundos, pues de otra manera la coloración no resulta satisfactoria.

El colorante da los mejores resultados cuando el tejido cerebral es fresco; al iniciarse la descomposición, la coloración característica se afecta, y aunque los corpúsculos de Negri retienen sus propiedades de coloración, el frotis en general resulta rojo y algunas veces azul, lo que hace la identificación de los corpúsculos más difícil.

Corpúsculos de Negri: Diagnóstico Diferencial

Aunque generalmente tienen una forma redondeada, los corpúsculos de Negri pueden adoptar cualquier forma. En diferentes ocasiones y en distintos laboratorios se ha demostrado que pueden ser redondos, ovalados, esféricos, ameboides, alargados, triangulares, etc. Asimismo, presentan también grandes variaciones en tamaño, oscilando entre 0,24 μ y 27,0 μ . Es de reacción característicamente acidófila en su coloración y toma una tonalidad entre rosada y rosa violeta, con los colorantes diferenciales que contienen fucsina básica o eosina y azul de metileno.

La posición del corpúsculo de Negri dentro de la neurona es intracitoplásmica. La idea más corriente es que se encuentra entre el núcleo y un ángulo de la neurona o en la prolongación del cuerpo celular. Sin embargo,

debe hacerse hincapié en que el corpúsculo únicamente se suele encontrar en posición intracitoplásmica en las secciones histológicas del cerebro. En los métodos sencillos de contacto, que se han descrito anteriormente, la estructura histológica resulta alterada y a menudo se observan corpúsculos de Negri bien formados, que parecen estar completamente fuera de la neurona. De ahí que, en los métodos de impresión de frotis o de "rodaje", la posición intracelular del corpúsculo de Negri no sea un requisito necesario para el diagnóstico, bastando, para establecer un diagnóstico positivo, la presencia, dentro o fuera de la neurona, de corpúsculos de Negri que satisfagan los requisitos de su identificación morfológica.

La nota más característica del corpúsculo de Negri es su estructura interna. Es éste el aspecto más importante para su identificación positiva en las técnicas descritas en esta sección. La matriz del corpúsculo de Negri tiene una reacción acidófila, y dentro de esta estructura de color magenta rojizo se encuentran pequeños cuerpos internos (Innerkörperchen), gránulos basófilos que se tiñen entre azul oscuro y negro. El tamaño de estos corpúsculos elementales varía generalmente entre $0,2 \mu$ y $0,5 \mu$. En los libros de texto se suele presentar el corpúsculo de Negri bien formado, con los gránulos internos en forma de roseta, un elemento grande en el centro y una serie de gránulos más pequeños claramente dispuestos en la periferia. Pero debe señalarse que este cuadro constituye la excepción más bien que la regla, y en realidad son raros los casos en que se encuentran los gránulos interiores tan bien ordenados. Para los efectos del diagnóstico es suficiente comprobar la presencia de estos gránulos, teñidos de azul oscuro, sin considerar su número ni la forma de su distribución dentro de la matriz del corpúsculo de Negri.

Universalmente se reconoce que el corpúsculo de Negri es específico de la rabia, y su presencia siempre indica esta infección. Más aún, un corpúsculo de Negri bien formado no se puede confundir con ningún otro. Sin embargo, en los laboratorios de diagnóstico, a veces se encuentran en los cerebros de animales otros corpúsculos que, por presentar ciertas semejanzas con los de Negri, pueden prestarse a confusiones. Esto sucede especialmente con los perros, zorros, gatos y ratones blancos de laboratorio. En los cerebros de perros o zorros se encuentran, a veces, las inclusiones acidófilas correspondientes al moquillo canino o a la enfermedad de Rubarth (hepatitis infecciosa canina o encefalitis del zorro). Estos cuerpos se hallan con mayor frecuencia en el tálamo y en los núcleos lentiformes que en el hipocampo. De la misma manera, en los cerebros de gatos y de ratones blancos de experimentación, que no padecen de rabia, se encuentran también, en algunos casos, inclusiones acidófilas no específicas. Todas estas inclusiones que no indican rabia tienen las mismas características tintóreas con el colorante

de Sellers, y no pueden diferenciarse entre sí con las técnicas ya descritas. Sin embargo, y esto es lo más importante, todas estas inclusiones no rábicas, consideradas en grupo, pueden diferenciarse de los corpúsculos de Negri con el empleo del colorante de Sellers. El siguiente esquema puede emplearse como guía para hacer esta diferenciación.

<i>Corpúsculos de Negri</i>	<i>Cuerpos de inclusión que no indican la rabia</i>
Presencia de gránulos basófilos internos	Ausencia de estructura interna*
Matriz heterogénea	Matriz homogénea
Menos refractivos	Más refractivos
Matices color magenta (heliotropo)	Color más acidófilo (más rosado)

* Véase la fig. 2 de la lámina en colores, a la derecha de la pág. 40.

Algunas veces se encuentran pequeñas inclusiones intracitoplásmicas atípicas en animales sacrificados en las primeras etapas de la rabia. Por ello, es imperativo mantener en cuarentena a los perros sospechosos o que han mordido, en vez de sacrificarlos inmediatamente y enviar el cerebro a un laboratorio para su diagnóstico (véase pág. 15). Hay una doble razón para esto. En primer lugar, permite la observación de los síntomas de rabia, lo que hará posible el diagnóstico clínico de la enfermedad. Y en segundo término, cuanto más viva el animal, mayores serán las probabilidades de obtener un diagnóstico microscópico positivo. En la rabia, la duración de la enfermedad clínica está en razón directa con la presencia, el tamaño, la abundancia y el desarrollo de los corpúsculos de Negri. En consecuencia, si la enfermedad prosigue su curso normal y completo, serán mayores las probabilidades de encontrar corpúsculos de Negri bien desarrollados, más numerosos y de mayor tamaño.

Diagnóstico Biológico: Preparativos para la Inoculación de Ratones

Como no siempre se consigue encontrar corpúsculos de Negri en el cerebro de los animales que mueren de rabia, es importante practicar pruebas de inoculación para el aislamiento del virus en los casos de muestras negativas. Extensas investigaciones en muchos casos de rabia han demostrado que del 10 al 15 % de los que han resultado positivos en la inoculación de ratones habían escapado al examen microscópico directo de corpúsculos de Negri. Por lo tanto, se recomienda seriamente que los laboratorios con servicios de diagnóstico de rabia dispongan del equipo adecuado para inocular, en animales, los tejidos cerebrales que resulten negativos al examen de corpúsculos de Negri.

En el pasado, se creyó que el cobayo y el conejo eran los animales más apropiados para este fin, pero desde que se demostró que la inyección intracerebral de virus rábico en el ratón blanco produce una infección típica y constante, éste ha pasado a ser el animal preferido. Las principales ventajas del ratón son: su bajo costo, que permite emplear varios animales para el examen de un solo espécimen; lo relativamente corto del período de incubación para los virus de la calle, y la formación constante de corpúsculos de Negri en el cerebro de ratones inoculados intracerebralmente con tales virus.

Un diagnóstico microscópico positivo es prueba suficiente de la presencia de rabia. Cuando el examen microscópico resulta dudoso o negativo deben tomarse, sin pérdida de tiempo, muestras de la corteza cerebral, cerebelo y del cuerno de Ammón en cada lado del cerebro, así como una muestra de la médula oblongata. Estas muestras se deben combinar emulsionándolas para hacer la inoculación en ratones descrita en la sección 4, página 57. Es muy importante obtener una muestra que represente todas las partes mencionadas, de ambos lados del cerebro, porque frecuentemente varía mucho la distribución del virus en éste.

Agentes Bactericidas para Muestras Contaminadas y Descompuestas

En muchos casos, es difícil conseguir que los cerebros lleguen al laboratorio sin haber sufrido una contaminación bacteriana. Esta se puede deber a que la cabeza haya estado en tránsito mucho tiempo, o al excesivo lapso entre la muerte y la decapitación del animal, o a que éste haya muerto de un tiro o un golpe en la cabeza. Por otra parte, la causa de la muerte puede haber sido una encefalitis bacteriana.

La inoculación intracerebral de bacterias puede causar la muerte del ratón inoculado en uno, dos, tres o más días, antes de que se haya completado el período de incubación del virus rábico que pueda haber en el inóculo. También puede darse el caso de que el ratón inoculado viva el tiempo suficiente para la incubación de la rabia y experimente todos los síntomas de temblores, parálisis y postración. De ser así, en los frotis del cerebro preparados al morir el animal pueden aparecer corpúsculos de Negri junto con numerosas bacterias.

Cuando existan sospechas de contaminación bacteriana, por ejemplo, cuando el cerebro del animal esté descompuesto o se encuentren muchas bacterias en las preparaciones, es conveniente tratar la suspensión cerebral con algún agente bactericida antes de inyectar los ratones. De los agentes

que se enumeran, la penicilina y la estreptomina⁴ dan los mejores resultados. Si no se dispone de estos antibióticos se puede emplear cualquier otro, por ejemplo:

(1) *Glicerina*. Colóquese la muestra de cerebro en glicerina pura durante 48 horas.

(2) *Fenol al 0,5%*. Prepárese una solución de fenol al 0,5%, en solución salina fisiológica. Esta se emplea como diluyente para hacer la suspensión de tejido al 10%. Consérvese durante 6 horas o de un día para otro. Si se conserva 6 horas, manténgase a temperatura ambiente. Si se conserva más de 6 horas, manténgase en el refrigerador durante la noche.

(3) *1:5.000 tiomersal (mertiolato)*. Prepárese una solución de tiomersal en suero fisiológico al 1 por 5.000. Esta se emplea como diluyente para hacer la suspensión de tejido al 10%. Consérvese durante 6 horas o de un día para otro. Si se conserva 6 horas, manténgase la suspensión a temperatura ambiente. Si se conserva más de 6 horas, manténgase durante la noche en el refrigerador.

(4) *Eter al 10%*. Mézclese una parte de éter con diez de suspensión de tejido; agítese en un frasco con tapón de vidrio y déjese dos horas a temperatura ambiente, utilizando tapón de algodón estéril para permitir la evaporación del éter.

Advertencia: Si no se evapora todo el éter, la inoculación intracerebral causará la muerte casi instantánea del ratón.

(5) *Penicilina y estreptomina*. Agréguese 500 unidades de penicilina G sódica soluble y 2 mg. de estreptomina por cada c.c. de suspensión de tejido. Manténgase 30 minutos a temperatura ambiente antes de inyectar. Generalmente esta cantidad es suficiente, pero tratándose de cerebros o glándulas salivales muy contaminados pueden emplearse hasta 1.000 unidades de penicilina y 3 mg. de estreptomina.

Para facilitar el descubrimiento de las posibles bacterias contaminantes debe cultivarse una parte de la suspensión en caldo de dextrosa u otro medio semejante, pasándola después por una placa de agar-sangre. La cantidad recomendada es de aproximadamente 0,1 c.c. de emulsión en 3 c.c. de caldo. Manténgase de un día para otro a 37,5°C.

Las muertes prematuras (1 a 3 días) de los ratones inoculados podrán atribuirse a la presencia de bacterias de contaminación si los cultivos muestran un crecimiento regular o fuerte, o si se encuentran en los frotis del cerebro de los ratones muertos muchas bacterias.

⁴ Johnson, H. N. (1942) *Illinois med. J.* 81, 382

DESCRIPCION DE LA LAMINA

La fig. 1 se reproduce por cortesía de la casa J. B. Lippincott Company y apareció en T. M. Rivers, ed. *Viral and rickettsial infections of man*, 2ª. ed., Filadelfia, Londres, Montreal, 1952; la fig. 2 se reproduce por cortesía de la Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, Pearl River, N. Y., E. U. A.; las figs. 3 a 8 fueron amablemente facilitadas por el profesor P. Lépine del Instituto Pasteur de París.

- Fig. 1.* Coloración de Sellers mostrando tres grandes corpúsculos de Negri con "Innerkörperchen". Las tres pequeñas células redondas coloreadas en rojo son eritrocitos. (Aumento, 900 veces.)
- Fig. 2.* Zorro: inclusiones no específicas en el citoplasma de una neurona degenerada (célula del cuerno anterior). Obsérvese la homogeneidad y la falta de estructura interior en el cuerpo de la inclusión. (Colorante de Mann: aumento, 1.440 veces.)
- Fig. 3.* Virus rábico de la calle—I. La célula a la derecha del centro muestra la diferencia entre el nucléolo (coloreado de rojo-violeta dentro del núcleo) y el corpúsculo de Negri (en la misma célula debajo del núcleo). Se pueden ver otros corpúsculos de Negri en el citoplasma de la célula hacia la posición que corresponde a las 10 en el reloj. (Colorante de Mann: aumento, 680 veces.)
- Fig. 4.* Virus rábico de la calle—II. Obsérvese el corpúsculo de Negri en el citoplasma de las neuronas por debajo del centro de la figura. (Colorante de Giemsa: aumento, 680 veces.)
- Fig. 5.* Virus rábico de la calle: Corpúsculos de Negri típicos, mostrando varios de ellos estructuras interiores; abundan los cuerpos microscópicos; algunos, que se encuentran en las prolongaciones de las neuronas, parecen ser extracelulares. (Colorante Lépine, de fucsina, safranina y azul: aumento, 680 veces.)
- Fig. 6.* Virus rábico fijo—I. Degeneración nuclear oxifílica típica, característica de las lesiones causadas por virus fijo. (Colorante de Mann: aumento, 680 veces.)
- Fig. 7.* Virus rábico fijo—II. Lesión nuclear osifílica, semejante a la anterior, en una neurona situada en la capa exterior del cuerno de Ammón. (Colorante de Giemsa: aumento, 680 veces.)
- Fig. 8.* Iniciación de una degeneración nuclear resultante de una lesión por virus fijo: pequeños cuerpos policromáticos llenan el núcleo de la neurona afectada. (Colorante de Mann: aumento, 680 veces.)

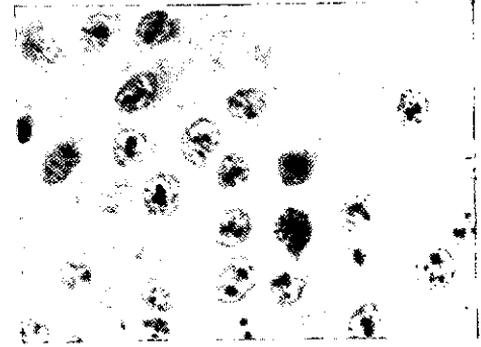
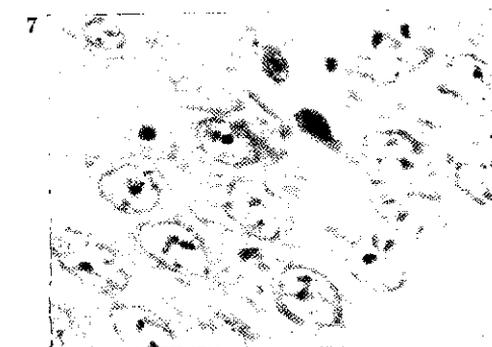
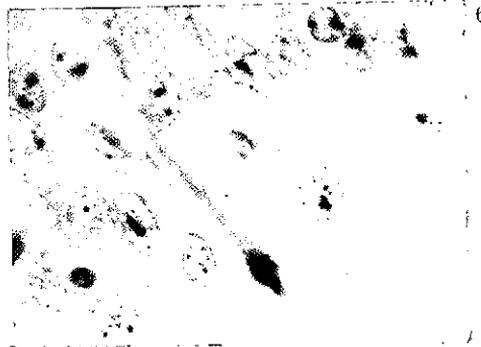
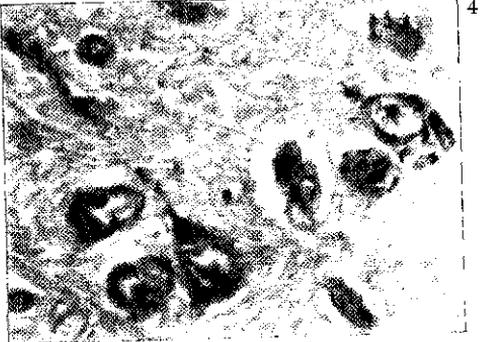
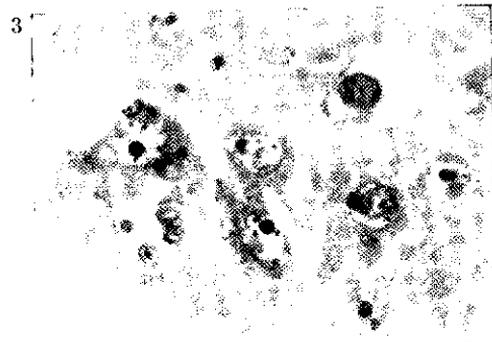
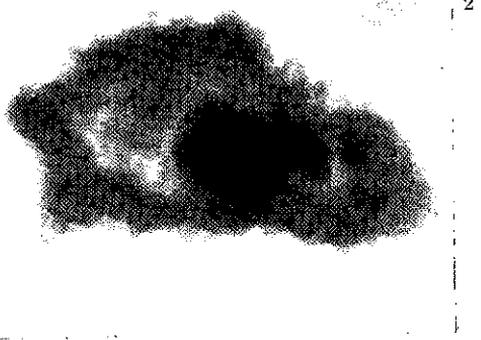
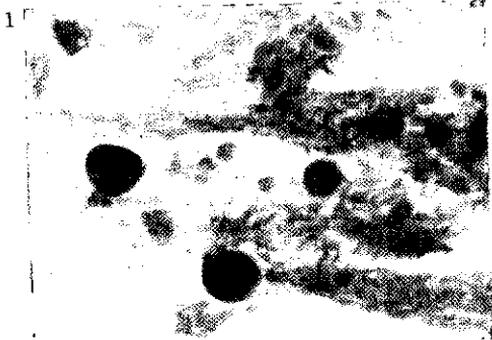
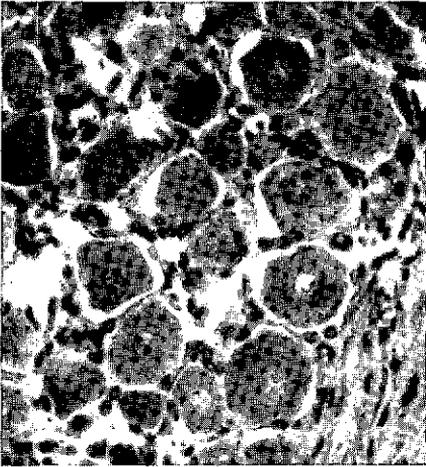


FIG. 1. GANGLIO DE GASSER NORMAL

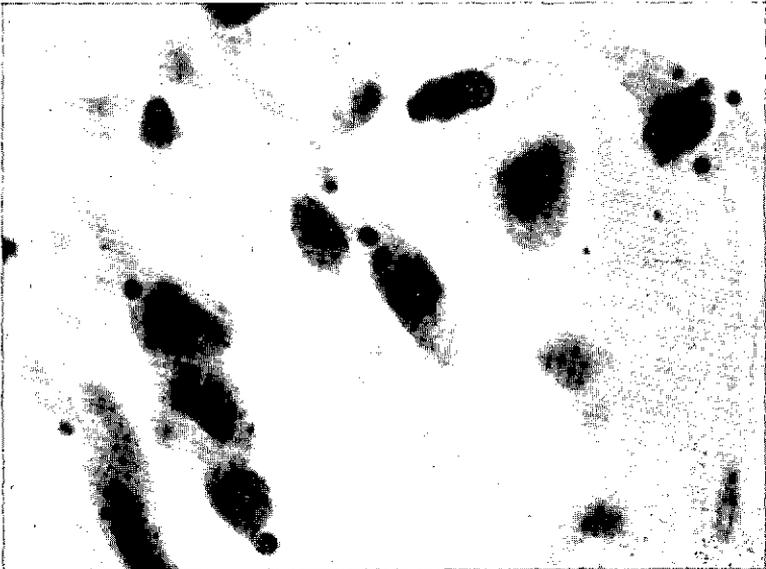


Neuronas ganglionares con una sola
capa de células satélites

FIG. 2. RABIA: INFILTRACION DEL
GANGLIO DE GASSER

Infiltración, satellitosis y neuronofagia
(lesión de van Gehuchten y Nélis)

FIG. 3. CONEJO: VIRUS DE LA CALLE



Colorante de Mann

Corpúsculos de Negri en las neuronas del cuerno de Ammón (capa interior)

Aumento: 2.000 veces

Los corpúsculos de Negri se encuentran especialmente en la capa piramidal central del cuerno de Ammón (véase la fig. 3) y en el hipocampo, en el asa inferior y capa central de las ganglioneuronas del cuerno de Ammón y, con menos frecuencia, en las neuronas del cerebro (áreas motoras) y de los núcleos medulares. Pueden ser muy numerosos en los ganglios, pero generalmente son de tamaño pequeño.

FIG. 4. CONEJO: VIRUS RABICO FIJO



Colorante de Lépine (fucsina-safranina-azul)

Aumento: 770 veces

Degeneración policromática de neuronas en la capa externa del cuerno de Ammón

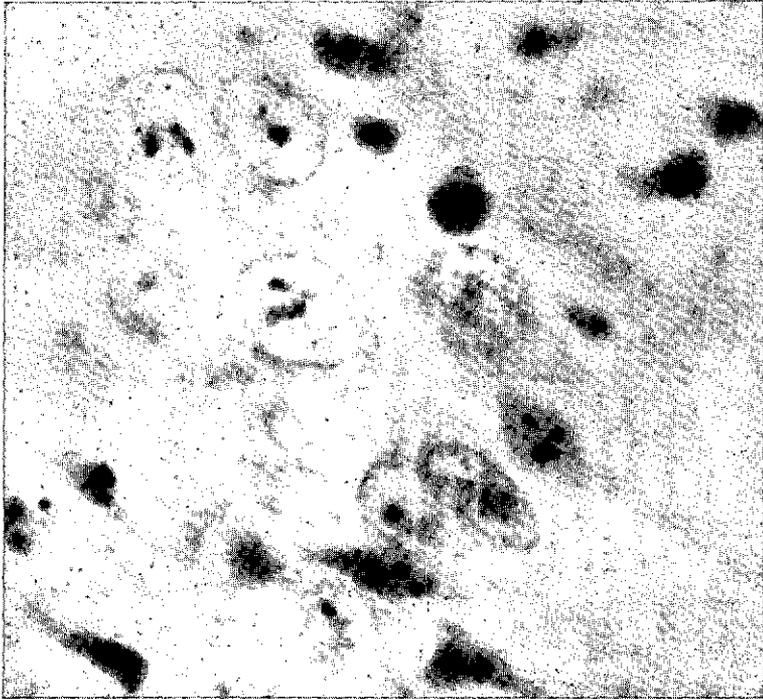
Las lesiones causadas por virus rábico fijo se encuentran exclusivamente en la zona central de la capa externa de las células del cuerno de Ammón (véanse las figs. 4 y 5). Coexisten siempre, en mayor o menor proporción, con lesiones de virus de la calle.

Estas lesiones sólo pueden descubrirse por métodos especiales de coloración (Mann, Giemsa, como en la fig. 4 de la lámina en colores, a la derecha de la pág. 40, Sellers, etc.). Su presencia permite un diagnóstico *definitivo* de la rabia.

EXTRACCION DEL CEREBRO Y PREPARACION DEL MATERIAL**Animales Grandes (Perros, Ganado Vacuno)**

El animal se amarra firmemente sobre la mesa de autopsia o, aún mejor, se separa la cabeza del resto del cuerpo y se sujeta con correas a un bloque

FIG. 5. CONEJO: VIRUS RABICO FIJO



Colorante de Lépine (fucsina-safranina-azul)

Aumento: 1.850 veces

Detalle de neuronas afectadas: pícnosis de los cuerpos celulares y multiplicidad de restos nucleares polieromáticos

de madera, ahuecado especialmente para este objeto. El operador y sus ayudantes deben usar guantes gruesos de caucho para protegerse las manos. Se hace una incisión en la línea media del cráneo a través de la piel, y se separan ésta, los músculos y fascias hasta dejar al descubierto la base del cráneo, desde la corona hasta la altura de los ojos. Se corta éste transversalmente, con una sierra, al nivel de los ojos, y simétricamente a través del occipital, haciendo además dos cortes en el temporal de cada lado a la misma altura que los anteriores. Con una pinza cortahueso se unen los

cortes de la sierra y se levanta hacia atrás la tapa del cráneo. Cuando se trata de animales muy grandes (perros grandes, vacas, etc.), es preferible seguir un método diferente: se hace con la sierra un corte longitudinal a ambos lados de la línea media del cráneo y aproximadamente a 1,5 cm. de ésta; se unen esos cortes con uno o dos transversales, por encima de las órbitas y en el occipucio, de modo que pueda retirarse la bóveda del cráneo en dos porciones simétricas.

Una vez retirada la bóveda craneana se emplean otros instrumentos estériles—pinzas de dientes de ratón y tijeras finas—para abrir las meninges. La operación consiste en hacer una incisión en las meninges, comenzando en la parte media, a lo largo y a cada lado del seno longitudinal. Luego se hace una segunda incisión, perpendicular a la primera, y los segmentos de las meninges se separan hacia atrás. Después de cambiar nuevamente de instrumentos, se corta la médula con un escalpelo, lo más abajo que se pueda, y se levanta el cerebro, de atrás hacia adelante, cortando sucesivamente los pares craneanos. Al final de la operación, se voltea el cerebro hacia adelante para depositarlo en una caja grande de Petri estéril, descansando en su cara dorsal. En época de calor, o si el cerebro está blando (cerebro cadavérico), deberá enfriarse antes de la disección a 5°C (en refrigerador), para que adquiriera una consistencia más firme.

Examen del cerebro

Obsérvese si hay o no congestión de los vasos o exudado en las meninges, etc. Hágase la disección del cerebro como sigue:

(a) Después de retirar el cerebelo y la médula, sepárense los dos hemisferios longitudinalmente con un cuchillo de cerebro.

(b) Búsquese el hipocampo y el cuerno de Ammón. Esto puede hacerse de dos maneras.

(1) Córtese transversalmente el cerebro, comenzando en la base, detrás del quiasma óptico, y continuando hacia el tercio inferior de la convexidad. El tercer ventrículo aparece en la superficie cortada; el cuerno de Ammón se presenta como un pliegue blanquecino que semeja un haba grande cortada transversalmente y puede retirarse con facilidad.

(2) En otro caso, se puede hacer una incisión longitudinal en la superficie del tercio posterior de cada hemisferio cerebral, aproximadamente a 1,5 cm. de la línea media. Se continúa la incisión a través de la materia gris y la blanca, hasta alcanzar el estrecho espacio del tercer ventrículo. El hipocampo aparece en la base del ventrículo como una protuberancia blanca, reluciente, semicilíndrica, que se extiende lateralmente a ambos lados (véase fig. 3 de la sección 2, pág. 26).

Córtense secciones transversales, de 1 a 2 mm. de espesor, de cada hipocampo. Tómense muestras similares de la corteza cerebral (área motora), del cerebelo y de la médula y sumérganse inmediatamente en el fijador elegido.

Cuando se examinen impresiones se deben ver minuciosamente por lo menos seis muestras (dos de cada hipocampo, una de la corteza cerebral y una del cerebelo), antes de declarar que el resultado es negativo. Si lo es, se debe practicar el examen histológico y la inoculación de animales.

Preparación de las muestras de tejido para el examen histológico

Si el tejido es blando y difícil de seccionar se preparan recortes de papel de filtro un poco más grandes que la muestra que se desea tomar. Sobre la superficie seccionada de cerebro se coloca uno de esos recortes y, mientras se sostiene su borde con la mano izquierda, utilizando un forceps fino con la derecha, y por medio de un escalpelo, se hace un corte paralelo al papel 2 ó 3 mm. del mismo; el tejido cortado queda adherido a éste y, en esa forma, se sumerge inmediatamente en el fijador.

Toma del material para inoculación

En la operación se debe tener cuidado de separar asépticamente muestras de las mismas partes (corteza, hipocampo, cerebelo y médula) para las pruebas de inoculación (véase sección 6 (A), pág. 79). Si el cerebro se recibe en buen estado y se puede considerar estéril, se toman las muestras antes de hacer cualquier examen. Cuando el cerebro está infectado, se pueden tomar los fragmentos en cualquier momento empleándose antibióticos, en la forma descrita en la sección 2, pág. 38.

Animales Pequeños (Conejos, Cobayos, Hamsters, Ratones)

Conejos

Descansando el animal en su superficie ventral, se sujeta a la bandeja de autopsia, con la cabeza en el borde de la misma. Con una pinza de dientes de ratón, un escalpelo y una tijera, se separa la piel de la cabeza, desde la nuca hasta el hocico, cortándose las orejas y los párpados superiores.

