

El Método de la Precipitación en Gelosa y el Diagnóstico de la Rabia

VLADIMIR KUBES¹

Se da cuenta de los estudios de más de 300 cerebros, la mayoría de ellos rábicos, hechos por el método de la precipitación en gelosa en láminas portaobjetos y valiéndose de anti-sueros de elevada hiperinmunidad, sobre todo, de ratón y de equinos.

La precipitación producida por la unión antígeno-anticuerpo, difundidos a través de una sustancia semisólida, fue descubierta por Bechhold (1) en 1905. No obstante, para ser incorporada a las reacciones serológicas usuales, fue necesario su redescubrimiento por Oudin (2), en 1946, quien por primera vez interpretó correctamente este fenómeno. Finalmente, contribuyeron a su aplicación ciertos cambios de la técnica—sustitución de difusión simple por la de difusión doble—, hechos independientemente por Ouchterlony (3) y Elek (4) en 1948.

Aparte de numerosos estudios de índole bacteriológica, la precipitación en gelosa así obtenida estimuló también la investigación relativa al antígeno-anticuerpo en las virosis. Así, en 1953 Jensen y Francis (5) notificaron reacción específica obtenida con el virus de influenza; en 1954, Molnar (6), con el de peste porcina; en 1955, Bodon (7), con el de fiebre aftosa; en 1955, Gispén (8), con el de viruela de aves y de conejos; en 1957, Brown y Crick (9), con el de fiebre aftosa y de estomatitis vesicular; en 1957, Mansi (10), con el de mixoma y fibroma de conejo, de moquillo y hepatitis del perro y de peste porcina; en 1958, White (11), con el de peste bovina oriental; en 1960, Schoop y

Wachendörfer (12), con el de la enfermedad de Newcastle, etc., etc.

En relación con la infección rábica, el primer intento de usar la precipitación de Ouchterlony con fines de diagnóstico, es de 1958, y parece corresponder a Fras y Grmovsek (13), quienes obtuvieron resultados prometedores utilizando suero antirrábico hiperinmune de caballo y la sustancia cerebral de conejos muertos por infección de virus rábico fijo y de virus de calle. Asimismo reaccionaron positivamente varios cerebros de ratones muertos por efecto de virus de calle, tres cerebros caninos y uno porcino.

El mismo año, Villemot y Provost (14), en una comunicación preliminar, describen una reacción precipitante positiva entre el suero antirrábico hiperinmune y 12 cerebros rábicos caninos. Su segunda comunicación (15) amplió la anterior con los resultados del experimento con 64 cerebros, 25 de ellos comprobados rábicos, según las pruebas de inoculación; utilizaron en él 4 sueros hiperinmunes, 3 de equinos y 1 de asno. De nuevo la reacción precipitante en gelosa fue altamente específica para la infección, y resultó positiva con los 25 cerebros rábicos y negativa con los restantes no rábicos.

En 1959 Sharma (16) describe reacciones precipitantes positivas con líquido sobrenadante de la suspensión al 10 ó 20 % en NaCl de 0,85 % de los cerebros rábicos tratados

¹ Del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guatemala.

previamente con éter para extraer los lípidos. En total usó 13 cerebros, la mayoría caninos, 9 de ellos comprobados rábicos y 4 negativos. La reacción precipitante positiva coincidió plenamente con los resultados de la inoculación.

En 1961 Grasset y Atanasiu (17) obtienen precipitación en gelosa tamponada con veronal, utilizando como antígeno virus rábico fijo, reproducido en histocultivos y concentrado; como anticuerpo, se valieron del suero equino hiperinmune.

Mead (18, 19) en dos amplios trabajos de 1962, referentes al antígeno soluble de la rabia, también empleo, entre otros métodos, la prueba de precipitación en gelosa, según Ouchterlony. Utilizó como antígeno tres extractos concentrados distintos de cerebros rábicos de ratones de leche muertos a causa de la cepa avianizada Flury, y como anticuerpo, suero antirrábico procedente de ratones adultos hiperinmunizados con la misma cepa Flury. La reacción positiva se presentó en forma de cuatro líneas precipitantes, reducidas a veces a tres y a dos.

El mismo año, Ver y colaboradores (20) utilizaron dicha reacción en el análisis antigénico del virus rábico fijo en suspensiones cerebrales de ovejas, conejos, cobayos y ratones, con el correspondiente suero equino hiperinmune; observaron de 3 a 9 líneas precipitantes, según la especie animal. En cerebros normales sólo aparecieron 2 líneas.

Finalmente, en 1963, los autores rusos Buchnev y colaboradores (21) emplearon para el diagnóstico rábico en gelosa, la fracción globulínica del antisuero equino, confrontada con la papilla cerebral; y concluyeron que la reacción, si bien realizable incluso en cerebros no frescos, no es 100 % segura, y por consiguiente no es apta para sustituir la prueba de corpúsculos de Negri. Sin embargo, en cerebros de ratones inoculados y muertos de rabia, con fines de diagnóstico, resultó 100 % efectiva.

En la mayoría de estos trabajos se siguió la técnica precipitante de doble difusión en gelosa, hecha en placas de Petri, no obs-

tante que, a partir del año 1957, fue introducida la micromodificación de la misma (Wadsworth (22), Hartmann y Toilliez (23), Crowle (24), Mansi (25), etc.), que practicada en láminas portaobjetos se hizo muy popular por su sensibilidad, fácil técnica, rapidez y la notable reducción de la cantidad requerida de antígeno y de anticuerpo.