Se moja la superficie de la cabeza con alcohol yodado y se flamea rápidamente con un mechero de Bunsen. Sosteniendo el hocico del animal con la mano izquierda, por medio de un fórceps de Farabeuf, se destapa el cráneo con tres cortes de una pinza cortaheuso. Los dos primeros cortes se hacen

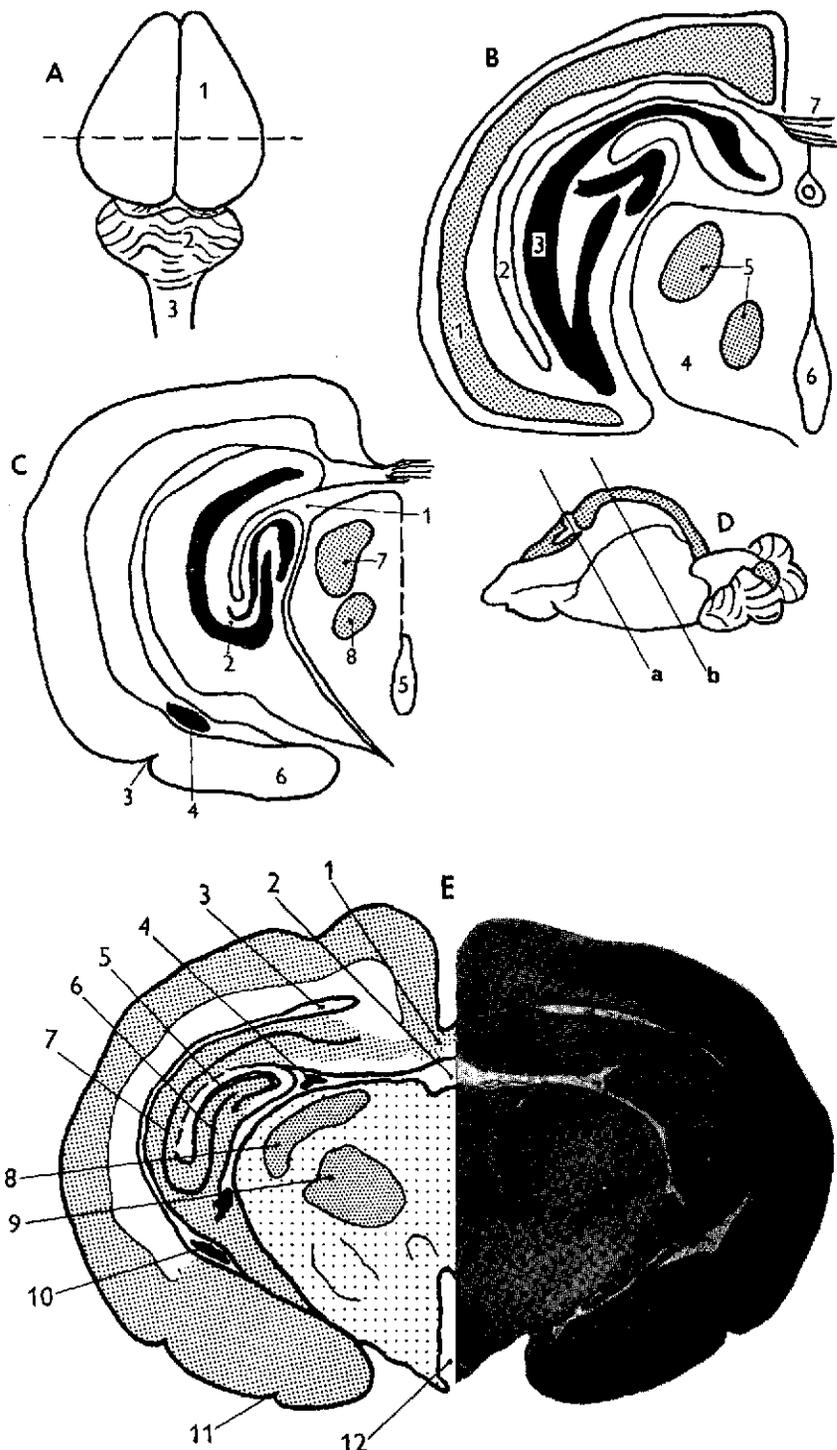
en la parte anterior de la cabeza, desde cada órbita hasta la línea media, con un movimiento hacia arriba y hacia afuera, separando hacia un lado los huesos parietales y temporales. El tercer corte se hace en el occipucio, con un movimiento de eversión, para poder levantar la tapa hacia atrás y dejar despejado el campo de operación. Se dejan los fórceps de Farabeuf y la pinza de hueso, y con pinzas de disección y tijeras se separan las meninges y se secciona, en el lóbulo olfatorio, la parte anterior del cerebro; se corta la médula detras del cerebelo y, después de levantar el cerebro para cortar el quiasma óptico, se coloca en una caja de Petri para su disección.

Con el cerebro descansando en la caja de Petri, sobre su cara dorsal con la superficie ventral hacia arriba, se corta el eje cerebral en el pedúnculo; luego se corta a través de la masa encefálica oblicuamente, siguiendo un plano transversal inclinado que comience en el quiasma óptico y se extienda hacia la convexidad, paralelamente a la superficie posterior de los hemisferios y el corte del eje cerebral. Un segundo corte en la misma forma, paralelo y por detrás del primero, y de 5 a 8 mm., da una sección transversal del cerebro que comprende la circunvolución del hipocampo y el cuerno de Ammón, así como el ganglio óptico basal—áreas preferidas para la búsqueda de corpúsculos de Negri—además del área motora de la corteza (véanse figs. 6 y 7 y la fig. 5 de la lámina en colores, a la derecha de la pág. 40). Un corte transversal del cerebelo permite el examen de las células de Purkinje y de la región peduncular. Por último, un corte en el extremo del eje cerebral proporciona una sección de la médula. Para alcanzar el ganglio de Gasser se ha de cortar la porción petrosa con un fórceps de hueso en su inserción en la silla turca; la superficie cortada se abre separando el hueso temporal hacia abajo y hacia afuera. El ganglio de Gasser se reconoce fácilmente por su forma nodular, color blanco y consistencia casi fibrosa. El ganglio se retira cuidadosamente, librándolo de fragmentos óseos, se coloca sobre un trozo de papel de filtro y se introduce en el fijador con las otras muestras.

Cobayos o hamsters

Se sujeta el animal a la bandeja de autopsia y se retira la piel de la cabeza. Se flamea rápidamente el cráneo. Con el segundo par de tijeras grandes estériles, se abre el cráneo por medio de cuatro incisiones alrededor de la cavidad craneana: la primera uniendo las dos órbitas, y las otras tres hechas sucesivamente a los lados y en el hueso occipital. Se retira el cerebro con pinzas finas y tijeras y se hace la disección en la forma descrita para el conejo. Es más difícil encontrar el ganglio de Gasser en el cobayo que en el conejo, pero con cuidado se puede conseguir.

FIG. 6. CORTES DE CEREBRO DE CONEJO Y DE RATON



La explicación de estos cortes aparece en la pág. 49)

Ratones

Se clava el ratón sobre una lámina de corcho, con la superficie ventral hacia abajo y las extremidades extendidas. Primero se fijan las cuatro patas con alfileres; con un quinto alfiler se asegura la base de la cola y con otro se clava la extremidad anterior del hocico, estirando el animal hacia adelante. Se retira la piel de la cabeza, se moja el cráneo con alcohol yodado y se flamca ligeramente con la llama piloto de un mechero de Bunsen. Se abre el cráneo con un par de tijeras finas, uniendo primero las órbitas y haciendo luego dos cortes laterales en la parte baja, para poder levantar la tapa hacia atrás. Se corta la médula y el quiasma y se pasa toda la masa encefálica a una caja de Petri. Se separa el cerebelo. Se corta el cerebro transversalmente a la altura del quiasma óptico y en un plano paralelo a la superficie posterior del cerebro, para obtener un corte transversal que se coloca en el fijador, reservándose la parte anterior para frotis e inoculaciones. Se debe fijar también una sección del cerebelo.

Si se desea examinar un ganglio se debe retirar la porción superior de la médula dorsal junto con el ganglio cervical superior.

INCLUSION, COLORACION Y EXAMEN DE CORPUSCULOS DE NEGRI

Fijador Rápido de Sublimado Corrosivo⁴

Recomendamos la siguiente mezcla para la fijación rápida del sistema nervioso: volúmenes iguales de ácido acético glacial, acetona y solución saturada de sublimado corrosivo ($HgCl_2$) en alcohol absoluto.

Explicación de la fig. 6 (pág. 48).

- A: Cerebro (ratón o conejo): 1. cerebro; 2. cerebelo; 3. médula oblongada.
- B: Sección de cerebro de ratón normal: 1. corteza cerebral; 2. ventrículo lateral (plexo coroideo); 3. cuerno de Ammón; 4. mesencefalo; 5. núcleos interiores de materia gris; 6. ventrículo medio; 7. cuerpo calloso.
- C: Sección de cerebro normal de conejo: 1. tercer ventrículo; 2. cuerno de Ammón (capa media); 3. canal olfatorio; 4. plexo coroideo; 5. infundíbulo; 6. circunvolución del hipocampo; 7. ganglio geniculado lateral; 8. núcleo ventral del tálamo.
- D: Cerebro de conejo fuera de la cavidad craneal: aspecto lateral. A la izquierda: porción anterior; al centro: lóbulos temporal y parietal; a la derecha: el cerebelo. Los cortes se hacen delante de la línea *a* (a través del quiasma óptico) y detrás de la línea *b*; la sección *a-b* se introduce en el fijador.
- E: Cerebro de conejo: sección transversal *a-b*: 1. cuerpo calloso; 2. tercer ventrículo; 3. ventrículo lateral; 4. plexo coroideo; 5. cuerno de Ammón (capa media); 6. cuerno de Ammón (capa interior); 7. cuerno de Ammón (capa exterior); 8. ganglio geniculado lateral; 9. núcleo ventral del tálamo; 10. plexo coroideo lateral; 11. canal olfatorio; 12. infundíbulo.

La mezcla se hace previamente, pues se conserva muy bien. Prepárese la solución saturada de sublimado en alcohol, en frascos herméticamente cerrados; acelérese la saturación en la incubadora a 37°C. Las secciones se deben tratar con solución de Lugol o alcohol yodado antes de teñirlas para eliminar el sublimado. Las mezclas que contengan otros componentes, especialmente formol, dan decididamente resultados inferiores, al igual que las mezclas con agua o alcohol hidratado, agregado para demorar la fijación. Este fijador endurece todos los tejidos que no sean del sistema nervioso.

Método Rápido para Inclusiones Histológicas

La fijación de secciones de tejido cerebral de 1 mm de espesor necesita de 15 a 30 minutos. El tejido se transfiere directamente a alcohol absoluto, en el que se le dan dos baños durante unos 20 a 30 minutos; luego se baña dos veces en tolueno y dos en parafina, renovando el líquido; cada baño ha de ser de 15 minutos. Incluyendo el período necesario para el corte y la coloración de las secciones, la preparación queda dispuesta para su examen microscópico entre tres horas y media y cuatro horas después de la autopsia del animal.

Inclusión en Dioxan

A veces es ventajoso el empleo de un disolvente de la parafina que también sea miscible con agua. De este modo se reducen las manipulaciones y, cuando se trata de fragmentos delgados de tejido, se ahorra tiempo. En estos casos se recomienda el uso de dioxan.

Fíjese el tejido en secciones delgadas que no pasen de 5 mm de espesor. En principio, se puede emplear cualquier fijador, pero es preferible usar la mezcla⁸ de dioxan de Bouin descrita por Lison:

Dioxan saturado con ácido pícrico	8, 5 volúmenes
formol comercial	1 volumen
ácido acético glacial	0, 5 volúmenes
Inclúyase sin lavar, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: ⁹	
dioxan I	1 hora
dioxan II	1 hora
dioxan III	2 horas

y en seguida:

parafina I.....	15 minutos
parafina II.....	45 minutos
parafina III.....	2 horas

Usese para la inclusión parafina fresca.

Téngase cuidado de conservar el dioxan en frascos herméticamente cerrados, pues hay peligro de envenenamiento crónico y anemia, a causa de los vapores, si se deja el dioxan en frascos abiertos; asegúrese su conservación en estado anhídrico, agregándole trozos de CaO.

Coloración de los Corpúsculos de Negri por el Método de Mann

Este método clásico produce secciones de coloración permanente, con una excelente diferenciación de los corpúsculos de Negri. Es un magnífico método de demostración, pero exige tiempo y cierta destreza para lograr los mejores resultados.

He aquí el procedimiento que se ha de seguir:

Prepárese la mezcla en el momento de emplearla:

azul de metilo (no azul de metileno), en solución acuosa al

1 %.....	18 c.c.
solución acuosa de eosina al 1 %.....	23 c.c.
agua destilada.....	49 c.c.

Tíñase durante 24 horas a temperatura de laboratorio o de 6 a 14 horas a 38°C (en este caso trátase primero la sección con alcoholformol para insolubilizar la gelatina, pues de otro modo se desprenden las secciones).

Lávese primero con agua corriente y luego con alcohol absoluto (rápidamente).

Hágase la diferenciación en solución alcohólica de sosa cáustica

solución al 1,5 % de sosa cáustica en alcohol.....	1 c.c.
alcohol absoluto.....	30 c.c.

hasta que la sección se tiña de color rosa (aproximadamente 10 minutos). Tan pronto como se logre esta fase, lávese bien en agua corriente. La sección debe tomar un color celeste; de otra manera, trátase con agua que contenga ácido acético (2 gotas de ácido acético en 40 c.c. de agua destilada) durante 1 minuto.

Deshidratérese rápidamente (alcohol absoluto); trátase con xilol; móntese en bálsamo.

Resultado: Corpúsculos de Negri, color bermellón; nucléolos de las neuronas, violeta rojizo; cromatina, azul; células, azul oscuro; estroma, azul pálido; eritrocitos, color rosa (véanse las figs. 3, 6 y 8 de la lámina en colores, a la derecha de la pág. 40).

Si se utiliza floxina B en lugar de eosina, en la misma proporción, las preparaciones resultan menos vistosas (azul violeta o violeta en lugar de celeste), pero las inclusiones (corpúsculos de Negri) son más numerosas y más destacadas.

Coloración de los Corpúsculos de Negri por el Método Fucsina-Safranina-Azul³

Después de que el tejido esté bien fijado, inclúyase en parafina, córtese en secciones delgadas y sáquese de la parafina. Coloréese 10 minutos con la mezcla siguiente:

- | | |
|-------------------------------------------|----------|
| (1) fucsina básica | 1 g. |
| alcohol al 50% | 200 c.c. |
| (2) solución acuosa de safranina al 0,2%. | |

Mézlense los componentes (1) y (2) en partes iguales (en frasco gotero, la mezcla es bastante estable y se conserva durante algún tiempo).

Viértase el colorante, cúbrase la sección con alcohol y acetona (en partes iguales) para eliminar el exceso de aquél y lávese rápidamente: la sección queda teñida de rojo. Coloréese de 15 segundos a un minuto con azul policromático de Unna (dilución al 10%) o con azul de permanganato preparado por el método de Stévenel¹¹ y úsese sin diluir. Viértase el colorante: la sección queda color violeta oscuro. Hágase la diferenciación en alcohol-acetona durante unos pocos segundos: la sección se torna azul; inmediatamente, lávese la preparación en agua corriente (agua de la llave) para eliminar el exceso de colorante azul y trátase nuevamente con alcohol-acetona; luego, sin lavar la preparación, comiencese la deshidratación agitando en un tubo de Borrel con alcohol absoluto. El exceso de colorante en la preparación queda así eliminado y la sección diferenciada con un color rosalila, que varía en tono de acuerdo con el espesor de la sección. Complétese la deshidratación rápidamente en alcohol absoluto, elimínese cuidadosamente el alcohol en varios cambios de xilol y móntese en bálsamo.

Resultado: estroma de color rosado muy pálido, con las fibras nerviosas de un rosado más intenso; la neuroglia y los leucocitos, azul-violado; las neuronas, azul pálido; la cromatina, morado oscuro con los nucléolos de un rojo vivo; las formaciones patológicas muy bien diferenciadas: inclu-

siones nucleares y substancias oxífilas, rosa vivo; corpúsculos de Négri, rojo amapola a rosado violeta, con la estructura interior color lila (véanse figs. 5 y 7 en la lámina de colores, a la derecha de la página 40).

FIG. 7. RABIA DE CALLE: CUERNO DE AMMON (CAPA MEDIA)



Colorante de Mann

Aumento: 800 veces

Aspecto bajo la luz blanca; numerosos corpúsculos de Négri

Descubrimiento de los Corpúsculos de Négri con el Microscopio Fluorescente

En este método se aprovecha la fluorescencia de los corpúsculos de Négri, cuando se han impregnado con fluorocromo y se exponen a la acción de una luz con una longitud de onda de 4.000 \AA .⁵ Cuando se cuenta con equipo para la microscopía fluorescente, éste es un método rápido y seguro para el diagnóstico de la rabia.

(1) Fijese el tejido cerebral e inclúyase en parafina en la forma acostumbrada. Se hacen secciones delgadas, se montan en portaobjetos y se tratan sucesivamente con xilol, alcohol absoluto y agua, para retirar la parafina.

(2) Luego, se sumerge por 30 minutos en solución acuosa de tioflavina S, al 0,2%. Sin lavar la preparación, trátase durante unos segundos con

alcohol absoluto y luego con tolueno. Móntese en bálsamo entre el portaobjetos y el cubreobjetos, empleando la menor cantidad posible de bálsamo. Se debe comprobar primero que el bálsamo esté libre de sustancias fluorescentes a la acción de la luz ultravioleta.

(3). Examínese con microscopio de fluorescencia, empleando un filtro para detener la longitud de onda mayor de $\lambda = 5.150 \text{ \AA}$. Localícese el

FIG. 8. RABIA DE CALLE: REGION CEREBRAL Y CELULAS IDENTICAS A LAS DE LA FIG. 7



Colorante de Mann

Aumento: 800 veces

Vista bajo el mismo aumento, pero con luz fluorescente, de corpúsculos de Negri con tioflavina. Obsérvese cómo los corpúsculos, por ser fluorescentes, se destacan muy bien en el fondo oscuro de la preparación

cuerno de Ammón bajo el pequeño aumento y examínese con gran aumento, empleando glicerol o parafina líquida como líquido de inmersión.

Los corpúsculos de Negri se destacan inmediatamente por razón de su viva fluorescencia (véanse figs. 7 y 8) y su color celeste (azurc) brillante. El fondo de la preparación es amarillo pálido, el protoplasma celular amarillo brillante, y los nucléolos y eritrocitos azul pálido.

Método de Stovall y Black

Un método de coloración muy generalizado en los Estados Unidos es el descrito por Stovall y Black,¹² caracterizado por fijación con acetona y

coloración en serie. A continuación se reproduce la descripción hecha por Lillie,⁶ así como una variante de este método citada por él.

- “1. Tíñase durante 2 minutos en solución alcohólica de eosina etílica, al 1%, (C. I. No. 770, eosinato etílico de sodio), ajustada a pH 3,0 con ácido clorhídrico N/10.
2. Lávese con agua.
3. Tíñase durante 30 segundos en azul de metileno al 0,23%, diluído en alcohol de 22% estabilizado a un pH 5,5 con estabilizador de ácido acético y acetato sódico.
4. Diferénciese en ácido acético al 0,38% en agua (13 gotas en 60 c.c.) hasta que las secciones queden color rojo parduzco.
5. Lávese, deshidrátese y clarifíquese.
6. Móntese en bálsamo.

Resultados: Los corpúsculos de Negri aparecen de color rojo parduzco a rojo vivo; los nucléolos, azul pálido; las demás estructuras, color de rosa.

“Variante de este método que hemos usado con éxito.

1. En 90 c.c. de alcohol al 100% ó 94 c.c. de alcohol, al 95,5%, 3,25 c.c. de ácido acético, al 1%, y suficiente agua para completar 100 c.c., disuélvanse 950 mg. eosina etílica. Colorécese en esta mezcla durante 2 minutos.
2. Lávese luego en alcohol y agua.
3. Contratíñase el tejido fijado en formalina con azul de metileno al 0,5%, en alcohol al 25%; el material fijado en alcohol, en alumbre-hematoxilina.
4. Diferénciese en ácido acético al 0,25% durante 2 a 5 minutos.
5. Lávese, deshidrátese y clarifíquese.
6. Móntese en bálsamo.”

Otros Métodos de Coloración

Entre el sinnúmero de métodos que han sido recomendados para teñir los corpúsculos de Negri los siguientes son también eficaces:

- (1) Método de Lentz:² ésta es una variante del método de Mann.
- (2) Método de Gallego,¹ en el que se emplea cloruro férrico ácidocoma mordente, seguido de coloración por el método de Ziehl y pierocarmin.
- (3) Método de Romanowsky-Giemsa: Giemsa estabilizado siguiendo el método de Lillie y Pasternack.⁷
- (4) Método de Schleifstein:¹⁰ combinación del método de Sellar con el método rápido de inclusión con dioxan.

BIBLIOGRAFIA

1. Gallego, A. (1925) *Z. InfektKr. Haustiere*, **28**, 95
2. Lentz (1907) *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.* **44**, 374

3. Lépine, P. (1935) *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **119**, 804
4. Lépine, P. y Sautter V. (1936) *Bull. Histol. Tech. micr.* **13**, 287
5. Levaditi, J., Lépine, P. y Augier, J. (1948) *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **227**, 1061
6. Lillie, R. D. (1948) *Histopathologic technic*, Filadelfia, p. 225
7. Lillie, R. D. y Pasternack, J. G. (1936) *J. techn. Meth.*, **15**, 65
8. Lison, L. (1936) *Histochimie animale. Méthodes et problèmes*, París
9. Mossman, H. W. (1937) *Stain Technol.* **12**, 147
10. Schleifstein (1937) *Amer. J. Publ. Hlth.*, **27**, 1283
11. Stévenel (1918) *Bull. Soc. Path. exot.* **11**, 870
12. Stovall, W. D. y Black, C. E. (1940) *Amer. J. Clin. Path.* **10**, 1

*Sección 4**

PRUEBA DE INOCULACION EN RATONES

A pesar de la sencillez propia de una prueba de inoculación en ratones, sus resultados dependen, en gran parte, del grado de exactitud con que se haya llevado a cabo.

Selección de los Ratones

Raza

Por regla general, el ratón blanco de cualquier raza sirve para esta prueba. Se debe dar preferencia, al ratón suizo albino, ya que es muy susceptible al virus rábico y es fácil de mantener el plantel de cría en el laboratorio. Sin embargo, si no se puede obtener el ratón suizo albino, se puede emplear casi cualquier variedad de ratón, excepto el gris silvestre, porque aún no se ha encontrado una raza genéticamente resistente. El ratón gris silvestre se debe excluir, no porque no sea susceptible, sino porque no es fácil que resista el confinamiento en la jaula durante el período de observación.

Edad

Los ratones de toda edad son susceptibles a la rabia por vía intracerebral. Sin embargo, es más fácil inocular, mantener y observar ratones que tengan entre 21 y 35 días de edad (8-12 g. de peso) en el momento de inocularlos.

Sexo

Los ratones de ambos sexos son igualmente susceptibles al virus rábico. No es aconsejable mantener en la misma jaula adultos de un mismo sexo porque, especialmente los machos, pueden matarse peleando antes de que termine el período de observación.

Salud en general

Es imperativo que los animales seleccionados para ser inoculados estén en buen estado de salud. Es importante conocer la historia de la colonia y conviene examinar cuidadosamente a los animales antes de inocularlos.

* Colaboración de Hilary Koprowski, Subdirector de la División de Investigaciones de Virus y Rickettsias de los Laboratorios Lederle, American Cyanamid Company, Pearl River, N. Y., E.U.A.

La presencia de ectoparásitos, pelo hirsuto y claros signos de diarrea, basta para descalificar estos animales inmediatamente. Si los ratones son enviados al laboratorio desde un punto lejano, es aconsejable postergar la inoculación por lo menos tres días para dejar que descansen y se ajusten a las nuevas condiciones. En estos casos, conviene también dejar unos cuantos animales sin inocular a fin de poder observar la mortalidad "normal" y compararla con la de los animales inoculados.

Preparación de Material Sospechoso para la Inoculación

Selección del tejido

Para aislar el virus de un animal sospechoso de rabia se pueden emplear tanto el cerebro como las glándulas salivales. La recuperación del virus es más frecuente en el cerebro que en las glándulas salivales. Sin embargo, desde los puntos de vista epidemiológico y epizootiológico, es importante examinar también las glándulas salivales.

Aunque para preparar la suspensión puede utilizarse, indistintamente, cualquier porción de cerebro, se debe dar preferencia al cuerno de Ammón, al cerebelo y porciones de la corteza. Cuando se elijan glándulas salivales se debe tener en cuenta que en las submaxilares es donde más fácilmente se acusa la presencia del virus rábico. Asimismo, cuando se emplean glándulas salivales, conviene picar el tejido antes de molerlo.

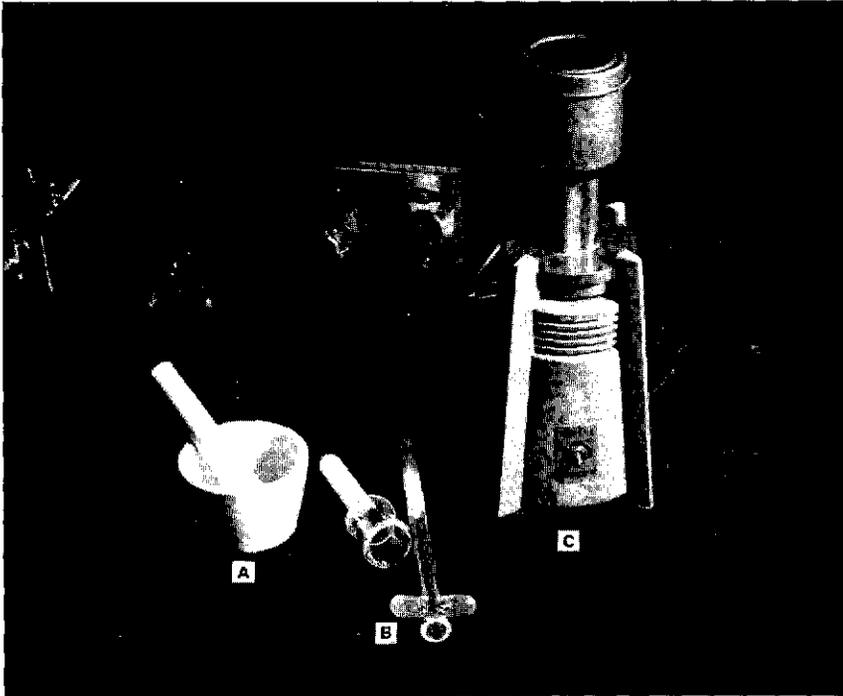
Molino

La selección del molino, hasta cierto grado, depende de la cantidad de tejido disponible. Si se dispone de más de 3 ó 4 g. de material, es preferible una licuadora de Waring a cualquier otro molino (véase fig. 1). Pero si la cantidad de tejido es menor de 3 g. (lo cual es lo más frecuente), o si no se dispone de una licuadora de Waring, conviene utilizar los molinos o dispositivos que se mencionan a continuación, en el siguiente orden de preferencia:

(a) *Molinillo de TenBroeck* (véase fig. 1): Este molino es un aparato muy manejable, fácil de montar, lavar y esterilizar, pero sólo se puede emplear para tejido cerebral, pues las glándulas salivales son demasiado duras para triturarlas debidamente en él. Presenta una ligera desventaja por lo delicado de su mecanismo. Si se usa en forma inapropiada, se puede romper durante su funcionamiento y se puede dañar con facilidad durante su limpieza o esterilización, etc. Desde el punto de vista de la seguridad personal, la licuadora de Waring y el molino de TenBroeck, empleados debidamente, ofrecen ciertas ventajas sobre los otros dispositivos.

(b) *Mortero y pistilo* (véase fig. 2): Este método clásico de trituración tiene una ventaja, pues, con la ayuda de un abrasivo (v.g., arena estéril), permite triturar hasta los tejidos más duros. El mortero y pistilo no se pueden manejar en condiciones tan asépticas como la licuadora de Waring o

FIG. 1. MOLINOS PARA LA PREPARACION DEL TEJIDO



A = Mortero y pistilo B = Molinillo de TenBroeck
C = Licuadora de Waring (pequeña)

el molino de TenBroeck; pero en cambio se pueden limpiar y esterilizar con facilidad y resisten el uso y desgaste durante mucho tiempo.

(c) *Dispositivos improvisados*: Si no se cuenta con una licuadora de Waring, ni con un molinillo de TenBroeck o mortero y pistilo, se pueden improvisar los siguientes dispositivos:

(i) *Vasija cóncava y brocha de pintar*. Cualquier recipiente cóncavo y brocha de pintar de tamaño mediano que se puedan esterilizar, se pueden emplear para moler, aunque sólo tejido cerebral. La suspensión puede hacerse con bastante facilidad y resulta tan homogénea como la preparada con mortero y pistilo, pero se requiere más tiempo. La brocha

se debe limpiar escrupulosamente y se ha de esterilizar debidamente después de su empleo.

(ii) *Trituración con tijera.* Si no se dispone de otra forma de moler, se puede picar el tejido con tijeras curvas muy afiladas. Lo mejor es utilizar para esto un cristal de reloj, esterilizado, dentro de una caja de Petri. Claro que éste es el método menos recomendable porque siempre quedan

FIG. 2. PREPARACION DE LA SUSPENSION CON MORTERO Y PISTILO



Por cortesía del US. DHEW-PHS-CDC

algunas porciones de tejido demasiado grandes para la pipeta, la inoculación, etc.

Diluyente

La elección del diluyente puede dejarse al criterio del laboratorista, pero es preferible emplear una concentración salina isotónica; sin embargo, se sabe que los ratones pueden resistir con facilidad la inoculación intracerebral de agua destilada estéril. Se puede elegir cualquiera de los siguientes diluyentes, según el orden que aconseje su facilidad de obtención:

(a) *Una solución salina fisiológica con diversas cantidades de suero (con-*

centración de 10 a 50 %): Este es el diluyente más empleado. Sin embargo, el animal donante no debe haber sido vacunado nunca contra la rabia, y este hecho se ha de confirmar con toda seguridad. Por lo tanto, hay que evitar, generalmente, el empleo de suero de perros o gatos o de ganado vacuno. El suero normal de carnero parece tener ciertas propiedades contra los virus que no se encuentran en el suero de conejo. De ahí que, si se puede obtener, se debe considerar al conejo como la principal fuente de suero. Es preferible inactivar el suero durante 30 minutos a 56°C antes de usarlo para preparar el diluyente. Los diluyentes que contengan suero sólo se pueden esterilizar a través de un ultrafiltro.

(b) *Otros diluyentes:*

- (i) leche desnatada
- (ii) solución de albúmina en una concentración salina compensada.
- (iii) solución salina fisiológica con agua destilada

Estos diluyentes no se recomiendan especialmente, aunque parece que el virus rábico no es muy susceptible a la acción inactivadora de las soluciones salinas, en contraste con otros virus como el de la encefalomielitís equina del este o del oeste.

Nota: Si una suspensión de tejido se ha conservado durante algún tiempo en estado de congelación, el diluyente debe ser, de preferencia, una solución de suero y agua al 50 %.

Esterilidad bacteriana

No es necesario agregar antibióticos a las suspensiones de *tejido cerebral*, si el material ha sido manejado en la autopsia con el debido cuidado y despachado en un recipiente estéril. Para la conservación del material se recomienda una solución de glicerina al 50 % porque, además de su cualidad de preservador, ejerce una fuerte acción bacteriostática (véase la sección 2, pág. 39). Sin embargo, si hay alguna duda, será más seguro agregar a la suspensión suficiente penicilina y estreptomina para obtener una concentración de 2 mg. de estreptomina y 50 unidades de penicilina por cada c.c. de suspensión total. Si se emplean antibióticos, es mejor dejar la suspensión por lo menos 30 minutos antes de inocular a los animales.

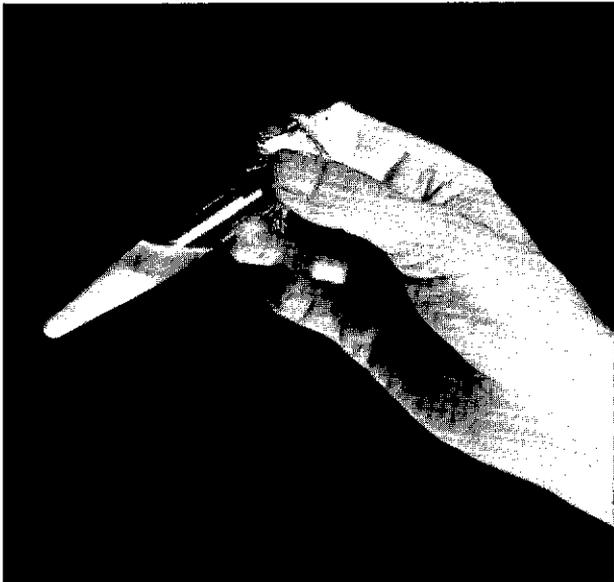
Se recomienda que se agreguen siempre antibióticos a las suspensiones de *glándulas salivales*. A pesar del empleo de antibióticos, las suspensiones de glándulas salivales se deben cultivar siempre por la posible contaminación bacteriana. Para tales cultivos, se consideran excelentes el caldo de infusión de carne, el medio de tioglicolato y el agarsangre. Si se observa desarrollo de bacterias, se debe tratar de identificar el agente bacteriano. Si los resultados de la inoculación en ratones son dudosos (véase pág. 69)

FIG. 3. CENTRIFUGACION DE LA SUSPENSION



Por cortesía del US. DHEW-PHS-CDC 1.000 r.p.m. durante 5 minutos

FIG. 4. ASPECTO DE LA SUSPENSION DE TEJIDO CENTRIFUGADA



Por cortesía del US. DHEW-PHS-CDC

puede ser conveniente comprobar la patogenicidad de la contaminación bacteriana mediante la inoculación de tales roedores por vía intracerebral.

Concentración de la suspensión de tejido

En cada caso se ha de utilizar el grado de concentración que se estime conveniente. Si se va a almacenar, lo mejor es una suspensión al 20 %, por peso. El peso del tejido en gramos, multiplicado por 4, da el número de centímetros cúbicos de diluyente que se debe agregar. En cambio, si se va a usar para la inoculación intracerebral de ratones, se debe preferir el 10 %. Se puede diluir la suspensión al 20 %, agregando un volumen igual de diluyente, o se puede preparar la suspensión multiplicando por 9 el peso en gramos del tejido, a fin de conocer la cantidad necesaria en centímetros cúbicos de diluyente.

Cuando se trata de aislar ciertas cepas del virus rábico de calle se puede sospechar, en algunos casos, el fenómeno de la "neuro-autoesterilización". En estos casos, que no son frecuentes, se recomienda que se diluya la suspensión a más del 10 %. (véase pág. 69).

Centrifugación y filtración

Si se cuenta con el instrumental necesario, se aconseja que se centrifugue la suspensión de tejido durante 5 minutos a 1.000 revoluciones por minuto (r.p.m.), a fin de eliminar las partículas gruesas (véanse las figuras 3 y 4). Sin embargo, si no se dispone de centrifugadora, se pueden inyectar perfectamente los ratones por vía intracerebral, con la suspensión al 10 % sin centrifugar. Las suspensiones de glándula salival sin centrifugar se deben filtrar a través de una o dos capas de gasa estéril, a fin de evitar que los animales mueran por trauma.

Inoculación de Ratones

Elección de la jeringa

Se deben escoger jeringas que puedan medir exactamente 0,03 c.c. (dosis para el ratón). En consecuencia lo preferible es una jeringa de tuberculina, de un cuarto de c.c., o, en su defecto, una de medio centímetro o una de un centímetro cúbico. Para la inoculación intracerebral hay que elegir agujas de calibre 27 ó 26 (0,40 a 0,45 mm. de diámetro) y de 1 a 1,5 cm. de largo. Las agujas más gruesas producen traumatismo en la masa cerebral.

Anestesia

Es muy conveniente anestcsiar a los ratones antes de inocularlos: el mejor método es la inhalación de éter. Para este objeto se puede usar un frasco de pila eléctrica al que se le coloca un fondo de tela de alambre (fig. 5). Si no se cuenta con este dispositivo, se puede aplicar una inyección de pentobarbital de sodio. Es aconsejable que la mesa utilizada para la inoculación esté suficientemente separada de la pared, para que un ayudante pueda anestcsiar a los ratones situándose frente al operador.

Método de inoculación (véase la fig. 5)

Hay tantos métodos de inoculación como investigadores. El autor de este trabajo opera con la mano derecha y prefiere la técnica siguiente.

Los ratones anestcsiados se colocan sobre el lado izquierdo con las patas hacia el inoculador. Con el pulgar de la mano izquierda, el inoculador sujeta la mandíbula inferior del ratón, teniendo el dedo índice detrás del cráneo del animal. La presión debe ser muy ligera para evitar la sofocación y la muerte de éste. Con la mano derecha, el inoculador toma la jeringa, manteniéndola en posición horizontal, paralelamente a la superficie de la mesa y perpendicular a la cabeza del ratón, con la aguja dirigida hacia sí mismo. Mediante un movimiento rápido, se introduce la aguja en el cráneo en un punto que se puede señalar como el vértice de un ángulo imaginario, cuyos lados se dirigen al ojo y a la oreja derecha del animal. La aguja atraviesa fácilmente el hueso, y, después, se debe hacer que penetre de 0,1 a 0,2 cm. en la masa encefálica. Cuando el inoculador esté empleando una aguja de 1,5 cm. debe tener cuidado de no profundizar demasiado, pues corre peligro de hacer la inyección en la base del cráneo. El émbolo se empuja hasta la próxima división de 0,03 c.c. y luego se retira la aguja con mucho cuidado.

En la inoculación intracerebral los ratones inoculados se apartan de la mano en que se tenga la jeringa (si se trabaja con la mano derecha los ratones se deben apartar hacia la izquierda). Esto es para evitar que se crucen las manos, lo que podría causar un pinchazo en un dedo con la aguja sostenida en la mano contraria.

Una vez inoculados los ratones, se colocan inmediatamente en una lata o una caja preparada y rotulada con anterioridad con una etiqueta que lleve el número del grupo de ratones o cualquier otra marca de identificación. Si se hace un gran número de inoculaciones, vale la pena tomar nota del número de ratones que sobreviven en cada serie al terminar todo el experimento. Si mueren algunos animales, se inocula un número igual y se agrega al grupo.

En ningún caso se deberá usar la misma jeringa para inyectar dos suspensiones distintas. Si no se cuenta con número suficiente de jeringas

estériles, las disponibles se deben hervir entre una y otra inoculación, teniendo cuidado de enfriarlas antes de llenarlas nuevamente de inóculo.

Conviene aplicar siempre las mismas precauciones y en la forma más estricta, para desarrollar buenos hábitos en el trabajo con virus. Por ejemplo, al vaciar rápidamente una jeringa en un recipiente de agua, se produce un aerosol que puede causar una infección por inhalación en el operador o en los animales con que esté trabajando, si la enfermedad es de las que se

FIG. 5. INOCULACION INTRACEREBRAL DE RATONES



transmiten en esta forma. El virus se puede transmitir de la mesa a las manos, y si éstas no se lavan en forma debida es posible contaminar otras muestras durante la trituración en mortero; por ejemplo el virus puede caer de las manos o mangas al mortero. Al colocar sobre la mesa los ratones anestesiados algunos de ellos se pueden despertar, y al introducirlos de nuevo en el frasco de anestesia pueden contaminarlo. Si se empleara el mismo frasco para nuevos trabajos, el virus podría adherirse a la cabeza de los ratones normales y penetrar en el cerebro en el acto de la inoculación. La mesa de trabajo se debe considerar contaminada hasta que se haya lavado con agua y jabón. El bicloruro de mercurio diluído es un buen desin-

fectante para la superficie de las mesas. Las soluciones de cresol y fenol no son más efectivas que el agua contra los virus que más comúnmente contaminan el tejido del ratón, tales como el virus de la encéfalomicelitis y muchos otros. El fenol no tiene una acción apreciable contra el virus de la rabia.

Una vez terminada la inoculación de todos los ratones, la jeringa y aguja se pueden enjuagar en agua, siempre que esto se haga con cuidado, manteniendo la punta de la aguja debajo de la superficie del agua en la cubeta de esterilización. Hay que esterilizar todas las jeringas y agujas en agua hirviendo durante cinco minutos.

FIG. 6. HISTORIA CLINICA DE LOS RATONES

Num.	Fecha										Virus											
Cepa	Pase										Preparación											
Volumen					Dilución																	
Fecha	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						
6																						
Observados por																						
										Edad de los ratones										Via		

LPR 542

Observación de los Ratones Inoculados

Aunque el virus rábico rara vez produce síntomas de enfermedad en los ratones antes del quinto día, a partir de la inoculación intracerebral, es conveniente observarlos diariamente desde el siguiente a la inoculación. El número de ratones que se encuentren normales, enfermos o muertos, se va registrando en una tarjeta (fig. 6) que se conserva en los archivos como un registro permanente del experimento. El período de observación debe continuar por un mínimo de 21 días después de la inoculación. Sólo rara vez se encontrará virus rábico en el material inyectado después de transcurrir veintidós días desde la inoculación.

Se pueden observar en los ratones los signos siguientes:

(a) Pelo hirsuto; (b) temblores cuando se les sostiene en el aire, por la cola, con una pinza; (c) falta de coordinación en las patas traseras: nótese

la forma de avanzar del ratón cuando se le obliga a caminar; (d) parálisis; (e) postración (cercana a la muerte). Todos los días se anotan, con una letra representativa, los diferentes síntomas en la tarjeta de historia clínica de los ratones.

Las muertes de ratones que ocurran de 24 a 48 horas después de la inoculación intracerebral se deben imputar a otras causas y no al virus rábico (trauma, contaminación bacteriana, otros virus). Para fines de diagnóstico, se pueden sacrificar diariamente uno o dos ratones, comenzando en el quinto día, con el objeto de buscar corpúsculos de Negri. Frecuentemente se puede obtener así un diagnóstico precoz, especialmente cuando se trate de ciertas cepas de virus de calle que podrían tardar de 1 a 3 semanas en causar la muerte de los ratones.

Nota: Los síntomas clínicos de enfermedad en los ratones inoculados no pueden considerarse como característicos de rabia. Aunque los síntomas de parálisis, cinco o más días después de la inoculación, pueden hacer sospechar la presencia del virus rábico, los mismos síntomas se pueden observar en muchas otras infecciones, causadas por virus, bacterias y protozoarios que atacan el sistema nervioso central del ratón. La prueba definitiva de la naturaleza del virus se obtiene mediante la prueba de suero-neutralización (véase la sección 5, pág. 70).

Pases Adicionales de Material Infectado

Con el cerebro de los ratones que han muerto de infección después de ser inoculados con el virus original se puede, si se considera necesario, preparar una suspensión en la forma ya descrita y almacenarla o emplearla en pruebas de neutralización o para la inoculación de otro grupo de ratones.

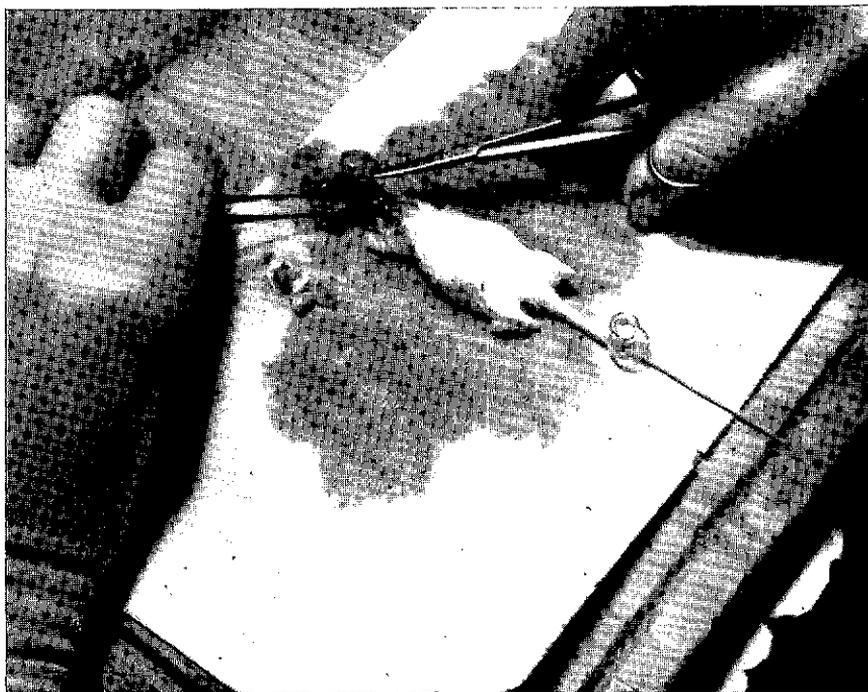
Extracción del Cerebro del Ratón

El cerebro de todo ratón que haya muerto durante la noche, o que haya sido sacrificado en estado de coma, se debe extraer para buscar corpúsculos de Negri (véase la sección 2, pág. 24). Para sacrificar a los ratones que presenten síntomas de postración (síntomas terminales de rabia) se les debe administrar cloroformo.

Clávese el ratón muerto sobre el tablero de disección con la superficie dorsal del cuerpo hacia arriba. Sólo se necesitan dos alfileres: uno a través del hocico y el otro en la base de la cola (véase la fig. 7). También se pueden usar tres alfileres o sujetadores de resorte: uno para cada mano y uno para la cola.

Con pinzas y tijeras se retira la piel de la cabeza y el cuello, descubriendo el cráneo. Este se sujeta por las órbitas con una pinza de dientes de ratón y la bóveda se corta con tijeras curvas, descubriendo el cerebro. El cerebro se retira con un par de tijeras curvas (véase Fig. 7) y se coloca en una caja de Petri estéril. Se corta una sección delgada del mismo, por delante del cerebelo, y se coloca sobre un bajalengua de madera o una toalla de papel.

FIG. 7. EXTRACCION DEL CEREBRO DEL RATON



Por cortesía del US. DHEW-PHS-CDC

Con un portaobjetos limpio se presiona ligeramente la superficie cortada de la sección; la presión debe ser suficiente para dejar una impresión en la lámina de vidrio. Hecho esto, se aplica a la preparación un colorante para corpúsculos de Negri.

Complicaciones de la Prueba de Inoculación en Ratones

Contaminación bacteriana del material de inoculación

Si la contaminación bacteriana produce la muerte de los ratones, a pesar del empleo de antibióticos, y si se conserva la suspensión original, pueden

ensayarse los métodos siguientes para eliminar la interferencia causada por las bacterias.

(a) *Filtración por ultrafiltro*: Se debe emplear para este objeto líquido sobrenadante, de una suspensión centrifugada a 1.500. r.p.m. durante 15 minutos. Como las partículas del virus rábico son bastante grandes, y la concentración de virus en muestras de campo no suele ser muy alta, se corre el peligro de perder el virus en el proceso de filtración.

(b) *Método de dilución*: A veces es posible diluir la suspensión más allá del límite de contaminación bacteriana, reteniendo la actividad del virus, pero esto sucede raras veces.

(c) *Conservación prolongada*: Algunas veces resulta más fácil combatir la contaminación bacteriana después de conservar, durante cierto tiempo, la suspensión de tejido, ya sea en congelación o en glicerina (véanse págs. 39 y 61).

(d) *Inoculación parenteral*: Para este objeto se debe escoger el *hamster* de Siria, por ser el animal más susceptible a la infección parenteral. Los ratones son relativamente poco susceptibles a la infección parenteral por rabia.

Presencia de dos virus

Esto es causa de confusiones, particularmente cuando el segundo virus posee propiedades patogénicas semejantes a las de la rabia. Puede intentarse la inoculación intracerebral o parenteral de especies distintas al ratón, especialmente en vista de la gran variedad de animales susceptibles al virus rábico.

"Neuroinfecciones autoesterilizantes" o fenómenos de interferencia

En ciertos casos, ya sea por las propiedades de una cepa determinada de virus de calle o porque la presencia de gran cantidad de partículas de virus inactivado afecte al virus vivo, puede ser necesario diluir el material de inoculación diez o cien o más veces. No hay regla que determine cuándo se debe hacer esto. Sin embargo, si se encuentra constante dificultad en aislar virus rábico en la misma especie animal, en una región geográfica determinada, se debe pensar seriamente en la posibilidad del fenómeno de interferencia, y las suspensiones de tejido se deben diluir más allá de las concentraciones al 10%.

PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN DE SUERO-VIRUS

La prueba de neutralización de suero-virus, ejecutada debidamente, es una de las mejores para identificar el virus de la rabia. Aunque la prueba de neutralización es menos sensible por vía intracerebral que por vía parenteral, no es posible aplicar este último método en la identificación del virus rábico porque dicho virus tiene un reducido poder de invasión cuando se inyecta parenteralmente en ratones. Vamos a describir esta prueba como si quisiéramos identificar un virus aislado recientemente en el campo. Sin embargo, el método se puede aplicar a cualquier prueba de neutralización ejecutada normalmente en el laboratorio.

Selección de los Ratones

Se debe aplicar el mismo criterio recomendado para la prueba de inoculación en ratones (véase la sección 4, pág. 57).

Preparación de la Suspensión de Virus

Generalmente se puede emplear el primer pase del virus por ratón, como la fuente de material infectante. Sin embargo, en algunos casos la concentración de virus es muy baja y la prueba falla porque muere un número muy reducido de ratones inyectados con una mezcla de virus y suero *normal*. En estos casos se debe emplear el segundo o tercer pase por cerebro de ratón. La preparación de la suspensión de cerebro de ratón debe ceñirse a la técnica descrita en la sección 4, pág. 58, salvo que sea más conveniente preparar una suspensión al 20 % por peso de tejido infectado. Además, el empleo como diluyente de suero normal al 10 % y solución salina fisiológica o 10 % de suero normal en agua destilada puede dar resultados más uniformes que el empleo de otros diluyentes.

* Colaboración de Hilary Koprowski, Subdirector de la División de Investigaciones de Virus y Rickettsias de los Laboratorios Lederle, American Cyanamid Company, Pearl River, N.Y., E.U.A. y de Harald N. Johnson, División de Salubridad Internacional del Instituto Rockefeller de Investigación Médica, Nueva York, N.Y., E.U.A.

Conservación del Virus

Por ciertas razones técnicas puede resultar recomendable conservar el virus antes de emplearlo en la prueba de neutralización. Varios métodos se pueden recomendar para la conservación del virus rábico. El mejor es conservar el tejido virulento (generalmente una suspensión al 20% por peso) en una ampolla herméticamente cerrada, mantenida a temperaturas inferiores al punto de congelación, de -15°C a -30°C en congeladora eléctrica, o entre -60°C y 70°C en nevera de CO_2 .

Muestras de Suero

Es indispensable que en las pruebas de neutralización se emplee un suero inmune a la rabia que haya sido ensayado previamente, ya sea en el propio laboratorio o, preferentemente, por otros investigadores, habiéndose comprobado que posee una capacidad neutralizadora específica.¹ El suero inmune debe conservarse, de preferencia, congelado o en estado de desecación. También puede conservarse a $+4^{\circ}\text{C}$ en una refrigeradora corriente, en tubos de ensayo cerrados con tapón de caucho o de corcho. Se aconseja que se mantenga el suero normal y el suero antirrábico en frascos de vacuna con tapón de caucho con manga, a fin de poder extraer el suero con una aguja y jeringa, sin necesidad de quitar el tapón. Generalmente, no se agrega ningún preservativo, pero puede añadirse tiomersal (mertiolato) al suero normal y al inmune, a una concentración de un 1 por 10.000. Lo importante es que el suero testigo normal y el suero inmune se preparen de la misma especie de animal y se conserven en idénticas condiciones.

Hay varias circunstancias que pueden motivar aparentes diferencias en las pruebas de muestras de suero para sustancias neutralizantes. Estas sustancias pueden ser no específicas y resultar de variaciones en las condiciones de preparación o conservación del suero, o de la presencia de algún virulicida en los tubos empleados para conservar y probar las muestras de suero. Por ejemplo, se pueden producir sustancias virulicidas en los tapones de algodón de los tubos de ensayo, si aquéllos se queman durante la esterilización en seco o si el algodón no se trata especialmente para eliminar las sustancias lípidas. En los tubos de prueba puede quedar jabón, tejido carbonizado o residuos de las sustancias que se emplean para limpiarlos. La contaminación bacteriana de las muestras de suero puede producir asimismo sustancias virulicidas. También hay otros factores de

¹ La Organización Mundial de la Salud, Palais des Nations, Ginebra, Suiza, proporcionará, a quienes lo soliciten, muestras de suero positivo.

menor importancia que deben tenerse en cuenta, como el contenido de CO_2 y la existencia de complemento activo. El pH de las muestras de suero, guardadas en tubos de prueba, cambia de 7,4 a 8,5, a medida que el contenido de CO_2 se reduce al equilibrarse con el aire el contenido gaseoso del suero. Las muestras frescas contienen complemento activo y enzimas que se inactivan, a 4°C , en dos o tres semanas, o más lentamente a temperaturas inferiores al punto de congelación.

En la preparación de suero testigo normal y de suero inmune se aconseja emplear el cobayo como animal de experimentación. Tómense las muestras de sangre por la mañana y retírese de las jaulas, la noche anterior, todo el alimento, a fin de obtener un suero transparente. La inmunización del cobayo debe hacerse con cerebro virulento de cobayo. El empleo de virus de cerebro de ratón puede determinar la producción de anticuerpos del virus de la encéfalomielitosis de este roedor, si tal virus se encontrase presente, como contaminante, en la cepa de ratón. Esto puede conducir a una falsa interpretación de los resultados de la prueba de especificidad. El suero inmune de cobayos, preparado en la forma descrita, puede usarse asimismo para la prueba de fijación del complemento. El conejo también es un animal apropiado para la preparación de suero inmune (véase la sección 6 (B), pág. 87).

Ejecución de la Prueba

Suero

Colóquense dos hileras de cinco tubos de ensayo esterilizados, de 12×75 mm. Con un lápiz de cera márchese cada hilera de tubos con 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Márchese una hilera con la letra N (suero normal) y la otra con la letra I (suero inmune). En cada tubo de la serie N agréguese 0,2 c.c. de suero normal, medidos en una pipeta de 1 c.c. graduada en 0,01 c.c. Hágase lo mismo con los de la serie I, empleando suero inmune. (Utilícense pipetas diferentes para cada suero.)

Virus

Prepárese un juego de tubos de 12×110 mm. y márchese del 10^{-1} al 10^{-5} . Déjese el primer tubo vacío, y con una pipeta colóquese 2,7 c.c. de diluyente (de preferencia 10% de suero normal en solución salina fisiológica) en cada uno de los restantes. En el primer tubo vacío, marcado 10^{-1} , viértase con una pipeta la suspensión al 20% de cerebro de ratón infectado. Transfíranse 0,3 c.c. de esta suspensión al tubo marcado 10^{-2} y, empleando

otra pipeta (1 c.c.), mézclense bien con el diluyente; para lo que se transvasará el líquido por lo menos 12 veces de uno a otro recipiente. Luego transfíranse 0,3 c.c. al tubo marcado 10^{-3} , mézclense bien y continúese así sucesivamente, repitiendo el procedimiento expuesto.

Pásense 0,2 c.c. del contenido del tubo marcado 10^{-1} al tubo con suero normal ($N-10^{-1}$) y luego 0,2 cc. al tubo con suero inmune ($I-10^{-1}$). Continúese con las diluciones de virus siguientes, empleando una pipeta limpia para cada dilución.

Agítense la gradilla y colóquese durante hora y media en baño de María o en una incubadora regulada a 37°C .

Nota: Al preparar diluciones seriadas es esencial emplear para cada pase una nueva pipeta. Después de transferir la cantidad deseada al tubo que corresponda, se debe emplear una nueva pipeta para hacer la mezcla y luego pasar el líquido al tubo que siga en turno. Debe establecerse el sistema de colocar separadamente en la gradilla, antes de hacer la mezcla, el tubo al que ya se haya agregado el virus. La mezcla se hace llenando y yaciando una pipeta de 1 c.c., 10 ó 12 veces; procúrese no hacer espuma. Un error frecuente, en técnicos de poca experiencia, es el de transvasar sin hacer la mezcla, u omitir un tubo y, en consecuencia, no transportar el virus.

En ningún caso debe intentarse hacer una titulación si no se dispone de suficientes pipetas para cambiarlas en cada dilución, pues la titulación carecería de sentido. Al titular con una sola pipeta es posible infectar ratones con diluciones 10^{-17} , etc., por desprenderse de ésta un poco de tejido. Esto se puede demostrar empleando una sola pipeta y haciendo diluciones decimales de azul de metileno.

Inoculación de Ratones

Retírese la gradilla de la incubadora o baño de María y colóquese en una bandeja con agua y cubos de hielo. Inyéctese el contenido de cada tubo intracerebralmente en seis ratones (0,03 c.c. por ratón), siguiendo la técnica descrita en la sección, 4, páginas 63-64. La serie de ratones que reciben el suero inmune y la mezcla con virus se deben inocular primero. Se puede emplear una jeringa de tuberculina para la serie de suero inmune y otra para la de suero normal. En este caso, sin embargo, se deben comenzar las inoculaciones con la dilución 10^{-5} y continuarlas en orden inverso hasta la dilución 10^{-1} . Al cambiar las diluciones se debe enjuagar siempre la jeringa con la "nueva" dilución antes de llenarla. Al terminar la prueba hay que tener seis ratones vivos inyectados con cada dilución.

Observación de los Ratones Inoculados

Sígase el método descrito en la sección 4, página 66. La prueba se ha de dar por terminada a los 21 días de la inoculación, salvo que se sospeche la presencia de contaminación por el virus de la encéfalomiелitis del ratón (véase más abajo). Si se observan coeficientes uniformes de mortalidad, se puede terminar la prueba a los 14 días.

Cómputo de los Resultados

A continuación se resumen los resultados hipotéticos de una prueba típica:

Suero	Coeficiente de mortalidad en ratones inoculados con suero y diluciones de virus					DL ₅₀ título del virus	DL ₅₀ virus neutralizado
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
Normal	6:6	6:6	6:6	4:6	0:6	10 ^{-4.25} *	—
Inmune	6:6	2:6	0:6	0:6	0:6	10 ^{-1.75}	316†

* Véase la sección 11, página 117, para los cómputos logarítmicos.

† Antilogaritmo de 2, 5 ó sea de la diferencia entre 4, 25 y 1, 75

Interpretación de los Resultados

Si 100 DL₅₀ de virus, o más, son neutralizadas por el suero, la identidad del virus queda establecida. En caso de resultados dudosos, conviene que se repita la prueba. A veces la neutralización de 75 DL₅₀ de virus se puede considerar suficiente para establecer la identidad.

Si el virus rábico se ha perdido y ha sido substituído por otro virus, el título será el mismo en los dos grupos. Los virus aislados o mantenidos en ratones se pueden contaminar con el virus de la encéfalomiелitis del ratón y este virus puede pasar en serie con el rábico. La mayoría de las cepas del virus de encéfalomiелitis del ratón tiende a producir síntomas antes que el virus rábico fijo, esto es, entre el segundo y el tercer día. De los ratones que presenten síntomas en este tiempo, se debe sospechar que albergan el virus de la encéfalomiелitis, y su tejido cerebral se debe someter a examen microscópico y pases sucesivos. Las llamadas cepas de virus rábico de ratón, de "alta invasividad", que rompen la inmunidad producida por la vacuna antirrábica, se deben someter a un examen de comprobación para determinar la presencia del virus de la encéfalomiелitis. Un solo pase por conejos basta para eliminar la enfermedad del ratón.

Los ratones inoculados se deben mantener en observación durante un

período no menor de 30 días, pues si se encuentra presente el virus de la encéfalomiélitis puede producir parálisis tres o cuatro semanas después de la inoculación. Si los ratones están infectados con virus de encéfalomiélitis, es difícil aislarlo cuando se ha desarrollado la parálisis. El virus de la encéfalomiélitis del ratón se mantiene mejor mediante pases cada tres días. La enfermedad del ratón no es capaz de producir altos títulos.

Prueba de Diluciones de Virus de Medio Logaritmo

Para ciertos estudios puede ser conveniente trabajar con diluciones de virus de medio logaritmo. Al preparar las acostumbradas diluciones decimales de virus (1 c.c. más 9 c.c. de diluyente) colóquense tubos alternos con 2,16 c.c. de diluyente, y al transferir cada dilución decimal tómense 2 c.c. y agréguese 1 c.c. a la siguiente dilución decimal y 1 c.c. a la dilución de medio logaritmo (1 c.c. más 2,16 c.c., ó 1 parte en 3,16 ó medio logaritmo). No se deben mezclar las diluciones de medio logaritmo hasta que estén preparadas las decimales. Luego, tómese una pipeta limpia y, comenzando por la más alta de las diluciones de medio logaritmo, transfíranse y háganse las mezclas sucesivamente hasta terminar la serie con la dilución más concentrada, empleando la misma pipeta. También se pueden hacer las diluciones de medio logaritmo en un frasco, agitándolas por rotación sin necesidad de emplear pipeta.

Modificación de la Prueba: Diluciones del Suero con la Misma Concentración de Virus

Si se conoce previamente el título del virus, se puede modificar la prueba utilizando una dosis constante de virus que represente para el ratón aproximadamente 100 DL_{50} al mezclarse con igual cantidad de suero. El procedimiento es semejante al ya descrito, excepto que se diluye el suero en vez del virus. Esta prueba economiza ratones, porque no es necesario emplear sino una dilución de suero normal. El suero inmune se puede diluir decimalmente o en cinco partes, de acuerdo con su poder neutralizante determinado con anterioridad. Esta es una prueba más sensible que la que se emplea de dilución del virus, y tiene mayor aplicación como método estándar de laboratorio que como método para la identificación de un agente de título desconocido. Es de especial valor para determinar el título o potencia relativa de las muestras de suero.

Parte II

METODOS DE PRODUCCION DE VACUNA

VACUNA FENOLIZADA: TIPO SIMPLE

A. VACUNA DE CEREBRO DE CARNERO: METODO DEL INSTITUTO PASTEUR DE PARIS

Fórmula general de la vacuna

La vacuna consiste en una suspensión al 5% de cerebro de carnero, inoculado con virus fijo, en solución fisiológica fenolizada al 1%. La preparación, en su fase final, no contiene virus vivo.

Cepa empleada

La cepa empleada en la elaboración de esta vacuna es el virus fijo del Instituto Pasteur (cepa Louis Pasteur) aislada el 19 de noviembre de 1882 y mantenida desde entonces en conejo solamente. En su nonagésimo pase se utilizó en la primera inmunización antirrábica del hombre (6 de julio de 1885) y, desde entonces, se ha venido empleando sin interrupción en el Instituto Pasteur de París para fines de inmunización. Las características y el comportamiento de esta cepa se examinan periódicamente y han sido objeto de muchas investigaciones. Actualmente, la titulación de esta cepa en el conejo indica que el virus fijo diluido al 1:15.000 mata 6 conejos de cada 7; diluido al 1:16.000, mata cinco de cada diez conejos inoculados; al 1:17.000 rara vez mueren los conejos y, finalmente, en la dilución al 1:18.000 no produce nunca la muerte.

Desde el 1 de abril de 1952 la cepa Pasteur, que anteriormente se pasaba continuamente en conejo, ahora sólo se pasa una vez al mes. Para ello por lo menos dos conejos con un peso mínimo de 2 kg. cada uno se inoculan intracerebralmente con 0,25 c.c. de una suspensión al 1:10 de cerebro del pase anterior (el cerebro se conserva en glicerol a la temperatura de +5°C.). Los conejos que presentan parálisis al sexto día se sangran al día siguiente, y sus cerebros se extraen en condiciones asépticas, se someten a pruebas bacteriológicas de esterilidad, a examen histológico a fin de descubrir las lesiones típicas de virus fijo y se hace titulación del virus en conejos con suspensiones de virus fresco (véase la lámina en color, figs. 6, 7 y 8, frente a la pág. 40).

* Colaboración de Pierre Lépine (Jefe) y R. Béquignon, Sección de Virus del Instituto Pasteur, París, Francia (A) y de Martin M. Kaplan, Veterinario Jefe de Salud Pública de la División de Servicios de Enfermedades Transmisibles, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza (B)

Inmediatamente después de extraer el cerebro se coloca en glicerol puro y esterilizado, en botellas de boca ancha. Cada botella se rotula con el número del conejo y el del pase del virus, y se mantiene en refrigeradores a una temperatura comprendida entre $+2^{\circ}\text{C}$ y $+5^{\circ}\text{C}$.

Al 1° de junio de 1953 la cepa Pasteur había experimentado 1.908 pases desde la fecha en que se aisló.

Preparación de virus de inoculación

Para inocular al carnero se usa el último pase de la cepa, es decir, un cerebro de la serie regular de pases, conservado en el refrigerador en glicerol por más de una semana y menos de un mes. Se separa una porción del cerebro, se enjuaga bajo condiciones asépticas con agua destilada estéril y sé pesa. A continuación se tritura en un mortero enfriado a fin de obtener una emulsión de cerebro al 1:10 en peso en solución salinofisiológica. De este inóculo se inyecta 0,5 c.c. intracerebralmente, en un solo punto, de acuerdo con la técnica que se describe a continuación.

Preparación del carnero

Para la obtención de vacuna sólo se emplean carneros jóvenes y sanos, de un peso medio de 42 kg., los cuales suelen tener un cerebro de un peso aproximado de 80 g. Los carneros se trasquilan y mantienen bajo observación por tres semanas, desechándose todos los animales que no se encuentren en estado normal.

La víspera de la inoculación se afeita la cabeza del carnero y se desinfecta la piel afeitada restrandola fuertemente con un cepillo sumergido reiteradamente en una solución de cresol. A continuación, se pinta la piel del cráneo con tintura de yodo por la mañana y al anochecer, la operación se repite a la siguiente mañana. En el momento de hacer la inoculación, la cabeza del animal se ha desinfectado con cresol y con tres aplicaciones de tintura de yodo.

Se le lleva entonces al laboratorio de inoculación, donde se le coloca sobre una mesa especial y se le sujeta con correas (fig. 1). Mientras un ayudante mantiene tensa la piel, se hace la trepanación, sin hacer una incisión previa, con un trépano provisto de una barrena de 13 mm. de largo por 2 mm. de diámetro (véase fig. 2). La punta del instrumento se dirige hacia la región lateral externa del hemisferio izquierdo del cerebro (cara lateral del lóbulo frontal). Como dijimos ya, a cada animal se le hace una sola inoculación de 0,5 c.c.

Se inoculan a la vez varios carneros, ocho por lo general. Los primeros síntomas de la rabia aparecen de siete a ocho días después de la inoculación;

FIG. 1. MESA PARA SUJETAR A LOS CARNEROS DURANTE LA INOCULACION INTRACEREBRAL



FIG. 2. METODO Y LUGAR DE LA TREPANACION EN EL CARNERO



al noveno día, cuando se encuentran postrados, pero vivos aún, se les sacrifica mediante la sangría de la carótida e inmediatamente después se les extrae el cerebro.

Extracción del cerebro

Tan pronto como el animal muere se le separa la cabeza por la mitad del cuello, se la desuella por entero y se la coloca en una bandeja. Hecho esto,

FIG. 3. TECNICA PARA ABRIR EL CRANEO



toda la superficie craneal se baña en alcohol iodado y se le pasa cuidadosamente la llama de un mechero de Bunsen. Se abre entonces el cráneo con un cincel y un martillo de autopsia cortando una abertura en forma de rombo (fig. 3) paralela al eje longitudinal de la cabeza y cuya diagonal mayor se extiende desde la línea de las órbitas hasta la cresta occipital y transversalmente de un borde al otro del cráneo. Separadas las meninges y cortada la base de la médula (fig. 4), se extrae el cerebro y se coloca en un recipiente esterilizado (fig. 5). Para probar la esterilidad de sus distintas partes se cortan entonces varias muestras de la masa cerebral, hecho lo cual cada cerebro se deposita en un recipiente esterilizado (frasco de pyrex, de boca ancha y cerrado herméticamente) y se somete a una temperatura

de -25°C en espera de los resultados de las pruebas de esterilidad y de la titulación del virus contenido en el cerebro.

Para comprobar si el animal se encontraba en perfectas condiciones, se lleva a cabo la autopsia completa, y los resultados de la misma se anotan e incorporan al protocolo de la preparación de la vacuna.

FIG. 4. ASPECTO DEL CRANEO DESPUES DE ABIERTO Y DE HABER RETIRADO LA BOVEDA



Pruebas de esterilidad y de virulencia

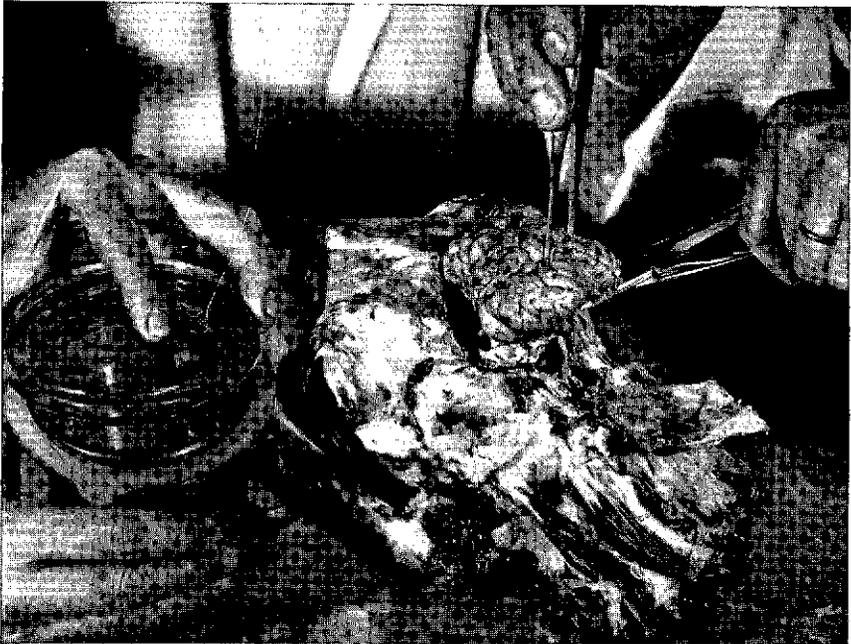
En condiciones asépticas se cortan porciones de la corteza y de los pedúnculos cerebrales y se siembran en caldo de cultivo contenido en tubos ordinarios y en tubos de Hall para la prueba aeróbica y anaeróbica, respectivamente. Estos cultivos se conservan por un período de ocho días a la temperatura de 37°C , al mismo tiempo que se lleva a cabo una titulación para controlar la virulencia de acuerdo con lo indicado anteriormente, o sea inoculando conejos intracerebralmente con diluciones crecientes de la suspensión de tejido cerebral.

Preparación de la vacuna

La vacuna se prepara con los cerebros de carnero que se han conservado a una temperatura de -25°C por no más de un mes. Se sacan del refrigera-

dor en los envases respectivos y se deshuelan rápidamente en un baño de agua a 37°C, hecho lo cual cada cerebro se pesa por separado y se tritura. Para ello se emplea una licuadora de Waring, que se enfría dentro de una camisa que contiene hielo machacado. Se colocan en el aparato dos cerebros al mismo tiempo, o sea unos 160 g. Con el motor a toda velocidad y sin añadir líquido alguno, la operación de trituración se completa en un período

FIG. 5. EXTRACCION DEL CEREBRO DE CARNERO



A la izquierda—Caja de Petri estéril donde se conservará el cerebro a baja temperatura

de cuatro minutos. Entonces se añade una pequeña cantidad de solución fisiológica esterilizada y se deja en marcha la licuadora por otros tres minutos para homogenizar el producto, conseguido lo cual se toman muestras para las pruebas de esterilidad y se hace la dilución definitiva en frascos de pyrex de cinco litros de capacidad.

El solvente es una solución salina fisiológica estéril que se fenoliza en el momento que se va a emplear. Para ello se disuelve fenol puro en una solución salina fisiológica a una concentración de 5% y se diluye inmediatamente antes de emplearla en la proporción necesaria para obtener la concentración final de la vacuna que se desee. Las cantidades se calculan de

acuerdo con el peso de los cerebros como sigue:

Cerebro de carnero.....	1 g.
Solución salina fisiológica estéril.....	16 c.c.
5 % de fenol en solución salina fisiológica	4 c.c.

Esta suspensión se agita y luego se deja reposar por 24 horas en una estufa a 22°C. Al sacarla de allí se la envasa inmediatamente en ampollas de 5 c.c. de capacidad. Es esencial que la suspensión sea absolutamente homogénea a fin de que cada ampolla contenga exactamente la misma cantidad de vacuna. Para ello es necesario agitarla durante el proceso de llenar las ampollas, lo que se consigue mediante el empleo de adaptadores especiales y del eje giratorio de un turboagitador eléctrico. El eje giratorio, de acero inoxidable (de alrededor de 35 cm. de longitud), la turbina y el adaptador pueden separarse del motor para esterilizarlos previamente. El turboagitador tiene la ventaja sobre los agitadores corrientes de hacer posible una mayor homogenización de la mezcla sin producir espuma. De este modo se pueden envasar cantidades ilimitadas de vacuna en las ampollas con la certeza de una rigurosa homogeneidad y, en consecuencia, de una dosis precisa (fig. 6).

Las ampollas de vacuna se conservan, al menos por una semana, a una temperatura comprendida entre +2°C y +5°C antes de enviarlas a empaquetar. Durante este período mínimo de almacenaje se completa la inactivación del virus y se lleva a cabo la comprobación final de la vacuna.

Comprobación final de la vacuna

Antes de la distribución para su uso, la vacuna es objeto de las pruebas siguientes:

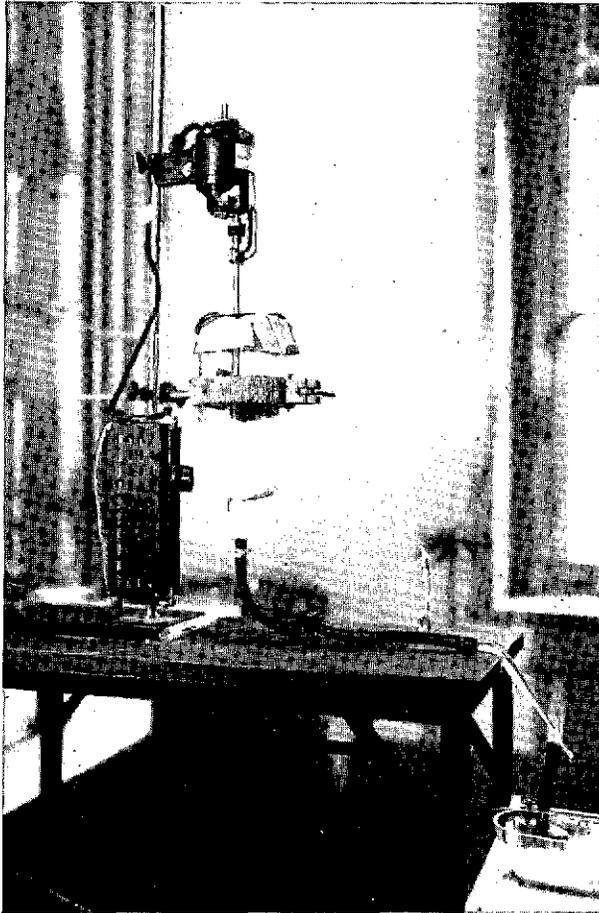
- (1) Prueba de esterilidad, descrita ya.
- (2) Prueba de inactivación, mediante inoculación intracerebral en el conejo.
- (3) Prueba de potencia. Esta puede hacerse, bien por el método de Habel (véanse las secciones 11 y 12, páginas 116 y 120) o por medio de la prueba de control en conejos, como indican Béquignon y Vialat (sección 14, p. 130). Un conejo que pese 2 kg. se vacuna subcutáneamente por 10 días consecutivos con una dosis de 2 c.c. diarios. Al cabo de treinta días el conejo debe estar a salvo de los efectos de una inoculación intracerebral de una dilución de virus fijo al 1:10.000.

Además de estas comprobaciones, muestras de la vacuna se someten a otras comprobaciones consistentes en una estimación del extracto seco y del fenol, así como en la determinación del pH.

Período de empleo

La vacuna se puede usar por un período de cinco meses a contar del momento de su distribución, siempre y cuando se mantenga a una tempera-

FIG. 6. ENVASE DE LA VACUNA ANTIRRABICA



Obsérvese que el turboagitador, sumergido en la suspensión de vacuna, mantiene la dispersión del virus durante el envase

tura comprendida entre 2°C y 5°C por todo el período. Si no se puede contar con almacenaje a baja temperatura el período de validez se reduce a dos o tres meses, de acuerdo con el clima de la región a que se destina.

La vacuna fenolizada no se debe congelar en ningún momento, ya sea durante su preparación o durante su almacenaje.

Modo de empleo

La vacuna se envasa en cajas de 20 ampollas de 5 c.c. cada una, lote que proporciona un tratamiento completo. En caso de mordeduras graves, o en la cara, se recomienda un tratamiento de 30 inyecciones y no de 20, que es el tratamiento estándar. Tratándose de niños menores de 10 años el volumen de las inyecciones de vacuna se reduce a la mitad.

B. VACUNA DE CEREBRO DE CONEJO:**METODO RECOMENDADO PARA CUMPLIR CON LOS REQUISITOS DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE HIGIENE DE LOS ESTADOS UNIDOS***

Se recomienda el siguiente método para cumplir con los requisitos de los Institutos Nacionales de Higiene (INH) de los Estados Unidos.¹ En la preparación de la vacuna, especialmente para uso veterinario, se pueden emplear, y se emplean, caballos, carneros y cabras, en lugar de conejos (véase la sección 6 (A), página 77).

Fórmula de la vacuna

La vacuna consta de virus rábico fijo inactivado, al 20 %, en solución salina con tope de fosfato (pH7), fenol al 0,25 % y 1:10.000 de tiomersol (mertiolato). Las estipulaciones del INH, para la vacuna de uso humano, establecen que cada dosis de vacuna contenga no menos de 2,0 c.c. de una suspensión al 5 % de cerebro, o su equivalente en otra concentración. La dosis de una suspensión al 20 % será, por lo tanto, de 0,5 c.c. Además de la concentración final de 0,25 % de fenol, se puede usar como preservativo borato de fenilmercurio al 1:12.500 ó tiomersol al 1:10.000. La concentración final del fenol no debe exceder de 0,25 % en las vacunas que contengan 10 % ó menos de tejido cerebral y no debe pasar de 0,4 % en las vacunas que contengan más de 10 % de tejido cerebral.

Cepa de virus rábico

Se puede emplear la cepa Pitman-Moore² u otra cepa adecuada de virus fijo que haya dado resultados satisfactorios en la práctica.

* El método se basa en los resultados obtenidos en la producción en gran escala, de los laboratorios de los Estados Unidos.

¹ United States National Institutes of Health (1953) *Minimum requirements: rabies vaccine*, 3rd rev. Bethesda, Md., E. U. A.

² Los laboratorios nacionales la pueden obtener solicitándola directamente a la Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, o a la Oficina Sanitaria Panamericana, Washington, D. C., E. U. A.

Conservación de la cepa de virus

El pase del virus para la producción de vacuna se hace siempre por cerebro de conejo. La semilla de virus se emplea por un tiempo conveniente (generalmente no más de tres meses), mientras mantenga toda su potencia, demostrada por titulación en el ratón. La suspensión de virus al 25 % en agua destilada con tope de fosfato (pH 7) se congela rápidamente y se conserva, de preferencia, en una caja de CO₂ a -70°C o por lo menos inferior a -15°C .

El virus semilla debe poseer la suficiente potencia para matar todos los ratones que se inyecten por vía intracerebral con 0,03 c.c. de una suspensión de cerebro de conejo a una dilución no menor de 10^{-5} .

La pureza de la cepa de virus se comprueba periódicamente mediante titulación en ratón, por la neutralización de suero antirrábico hiperinmune específico, cuya capacidad para proteger contra el virus de la calle se haya demostrado (véase sección 18, página 145).

Preparación de la suspensión de virus semilla al 25 %

Los cerebros infectados de rabia se pesan y emulsionan en tres partes de agua destilada estabilizada (pH 7). La emulsión se hace en tres minutos en una licuadora Waring pequeña (200 c.c. de capacidad); se colocan porciones de a 1 c.c. en ampolletas de 5 c.c. de capacidad, se cierran, se congelan rápidamente en hielo seco y alcohol y se conservan de preferencia a la temperatura de hielo seco (-70°C), pero por lo menos inferior a -15°C .

Esterilidad

Se inoculan 0,5 c.c. de la suspensión de virus al 25 %, en dos tubos, que contengan 30 c.c. de tioglicolato de sodio o cualquier otro medio adecuado. La prueba de esterilidad dura 14 días, incluyendo un subcultivo que se incuba por siete días (véase la página 92).

Titulación del virus

Se deben hacer por lo menos dos titulaciones intracerebrales en ratón a diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . El período de prueba es de catorce días y todos los ratones que reciben la dilución de 10^{-6} deben morir.

Método de inoculación

De la suspensión al 25 % de virus semilla se hace una dilución final al 1:1.000 en suero normal, al 2 %, en agua destilada. El virus diluído se centrifuga en una centrifugadora angular (aproximadamente 1.000 g)

por 15 minutos, y el líquido sobrenadante se emplea como inóculo. Cada día se hace una nueva dilución para la inoculación y se prueba su esterilidad en un medio de tioglicolato.

Los conejos, que han de ser sanos y pesar de tres a cuatro kilos, se sujetan firmemente y se les inyectan 0,2 c.c. del inóculo, con una jeringa de 2 c.c. y agujas de calibre 23 y $\frac{3}{8}$ de pulgada (0,65 mm. \times 1 cm.), a través de una punción hecha en el cráneo a 1,5 cm. del ángulo externo del ojo. Esto se hace generalmente en el hemisferio derecho únicamente, aunque se pueden hacer dos inoculaciones de 0,05 c.c. en cada uno de los dos hemisferios. Para hacer la punción se puede utilizar una lezna de acero inoxidable o un perforador (véanse las figs. 1 y 2).

Evolución de la enfermedad en los conejos

Al cuarto día los conejos muestran signos marcados de parálisis que progresan rápidamente hasta llegar a una parálisis completa en el quinto día (a veces en el sexto).

Sacrificio de los conejos

Los conejos moribundos que hayan mostrado síntomas de rabia por lo menos durante 24 horas y estén completamente paralizados, salvo los músculos torácicos, se sacrifican por inyección intravenosa de aire, de 10 c.c., en la vena marginal de la oreja. La muerte sobreviene en uno o dos minutos. Para la producción de vacuna se emplea solamente el cerebro de los conejos recién sacrificados. No se utilizan animales muertos de rabia o de otras causas.

Autopsia

Después de la extracción de los cerebros, se hace la autopsia, con el fin de evitar el uso de conejos inapropiados. No se deben utilizar los cerebros de los conejos que presentan coccidiosis en cualquier parte del cuerpo, por la posibilidad de que la causa de la parálisis haya sido la coccidiosis y no la rabia. Se debe llevar un registro del resultado de todas las autopsias.

Cosecha de cerebros

Se baña el conejo con creolina u otra solución antiséptica adecuada. Los conejos se decapitan lo más cerca posible de los hombros; la cabeza, bien asegurada en un soporte especial, se pinta con tintura de yodo y luego se lleva al "cuarto estéril" donde se hace la extracción del cerebro.

Se corta la piel a lo largo de la línea media de la cabeza y se separa a ambos lados para descubrir la bóveda del cráneo, que se lava con yodo

FIG. 1. EMPLEO DEL PUNZON EN LA INOCULACION INTRACEREBRAL



Por cortesía del Dr. F. Pérez-Gallardo, Madrid

FIG. 2. METODO DE INOCULACION INTRACEREBRAL



Por cortesía del Dr. F. Pérez-Gallardo, Madrid

usando un pequeño frasco gotero. Con un par de cizallas se corta la bóveda crancana y el cerebro se traslada, con tijeras y pinzas estériles, a un recipiente estéril. Se toma una muestra de cerebro con una torunda estéril y se inocula un tubo de 15 c.c. de tioglicolato, para hacer una prueba de esterilidad. Los cerebros se conservan a -15°C ., y de preferencia a menor temperatura, hasta el momento en que se va a hacer la vacuna. Los que muestren contaminación bacteriana se descartan.

Preparación de la Vacuna: Suspensión al 40 %

Emulsión

Los cerebros congelados se pesan y se colocan en un frasco Erlenmeyer de 2 litros para hacer una suspensión al 40 % en una solución de cloruro de sodio estabilizada y estéril que contenga suficiente fenol para dar una concentración final de 0,5 % (véase "Diluyente" a continuación). Después que los cerebros se descongelan, se agita el frasco a mano hasta que se deshacen. Esta emulsión parcial se transfiere a un molino coloidal Eppenbach (regulado al 22 ó 24). La emulsión se completa en un solo pase por el molino. Se puede emplear también una licuadora Waring u otro emulsificador adecuado, teniendo cuidado de evitar que el aparato genere calor durante su funcionamiento. Bastan, generalmente, dos o tres minutos para que la licuadora Waring emulsione los cerebros adecuadamente. Para prevenir el sobrecalentamiento, el recipiente se debe cubrir con una camiseta de hielo picado y sal.

Diluyente

(a) Solución de cloruro de sodio estabilizada con fosfato: se prepara la solución con dos partes de M/10 Na_2HPO_4 y una parte de M/10 KH_2PO_4 .

A una porción de esta solución se le agregan cuatro partes de 0,85 % de NaCl al pH 7,0.

(b) Para hacer una concentración de tejido al 40 % que contenga 0,5 % de fenol, se agrega a la solución salina estabilizada con fosfato 0,68 % de fenol al 90 % (esto es suficiente para el volumen de cerebro emulsionado). La suspensión al 40 % se hace por peso agregando el volumen necesario de diluyente, de acuerdo con el peso de cerebro.

Nota: Después de agregar el fenol, se debe tener gran cuidado en no congelar la suspensión de tejido cerebral, ya sea la concentración de 40 % o la dilución final. *La congelación de la suspensión fenolizada destruye su antigenicidad.*

Título del fondo común de cerebro antes de la incubación

Se pesa una muestra de la suspensión de tejido al 40% (por el aire incorporado por acción del molino), se diluye inmediatamente y se titula en ratones de 16 a 20 g. Se inyectan intracerebralmente diluciones de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} del tejido cerebral y el título (DL_{50}) debe ser por lo menos de 10^{-6} para el cálculo (véase sección 11, pág. 117).

Incubación

La vacuna emulsionada, con un contenido de 0,5% de fenol, se pone en baño de María a 37°C. por una hora y luego se lleva a la incubadora a 37°C. por 72 a 76 horas. (Se emplea el tiempo mayor, si la prueba preliminar de inocuidad no es satisfactoria). Durante todo el tiempo que la vacuna permanece en la incubadora se agita mecánicamente.

Nota: El tiempo que se requiere para la inactivación en la incubadora varía con las diferentes cepas de virus, así como con el método que se emplea para la emulsión del tejido cerebral (finura de las partículas). El tiempo que se requiere en cada caso se debe determinar en cada laboratorio mediante pruebas experimentales, esto es, por inoculación intracerebral de ratones con la suspensión, a intervalos de seis horas o menos de incubación.

Dilución de la vacuna al 20%

La vacuna al 40% se diluye en un volumen idéntico de solución salina estabilizada estéril que contenga 1:5.000 de tiomersol, para tener un producto final con 20% de tejido, 0,25% de fenol y 1:10.000 de tiomersol.

La vacuna diluida se filtra a través de varias capas de gasa o por un filtro de seda, con el fin de separar cualquier partícula de tejido cerebral que no haya sido triturada. Para la manipulación resulta conveniente un volumen de dos litros. El producto se somete a las pruebas de inocuidad y esterilidad que se describen a continuación, y se almacena a una temperatura de 4° a 6°C.

Esterilización

Se hace una prueba de esterilidad de la vacuna final en medio de tioglicolato de sodio o cualquier otro medio estándar. De cada envase se toman 10 c.c. de vacuna que se dividen en tres porciones y se inoculan en tres botellas que contienen 225 c.c. de medio; se mezcla la prueba y se coloca en una incubadora a 31° ó 32°C. El medio se mezcla cuidadosamente después de 48 horas de incubación. Las pruebas se observan diariamente por siete días para ver el crecimiento bacteriano. Al fin de los siete días se mezcla el

contenido de las botellas cuidadosamente y 1 c.c. de cada botella se inocular en tubos que contienen 40 c.c. de medio de tioglicolato de soda fresco. Las botellas originales y los subcultivos se incuban por siete días más. A cualquier vacuna que muestre contaminación se le repite la prueba, usando para este objeto doble volumen.

Prueba de inocuidad

Inmediatamente después de la dilución y en el momento de hacer la prueba de esterilidad se toman 2 c.c. de la muestra para inoculación intracerebral de cinco ratones con una dosis de 0,03 c.c. Por lo menos tres de cada cinco ratones deben sobrevivir sin mostrar síntomas de rabia.

Lote final

Se hace la mezcla final después de haber terminado la prueba preliminar de inocuidad o después de la reincubación de la vacuna a 26°C, en caso de que por lo menos tres de los ratones no sobrevivan a la prueba preliminar de inocuidad. Los lotes se mezclan en una botella de tamaño adecuado para poder llenar las ampolletas.

Se toman muestras para las pruebas siguientes:

Pruebas analíticas

Una muestra de la vacuna final se reincuba por 24 horas a 37°C para asegurar la muerte del virus y luego se determina el total de sólidos: de fenol, de pH y de tiomersol.

Esterilidad

Esta prueba se hace en la forma descrita en el subtítulo "Esterilización", página 92.

Inocuidad

Se emplean por lo menos dos conejos y dos ratones. A cada conejo se le inyectan intracerebralmente cuando menos 0,25 c.c. y a cada ratón (con un peso de 18 a 20 g.) 0,03 c.c. de vacuna que no contenga menos de 5% de tejido cerebral. A todos los animales se les observa por un período mínimo de catorce días, durante los cuales deben permanecer libres de síntomas de rabia fija o de otras enfermedades del sistema nervioso.

Estandarización final para cumplir con los requisitos del INH

Potencia: (véase sección 13, página 121).

Inocuidad: Se hace una prueba de inocuidad del contenido del recipiente final seleccionando al azar un frasco de cada lote o de cada porción de lote. La inyección parenteral de 0,5 c.c. de una suspensión de cerebro al 5% o su equivalente en ratones de un peso aproximado de 20 gr. cada uno, y 5,0 c.c. en cobayos de un peso aproximado de 350 gr. cada uno, no debe producir ni síntomas significativos ni la muerte. Se deben usar por lo menos dos animales de cada especie y el período de observación no debe ser menor de siete días.

Fecha

El período de expiración no debe pasar de seis meses desde la fecha de preparación o salida del producto. Para estos efectos se debe tomar en cuenta la fecha en que la vacuna pasó satisfactoriamente la prueba de potencia. La fecha de salida puede ser tres meses después de la fecha de producción. El producto se almacena todo el tiempo a temperaturas de 2° a 5°C. Se ha de evitar la congelación de la suspensión fenolada.

VACUNA IRRADIADA CON LUZ ULTRAVIOLETA

Principios y Métodos

Desde hace varios años se conoce el poder de la irradiación de la energía ultravioleta (UV) para producir la esterilización de las bacterias; pero son mucho más recientes los conocimientos sobre la efectividad, como vacunas, de los antígenos microbiológicos inactivados por tales rayos.

La energía UV tiene poca capacidad de penetración de las substancias biológicas, porque es absorbida rápidamente. Por lo tanto, para asegurar una irradiación eficaz, el material que se va a someter a los rayos UV se debe irradiar en una capa muy fina. El empleo actual de vacuna antirrábica irradiada con rayos UV no ha sido posible hasta que se ha inventado un aparato que permite la exposición de una capa finísima. También se sabe que a medida que aumenta la cantidad de energía UV absorbida por material biológico, aumentan también los cambios químicos de la substancia, de manera que la inactivación se debe hacer en el período de exposición más corto posible, pues de lo contrario se desintegra el antígeno. La acción biológica de la irradiación UV en los virus es prácticamente instantánea, y una vez que esta acción inmediata ha tenido efecto, no se produce ninguna otra. No existen pruebas de que en el proceso de irradiación se formen subproductos secundarios que puedan ser luego perjudiciales para el antígeno.

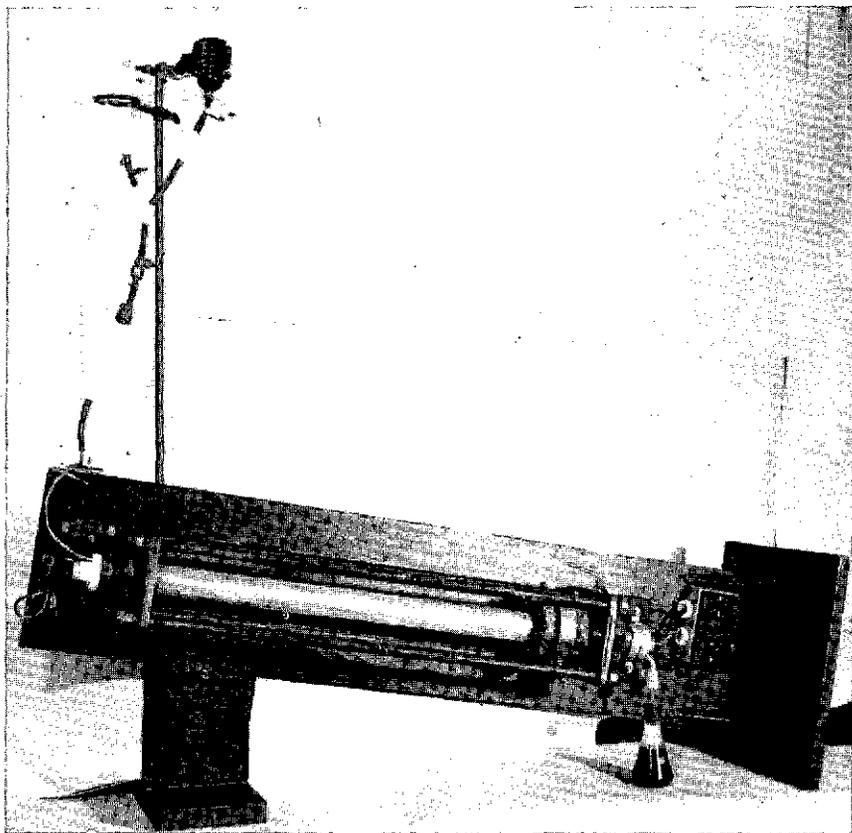
Además de la necesidad de controlar la duración de la exposición y de que el material sea irradiado en capa delgada, en la práctica, la producción de grandes cantidades de vacuna exige que el aparato empleado permita que la suspensión del antígeno circule continuamente a través del equipo. Aunque el cuarzo es un buen conductor de energía UV y se ha empleado frecuentemente en la fabricación de varias clases de recipientes para la irradiación del antígeno, en general, los aparatos diseñados para eliminar la penetración de los rayos UV a través del cuarzo dan una irradiación más efectiva. Otra de las condiciones que debe reunir un aparato práctico de irradiación es la facilidad de manejo y la disponibilidad de una fuente sencilla y económica de rayos ultravioleta.

* Colaboración de Karl Habel, Jefe, Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Microbiología, Servicio de Salud Pública, Bethesda, Maryland, E. U. A.

Aparatos

Se han diseñado varios tipos de aparatos que, de una u otra forma, recogen los principios ya mencionados. En los Estados Unidos de América

FIG. 1. APARATO DE IRRADIACION, DE FLUJO CONTINUO



Se está empleando una solución colorante para fines de demostración.

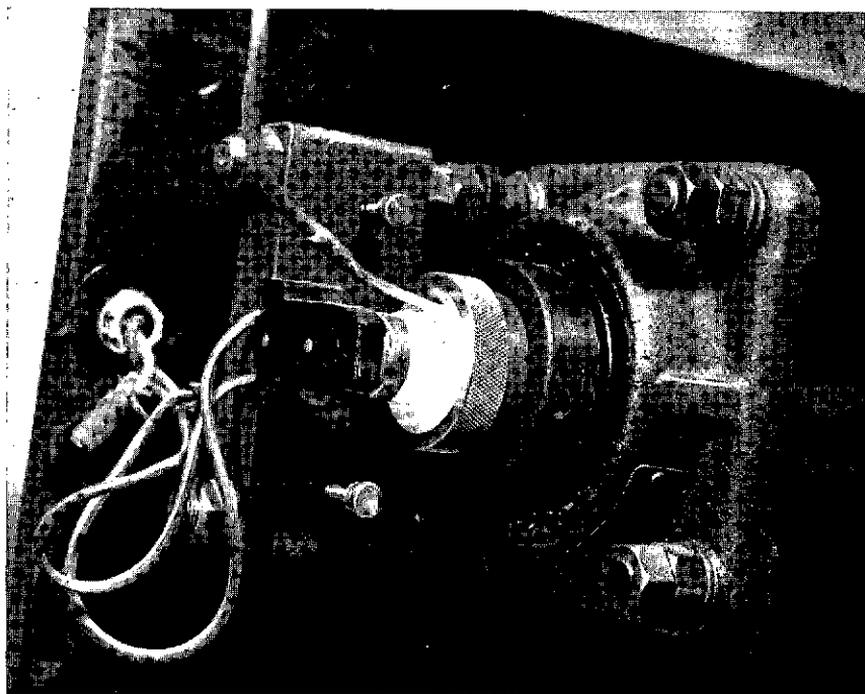
se venden dos tipos, y ambos han dado resultados satisfactorios en la producción de una vacuna antirrábica potente. El aparato "Dill"¹ emplea un tubo germicida estándar de alta energía; es de larga duración, se obtiene fácilmente y resulta relativamente barato. El aparato "Oppenheimer-Kettering"² requiere un tubo especial, muy eficiente, que es más costoso.

¹ Irradiador Dill, J. J. Dill Company, 1302 Bixby Road, Kalamazoo, Michigan, E. U. A.

² Irradiador de UV Oppenheimer-Kettering, Michael Reese Research Foundation, 29th Street and Ellis Ave., Chicago, Ill. E. U. A.

Sin embargo, la construcción de un tipo de aparato, del que el de Dill no es más que una modificación, se puede hacer en cualquier taller mecánico moderno con materiales básicos, fáciles de obtener y no muy caros. El modelo construido en el taller, que se emplea en nuestro laboratorio, consta de un tubo largo de vidrio o de metal, a ser posible de acero inoxidable, para que la superficie inferior sobre la que pasa la suspensión de virus sea lisa y fácil de limpiar.

FIG. 2. ENTRADA DEL APARATO DE IRRADIACION UV

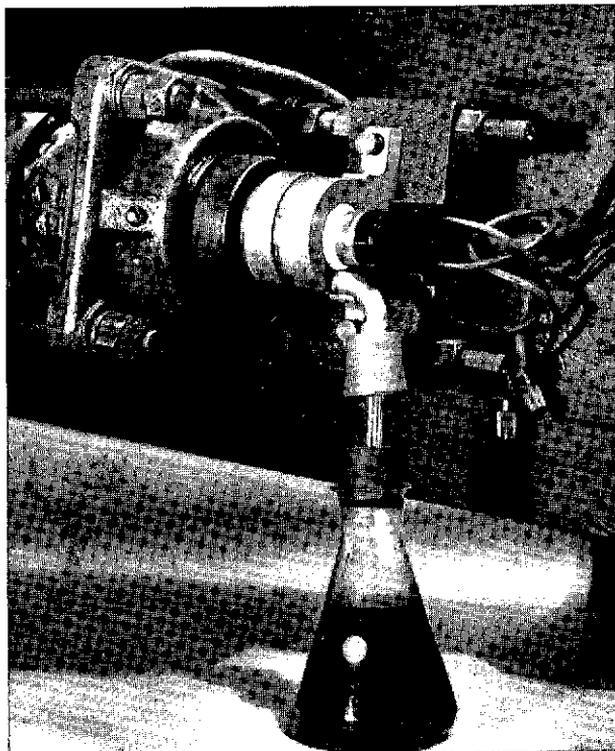


Este tubo es de un diámetro tal, que, al suspender en el centro un foco germicida, queda un espacio libre de un centímetro entre éste y la pared interior. El tubo está construido de forma que puede deslizarse fácilmente dentro de otro más fuerte, de latón, montado en ambos extremos en cojinetes. Estos tubos se deben hacer girar a una velocidad de 500 a 1.000 revoluciones por minuto (r.p.m.), para lo que se necesita la correspondiente fuerza motriz. Esta se puede aplicar con un engranaje o una correa, pero en nuestro aparato se logra en forma bastante sencilla, haciendo que el tubo exterior de latón sirva de armadura a un pequeño motor de corriente alterna, del tipo de los empleados en los ventiladores eléctricos. En la producción

en gran escala, el funcionamiento continuado puede ocasionar el recalentamiento del tubo.

En el extremo de salida del tubo giratorio se ajusta una taza de recolección, de diseño conveniente, para recibir la vacuna que sale del aparato. El tubo giratorio se sostiene en un ángulo de 20° por medio de un marco al que se fijan las conexiones del tubo UV. La suspensión de virus se introduce

FIG. 3. SALIDA DEL APARATO DE IRRADIACION UV



con una aguja de calibre 16 (1,65 mm) en la superficie interna del tubo giratorio central, donde se distribuye inmediatamente en una película de 1 mm de espesor, aproximadamente, que se extiende a lo largo del tubo. De esta manera, la película está continuamente expuesta a la luz UV y se recoge en la extremidad opuesta mediante una conexión cerrada. La suspensión de virus se deposita en una bureta o un frasco invertido conectados a la aguja de ingreso por medio de un tubo de caucho con una válvula para regular la velocidad de pasaje³ (figs. 1 a 3).

³ Los planos de este aparato se pueden solicitar del autor en el National Institutes of Health, Bethesda 14, Maryland, E. U. A.

El tubo germicida empleado en este aparato es de 30 vatios y de 36 pulgadas de largo.

A las velocidades de flujo necesarias para una exposición adecuada en este tipo de aparato, hay poca oportunidad para que el calor del tubo UV sea absorbido por la emulsión circulante. La temperatura de la emulsión sólo aumenta de 1 a 2°C durante el recorrido de acuerdo con el registro termoelectrico. Sin embargo, cuando se irradian lotes grandes de emulsión (más de 500 c.c.) se debe comprobar el posible calentamiento del aparato.

Estandarización del Aparato

Desde un punto de vista práctico, la única estandarización necesaria es la determinación de la irradiación mínima (o velocidad de circulación máxima) necesaria para inactivar la emulsión patrón de virus rábico empleada en la producción de vacuna. En el aparato descrito, un solo pase, a las siguientes velocidades de circulación, debe producir una exposición que varíe entre la total inactivación del virus y un grado en que éste se encuentre todavía vivo:

- 50 c.c. por minuto
- 100 c.c. por minuto
- 200 c.c. por minuto
- 400 c.c. por minuto

Si se desea determinar con exactitud el tiempo de exposición, éste se puede calcular averiguando previamente el volumen de material que se encuentra dentro del tubo giratorio, en un momento dado. Un método sencillo de determinar este volumen consiste en introducir un colorante en la entrada del tubo mientras esté pasando la emulsión de prueba. La recolección de la muestra se debe iniciar en el momento preciso de introducir el colorante y suspenderse cuando éste aparezca en la extremidad de salida. El volumen de esta muestra es aproximadamente igual al del tubo giratorio. Cuando se conoce éste, el volumen total de una prueba y el tiempo total de la operación, se puede calcular el tiempo de la irradiación con la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Capacidad del tubo (cc)} \times \text{tiempo total (minutos)}}{\text{volumen total (c.c.)}} = \text{tiempo de irradiación (minutos)}$$

Una vez determinada la irradiación mínima que regularmente produce la inactivación del virus, se debe regular la velocidad de circulación en forma que, en la producción normal, se duplique la exposición. Esto da un margen

conveniente de seguridad que sobrepasa el punto de mera inactivación del virus, pero queda dentro de los límites más allá de los cuales se puede destruir el antígeno y perder la potencia de la vacuna. Se ha comprobado que se requiere sobrepasar cinco veces el período de inactivación mínimo antes de producir un marcado descenso de la potencia antigénica.

Suspensión del Virus

Todos los factores importantes en la producción de vacuna antirrábica, por cualquier otro método de inactivación, tienen igual importancia con respecto al material que se va a irradiar. El título del virus de la emulsión original debe ser lo más alto posible, pero las variaciones de hasta un logaritmo no cambian apreciablemente el tiempo necesario de exposición. Como la luz UV no penetra los materiales biológicos hasta una profundidad apreciable, es muy importante que la suspensión sea uniformemente fina. Para asegurar esto, es conveniente filtrar la emulsión a través de varias capas de gasa estéril o a través de un colador de alambre.

Con el equipo de irradiación se emplea, generalmente, una suspensión total de 5% de tejido nervioso virulento, pero no se presentan dificultades en la inactivación de suspensiones hasta un 10% de concentración.

Preservación y almacenamiento de la vacuna irradiada

Si la vacuna irradiada se va a conservar en forma líquida antes de emplearla, se le debe agregar un preservativo químico. El tiomersal (mertiolato), en dilución de 1 por 8.000, o el fenol al 0,25%, parecen ser superiores a la formalina. La vacuna irradiada se puede mantener en congelación o desecada en estado de congelación, porque no contiene ninguna substancia que afecte al antígeno. Este último proceso de liofilización produce una inmediata reducción del poder inmunizante, pero la vacuna conserva esta potencia indefinidamente si se ha desecado suficientemente.

Prueba de la vacuna irradiada

La vacuna irradiada se debe someter a las pruebas de esterilidad, de seguridad y de potencia, lo mismo que cualquier otro tipo de vacuna antirrábica inactivada.

En términos generales, se ha comprobado que se pueden hacer vacunas de alta potencia de una manera más constante por el método de irradiación que por cualquier otro método de inactivación. Hasta la fecha no existen pruebas de que la incidencia de complicaciones postvacunales sea mayor con el uso de vacuna irradiada que con cualquier otro tipo de vacuna.

Desarrollo de una operación de irradiación

(1) El tubo interior se limpia con jabón o solución detergente, se enjuaga cuidadosamente y se limpia con éter.

(2) Se monta el aparato y se coloca la lámpara UV dentro del tubo, asegurando sus conexiones.

(3) La taza de recolección, esterilizada en el autoclave, se conecta con el aparato y, por medio de un tubo de caucho esterilizado, con el frasco recolector.

(4) Dos depósitos, uno con agua destilada estéril y el otro con emulsión de virus, se conectan por medio de un tubo en forma de "Y" con el tubo de caucho que, a través de una válvula reguladora, va a la aguja de ingreso.

(5) Se ajusta y se fija la aguja de ingreso en forma que oriente la emulsión hacia la superficie interna del tubo giratorio.

(6) Se enciende la lámpara UV durante 5 minutos para esterilizar el interior del tubo giratorio, después de poner en marcha el motor.

(7) Se hace circular el agua destilada para humedecer el tubo, y se regula el flujo a la velocidad deseada.

(8) Se suspende la corriente de agua destilada y se inicia el paso de la emulsión de virus. Hay que comprobar nuevamente la velocidad de circulación. Tan pronto como aparezca la emulsión en el extremo de salida, se conecta un nuevo frasco colector y se comienza a contar el tiempo que dura la operación. Hay que observar la hora, al final de la operación, y medir el volumen de la emulsión recogida.

VACUNA DE EMBRION DE POLLO

En la actualidad se emplean, para la producción de las vacunas antirrábicas que se utilizan en la inmunización profiláctica del perro, las cepas de virus rábico Flury² y Kelev¹ adaptadas y modificadas en el embrión de pollo.^a La vacuna preparada con la cepa de Flury se emplea mundialmente y, por lo tanto, la descripción del método de producción se concretará principalmente a esa vacuna. Sin embargo, los mismos principios se aplican a la preparación de vacuna antirrábica en embrión de pollo con la cepa de Kelev.

La cepa Flury para la vacuna canina representa de 40 a 50 pases del virus por huevo. En ese grado de pases, el virus Flury conserva toda su virulencia cuando se inyecta por vía intracerebral en el ratón, ratas algodoneras, *hamsters* y cobayos; sin embargo, afecta menos a los conejos, pues éstos son más resistentes. Los *hamsters*, los ratones y las ratas algodoneras son susceptibles a la inyección extraneural, pero los cobayos tienen mayor resistencia. Por otra parte, el conejo y el perro no manifiestan signos de infección al ser inoculados por vía intramuscular con suspensiones concentradas del virus.

Se ha conseguido una mayor modificación de la cepa Flury por medio de continuos pases en huevo (180 pases), lo que se ha traducido en una menor patogenicidad para los animales de experimentación, a la vez que, al parecer, se ha retenido la antigenicidad. Por el momento se recomienda que la vacuna de alto número de pases por huevo se use sólo para el ganado, y la de bajo número de pases, descrita en estas páginas, se emplee en perros y gatos.

La vacuna Kelev de embrión de pollo representa de 60 a 70 pases del virus por huevo. A este nivel, el virus no produce síntomas de infección en el *hamster*, el cobayo o el conejo inoculados, ya sea por vía extraneural o intracerebral. En cambio los ratones lactantes son susceptibles a la inoculación intracerebral. Los perros inoculados por vía intramuscular con suspensiones concentradas de virus no presentan signos de infección.

* Colaboración de A. Komarov, Director del Laboratorio del Estado para las Enfermedades producidas por Virus, Haifa, Israel.

^a La Organización Mundial de la Salud (Palais des Nations, Ginebra, Suiza) proporcionará muestras de estas cepas a los laboratorios nacionales que lo soliciten.

Preparación del virus semilla

Se prepara una suspensión al 60% de embrión inoculado con el pase adecuado (Flury, de 40 a 50 y Kelev, de 60 a 70) y agua destilada; se hace una prueba de potencia (véase la sección 15, página 133) y se conserva en forma congelada o deshidratada. Esto constituye el material de semilla. Inmediatamente antes de utilizarlo, se prepara una suspensión al 20% del material en agua destilada y se prueba la viabilidad del virus como sigue:

Se inoculan seis ratones por vía intracerebral con 0,03 c.c. de una dilución 10^{-1} del material de semilla (hay que emplear una jeringa de tuberculina de 0,25 c.c. con una aguja de un cuarto de pulgada y de calibre 27 (0,40 mm. \times 6 mm.)). Si el material de inoculación contiene virus activo, los ratones enfermarán a los 6 u 8 días. Si los ratones continúan sanos al noveno día, se deben descartar los huevos inoculados.

En el caso de la cepa Kelev, la prueba de viabilidad debe efectuarse en ratones lactantes.

Inoculación de los huevos

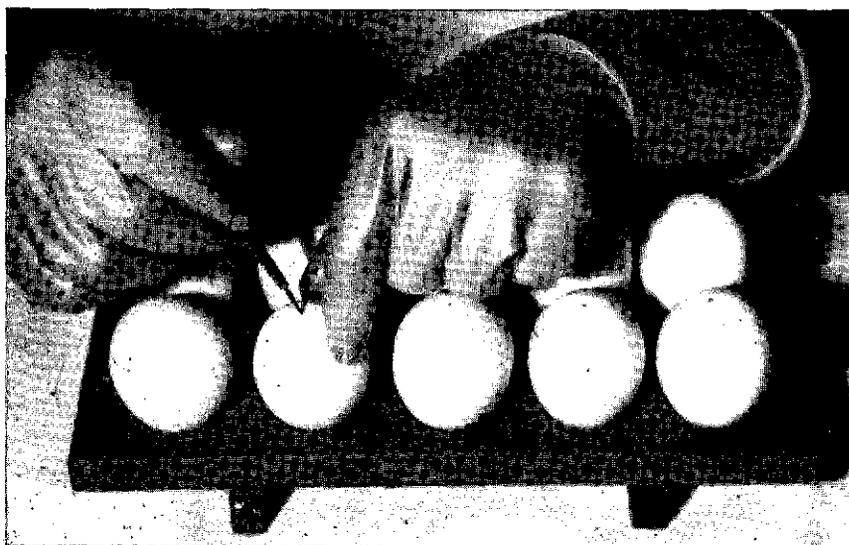
El número de huevos que se deben inocular depende de la cantidad de vacuna que se desee preparar y de las facilidades de almacenamiento. En la producción en gran escala, el rendimiento medio es de 4 a 6 dosis para perro por embrión. La mortalidad de los embriones producida por causas no específicas no excede generalmente de un 15%.

Se emplean huevos fértiles de pollo con 7 días de incubación. Es más conveniente obtener los huevos fértiles incubados en un criadero comercial y llevarlos al laboratorio un día antes de la inoculación. Al séptimo día después de la inoculación se examinan los huevos en el ovoscopio. Los huevos no fecundados, los que contengan embriones muertos o débiles (vascularización deficiente, movimientos lentos), así como los que presentan desplazamiento de la cámara de aire, deben descartarse. Durante el examen del huevo se marcan con un lápiz los límites de la cámara de aire; todos los huevos examinados se colocan en una bandeja, con la cámara de aire hacia arriba (las bandejas de cartón que se emplean comercialmente para huevos, sirven muy bien para este objeto). La cáscara se pinta encima de la cámara de aire con alcohol al 70%, y se pasa rápidamente por la llama.

La cáscara se corta en cruz con un disco de carborundum, accionado por un motor giratorio, o se perfora, con una fresa de dentista, en el centro de la parte alta de la cámara de aire. Si no se dispone de este tipo de instrumento, se debe perforar la cáscara en el punto indicado con un instrumento punzante (véase la fig. 1).

Los huevos se inoculan en el saco vitelino con 0,25 c.c. de la suspensión, al 20 %, del material de semilla, empleando una jeringa con aguja de $\frac{3}{4}$ a 1 pulgada de largo y calibre 19 ó 20 (6-25 mm \times 0,90-1,10 mm). La jeringa se llena de inóculo y se sostiene con la mano derecha paralelamente a la superficie de la mesa; con la izquierda se toma un huevo de la bandeja y se sujeta paralelo a la mesa y en línea con la jeringa, con la extremidad roma dirigida hacia ésta. Se introduce toda la jeringa en el huevo, a través del orificio hecho en la cáscara, y se depositan 0,25 c.c. del inóculo (véase fig. 2). Los huevos inoculados se vuelven a colocar en la bandeja y se tapa

FIG. 1. PERFORACION DE LA CAMARA DE AIRE



Por cortesía del Dr. F. Pérez-Gallardo, Madrid

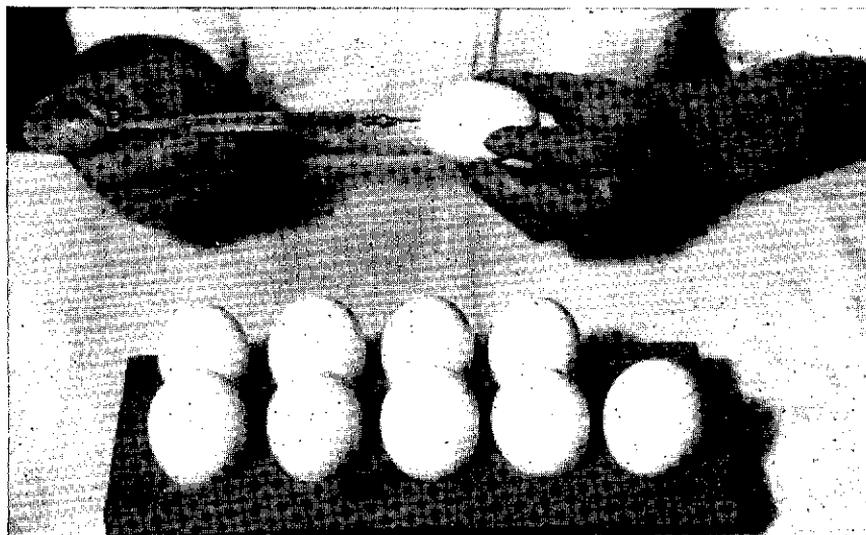
la abertura de la cáscara con parafina y vaselina derretidas (dos tercios de parafina y uno de vaselina) o con colodión. Al terminar la inoculación, se examina el material de semilla y se somete a prueba la esterilidad bacteriana del inóculo.

Después de la inoculación se incuban los huevos a 36,5°C por espacio de nueve a diez días.

Cosecha

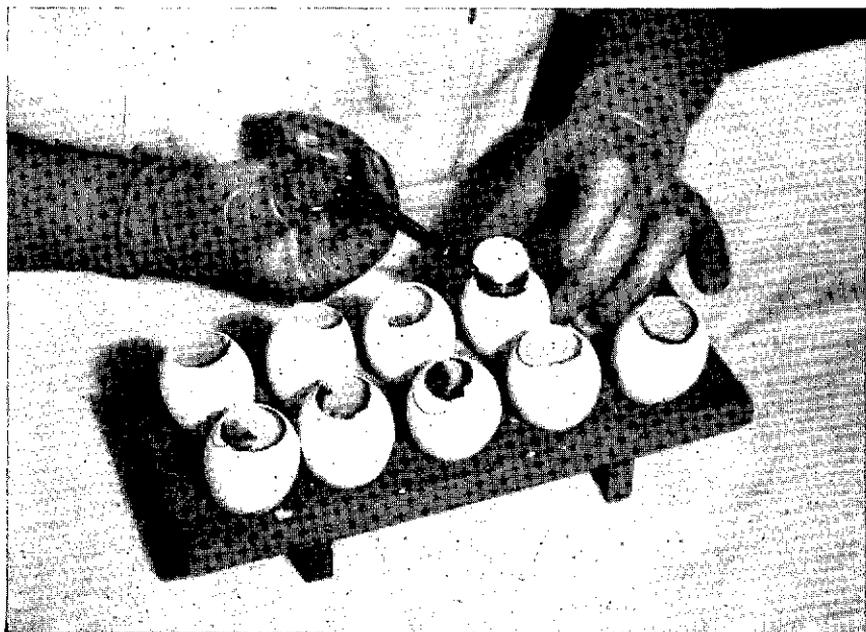
Después del período de incubación, se cosechan únicamente los embriones vivos. La yema, el saco, las membranas y los líquidos embrionarios se descartan.

FIG. 2. INOCULACION DEL SACO VITELINO DEL HUEVO EN POSICION HORIZONTAL



Por cortesía del Dr. F. Pérez-Gallardo, Madrid

FIG. 3. SECCION DE LA CASCARA



Por cortesía del Dr. F. Pérez-Gallardo, Madrid

Los huevos por cosechar se colocan en una bandeja, se les pinta o atomiza la cáscara con alcohol al 70 % y se pasan por la llama.

Los embriones vivos se cosechan por cualquiera de los métodos siguientes:

(a) Se corta la cáscara por encima de la cámara de aire con una tijera estéril de puntas agudas (véase la fig. 3). A continuación, se rompe la membrana para descubrir el embrión. Con un gancho de alambre, provisto de mango, se sujeta el embrión por el cuello y se saca hacia arriba lentamente. El embrión sale del huevo dejando la yema y tejidos extraembrionarios.

FIG. 4. SEPARACIÓN DEL EMBRION DE LAS MEMBRANAS



Por cortesía del Dr. F. Pérez-Gallardo, Madrid

También pueden utilizarse dos pinzas, levantando con una el embrión de pollo y separando las membranas con la otra (véase la fig. 4).

(b) Las manos se cubren con guantes estériles de goma. Se rompe la cáscara de los huevos, en el medio, con un instrumento cortante estéril. Hecho esto, se abre la cáscara con las manos enguantadas, vaciando el contenido del huevo sobre una malla de alambre estéril. El líquido y la yema pasan, a través de la malla, a un recipiente estéril colocado debajo de la misma. Después, se toman los embriones pasándolos a un recipiente apropiado.

Preparación de la suspensión de embriones

La cosecha de embriones se coloca en un recipiente frío, tras haberlo pesado. Se anota el peso total y se transfieren los embriones a una licuadora

Waring enfriada. Se agrega a la licuadora una cantidad suficiente de agua destilada fría (con 500 unidades de penicilina y 1 mg. de estreptomina por c.c., en los laboratorios en que se encuentre contaminación) para preparar una suspensión de embrión al 33%. Se trituran los embriones tres o cuatro veces consecutivas, en cada una de ellas durante 3 minutos, y se enfría la licuadora antes de cada trituración.

Esta suspensión se filtra haciéndola pasar a un recipiente helado a través de una gasa. La suspensión de embrión se envasa en ampollas de 5 c.c. de manera que cada una contenga 3 c.c. de la suspensión de embrión al 33%, lo que equivale a una dosis canina. Se pueden separar dosis múltiples sin aumentar el volumen del líquido, haciendo la suspensión de embrión al 66%.

Vacuna desecada

La emulsión de embrión se deseca en estado de congelación. Una vez desecada, se cierran las ampollas ya sea al vacío o en un ambiente de nitrógeno, y se conservan a 40°C. En nuestro laboratorio, el virus, después de ser desecado con un aparato Edwards, tiene un título aproximado de $10^{-3.5}$ a 10^{-4} .

Prueba de inocuidad

El material desecado se rehidrata y se inyecta 1 c.c. subcutáneamente en 8 ratones. Por lo menos 7 de los 8 ratones deben sobrevivir un período de observación de 14 días.

Prueba de potencia

Una cosa es el título del virus y otra la potencia de la vacuna. El título puede ser solamente $10^{-4.5}$ y sin embargo tener potencia la vacuna. Esta no debe salir del laboratorio sin haber pasado la prueba de potencia.

Koprowski describe una prueba de potencia para vacuna antirrábica de embrión de pollo (véase la sección 15, página 133). Esa prueba consiste en la inoculación intramuscular de cobayos con la vacuna, seguida, 21 días después, por la inoculación intramuscular de un re infectante de virus de la calle. El virus para la prueba es una emulsión de glándulas salivales de perro rabioso. Como paso preliminar, se efectúa la titulación del virus en cobayos y para la re infección se emplea la dilución más alta del virus que haya causado la muerte del 70 al 100% de los animales testigos. En la prueba de control se inoculan 10 cobayos con 0,25 c.c., cada uno, de una suspensión de vacuna antirrábica de embrión de pollo al 5%, dejando 10 testigos. Veintiún días después de la vacunación se inoculan los animales, por vía intramuscular, con 0,1 c.c. del virus de confrontación, proveniente de

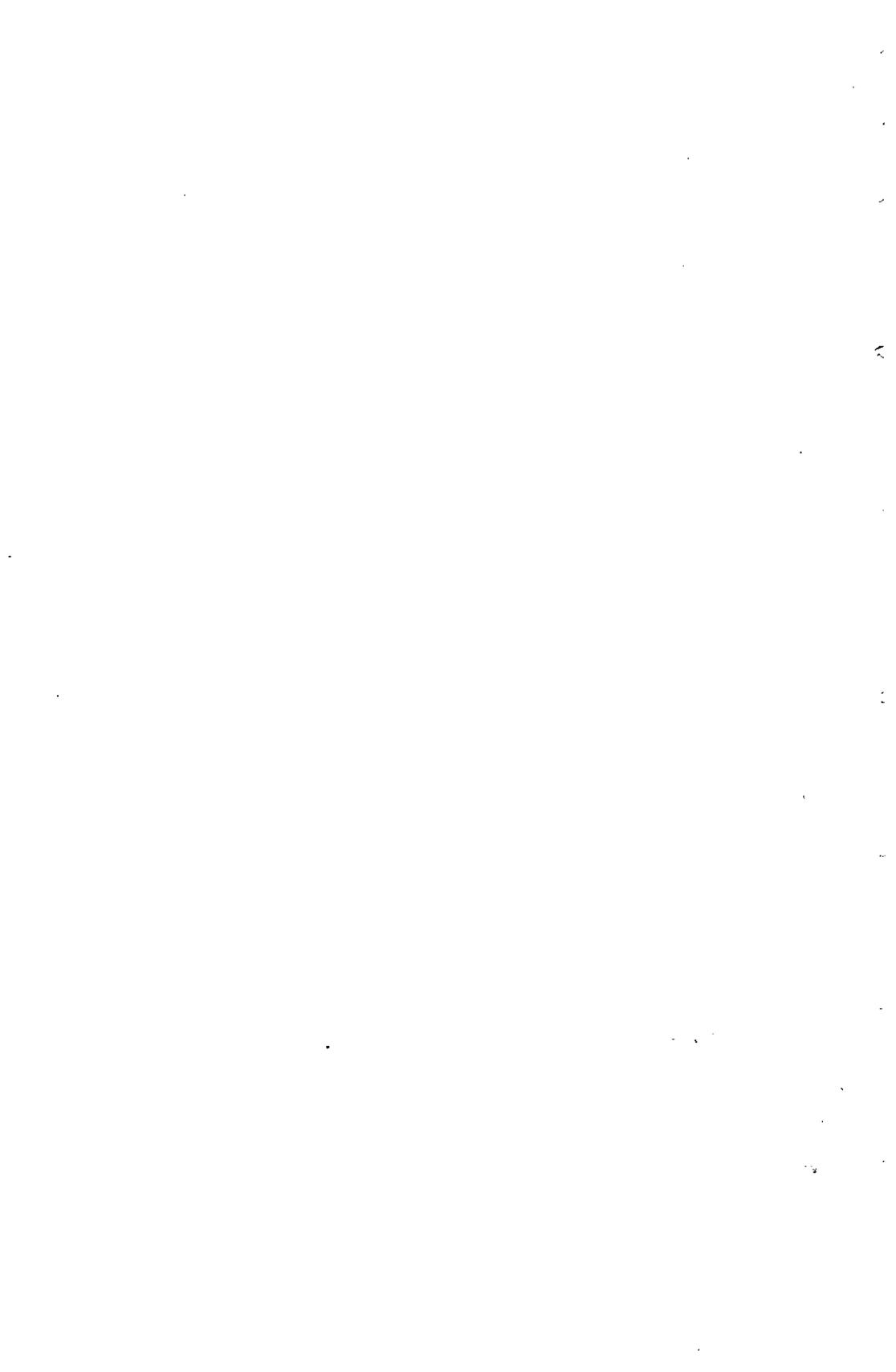
glándulas salivales de perro rabioso. Una vacuna de buena potencia protegerá al 70 % de los cobayos vacunados.

BIBLIOGRAFIA

1. Komarov, A. y Horenstein, K. (1953) *Cornell Vet.* **43**, 344
2. Koprowski, H. y Cox, H. R. (1948) *J. Immunol.* **60**, 533
3. Organización Mundial de la Salud, Comité de Expertos en Rabia (1954). *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.* **82**

Parte III

PRUEBAS DE POTENCIA DE LA VACUNA



CONSIDERACIONES GENERALES

A pesar de que desde la época de Pasteur se reconoce la necesidad de determinar el poder inmunizante de las vacunas antirrábicas y de que se han hecho numerosos trabajos de experimentación con ese fin, la mayoría de los laboratorios que producen tales vacunas no han comenzado, hasta época reciente, a probar sus productos en forma sistemática. En consecuencia, cuando se contó con pruebas prácticas de potencia, muchos laboratorios se sorprendieron al comprobar que habían estado trabajando bajo un falso sentido de seguridad, ya que las vacunas que por años habían estado distribuyendo, preparadas de acuerdo con métodos de producción bien establecidos, tenían en realidad poca o ninguna capacidad inmunizante. La característica hoy bien conocida de los virus, inclusive de las cepas de virus rábico fijo, de cambiar sus propiedades al ser pasados por animales, pone de manifiesto que los requisitos de hace 10 años, sobre el empleo de una cepa determinada para la preparación de una vacuna potente, pudieran carecer de validez en la actualidad.

Siempre ha sido difícil determinar el valor de las vacunas a base de los resultados obtenidos en el hombre, debido a la falta de controles, al número relativamente reducido de casos humanos de rabia y a la imposibilidad de tomar en consideración todos los diversos factores que impiden establecer comparaciones en los casos de exposición humana al contagio. Más aún, lo que se necesita es evaluar la vacuna *antes* de destinarla al uso humano o veterinario.

Parece ser que en la evaluación de la prueba de potencia en las vacunas antirrábicas hay que tener en cuenta, entre otras cosas, tres importantes consideraciones: en primer término, el método de prueba debe evaluar realmente la propiedad de la vacuna que determina su efectividad en la profilaxis de la rabia en el hombre o en los animales. Utilizando un huésped de susceptibilidad natural, la prueba ideal consistiría en simular las condiciones de exposición natural y tratamiento preventivo acostumbrado. Ello supondría, en el caso de las vacunas preparadas para uso humano, el empleo de virus de la calle inoculado por medio de una mordedura y seguido de dosis diarias de vacuna. Esto indudablemente no es práctico, como tampoco lo son las pruebas en que se administra la vacuna después de la inoculación

* Colaboración de Karl Habel, Jefe del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Microbiología, Bethesda, Maryland, E. U. A.

experimental del animal de prueba. Por lo tanto, en la mayoría de las pruebas se requieren dosis múltiples de vacuna (como se administra en el hombre) seguidas de la reinfectación con virus fijo por vía intracerebral, por ser éste un método de confrontación más fácil de estandarización. Aunque dista mucho de reproducir las condiciones exactas de la exposición natural y del empleo de la vacuna en la forma acostumbrada, se ha encontrado que este método de prueba refleja la capacidad relativa de una vacuna para servir de protección en condiciones más naturales.

En una prueba de potencia el segundo factor en importancia es su practicabilidad: la facilidad con que se puede afectar, la disponibilidad del material que se emplea y el costo y tiempo que demanda. No todo laboratorio puede obtener con facilidad un gran número de animales de experimentación ni, quizás, soportar el costo de repetidas pruebas cuando los animales son muy caros. El factor tiempo es también importante, puesto que la vacuna recién preparada se debe retener hasta que terminen las pruebas de potencia, y este tiempo se reduce del período de efectividad.

El tercer factor, en orden de importancia, es la estandarización del método de prueba de manera que los resultados de uno y otro laboratorio se puedan comparar.

En esta Parte III se describen detalladamente tipos de pruebas de potencia para vacuna antirábica. Todos se pueden emplear para la evaluación de vacunas, tanto para uso humano como veterinario, aunque la prueba con virus de calle en cobayos (véase la sección 15, pág. 133) está destinada especialmente para la vacuna de virus vivo producida para uso animal en embriones de pollo.

La elección de la prueba que se debe emplear en un laboratorio determinado depende de la clase de información que se quiera obtener y de las facilidades de que se disponga. Si el laboratorio tiene limitadas facilidades para adquirir animales y sólo desea determinar la potencia, o falta de potencia, de sus vacunas, debe emplear la prueba más sencilla como la modificación de la prueba de Habel en ratones (véase la sección 12, pág. 120). Si se dispone de medios y se desea hacer una evaluación cuantitativa de la potencia, como comprobación continua de la eficiencia de la producción, está indicado el empleo de una de las pruebas más estandarizadas. La prueba original de Habel en ratones (sección 11, pág. 116), así como la prueba adaptada recientemente en los Institutos Nacionales de Higiene de los Estados Unidos (sección 13, pág. 121), es cuantitativa, siendo esta última la más estandarizada. El inconveniente de esta prueba radica en la necesidad de emplear una vacuna patrón y gran número de animales. La prueba en conejos, del Instituto Pasteur, es también cuantitativa y semejante a la prueba de Habel, para la que se utilizan ratones.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ESTANDARDIZACION DE LAS PRUEBAS DE POTENCIA DE LA VACUNA ANTIRRABICA EN RATONES

Aproximadamente desde la última década la potencia de la vacuna antirrábica, distribuida bajo el sistema de licencias en los Estados Unidos, se ha controlado mediante una prueba de destrucción de la inmunidad, en la que todos los ratones son vacunados con la misma dosis de vacuna, administrada en seis inyecciones. En el momento de aplicar el re infectante o dosis de confrontación se divide a los ratones en cinco grupos, y cada grupo recibe una dilución decimal diferente del virus. La potencia de la vacuna se determina calculando el número de DL_{50} de virus necesario para vencer el mecanismo de inmunidad en la mitad de los ratones vacunados. Para que una vacuna sea aceptable debe proteger los ratones contra un mínimo de 1.000 DL_{50} de virus.

Cuando esta prueba de potencia se emplea para evaluar las mismas vacunas en más de un laboratorio, se observan ciertos factores capaces de producir resultados muy diferentes en las pruebas de potencia. Esas diferencias no sólo se aprecian en distintos laboratorios, sino entre las distintas pruebas practicadas en el mismo laboratorio. Algunos de estos factores son: la cepa del virus de confrontación, el método de trabajarlo y la raza de los ratones.

La primera variante, la de la cepa del virus de confrontación, ha sido estudiada minuciosamente por Habel y Wright y se ha eliminado por el establecimiento del virus estándar de control, cepa de virus rábico, que se proporciona a todos los laboratorios interesados en la evaluación de la potencia de la vacuna antirrábica.

El método de trabajar el virus de control también fué estandarizado por Habel y Wright, y se ha publicado una descripción completa.¹ Se ha visto, desde entonces, que las variaciones en el título del virus de control, entre una y otra prueba, son menores si en la preparación del virus de confrontación, para cada prueba, se diluye en agua destilada la suspensión al 10% de tejido cerebral con 2% de suero y se clarifica centrifugándola durante 15 minutos a una fuerza centrífuga relativa de 1.000 veces por g.

* Colaboración de George A. Hottle, Jefe de la Sección de Control de Productos Biológicos, Laboratorio de Control de Productos Biológicos, Instituto Nacional de Microbiología, Servicio de Salud Pública, Bethesda, Maryland, E. U. A.

¹ Habel, K., y Wright, J. T. (1948) *Publ. Health Rep.* (Washington) **63**, 44.

aproximadamente. De este modo se separan todas las partículas más gruesas de cerebro y se obtiene un líquido sobrenadante ligeramente opalescente, que contiene el virus con su título completo.

El problema que crea el empleo de diferentes razas de ratones es serio. Se conocen casos en que los títulos de protección de un mismo lote de vacuna han variado de 100 DL_{50} hasta 100.000 DL_{50} al emplear diferentes razas de ratones. Lo primero que se puede hacer para controlar esta variación es emplear una vacuna de referencia para hacer la prueba cada vez que se va a evaluar un lote de vacuna. Aunque es de desear que la vacuna de referencia posea la potencia mínima aceptable, es decir, una protección contra 1.000 DL_{50} , esto no es esencial. La potencia de la vacuna de referencia se debe determinar en ratones de una capacidad de inmunización media, y el título de potencia obtenido debe ser aceptado por todos los laboratorios interesados. Una vez que se ha determinado la potencia de la vacuna de referencia, los resultados de cada prueba se pueden evaluar a base del título aceptado de dicha vacuna. Aunque esta evaluación no revela la relación cuantitativa entre una vacuna desconocida y la vacuna de referencia, se puede obtener una comparación cualitativa entre las dos vacunas por medio de la prueba de potencia basada en la destrucción de la inmunidad.

En vista de la inestabilidad de las vacunas antirrábicas, se ha sugerido la conveniencia de disponer de una vacuna de referencia seca; ésta se puede obtener suspendiendo el tejido cerebral infectado en agua destilada, inactivando el virus con rayos ultravioleta y desecando la vacuna en estado de congelación. La vacuna de referencia seca, preparada en esta forma, conservará la mayor parte de su antigenicidad original y permanecerá completamente activa por lo menos un año.

Se ha sugerido que para una evaluación más cuantitativa de dos vacunas se haga una prueba, basada en la extinción del antígeno, en la cual los grupos de ratones reciben dosis determinadas de vacuna. Luego, se aplica a todos los ratones la misma dosis de re infectante. Se calcula que el 50 % de la dosis eficaz (DE_{50}) de cada vacuna es la cantidad necesaria para proteger a la mitad de los ratones contra la dosis del virus re infectante. En esta prueba es esencial el empleo de una vacuna de referencia, dada la variación de la dosis de confrontación de una prueba a otra; y los resultados se expresan siempre en términos de la vacuna de referencia. En una prueba de este tipo se pueden inyectar a los ratones seis, cuatro, tres y aun dos dosis de vacuna. Cuando se inyecta menor número de dosis de vacuna a los ratones se debe reducir también el número de DL_{50} de virus de confrontación. Cuando se dan tres o cuatro dosis de vacuna, la dosis de confrontación es generalmente entre 50 y 500 DL_{50} . Con dos dosis de vacuna, la dosis de confrontación del virus es entre 5 y 50 DL_{50} .

En la tercera revisión de los requisitos mínimos para la vacuna antirrábica (*Minimum requirements: rabies vaccine*) de los Institutos Nacionales de Higiene de los Estados Unidos, publicada el 3 de febrero de 1953, se dan detalles de la prueba de extinción del antígeno que se empleará para evaluar todos los lotes de vacuna antirrábica distribuida bajo licencia de los Estados Unidos (véase la sección 13, pág. 121). En esta prueba muchos de los detalles relativos al virus de confrontación, tal como se emplea en las pruebas de destrucción de la inmunidad, no se han cambiado. Sin embargo, en la vacunación de los ratones se inyectan 0,5 c.c. de las diluciones quíntuples de la vacuna por vía intraperitoneal, empleándose 16 ratones para cada dilución. Los ratones reciben dos inyecciones de vacuna con un intervalo de una semana. Una semana después de la segunda inyección se aplica a los ratones vacunados un re infectante, por vía intracerebral, consistente en 5-50 DL_{50} del virus estándar de control. Los ratones se observan durante 14 días. Al cómputo de los que mueran después del quinto día de confrontación se deben añadir todos los que muestren parálisis. Se calcula la DE_{50} de cada lote de vacuna como la cantidad en miligramos de tejido cerebral que se necesita para proteger la mitad de los ratones contra el virus de control. El valor de la vacuna se expresa en relación con la vacuna de referencia, considerada como la unidad de potencia. Con la actual vacuna de referencia (lote 150 C) se ha fijado el factor 0,67 como la potencia mínima aceptable en cualquier lote de vacuna antirrábica.

PRUEBA DE POTENCIA DE HABEL

Ratones

Se emplean ratones blancos suizos de 4 a 6 semanas de edad y de un peso uniforme, que se pueden escoger sin tener en cuenta el sexo o, en caso de que se crea conveniente, se pueden elegir de un mismo sexo.

Inmunización de los ratones

Se administran a sesenta ratones 0,25 c.c. de una vacuna diluída que contenga 0,5% del peso del cerebro fresco. Las inoculaciones se hacen por vía intraperitoneal los lunes, miércoles y viernes durante dos semanas consecutivas (un total de seis dosis). Antes de comenzar la inmunización se separan treinta ratones para emplearlos como testigos en el momento de aplicar el reinfecante.

Administración del reinfecante

Catorce días después de la primera dosis de vacuna se hace una prueba de confrontación. En este momento se deshielan dos ampolletas del virus fijo estándar usado como reinfecante (para su preparación véase la sección 10, página 113), y se hace una suspensión de 10^{-1} . Luego se preparan diluciones decimales, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , empleando como diluyente suero de caballo o conejo, al 2%, en agua destilada. Durante la ejecución de la prueba conviene mantener las diluciones del virus usado para la confrontación en una bañera de agua helada, a fin de evitar reducciones en el título del virus.

El reinfecante se aplica a grupos de 10 ratones vacunados, inyectándoles intracerebralmente 0,03 c.c. de las diluciones 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} y 10^{-1} del virus, en el orden citado. Se puede emplear la misma jeringa y aguja para todas las inoculaciones, siempre que antes de llenarla de nuevo se lave varias veces para usarla en la dilución siguiente.

Con una nueva jeringa se inoculan los ratones testigos con las diluciones 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} del virus para determinar cuál de las diluciones representa una DL_{50} . Si el virus de control está completamente activo, estas tres diluciones dejarán generalmente un número de sobrevivientes que oscilará del 100% a menos del 50%. La irregularidad en la distribución de las muertes,

*Colaboración de Karl Habel, Jefe del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Microbiología, Bethesda, Md. E.U.A.

durante el empleo de las tres diluciones, debe considerarse sospechosa. Para que la prueba de potencia sea válida, el 50 % del límite de las muertes por rabia, en los ratones testigos, debe ser superior a la dilución 10^{-6} .

Todos los ratones se observan durante 14 días; sólo las muertes que ocurran después del quinto día se deben atribuir a la rabia. La observación ha de ser diaria y se deben anotar los síntomas observados. Los ratones que sobreviven después de 14 días, pero que presentan síntomas indiscutibles de rabia, se deben considerar como muertos por rabia para los efectos del cálculo de la potencia de la vacuna.

Determinación del grado de protección

El límite del 50 % de la mortalidad por rabia se determina por el método de Reed y Muench, expuesto en el Anexo 1. Consiste este límite en la dilución que, aplicada a los ratones vacunados y a los testigos, debe de causar la muerte por rabia del 50 %, según los resultados obtenidos en las pruebas efectuadas con las diluciones. Restando el logaritmo del límite de los testigos, del correspondiente a los vacunados, se obtiene fácilmente el logaritmo del número DL_{50} de protección. Para satisfacer los requisitos mínimos, éste debe ser $\log. 3 \text{ ó } 1.000 \text{ } DL_{50}$.

Modificación de la técnica, tratándose de virus vivo o vacunas atenuadas

Las 6 dosis intraperitoneales, de 0,25 c.c. del equivalente de una suspensión al 0,5 %, se deben administrar comenzando con la dosis menos virulenta de vacuna para llegar gradualmente hasta las más virulentas, en el caso de que las dosis humanas varíen, como sucede con la vacuna original de tipo Pasteur. Si todas las dosis humanas son iguales, no es necesaria ninguna modificación del procedimiento original.

Anexo 1

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR EL LIMITE DEL 50 % DE LA PRUEBA DE POTENCIA TIPO HABEL EN RATONES

Resultados de un ensayo típico

Dilución	Ratones vacunados		Totales acumulados		Porcentaje de mortalidad
	supervivientes	rabia	supervivientes	rabia	
10^{-1}	4	6	4	20	83
10^{-2}	5	5	9	14	61
10^{-3}	3	7	12	9	43
10^{-4}	8	2	20	2	9
10^{-5}	10	0	30	0	0

Las cifras se calculan sumando de 10^{-1} a 10^{-5} , en el caso de los supervivientes, y en el orden inverso, para los muertos por rabia.

A continuación hágase el cálculo como sigue:

$$\frac{\text{(50 \% menos el porcentaje inferior inmediato a 50 \%)}}{\text{(\% superior inmediato a 50 \% menos el inferior inmediato a 50 \%)}} \quad \text{ó} \quad \frac{50 - 43}{61 - 43} = \frac{7}{18} = 0,39$$

Substráigase esta cifra (0,39) del log. de la dilución cuyo porcentaje de mortalidad fué el inferior inmediato a 50 %:

$$\begin{array}{r} 3,000 \\ 0,390 \\ \hline 2,610 \end{array}$$

Este es el logaritmo del límite del 50 % para este caso, o sea, $10^{-2,6}$.

En seguida, calcúlese el límite del 50 % de los testigos de la misma manera.

Dilución	Ratones vacunados		Totales acumulados		Porcentaje de mortalidad
	super-vivientes	rabia	super-vivientes	rabia	
10^{-5}	0	10	0	17	100
10^{-6}	4	6	4	7	64
10^{-7}	9	1	13	1	7

$$\frac{50 - 7}{64 - 7} = \frac{43}{57} = 0,75$$

$$\begin{array}{r} 7,000 \\ 0,750 \\ \hline 6,250 \end{array}$$

El límite del 50 % de los testigos es $10^{-6,2}$.

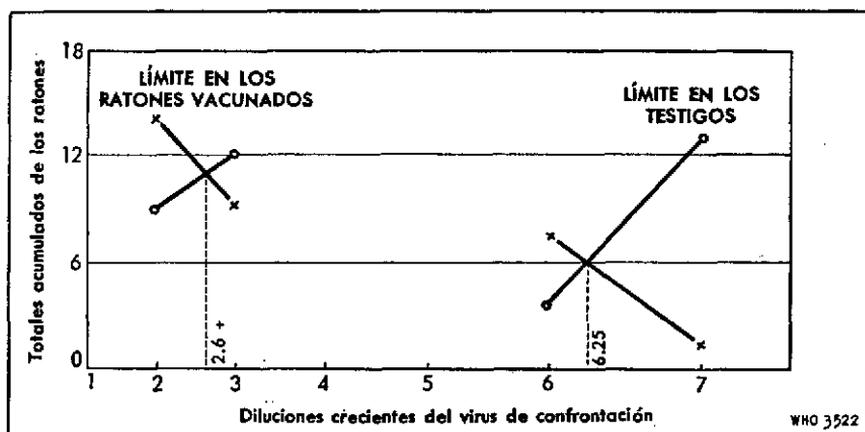
Para establecer la DL_{50} de protección ofrecida por la vacuna, réstese el logaritmo del límite del 50 % de los ratones vacunados, del logaritmo del límite del 50 % de los testigos:

$$\begin{array}{r} 6,25 \\ 2,61 \\ \hline 3,64 \end{array}$$

En consecuencia, la vacuna protegió contra $10^{-3,6} DL_{50}$, o sea $4.366 DL_{50}$. La cifra se debe redondear con arreglo a la centena más cercana, es decir, en este caso, $4.400 DL_{50}$.

Método para calcular la DL_{50} por medio de gráficas

Se puede obtener el mismo resultado, o uno de suficiente exactitud, sin necesidad de hacer cálculos de fracciones utilizando una hoja de papel semilogarítmico con divisiones decimales. Basta saber el total general de los ratones que sobrevivieron y el de los que murieron con las dosis inmediatamente inferior y superior al límite del 50 %, calculado en la forma expuesta. El número de ratones se indica en la escala aritmética de la hoja por medio de una ordenada, y la dilución de virus se anota en la escala logarítmica correspondiente a las abscisas. Los cuatro puntos que corres-

FIG. 1. METODO GRAFICO PARA COMPUTAR LA DL_{50} 

o = Supervivientes (total acumulado)
x = Muertes (total acumulado)

ponden a los ratones supervivientes y a los que murieron, en cantidad superior e inferior al límite del 50 %, se representan en esta forma, en oposición a las concentraciones correspondientes. Las concentraciones del virus de control se anotan en la escala logarítmica (abscisas). El extremo izquierdo de la gráfica corresponde a la concentración más alta de virus y el extremo derecho a la dilución más alta de la misma. Las cifras que corresponden, respectivamente, al número de ratones que murieron y al número de los que sobrevivieron se unen con líneas rectas. El punto de intersección de las dos líneas indica el límite del 50 %, cuyo valor se lee en la escala logarítmica. La figura 1 muestra las mismas cifras del ejemplo anteriormente citado. La DL_{50} de protección conferida por la vacuna se obtiene de la misma manera, es decir, calculando la diferencia entre los dos logaritmos y la derivación del antilogaritmo del resultado.

MODIFICACION DE LA PRUEBA DE POTENCIA DE HABEL

Para muchos laboratorios que producen vacuna antirrábica, la falta de animales de experimentación, en un número relativamente grande, hace que el empleo ordinario de la prueba de potencia estándar en ratones resulte poco práctico. Esto es especialmente cierto en el caso de aquellos laboratorios que, con relativa frecuencia, preparan pequeñas cantidades de vacuna. En estas circunstancias, es mejor hacer la prueba de potencia simplificada, que permite eliminar las vacunas de baja potencia antigénica y que, al mismo tiempo, se puede comparar en sus requisitos mínimos, con los resultados que se obtienen con la prueba estándar.

En la comprobación de los resultados de múltiples pruebas de potencia con vacunas de alto, bajo y mediano nivel antigénico, se ha puesto de manifiesto que la reinfección intracerebral con una dosis aproximada de 500 DL₅₀ causa la muerte a menos de la mitad de los ratones inmunizados, si la vacuna empleada demuestra, en la prueba completa, que puede proteger contra 1.000 DD₅₀, que es el requisito mínimo.

La técnica de la prueba es la misma que en el método estándar (véase la sección 11, página 116) y consiste en seis dosis intraperitoneales de una suspensión al 0,5% de cerebro (0,25 c.c.), con confrontación intracerebral al décimocuarto día, seguida de 14 días de observación. Sólo se inmunizan 20 ratones, dejando otros 15 en calidad de testigos. A los catorce días se inyecta intracerebralmente a los ratones vacunados el virus de control estándar diluido a una potencia de 500 DL₅₀ por 0,03 c.c. Al mismo tiempo grupos de cinco ratones testigos reciben el virus de control en diluciones a 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷. (En la sección 11, página 116, se expone un método análogo.)

Para que la prueba sea válida, el título en los testigos debe indicar que la confrontación en los ratones vacunados estuvo entre 100 y 1.000 DL₅₀, y el 50% de los ratones vacunados deben sobrevivir para que la vacuna pueda pasar la prueba de potencia de eliminación (para los cálculos, véase la sección 11, página 116).

Para tener una evaluación cuantitativa más exacta de la vacuna que se produce durante un largo período, en cada laboratorio, se recomienda hacer, periódicamente, una prueba de potencia estándar completa. (Véanse las secciones 11 y 13, páginas 116 y 121.)

* Colaboración de Karl Habel, Jefe del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Microbiología, Bethesda, Md., E.U.A.

REQUISITOS ESTABLECIDOS POR LOS INSTITUTOS NACIONALES DE HIGIENE DE LOS ESTADOS UNIDOS PARA LA PRUEBA DE POTENCIA

El virus patrón de confrontación

Periódicamente se facilita a los laboratorios de los Estados Unidos de América un virus patrón re infectante o de confrontación. Esto proporciona un medio de control casi uniforme y permite la evaluación de diferentes lotes de vacuna de un mismo laboratorio así como de vacunas provenientes de distintos laboratorios. A los laboratorios se les pide que se atengan rigurosamente a los procedimientos recomendados. La Organización Mundial de la Salud (Palais de Nations, Ginebra, Suiza) proporciona el virus patrón a los laboratorios nacionales que lo soliciten.

Preparación del virus

En los Estados Unidos se proporciona virus patrón en una suspensión al 20% de cerebro de ratón, para la que se emplea como diluyente un 2% de suero equino y agua destilada. La suspensión se conserva en hielo seco antes del envío y sólo debe emplearse cuando se reciba en estado de congelación, debiendo mantenerse en ese estado hasta el momento de ser utilizada. El contenido de la ampollita se debe descongelar rápidamente bajo un chorro de agua fría y luego diluirse 1:4 con suero de caballo al 2%. Esto da una suspensión al 5%, que se centrifuga por 15 minutos a una fuerza centrífuga relativa de 1,000 g. aproximadamente. El líquido sobrenadante se diluye a 10^{-3} y, empleando esta dilución, se inyectan 0,03 c.c. por vía intracerebral a un número suficiente de ratones sanos, a fin de producir la cantidad de virus patrón que se necesita para un año aproximadamente. (Un cerebro de ratón da, poco más o menos, 1,5 c.c. de una suspensión al

* Colaboración de Martin M. Kaplan, Veterinario Jefe de Salud Pública de la División de Servicio de Enfermedades Transmisibles, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Gran parte del texto de esta sección se ha tomado del: United States National Institutes of Health (1953) *Minimum requirements: rabies vaccine*, 3rd. revision, Bethesda, Maryland. Esta revisión, fechada el 3 de febrero de 1953, entró en vigor el 1 de septiembre de 1953. Hubo después dos enmiendas: la No. 1, fechada el 9 de septiembre de 1953 y la No. 2, del 12 de octubre de 1953. Las instrucciones originales de los Institutos Nacionales de Higiene han sido ligeramente modificadas, después de consultar con ellos, a fin de facilitar su aplicación internacional. Se agradece la autorización para reproducir este material.

20 %.) Cuando un ratón inoculado presenta síntomas de rabia, durante 24 horas, se le extrae el cerebro y éste se congela inmediatamente con hielo seco. Todos los cerebros cosechados se colocan en un recipiente común y, cuando se ha completado la recolección se deshielan, se pesan y se trituran para formar una pulpa. Al tiempo de la trituración se añade suficiente suero de caballo al 2 % para hacer una suspensión final del 20 %. A la suspensión se le da un número de lote y, sin colarla ni centrifugarla, se distribuye en ampollitas de 2,0 a 2,5 c.c. Estas se cierran a la llama y se congela rápidamente el contenido, guardándose a temperatura de hielo seco (aproximadamente -70°C).

En la preparación del patrón se deben efectuar rápidamente todas las operaciones, para asegurar la supervivencia de la mayor cantidad posible de virus. Antes de emplearlo como virus de control, se debe determinar la DL_{50} del lote en ratones de seis semanas. El lote es satisfactorio si los valores del DL_{50} oscilan entre $10^{-5,0}$ y $10^{-8,0}$, inclusive. La variación máxima en los títulos obtenidos, entre una prueba y otra, no debe pasar de una dilución decimal cuando se emplea el mismo lote de virus de control. Cuando se han empleado todas las ampollitas de un lote, o si ha transcurrido un período de un año, se debe obtener de los Institutos Nacionales de Higiene una nueva muestra de virus patrón como referencia para la preparación de un nuevo lote de trabajo. Esto es indispensable para asegurar la uniformidad del patrón que se emplea en todos los laboratorios que producen vacuna antirrábica.

Nota: Las dificultades para el despacho de sustancias congeladas requieren que la Organización Mundial de la Salud envíe la cepa patrón en forma seca a los laboratorios que la soliciten. Un laboratorio central puede preparar su propia fuente original de virus patrón mediante un solo pase de la cepa por un número suficiente de ratones para abastecer las necesidades de varios años. Si se dispone de hielo seco, la fuente primaria se debe conservar, a 70°C bajo cero, en ampollitas cerradas a la llama. Si no se dispone de hielo seco, el material se puede conservar a 20°C bajo cero, o a menor temperatura si es posible, pero se han de hacer titulaciones periódicas en ratones para determinar las posibles pérdidas en el título. No se aconseja trabajar directamente con virus patrón seco, porque el título puede ser demasiado bajo.

Tipo de ratón empleado en la prueba

La prueba se hace con ratones suizos blancos, de aproximadamente cuatro semanas, de un peso uniforme (11-15 gs.) y de un mismo sexo.

Vacuna de referencia

Los Institutos Nacionales de Higiene suministran, a los laboratorios de los Estados Unidos que lo soliciten, una Vacuna Antirrábica de Referencia (inactivada por luz ultravioleta y desecada). Cuando el contenido de cada ampolleta se disuelve en 8 c.c. de agua destilada con 0,25 % de fenol y 0,01 % de tiomersal (mertiolato), se considera que la vacuna es una suspensión al 10 %. La vacuna de referencia se mantiene constantemente a temperaturas de 2 a 10°C bajo cero, ya sea en estado líquido o seco. Una vez reconstituída la vacuna no se debe emplear por espacio de más de dos semanas después de haberse agregado el diluyente.

A petición de la Organización Mundial de la Salud, los Institutos Nacionales de Higiene le han proporcionado una cantidad limitada de su Vacuna Antirrábica de Referencia, 150C, que será distribuída por la OMS a los laboratorios nacionales que la soliciten. Debido a que sólo se dispone de una cantidad limitada de vacuna seca de referencia, se sugiere a los laboratorios nacionales que preparen su propia vacuna seca, en cantidad suficiente para satisfacer sus necesidades, por lo menos de un año, probándola luego con la Vacuna de Referencia de los Institutos. La ventaja de emplear una vacuna seca de referencia es su estabilidad y, de ahí, su utilidad para comparaciones futuras con otras vacunas.

Inmunización de los ratones

De cada vacuna sometida a prueba se preparan tres o más diluciones en solución salina fisiológica estabilizada (0,85 % de cloruro de sodio en solución Sorensen¹ fosfatada con pH 7,6), incrementando la dilución en múltiplos de cinco. Las diluciones se hacen en tal forma que la intermedia contenga suficiente vacuna para proteger el 50 % de los ratones. El grado de dilución dependerá de la fuerza de la dosis de confrontación, la clase de ratón que se emplee y la potencia de la vacuna. Con una dosis de 20 DI_{50} (véase la página 125), ha dado buen resultado una serie de diluciones de 1,0 % — 0,2 % — 0,04 % de cerebro, tanto para la Vacuna de Referencia INH 150C, como para las vacunas comerciales producidas en los Estados Unidos de América.

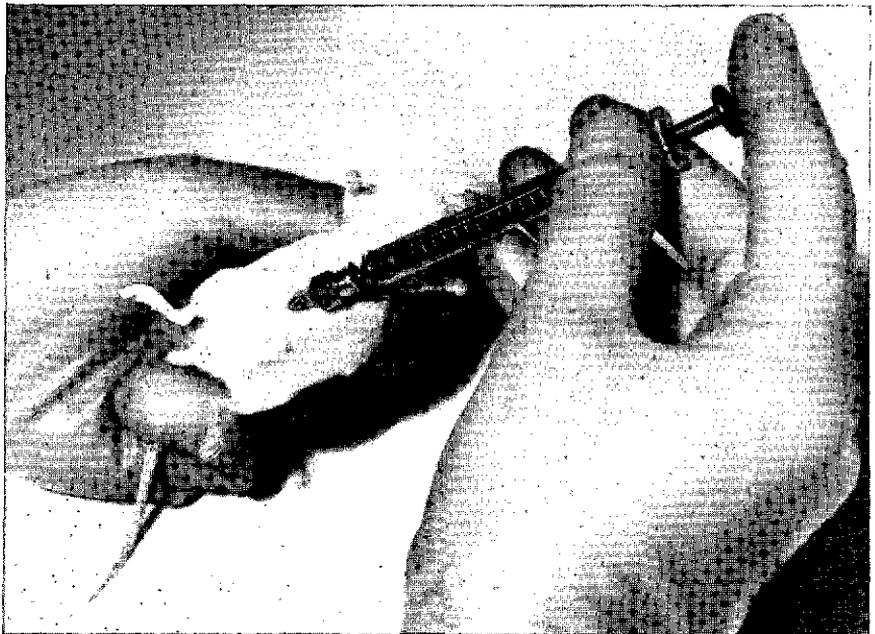
Inocúlense por lo menos 16 ratones, por vía intraperitoneal, con 0,5 c.c. de cada dilución de la vacuna. Cada ratón recibe dos dosis de vacuna con una semana de intervalo. En el momento en que los ratones reciben la primera dosis se separan suficientes ratones testigos para que pueda efectuarse una titulación adecuada del virus de confrontación, requiriéndose por lo

¹ 15 c.c. M/15 KH_2PO_4 , 85 c.c. M/15 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 900 c.c. agua destilada.

menos 10 ratones por cada dilución de virus (un total de 30 a 40 ratones testigos).

Para la vacunación de los ratones empléese una jeringa de tuberculina de 1 c.c. ó 0,5 c.c. e inyéctese cada ratón con 0,50 c.c. por vía intraperitoneal. Para el trabajo rápido es necesario anestesiarse al ratón con éter. El ratón se sujeta con el pulgar y el dedo índice por la piel del cuello, y con el meñique y la palma de la mano por la cola. Así queda de espaldas, asegurado

FIG. 1. INOCULACION INTRAPERITONEAL DEL RATON



Por cortesía del Dr. F. Pérez-Gallardo, Madrid

firmente y no puede escapar aunque no esté bajo los efectos del éter. La aguja más adecuada para la vacunación es de $\frac{1}{2}$ ó $\frac{3}{4}$ de pulgada (0,5 mm X 12 ó 18 mm). La inoculación se ha de hacer en la línea media, justamente por encima del ombligo, para no pinchar el estómago, el hígado ni la vejiga. La aguja se inserta con el bisel hacia arriba, formando un ángulo de 45° con la porción anterior del cuerpo, y la suspensión de vacuna se ha de inyectar rápidamente (véase la fig. 1). Si hay alguna duda de que la aguja haya penetrado en la cavidad peritoneal, se mueve la punta de un lado a otro y se observa la piel.

El orden de vacunación no tiene importancia, siempre que todos los ra-

tones sean vacunados con un lote de vacuna y se les pueda tener en una o dos cajas.

Confrontación de los ratones vacunados y testigos

A todos los ratones se les aplica intracerebralmente un re infectante 14 días después de la primera dosis de vacuna.

Se descongela bajo la llave de agua fría una ampollita del virus patrón del primer pase y se diluye al 1:4 con suero de caballo al 2% y agua destilada. La mezcla se centrifuga por 15 minutos a una fuerza centrífuga relativa de 1.000 g. aproximadamente. El líquido sobrenadante constituye una dilución 5×10^{-2} del material de confrontación y se utiliza para hacer las nuevas diluciones. Todas las diluciones se preparan con el mismo diluyente que se utilizó originalmente. Se recomienda que las diluciones del virus se conserven en un baño de agua helada, o su equivalente, durante la ejecución de la prueba, para evitar la pérdida de potencia.

Los ratones inmunizados se confrontan con una dilución de virus que se haya probado que contenga aproximadamente 20 DL_{50} . Cada laboratorio, por lo tanto, debe determinar cuál es la dilución del virus patrón que contiene la dosis de prueba de 20 DL_{50} . Por ejemplo, si se ha comprobado que el virus patrón tiene un título de $10^{-6,5}$ ó 1:3.160.000, entonces una dilución de 1:158.000 ó $10^{-5,2}$ tendrá 20 DL_{50} . Esta dilución se prepara del líquido sobrenadante 5×10^{-2} , ya descrito, en la forma siguiente:

- 1 c.c. (de 1:20) + 4 c.c. diluyente = 1:100
- 1 c.c. (de 1:100) + 9 c.c. diluyente = 1:1.000
- 1 c.c. (de 1:1.000) + 9 c.c. diluyente = 1:10.000
- 1 c.c. (de 1:10.000) + 14,8 c.c. diluyente = 1:158.000

Después de inocular a todos los ratones inmunizados, con la dosis del virus de prueba (0,03 cc. de la dilución 1:158.000, en el ejemplo citado), se inocula un grupo de ratones testigos con la misma dosis del virus de prueba. Luego, se preparan dos diluciones decimales de la dosis de prueba para la inoculación de los ratones testigos restantes. Es conveniente inyectar la dilución 1:100 y la dilución 1:10 de la dosis del virus de prueba en el orden señalado. De este modo, se puede emplear una sola jeringa para la confrontación de todos los ratones inmunizados y un grupo de ratones testigos; para los ratones testigos restantes hay que usar otra jeringa.

Todos los ratones se observan durante 14 días desde el momento de la inyección de confrontación. Sólo las muertes que ocurren después del quinto día y las que sean precedidas de síntomas de virus rábico fijo (parálisis, convulsiones) se consideran como producidas por la rabia. Los ratones

que muestren parálisis, pero que sobrevivan al período de observación de 14 días, se cuentan como si hubieran muerto de rabia.

La definición de los términos "parálisis" y "convulsiones", en lo que se refiere a los ratones inyectados con el virus de control, es la siguiente:

Parálisis es la pérdida parcial o total de la fuerza motora en una o más patas.

Las *convulsiones* se manifiestan por contracciones violentas y anormales de los músculos del cuerpo, denominadas a veces espasmos. Obedecen a estímulos exteriores, como ruidos extraños o al manejo de los animales.

Para que la prueba se considere válida, los resultados obtenidos después de la confrontación de los ratones inmunizados deben mostrar que las diluciones de la vacuna de referencia están dentro del límite del 50 %, es decir, que la mayoría de los ratones que recibieron la dosis más fuerte de vacuna sobrevivieron y la mayoría de los que recibieron la dosis más débil murieron. En el caso de la vacuna en prueba, a menos que se requiera especialmente un límite exacto, sólo es necesario que sobreviva la mayoría de los ratones que recibieron la dosis más alta de vacuna. El título de virus de la dosis de prueba del virus de control no tiene especial importancia, siempre y cuando esté entre 5 y 50 DL_{50} . Es necesario sin embargo, que todos los ratones testigos que recibieron la dosis de prueba mueran. Por razón de la naturaleza del virus, y de la prueba misma, es difícil obtener exactamente el mismo título de virus en todas las pruebas.

Prueba de potencia con vacunas de virus vivo o atenuado

Las vacunas que contengan virus vivo o atenuado, con excepción de las vacunas de embrión de pollo (véase la sección 15, página 133), se pueden probar en la misma forma que las vacunas preparadas con virus muerto.

Determinación de la potencia (valor antigénico)

Tanto para la vacuna de referencia como para la vacuna en prueba, el límite del 50 % se establece por el método de Reed y Muench. Se calcula dicho límite como el 50 % de la dosis efectiva (DE_{50}) de vacuna del cerebro original expresada en miligramos, capaz de proteger al 50 % de los ratones. Se hace a continuación un resumen de este método en el Anexo 1. Dividiendo la DE_{50} de la vacuna de referencia por la DE_{50} de la vacuna de prueba se obtiene como cociente el valor antigénico de la vacuna de prueba en relación con la vacuna de referencia. La DL_{50} del virus re infectante recibido por los ratones inmunizados se calcula dividiendo la dilución de virus empleada

como dosis de prueba por la dilución del límite del 50% del virus usado en los ratones testigos, haciendo el cálculo por el método de Reed y Muench.

Valor antigénico requerido (véase página 128 para el método de computación)

El valor antigénico de una vacuna sometida a prueba debe ser por lo menos 0,6 en relación con la Vacuna de Referencia 150 C de los Institutos Nacionales de Higiene. El valor antigénico de cada nuevo lote de vacuna de referencia se debe determinar en relación con la vacuna de referencia anterior. Hay que prever pequeñas diferencias en las potencias de los futuros lotes de vacuna de referencia, a pesar de los esfuerzos para reducir esas variaciones a un mínimo.

Anexo 1

METODO PARA DETERMINAR EL LIMITE DEL 50% POR EL METODO DE REED Y MUENCH,² APLICADO A LA PRUEBA DE POTENCIA DE LA VACUNA ANTIRRABICA EN RATONES

*El 50% de la dosis efectiva (DE₅₀), se calcula como la cantidad de cerebro que protege al 50% de los ratones contra una confrontación posterior con virus rábico. Los resultados del control se ordenan en dos columnas que indiquen el número de ratones que sobrevivieron y los que murieron en cada dosis de la vacuna. Las cifras correspondientes a ratones supervivientes y ratones muertos que aparecen bajo el título *Totales reconstruidos* se obtienen sumando los casos de supervivencia desde la más alta hasta la más baja dilución, y los muertos en el sentido contrario.*

EJEMPLO

Diluciones de la vacuna 5% cerebro	Cerebro (mg)	Numero de ratones	Supervivientes	Muertos	Totales reconstruidos		Porcentaje de mortalidad
					Supervivientes	Muertos	
1:5	10	16	10	6	↑ 19	↓ 6	6/25 = 24
1:25	2	16	8	8	↑ 9	↓ 14	14/23 = 61
1:125	0,4	16	1	15	↑ 1	↓ 29	

De esta tabulación, el límite del 50% está entre 2 mg. y 10 mg. de cerebro y se obtiene por el siguiente cálculo:

$$A. \frac{61 \text{ (mortalidad inmediata superior al 50\%)} - 50}{61 \text{ (mortalidad inmediata superior al 50\%)} - 24} = \text{(mortalidad inferior al 50\%)}$$

² Reed, L. J. y Muench, H. (1938), *Amer. J. Hyg.*, 27, 493

× el logaritmo del factor de dilución (en este ejemplo el factor de dilución es 5)
 = logaritmo del factor de dilución al límite del 50 %
 o sea $\frac{11}{37} \times 0,699 = 0,208$ (logaritmo del factor de dilución al límite del 50 %).

- B. El antilogaritmo del factor de dilución al límite del 50 % × la cantidad de tejido cerebral inyectado en los ratones a la dilución en la cual más del 50 % de los ratones murieron = DE_{50}
 El antilogaritmo de 0,208 = 1,61
 luego, $1,61 \times 2,0 \text{ mg} = 3,22 \text{ mg} = DE_{50}$

El valor antigénico de una vacuna se obtiene dividiendo la DE_{50} de la vacuna de prueba por la DE_{50} de la vacuna de referencia, v.g.,

DE_{50} de la vacuna de referencia = 3,22 mg TC (tejido cerebral)
 DE_{50} de la vacuna de prueba No. 1 = 1,07 mg TC
 valor antigénico de la vacuna No. 1 = $\frac{3,22}{1,07} = 3,0$

La dosis de confrontación de virus se calcula a base del resultado de la reinfectación de los ratones testigos.

Los resultados de la reinfectación se ordenan en columnas, y se prepara la columna de *Totales reconstruidos* en la forma ya descrita.

EJEMPLO

Dilución del virus	Numero de ratones	Sobrevivieron	Murieron	Totales reconstruidos		Porcentaje de mortalidad
				Sobrevivieron	Murieron	
$10^{-5.2}$	10	0	10	0	18	$\left. \begin{array}{l} \uparrow \\ 8/12 = 67 \\ \downarrow \\ 2/14 = 14 \end{array} \right\}$
$10^{-6.2}$	10	4	6	4	8	
$10^{-7.2}$	10	8	2	12	2	

Como la dilución correspondiente al 50 % del límite letal, o la DL_{50} , está entre $10^{-6.2}$ y $10^{-7.2}$ el logaritmo de la dosis DL_{50} se establece del modo siguiente:

$$\begin{aligned}
 \text{Logaritmo de la dosis } DL_{50} &= 6,2 + \frac{67 - 50}{67 - 14} \\
 &= 6,2 + \frac{17}{53} \\
 &= 6,2 + 0,32 \\
 &= 6,52
 \end{aligned}$$

Por lo tanto, la DL_{50} es de $10^{-6,52}$, o sea que la suspensión de virus sin diluir contenía 3.310.000 DL_{50} . Como se empleó como dosis de confrontación una dilución de virus al $10^{-5,2}$, esa dosis contenía

$$\frac{3.310.000}{158.000} \text{ ó sea } 21 \text{ } DL_{50}$$

UNA PRUEBA DE LA POTENCIA EN CONEJOS

Se emplean conejos domésticos sanos que pesen entre 2 y 2,5 kg; los resultados que se obtengan dentro de estas condiciones son constantes, sin que influya en ellos la raza ni la edad de los animales. Para las pruebas ordinarias se aconseja el empleo de seis conejos: dos se vacunan durante 20 días, dos durante 10 días y dos se usan como testigos.

Virus de confrontación

El virus de confrontación, o re infectante, es el virus fijo Louis Pasteur (véase su descripción en la sección 6, A, página 79). Cuando se inocula por vía intracerebral, a una dilución por peso de 1:16.000 (suspensión en agua destilada), ese virus mata el 50 % de los conejos que pesen 2 kg. La vacunación se efectúa en el flanco del animal, en el tejido celular subcutáneo, y el volumen inoculado es de 0,25 c.c., reduciéndose así a un mínimo las causas de error (en comparación con la inoculación en la cámara anterior del ojo). Los conejos se prueban treinta días después de iniciada la vacunación, en la forma siguiente:

(1) Se tritura un fragmento de cerebro fresco de conejo, de peso conocido, infectado con virus fijo, utilizando arena estéril de cuarzo y un mortero enfriado a -24°C .

(2) Se añade un volumen determinado de agua destilada para obtener una emulsión por peso al 1:10.

(3) Se elimina el cuarzo, centrifugando la emulsión rápidamente (8 minutos a 4.000 revoluciones por minuto).

(4) Se preparan con agua destilada diluciones del líquido sobrenadante, cambiando las pipetas antes de cada dilución.

En numerosas pruebas se han obtenido con notable constancia los resultados siguientes:

una dilución al 1:13.000 de virus fijo mata a todos los conejos;

una dilución al 1:15.000 de virus fijo mata a 6 de cada 7 conejos;

una dilución al 1:16.000 de virus fijo mata a 5 de cada 10 conejos (= 1 DL_{50}); y

* Colaboración de R. Béquignon y C. Vialat, Instituto Pasteur, París, Francia. Esta es una versión modificada del trabajo publicado en francés en los *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 529.

una dilución al 1:18.000 nunca es mortal.

Parece innecesario interpretar matemáticamente estos resultados por el método de acumulación empleado por Reed y Muench, toda vez que la dosis letal mínima se puede determinar fácilmente y no cambia dentro de las condiciones experimentales.

Es evidente, sin embargo, que este título de virulencia varía, no sólo de acuerdo con la cepa del virus fijo escogido para la prueba, sino también de conformidad con el número de pases de la cepa, el peso y las características de los conejos domésticos empleados y el clima donde se efectúe la prueba. No obstante, no hay razón para que estos factores modifiquen la dosis letal mínima si ésta ha sido establecida dentro de idénticas condiciones experimentales (véase la nota en la página 132).

Los resultados de la prueba se pueden conocer en 8 días, pero se recomienda mantener a los animales un mes después de la inoculación de confrontación para comprobar los resultados, puesto que, en casos excepcionales (el 2% de los casos), la rabia se puede desarrollar tardíamente.

Vacunación

Una vez que se conoce el título de virulencia se puede evaluar el poder de protección de las vacunas antirrábicas, probando lotes de cinco conejos, a los treinta días de vacunados, con diluciones crecientes de virus fijo.

Así, la vacuna fenolada del Instituto Pasteur de París (véase la sección 6, A, página 79), al ser inyectada subcutáneamente en el flanco del animal a razón de 2 c.c. por día durante 20 días consecutivos, protege a un conejo de 2 kg.—inoculado intracerebralmente a los 30 días de la vacunación—contra una dilución de virus al 1:5.000 (3 DL₅₀).

Si se varía el volumen de las inyecciones de vacuna (es decir, la cantidad de vacuna inoculada y la duración de las vacunaciones), los resultados obtenidos demuestran que las inyecciones cuantiosas son más eficaces que las repetidas. Cuando se inyectan 2 c.c. diariamente por 10 días consecutivos, la vacuna fenolada protege a un conejo de 2 kg. inoculado por vía intracerebral a los treinta días contra una dilución de virus al 1:10.000 (1,5 DL₅₀). En cambio, cuando se inyecta 1 c.c. diariamente durante 20 días consecutivos, no protege al conejo contra la dilución al 1:16.000, lo que tiende a comprobar la importancia que tiene para el hombre el tratamiento preventivo precoz y la inyección cuantiosa e inmediata al sufrir la mordedura de un animal sospechoso.

En la ejecución de la prueba se emplea un mínimo de 6 conejos, aunque es preferible utilizar 12 animales divididos en dos grupos de igual número. El primer grupo recibe 2 c.c. de vacuna (suspensión de tejido al 5%)

durante 10 días. El segundo grupo recibe 2 c.c. de vacuna (suspensión de tejido al 5%) durante 20 días. El tercer grupo se emplea como testigo. Treinta días después de iniciada la vacunación se administra al primer y tercer grupo una inyección re infectante intracerebral de 0,25 c.c. de una dilución de la cepa Pasteur de virus fijo al 1:10.000 (1,5 DL₅₀); el segundo grupo se inyecta en forma análoga con una dilución al 1:5.000 (3 DL₅₀). Todos los animales vacunados deben sobrevivir, pero el re infectante debe causar la muerte de los testigos.

Nota: El método de prueba antes descrito fué desarrollado para su empleo con la cepa Louis Pasteur de virus fijo en la fase actual de adaptación al conejo en el Instituto Pasteur de París (1.901 pases hasta el 1º. de enero de 1953).

Cuando se emplee otra cepa de virus rábico fijo, adaptado al conejo, se recomienda hacer una titulación preliminar del virus en el conejo, por vía intracerebral, para determinar las diluciones del virus en ambos extremos de la DL₅₀.

Para la prueba intracerebral hecha el trigésimo día en conejos vacunados durante 10 días, debe emplearse 1,5 DL₅₀ y en los vacunados durante 20 días, la concentración debe ser de 3 DL₅₀.

PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNA DE EMBRION DE POLLO

La prueba consiste en inoculación intramuscular de cobayos con vacuna de embrión de pollo, seguida de la inoculación del virus de calle tres semanas después.

Cobayos

Deben escogerse animales que pesen por lo menos 400 g. No se aconseja el empleo de animales de menor peso.

Método de inmunización

Si se usa la actual vacuna de embrión de pollo en cada cobayo (suspensión de tejido al 33%), inyéctense 0,25 c.c. de una suspensión al 5% haciendo la inoculación en el músculo gastrocnemio de la pata derecha. La vacuna debe ser rehidratada con agua destilada estéril antes de la inoculación, y la dilución indicada se deberá hacer con agua destilada estéril.

Preparación del material re infectante

Los perros adultos se inoculan con 0,1 c.c. de una suspensión de glándula submaxilar de perro infectado, que se conserva congelada a 70°C bajo cero. La inyección es bilateral en los músculos maseteros, empleando una jeringa de 1 c.c. y una aguja de una pulgada, calibre 20 (0,90 × 25 mm) (véase la fig. 1). Cuando los animales mueren con síntomas de rabia, o cuando se sacrifican en estado agónico, se toman las glándulas submaxilares, seccionándose un pedacito con una tijera y el resto se congela en una caja de Petri grande, conservándose en la congeladora entre 50 y 70°C bajo cero. La porción seleccionada se tritura en un mortero con suficiente suero de conejo normal, al 10%, en solución salina fisiológica, para hacer una suspensión al 10% por peso. La suspensión se centrifuga en un centrifugador angular durante un minuto, a 1.000 revoluciones por minuto, y se separa el líquido sobrenadante. Se hacen diluciones decimales del líquido sobrenadante en suero de conejo normal al 10% y solución salina fisiológica, y se inyectan 0,03 c.c. por vía intracerebral en ratones albinos suizos de 28 a

* Colaboración de Hilary Koprowski, Subdirector, División de Investigaciones de Virus y Rickettsias de los Laboratorios Lederle, American Cyanamid Company, Pearl River, Nueva York, E.U.A.

35 días de edad. Los ratones se observan durante 21 días y se anota diariamente el número de ratones muertos. Después del período de observación, se calcula el título DL_{50} de cada dilución (para el método de cálculo, véase la sección 13, página 127).

FIG. 1. INOCULACION EN EL MUSCULO MASETERO DEL PERRO



Por cortesía del Dr. F. Pérez-Gallardo, Madrid

Para preparar un fondo común de virus sólo deben emplearse las glándulas cuyo título sea mayor de $10^{-4,5} DL_{50}$.

Preparación del fondo común

Las glándulas se sacan del congelador, se deshuelan, se cortan con tijeras en pequeños trozos y se ponen en una licuadora de Waring con suficiente suero estéril de conejo normal al 10%, en solución salina fisiológica, para hacer una suspensión al 30% por peso. La licuadora se acciona sólo dos o

tres minutos para evitar que el material se caliente. Luego se enfría el recipiente y se vuelve a triturar en agua helada por dos o tres minutos. Se repite este proceso cuatro o cinco veces y el producto final se filtra por una capa de gasa.

El material, ya filtrado, se distribuye en ampollitas de vidrio Pyrex en cantidades de 1 c.c. Se cierran las ampollitas y se congela el contenido en un baño de alcohol y CO₂. Las ampollitas se conservan a una temperatura de entre 50 y 70°C bajo cero.

Método de confrontación

Veintiún días después de la vacunación, 10 de los animales vacunados y 5 testigos no vacunados, mantenidos en las mismas condiciones que aquéllos, se inyectan intramuscularmente (pata izquierda) con 0,1 c.c. de una dilución de glándula salival de perro infectado con virus de la calle, que, como es sabido, puede matar por lo menos el 80 % de los cobayos normales.

Se observan diariamente los animales inoculados, anotándose el número de cobayos enfermos y el de los muertos. Los animales que mueren antes del sexto día después de la inoculación con virus de la calle no se consideran muertos de rabia.

La prueba se da por terminada 21 días después de la inoculación con virus de la calle.

Otro método de inmunización y confrontación

Se incuba una muestra de vacuna a 37°C durante 48 horas, por lo menos. La vacuna incubada se inyecta por vía intramuscular a un grupo de cobayos que pesen por lo menos 400 gramos. La dosis ha de ser equivalente a 0,5 c.c. de suspensión de tejido de embrión de pollo, al 2,5 % ó al 0,25 c.c. de suspensión, al 5 %. Después de tres semanas, se inyectan por lo menos 10 cobayos inmunizados y cinco testigos por el método antes descrito. Todos los cobayos se mantienen en observación durante 21 días y por lo menos el 50 % de los cobayos inoculados deben sobrevivir sin manifestar síntomas de rabia.

Examen de los resultados

En el cuadro I aparece una muestra de los resultados obtenidos con vacunas que han pasado la prueba de potencia. Como puede verse, la vacuna ha demostrado tener valor antigénico para perros confrontados en este laboratorio con virus de la calle. También puede observarse que en la mayoría de los casos los perros fueron protegidos contra el virus de calle por una vacuna que inmunizaba cobayos en una suspensión de tejido de em-

CUADRO I. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE POTENCIA DE VACUNA DE EMBRION DE POLLO

Lote de vacuna	Título DL ₅₀ en ratones	Resultados de la confrontación por vía intramuscular con virus de la calle													
		Cobayos					Perros								
		Coeficiente de mortalidad de los animales en prueba													
		Dilución de la vacuna con que fueron inmunizados					Testigos no vacunados								
A*	10 ^{-2.75}	1:5	1:20	1:80	1:320	1:1,280	1:5,120	0/8	0/6	0/10	0/8	—	10/10	0/5	3/8
B	10 ^{-2.65}	0/9	0/10	5/10	5/10	9/10	—	0/9	9/10	5/10	—	—	10/10	0/6	3/5
C	10 ^{-2.95}	0/8	0/8	2/7	6/8	—	—	0/8	—	6/8	—	—	10/10	0/9	8/9
D*	10 ^{-3.00}	0/8	0/8	1/10	4/5	0/9	—	0/8	0/6	4/5	0/9	—	8/8	0/10	6/10
E	10 ^{-3.90}	—	—	1/4	1/6	4/5	0/4	—	1/4	1/6	4/5	0/4	8/9	0/6	18/25
F	10 ^{-6.00}	—	—	0/5	0/3	1/4	1/5	—	0/5	0/3	1/4	1/5	8/9	0/8	18/25
G	10 ^{-3.90}	—	3/15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13/16	0/7	3/5

* Se inyectó cada cobayo con 1 c.c. de vacuna, que contenía una suspensión de tejido al 5%; en todos los casos restantes se emplearon 0,5 c.c. (Nota: En la actualidad, se emplean 0,25 c.c. de suspensión de tejido al 5% en las pruebas ordinarias.)

** Se emplearon en la vacunación 5 c.c. de suspensión de tejido al 20%.

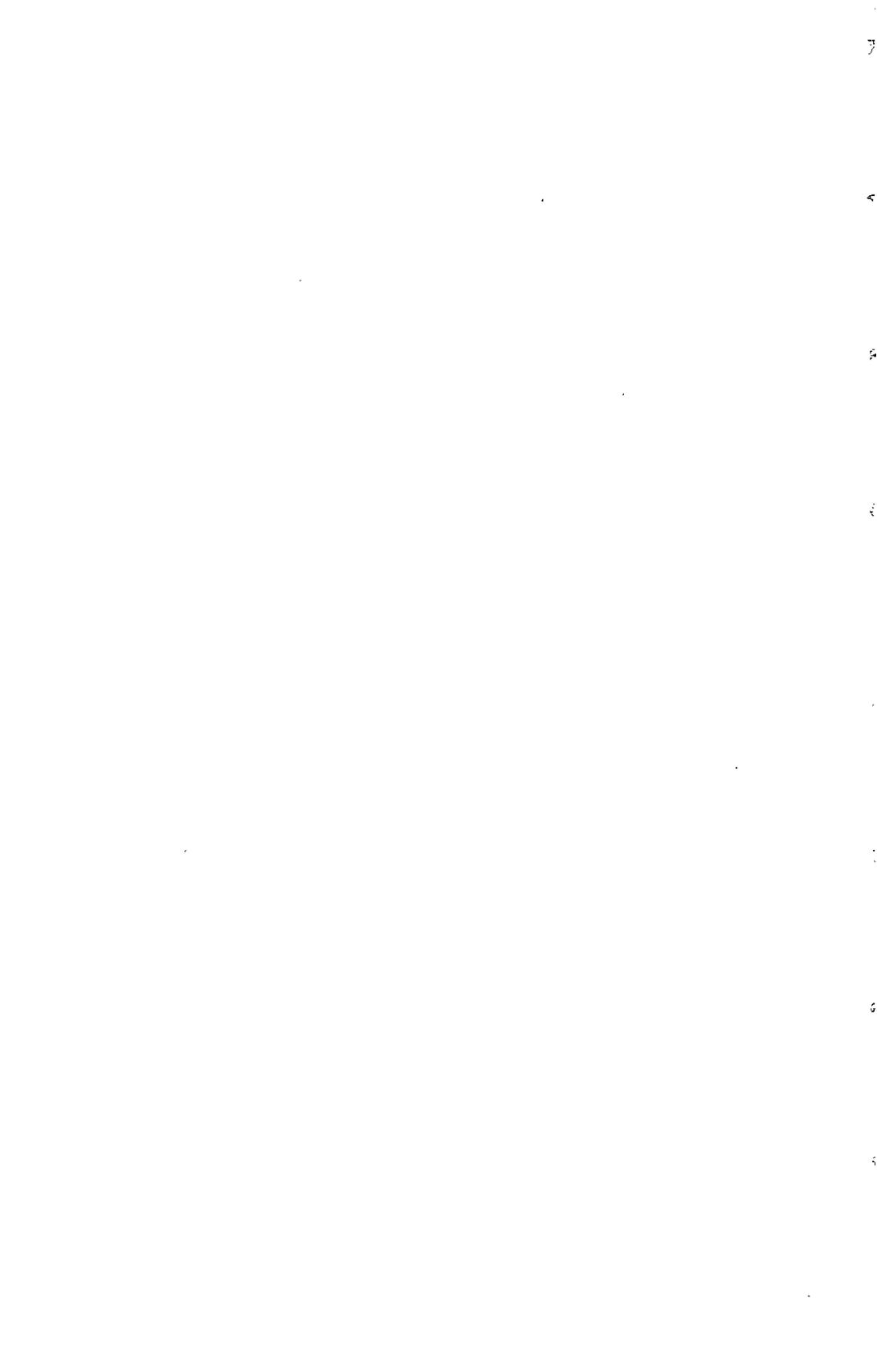
brión de pollo al 5%. Como ya se dijo, el virus de confrontación debe tener suficiente potencia para producir la muerte de la mayor parte, si no de todos los testigos. De acuerdo con anteriores observaciones, un virus de esa potencia debe tener un título de $10^{-6.50}$, ó un DI_{50} mayor, en ratones para tener una invasividad capaz de causar la muerte de la mayoría de los animales testigos. Hasta ahora, sólo se han empleado dos "fondos" de virus de la calle para pruebas de confrontación en este laboratorio, y se ha observado que 0,1 c.c. de una dilución al 1:40, ó 0,2 c.c. de dilución al 1:80 de tejido de glándula salival canina, infectada con la cepa de la ciudad de Nueva York, preparada en la forma descrita en la pág. 133, constituyen un inóculo excelente.

En la prueba el 80% de los animales testigos deben morir de rabia, y el 70% de los cobayos vacunados deben sobrevivir la inoculación, sin mostrar síntomas de rabia. Esta prueba reproduce con bastante fidelidad las condiciones de la infección natural, y puede llevarse a cabo con bastante facilidad. Sólo se requiere una inoculación con la vacuna y una inoculación de confrontación. Se puede emplear para esta última una cepa de virus de calle aislada en la misma localidad del laboratorio, a fin de determinar la potencia de vacunas de embrión de pollo en diferentes partes del mundo y contra distintas cepas de rabia. Esta prueba tiene la desventaja de requerir el empleo de perros para preparar el virus de confrontación. Sin embargo, si se emplea una preparación potente de tejido de glándula salival, basta un número relativamente pequeño de perros para obtener el material necesario para las pruebas de control por un tiempo considerable.



Parte IV

PRODUCCION DE SUERO HIPERINMUNE



METODO EMPLEADO EN EL INSTITUTO PASTEUR DE PARIS

El suero antirrábico del Instituto Pasteur se prepara en caballos hiperinmunizados con virus fijo. Este suero se puede producir en estado crudo o purificado y concentrado.

Cepa de rabia

La cepa de rabia empleada es la de virus fijo usada siempre por el Instituto Pasteur para la inmunización contra la rabia. Las propiedades de la cepa y el método de mantenerla en el conejo se describen en la sección 6 (A), página 79.

Método de inmunización

Los caballos se inmunizan por inoculación subcutánea. Primero se les da una serie inicial de inyecciones de virus rábico fenolizado, es decir, vacuna antirrábica preparada en la misma manera que para uso humano, tal como se describe en la sección 6 (A), página 83, pero empleando cerebro de conejo en vez de cerebro de carnero. La vacuna se emplea para las primeras inyecciones después de ser incubada por ocho días a + 4°C. Luego se emplean vacunas de más reciente preparación.

Después de esta inmunización inicial con vacuna fenolada, los caballos reciben el virus fijo sin atenuar. Finalmente, según el título alcanzado durante la inmunización, se continúan las inyecciones con la adición alterna de coadyudantes.

Una vez alcanzado un título adecuado, se reinoculan y sangran los caballos todos los meses.

Plan de inmunizaciones y dosis

Se emplean caballos jóvenes sanos, que se inmunizan de acuerdo con el siguiente plan:

Primera serie: virus fijo fenolado

Primera inyección:	40 c.c.	} 5% de cerebro de conejo fenolado
Una semana después:	80 c.c.	
Dos semanas después:	120 c.c.	

* Colaboración de Pierre Lépine, Jefe de la Sección de Virus, y P. Atanasiu, Instituto Pasteur, Paris, Francia.

Para esta serie, como para las siguientes, se administran las inyecciones en varios puntos, con el objeto de distribuir la masa de la inyección y asegurar su absorción rápida. Se observa muy poca o ninguna reacción en el punto en que se aplican las inyecciones.

Segunda serie: virus fijo fresco

La segunda serie comienza tras un intervalo de una semana.

Primera inyección: medio cerebro de conejo (virus fijo fresco) suspendido en 50 c.c. de agua destilada.

Segunda inyección: un cerebro de conejo en 100 c.c. de agua destilada.

Tercera inyección: dos cerebros de conejo en 150 c.c. de agua destilada.

Después de la tercera inyección de la segunda serie se hace una sangría de control. De acuerdo con los resultados y el título que se obtengan, se suspende la inmunización o se repite la segunda serie, agregando antígeno suplementario que se inyecta por vía intramuscular con coadyudantes. Pueden emplearse varios coadyudantes, pero el que da los mejores resultados es el alumbre sódico a la concentración de 4:1.000 de la suspensión inyectada. También se pueden usar derivados de aceite mineral con un emulsionante en cantidades que no pasen de la tercera parte del material inyectado, pero éstos son menos recomendables que el alumbre sódico. Normalmente, se alcanza la titulación definitiva del suero antirrábico al segundo o tercer mes (para la prueba de potencia véase la sección 18, página 145).

Conservación de la inmunización

A esta altura, se sangran los caballos y se dejan descansar durante un mes. Posteriormente, los caballos inmunizados reciben cada mes dos cerebros de conejo (virus rábico fijo, fresco), inyectados como en la tercera inyección de la segunda serie. A la semana de esta inyección de refuerzo se sangran los caballos. Se les deja en completo descanso durante un mes cada año.

METODO EMPLEADO EN EL INSTITUTO TOSCANO DE SUEROS Y VACUNAS, SIENA

Entre las distintas especies animales, ya sean grandes o pequeñas, los equinos, y en especial el caballo, se deben considerar como el animal preferible para la preparación de suero antirrábico.

La producción de suero hiperinmune en el caballo, iniciada por Fermi en 1909, está relacionada con la calidad del antígeno empleado, las dosis inyectadas y el ritmo de las inyecciones. El antígeno empleado por los autores de este trabajo consiste en vacuna antirrábica fenolada de Fermi (virus de "Sassari"), recién preparada e inyectada diariamente por vía subcutánea en dosis de 10-20 c.c. durante un mes.

La sangría hecha 7 u 8 días después de la última inyección de la primera serie demuestra, sin embargo, que a esta altura la presencia de anticuerpos virulicidas en el suero de los animales no es todavía muy elevada, aunque se encuentran en todos los animales tratados. Dando a los animales un período de descanso de un mes y una segunda serie de inyecciones, es posible obtener un suero cuyo valor virulicida sea por lo menos dos o tres veces mayor. Después de otro período de descanso de dos a tres meses, seguido de otra serie de inyecciones de vacuna, se puede obtener un suero muy potente, del que una dosis de 1 c.c. es capaz de neutralizar hasta un millón o más de dosis mortales para el cobayo.

La producción de un buen suero antirrábico en un caballo no utilizado previamente parece ser, sin embargo, un proceso muy lento que exige varios períodos de descanso alternados con series de inmunización. Por el contrario, los anticuerpos se producen en forma rápida e intensa en los caballos que han sido previamente inmunizados. La inyección de altas dosis de virus vivo y virulento no produce tampoco adversos efectos en los animales que han recibido una inmunización básica de vacuna fenolada, lo que permite lograr la inmunización más rápidamente. Como en la producción de suero antitético (difteria y tétanos), se encuentran animales que son buenos productores de suero junto con otros mediocres o aún refractarios. Aunque en menor escala, el proceso de la producción de suero antirrábico es muy parecido al de suero antitetánico; la rapidez y la intensidad de la producción de éste son bien conocidas en el caso de caballos que han sido sometidos a repetidos

* Colaboración de D. d'Antona y E. Falchetti, Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno Toscano, Siena, Italia

ciclos de inmunización, o a vacunación previa. Así es como se puede preparar un suero mixto potente, que sea al mismo tiempo antitetánico y antirrábico, por la inoculación simultánea del animal con los antígenos correspondientes (toxoides o toxina tetánica y vacuna antirrábica). Como sucede con la antitoxina tetánica, los anticuerpos virulicidas parece que están distribuidos en las fracciones de pseudoglobulina del suero y, en menor grado, en la euglobulina. El suero antirrábico se puede concentrar y purificar, sin embargo, por los mismos procedimientos que se utilizan con los sueros antitóxicos, incluyendo la digestión péptica.

El suero antirrábico es extraordinariamente estable: conserva sus propiedades en una refrigeradora durante varios años y resiste aun la exposición prolongada a temperaturas de 58 a 60°C.

Los autores efectúan la titulación de los anticuerpos virulicidas empleando mezclas *in vitro* de diferentes diluciones del suero y una suspensión de virus (cerebro) de virulencia conocida. Después de dejar las mezclas durante una hora a 37°C, se inyectan las mismas por vía intracerebral en cobayos, empleando una dosis de 0,2 c.c., y el título se calcula a base de las diluciones capaces de proteger al 80 % de los animales.

PRUEBA DE LA POTENCIA DEL SUERO ANTIRRABICO

Prueba de potencia

Esta prueba es esencialmente la misma que la prueba de neutralización suero-virus en ratones descrita en la sección 5, página 66. La prueba debe efectuarse con el suero antes de agregar cualquier preservativo químico.

Animales de experimentación: Se emplean ratones sanos, de cualquier sexo, que pesen entre 10 y 14 g. En cualquier prueba se deben utilizar solamente ratones de un mismo sexo.

Virus de prueba: Puede emplearse cualquier cepa de virus rábico de potencia conocida.

Suero antirrábico patrón: La OMS proporciona un suero patrón que puede emplearse, como medio de comparación, en las pruebas de potencia, para la estandarización de cualquier suero antirrábico. Este suero se facilita desecado, con instrucciones para su rehidratación. Su potencia está ajustada de tal manera que, cuando se mezele en concentración final con no menos de 31,6 DL_{50} ni más de 316 DL_{50} de una parte de la suspensión de virus, el título mínimo de protección (límite del 50 %) no será inferior a una dilución al 1:300.

Método: Prepárese una serie de diluciones dobles, tanto del suero en prueba como del suero patrón, con suero normal al 2%, en agua destilada o solución salina fisiológica. Para el suero patrón son generalmente suficientes seis series de diluciones dobles, de 1:50 a 1:1.600; para el suero en prueba la progresión es de 1:125 a 1:4.000. Estas diluciones revelan un factor de potencia de 2,5, que es lo que se requiere del suero en prueba. Se agregan partes iguales de una suspensión de virus a las diluciones de los sueros. Las mezclas se incuban en un baño de agua a 37°C, durante una hora, y se inyectan 0,03 c.c. a los ratones por vía intracerebral. Hay que inyectar por lo menos 10 ratones con cada mezcla. La cantidad de virus empleada es tal que cada ratón recibe no menos de 31,6 DL_{50} y no más de 316 DL_{50} . Los ratones se observan durante dos semanas. Para un suero en prueba la potencia mínima aceptable debe ser 2,5 veces la del suero patrón.

*Colaboración de Hilary Koprowski, Director de la División de Investigaciones de Virus y Rickettsias de los Laboratorios Lederle, American Cyanamid Company, Pearl River, Nueva York, E.U.A.

Prueba de esterilidad

El contenido del envase final debe ser estéril, comprobándose mediante el cultivo de una dosis completa; pero es necesario que la cantidad cultivada no exceda de 5,0 c.c. El cultivo se debe hacer en uno o más tubos, con medio de tioglicolato líquido o en otro medio de cultivo estándar, en una dilución suficiente para que el preservativo no ejerza ninguna acción bacterios-tática. La incubación se hace a 32°C y se observa, por lo menos, durante 7 días.

Parte V

ANIMALES DE LABORATORIO



CRÍA Y CUIDADO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

La colonia de cría

Este es quizás el aspecto más importante en el establecimiento de una colonia de ratones u otros animales de laboratorio. Cada variedad animal tiene ciertas enfermedades naturales, muchas de las cuales se pueden eliminar por la segregación apropiada de los animales adultos y los reconocimientos de las familias aisladas para descubrir rápidamente la presencia de cualquier enfermedad.

El ratón blanco, reproducido por cruzamiento consanguíneo, es el animal de experimentación más frecuentemente usado en los laboratorios de virus. Se ha observado que ciertas líneas genéticas de ratón blanco son muy susceptibles a una gran variedad de enfermedades causadas por virus. De otras estirpes genéticas o variedades de ratones blancos se sabe que son resistentes a ciertas enfermedades causadas por virus; por ejemplo, una variedad es resistente al virus 17 D de la vacuna contra la fiebre amarilla y cuando los ratones se inoculan por vía intracerebral con este virus no enferman ni mueren, mientras que otros tipos genéticos mueren siempre de esta infección.

Los ratones de cría se pueden obtener de colonias que se encuentren libres de paratifoidea y de salmonelosis intestinales, de bartonellosis, toxoplasmosis y los virus más comunes, como la encéfalomiелitis de los ratones, coriomeningitis linfocítica y ectromelia.

Es posible que el virus vacunal empleado para la inmunización del hombre pueda producir en una colonia de ratones una enfermedad semejante y antigénicamente idéntica a la ectromelia. Hay una infección de los ratones salvajes producida por *Rickettsia akari* y transmitida por ácaros que puede penetrar en las colonias de ratones de cría. Las heces de ratones salvajes pueden introducir la encéfalomiелitis de los ratones en las jaulas de cría y así infectar una colonia que anteriormente estuviera libre de esa enfermedad.

Todas las estirpes del ratón blanco parecen ser igualmente susceptibles al virus rábico de calle inyectado por vía intracerebral.

* Colaboración de Harald N. Johnson, del Centro de Investigación de Virus, Poona, India

Local

La colonia de ratones normales se debe tener en un cuarto separado y no se debe permitir la presencia de ratones inoculados en la misma unidad. Es preferible que la colonia de cría esté en otro piso o en un edificio separado del cuarto de los animales infectados.

Las ventanas del cuarto de cría se deben proteger con tela metálica para impedir que entren moscas y mosquitos, pues estos insectos pueden introducir infecciones causadas por virus, bacterianas o parasitarias. La entrada del cuarto de cría debe tener un vestíbulo separado por una puerta con tela metálica. El piso debe ser lavable y de un material que impida la entrada de ratones salvajes u otros roedores. El techo se debe construir o acondicionar en forma que no permita la entrada de roedores ni de pájaros.

Los ratones no resisten altas temperaturas y la del cuarto de cría no debe llegar a 37,8°C.

Cuidadores de los animales

No se debe permitir que las personas que trabajan en los cuartos con ratones infectados entren en los cuartos de cría para ratones normales. Los cuidadores deben lavarse las manos con un cepillo, agua y jabón y limpiarse las uñas con un palillo antes de empezar su trabajo y siempre que exista el peligro de contaminación. Si los cuidadores manipulasen la comida o los frascos de agua con las manos contaminadas, podrían servir de vehículo a infecciones intestinales de los ratones, tales como la fiebre paratifoidea y la salmonelosis.

Jaulas y camas

Las jaulas para ratones se construyen, generalmente, de hierro galvanizado y con tapa de tela metálica para la ventilación. En las jaulas de reproducción se necesitan botellas de agua y éstas se deben hervir si existe cualquier duda en cuanto a su pureza. Para limpiar las jaulas, basta con lavarlas escrupulosamente con agua y jabón. Se puede emplear como cama la viruta de madera, papel, bagazo de caña de azúcar picado en pedazos menudos o cáscaras de maní.

Alimento

Todo el alimento debe protegerse contra los roedores y los insectos en recipientes de metal con tapas adecuadas. Cualquier cereal sin moler, como el trigo, es un alimento completo para el ratón. Para los ratones de cría conviene agregar a la dieta leche en polvo. Un método excelente para alimentar ratones consiste en preparar una mezcla de trigo entero, leche en

polvo reconstituida y sal, dejando que adquiriera consistencia para cortarla en pedazos. De este modo se facilita a los ratones alimento y agua.

Método de comenzar la colonia de cría

Para la reproducción rápida, lo mejor es tener juntos constantemente dos hembras y un macho, mientras sirvan como reproductores. Esto asegura una nueva cría cada tres semanas y simplifica el manejo de los animales. Para ciertos fines, puede ser preferible poner cinco hembras y un macho en una caja de cría y sacar a las hembras cuando claramente se note que estén preñadas; éstas se ponen solas, cada una en una jaula, y se devuelven a la misma caja de cría después del destete. Tal método permite llevar un registro del número de ratones por parto y de la edad exacta de los mismos, pero no se emplea en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico porque retrasa demasiado la reproducción de cada ratón. Las hembras de cría que no estén preñadas al cabo de tres semanas deben eliminarse de la colonia y emplearse para otros fines.

Investigación de la presencia de enfermedades en la colonia de cría

Se puede investigar si existe virus de encefalomiелitis de los ratones analizando una muestra de las heces de una jaula de 50 ratones en edad de destete. Este material se tritura en un mortero, con solución salina, para hacer una suspensión aproximadamente al 10 % y se centrifuga a alta velocidad en una centrifugadora corriente horizontal o angular durante una hora, para sedimentar lo mejor posible el contenido bacteriano. Se separa el líquido sobrenadante, y se agrega penicilina, a una concentración de 500 unidades por c.c., y estreptomycin, hasta una concentración de 1 mg por c.c., el material se prueba inoculando 10 ratones, por vía intracerebral, con 0,03 c.c. Para esta prueba se han de emplear ratones de seis semanas. Si de 4 a 30 días después de la inoculación se desarrolla una parálisis entre los inoculados, se deben hacer impresiones del cerebro e investigar la presencia de bacterias mediante un cultivo o examen microscópico; si no se encuentran bacterias en las preparaciones hay que hacer nuevos pases en ratón y, si los ratones se infectan con cierta regularidad, se debe investigar la especificidad del virus mediante una prueba de suero neutralizado. Si en la colonia hay virus encefálico no habrá ninguna dificultad en descubrirlo por el método descrito. Los ratones blancos de la mayoría de las colonias de los laboratorios albergan tal virus en el intestino, pero rara vez se manifiesta la parálisis. El virus se puede aislar por subpases mediante la selección al azar de un ratón que presente una infección sistemática con virus natural. Hay casos en que el subpase en ratones de un virus neurotrópico, como el virus fijo de la rabia, puede dar como resultado la pérdida del virus fijo y el

mantenimiento de una cepa fija de virus de encéfalomiелitis con un período de incubación como el del virus rábico fijo. El subpase del virus a través del conejo eliminará la infección con virus de encéfalomiелitis de los ratones. Los *hamsters* son susceptibles a la infección por virus de encéfalomiелitis del ratón cuando se inyecta por vía intracerebral.

Para determinar la presencia del virus de la coriomeningitis linfocítica, y de otras infecciones crónicas del ratón, se deben tomar muestras de bazo provenientes por lo menos de 10 ratones de dos a tres semanas de edad, escogidos al azar en la colonia. Se preparan suspensiones de tejido esplénico, triturándolo en un mortero con suficiente cantidad de solución salina para formar una suspensión al 10%. La suspensión se centrifuga a poca velocidad, durante 10 minutos, o se deja en reposo en la refrigeradora durante 30 minutos; luego, se separa el líquido sobrenadante y se inyectan intracerebralmente 0,03 c.c. en 10 ratones. También se puede descubrir por este método la presencia de toxoplasma, aunque, si se sospecha que existe, conviene analizar toda la suspensión sin centrifugarla. La presencia de toxoplasma en las impresiones de cerebro se puede demostrar, fijándolas con alcohol metílico y tiñéndolas con Giemsa. El curso de la enfermedad y el período de incubación de la toxoplasmosis y de la infección a virus rábico fijo es igual en los ratones infectados por vía intracerebral. En el manual de Worden, mencionado en las notas bibliográficas, pág. 153, se puede encontrar información sobre otras enfermedades.

Ectoparásitos de los ratones

Conviene examinar los ratones para ver si tienen ectoparásitos, tales como los acáridos de la sarna. Si existe tal infestación, se puede combatir bañando los ratones o tratándolos con un insecticida. Las infecciones originadas por parásitos se pueden evitar impidiendo el acceso de ratones salvajes a los cuartos de cría.

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

En inglés

- American Public Health Association, *Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases*, Nueva York, 1948
- Banks, H. S., ed. *Modern practice in infectious fevers*, Londres, 1951
- Beveridge, W. I. B. y Burnet, F. M. *The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo*, Londres, 1946 (*Med. res. Coun. Spec. Rep. Ser. No. 256*)
- Bozeman, V., Trippe, J. T. y Berry, B. (1950) A modified Habel-Sockrider ultraviolet irradiation apparatus for use in serum and vaccine production, *J. Immunol.* **64**, 65
- Conn, H. J. *Biological stains*, 5a. ed., Geneva, N. Y., 1946
- Cunningham, C. H. *A laboratory guide in virology*, Minneapolis, 1948
- Farris, E. J., ed., *The care and breeding of laboratory animals*, Nueva York, Londres, 1950
- Habel, K. (1947) Ultraviolet irradiation in the production of potent antirabies vaccines, *Publ. Hlth. Rep. (Wash.)* **62**, 791
- Habel, K. y Sockrider, B. T. (1947) A continuous flow method of exposing antigens to ultraviolet radiation, *J. Immunol.* **56**, 273.
- Horsfall, F. L., Jr., ed. *Diagnosis of viral and rickettsial infections. Symposium held at the New York Academy of Medicine, January 29 and 30, 1948*, Nueva York, 1949
- Hyde, R. R. y Gardner, R. E. *Laboratory outline in filterable viruses*, Nueva York, 1937
- Kolmer, J. O., Spaulding, E. H. y Robinson, H. W. *Approved laboratory technic*, 5a. ed., Nueva York, 1951.
- Levinson, S. A., Milzer, A., Shaughnessy, H. J., Neal, J. L. y Oppenheimer, F. (1945) A new method for the production of potent inactivated vaccines with ultraviolet irradiation. II. Sterilization of bacteria and immunization with rabies and St. Louis encephalitis vaccines, *J. Immunol.* **50**, 317.
- Poindexter, H. A. (1949) Experimental animal colony in tropical West Africa, *Publ. Hlth. Rep. (Wash.)* **64**, 57
- Rivers, T. M. ed. *Viral and rickettsial infections of man*, 2a. ed. Filadelfia, Londres Montreal, 1952
- Rooyen, C. E. van y Rhodes, A. J. *Virus diseases of man*, 2a. ed., Nueva York, 1948
- Simmons, J. S. y Gentszkow, C. J. *Laboratory methods of the United States Army*, 6a. ed., Filadelfia, 1946
- Snell, G. D., ed. (1941) *Biology of the laboratory mouse*, Filadelfia
- Tierkel, E. S. (1948) A modified Habel-Sockrider ultraviolet irradiation apparatus for use in serum and vaccine production, *J. Amer. vet. med. Ass.* **112**, 18.
- Webster, L. T. *Rabies*, Nueva York, 1942.
- Worden, A. N., ed. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*, Londres, 1949

En francés

- Babès V. *Traité de la rage*, París, 1912
- Dumas, J., Bordet, P., Laporte, R., Lépine, P., Pochon, J. y Prévot, A. R. *Bactériologie médicale*, París, 1951
- Lépine, P. y Sohier, R. *Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus*, París, 1954
- Levaditi, C. y Lépine, P. *Les ultravirus des maladies humaines*, 2a. ed., París, 1948
- Levaditi, C., Sanchis-Bayarri, V. y Schoen, R. (1928) Neuro-infections auto-stérilisables (encéphalite, herpès, rage) *C. R. Soc. Biol. (París)*, **98**, 911
- Marie, A. *L'étude expérimentale de la rage* (Collection de l'Encyclopédie scientifique), París, 1909.
- Remlinger, O. y Bailly, J. *Etudes sur la rage*, París, 1938
- Remlinger, P. y Bailly, J. *La rage*, París, 1947

En alemán

- Doerr, R. y Hallauer, C., comp., *Handbuch der Virusforschung*, Viena, 1944
- Kolle, W. y Wassermann, A., comp., *handbuch der pathogenen Micro-Organismen*, Jena, 1930
- Kraus, R., Gerlach, F. y Schweinburg, F. *Lyssa bei Mensch und Tier*, Berlín y Viena, 1926
- Lubinski, H. y Prausnitz, C. (1926) Lyssa, *Ergebn, Hyg. Bakt.* **8**, 1

En italiano

- Fermi, C. *La rabbia*, Siena, 1950

OFICINA SANITARIA PANAMERICANA

SERIE DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- No. 1 Comité de Expertos en Higiene Mental. Informe de la primera reunión del Subcomité de Alcoholismo. (Serie de informes técnicos de la OMS No. 42) 1953. 23 páginas. Precio: \$0.50
- No. 2 Reglamento Sanitario Internacional, Reglamento No. 2 de la Organización Mundial de la Salud. (Serie de informes técnicos de la OMS No. 41) 1954. 103 páginas. Precio: \$1.50
- No. 3 Certificación Médica de Causa de Defunción, Instrucciones para los médicos sobre el empleo del Modelo Internacional del Certificado Médico de Causa de Defunción. (Suplemento 3, Boletín de la Organización Mundial de la Salud) 1954. 21 páginas. Precio: \$0.25
- No. 4 Comité de Expertos en Higiene Mental. Informe de la primera reunión (Serie de informes técnicos de la OMS No. 9) 1953. 42 páginas. Precio: \$0.50
- No. 5 Comité de Expertos en Estadísticas Sanitarias. Tercer informe, inclusive el segundo informe del Subcomité de Registro y Presentación Estadística de Casos de Cáncer. (Serie de informes técnicos de la OMS No. 53) 1953. 54 páginas. Precio: \$0.40
- No. 6 Comité de Expertos en Administración Sanitaria. Informe de la primera reunión. (Serie de informes técnicos de la OMS No. 55) 1953. 46 páginas. Precio: \$0.60
- No. 7 Comité de Expertos en Higiene Mental, Subcomité de Alcoholismo. Segundo informe. (Serie de informes técnicos de la OMS No. 48) 1948. 38 páginas. Precio: \$0.60
- No. 8 Procedimientos Básicos para la Notificación de las Enfermedades Transmisibles. (Elaborados y recomendados por el Seminario sobre Notificación de las Enfermedades Transmisibles.) 1954. 32 páginas. Precio: \$0.25
- No. 9 Basic Procedures for the Reporting of Communicable Diseases. (Developed and recommended by the Seminar on Reporting of Communicable Diseases.) 1954. 31 páginas. Precio: \$0.25
- No. 10 Comité de Expertos en Educación Profesional y Técnica del Personal Médico y Auxiliar. Segundo informe. (Serie de informes técnicos de la OMS No. 69) 1954. 25 páginas. Precio: \$0.30
- No. 11 Principios de Administración Sanitaria, John J. Hanlon. 1954. 590 páginas ilus. Precio: \$5.00
- No. 12 Informe de la Tercera Conferencia sobre los Problemas de Nutrición en la América Latina, patrocinada conjuntamente por la FAO y la OMS, (Caracas, Venezuela, octubre de 1953.) 1954. 54 páginas.
- No. 13 Aspectos Psiquiátricos de la Delincuencia Juvenil. L. Bovet (Serie de Monografías de la OMS No. 1) 1954. 107 páginas. Precio: \$1.00
- No. 14 Los Cuidados Maternos y la Salud Mental. J. Bowlby. (Serie de Monografías de la OMS No. 2) 1954. 231 páginas. Precio: \$3.00

- No. 15 Comité de Expertos en Enfermería. Tercer informe. (Serie de informes técnicos de la OMS No. 91) 1954. 31 páginas. Precio: \$0.50
- No. 16 Lo que Cuesta la Enfermedad y lo que Vale la Salud. C.-E. A. Winslow. (Serie de Monografías de la OMS No. 7) 1955. 126 páginas. Precio: \$1.50
- No. 17 Síndrome Policarenal Infantil (Kwashiorkor) y su prevención en la América Central. Marcel Autret y Moise Behar. 1955. 83 páginas. Precio: \$1.00
- No. 18 Comité de Expertos en Educación Higiénica del Público. Primer informe, 1953. (Serie de informes técnicos de la OMS No. 89) 1955. 31 páginas. Precio: \$0.25
- No. 19 Yellow Fever Conference, *Washington, D. C., December, 1954.* 1955. 92 páginas.
- No. 20 Conferencia de Fiebre Amarilla, *Washington, D. C., diciembre, 1954.* 1955. 82 páginas.
- No. 21 El Control de las Enfermedades Transmisibles en el Hombre. Octava edición. 1955. 243 p. Precio \$0.70
- No. 22 Profilaxia das Doenças Transmissíveis. Oitava edição. 1955. (*En prensa*)