El presente estudio trata de valorar este micrométodo de la precipitación en gelosa, como un posible procedimiento de diagnóstico de la rabia, utilizando al respecto reacciones repetidas en más de 300 cerebros rábicos y normales, procedentes de distintas especies. La elevada incidencia de la rabia en Guatemala y la posibilidad de poder sustituir algún día los actuales y laboriosos métodos de diagnóstico, por otros de igual exactitud y más fáciles y rápidos, es el móvil principal de este tema.

Materiales y métodos

Virus

Fueron necesarios para la inmunización de ratones y conejos, así como para la preparación de antígenos cerebrales controles, sobre todo rábicos. Se emplearon los siguientes:

- 1) Cepa patrón P.V. de virus rábico fijo, procedente de la Oficina Sanitaria Panameicana.
- 2) Cepa patrón C.V.S. de virus rábico virulento, de igual procedencia.
- 3) Cepa rábica Flury, en embrión de pollo, de 60 y 180 pases, de igual procedencia.
- 4) Cepas de virus rábicos de calle aislados en el país.

Antígenos

Fueron constituidos principalmente por cerebros caninos, aparte de algunos bovinos, felinos, equinos, humanos, cuniculinos (conejos), así como por cerebros de ratones, murciélagos y los embriones de pollo. Los

demás detalles al respecto figuran en el Cuadro 1, junto con el resultado de la prueba de inoculación hecha con todos los materiales, para poder separar los cerebros rábicos de los no rábicos.

Cada uno de los cerebros rábicos o normales fue homogeneizado y la papilla resultante se mantuvo a 6° C. durante las primeras 48 horas para hacer las primeras reacciones precipitantes, que llamaremos reacciones con material fresco. Terminadas éstas, toda papilla cerebral pasó al depósito de congelación a -20° C., para ser utilizada en días, semanas o meses venideros. En esta forma pudieron repetirse periódicamente los análisis en el mismo material, desde el estado fresco hasta los 8 meses de congelación, que fue el límite máximo. Debido a que algunas muestras se examinaron hasta 30 veces, la indispensable y repetida descongelación parcial se redujo siempre al tiempo mínimo, para garantizar la buena conservación del material.

En algunos casos las papillas cerebrales arriba citadas sirvieron también para preparar otros antígenos, aparte del empleo de algunos ajenos no cerebrales, a saber:

1) Extractos cerebrales obtenidos previa sedimentación o centrifugación de suspensiones en NaCl al 0,85 % con 10 hasta 50 % de la masa encefálica.

2) Treinta y seis extractos como los anteriores, si bien tratados con éter para la eliminación de lípidos (16).

CUADRO 1 — Origen de cerebros utilizados y resultado de las inoculaciones.

Origen	Cerebros rábicos	Cerebros no rábicos	Total
Perro.....	111	45	156
Gato.....	4	3	7
Bovino.....	8	5	13
Equino.....	—	2	2
Hombre.....	1	1	2
Conejo.....	6	7	13
Ratón.....	50*	50*	100
Murciélago.....	—	23	23

* Aproximadamente.

3) La vacuna antirrábica comercial tipo Semple, con suspensión de cerebros de conejo al 1,5 %.

4) Seis cerebros liofilizados además de 6 extractos liofilizados correspondientes a dichos cerebros.

5) Embriones de pollo liofilizados, de 60 y de 180 pases de cepa rábica Flury, y el embrión de pollo normal.

Sueros

1) Suero antirrábico equino Lederle, U.S.A., purificado, de 350 unidades internacionales por cc., cuyo poder neutralizante *in vitro* para el virus estándar C.V.S. correspondía aproximadamente a 10^{-6} de DL₅₀ de ratón.

2) Suero antirrábico equino, Instituto Nacional de Higiene de México, concentrado con 400 unidades internacionales por cc. No se estableció su poder neutralizante en comparación con C.V.S., pero su capacidad precipitante parecía superior al de Lederle.

3) Suero antirrábico de ratón albino suizo, elaborado en la forma siguiente: 20 animales de un mes de edad recibieron 6 inyecciones intraperitoneales de vacuna antirrábica fenolizada, según el método de Habel. Luego, a intervalos de 4-5 días, virus rábico vivo, así: 2 inyecciones de 0,25 cc. de suspensión embrional al 20 % de la cepa avianizada Flury, 60 pases; 2 de virus rábico fijo estándar P.V.; 2 de virus C.V.S. y 2 de virus de calle. De estos animales se obtuvo el suero hiperinmune, lote No. 1, por la sangría realizada después de la décima inyección del virus vivo, y los lotes subsiguientes, del segundo hasta el noveno, mediante sangrías repetidas a intervalos de un mes. La inmunidad deseada se mantuvo intercalando mensualmente de 4 a 5 inyecciones del virus P.V. La sangría se hizo por vía retrobulbar (26), que permitía repetir las extracciones a razón de una mensual casi durante un año. Cada suero fue inactivado durante 30 minutos a 56° C. y algunos de ellos sometidos a la prueba de neutralización *in vitro* con el virus

C.V.S. El título neutralizante se mantuvo prácticamente estable, oscilando alrededor de $10^{-5.8}$ a 10^{-6} de DL_{50} de ratón. Los sueros se mantenían congelados a $-20^{\circ}C$, y se retiraba para cada reacción sólo lo indispensable.

4) Suero antirrábico de conejo, de bajo título, obtenido de animales que habían recibido 4 inyecciones intramusculares de la cepa Flury en embrión de pollo, una cada cuarto día, y cuya sangría fue hecha 4 días después.

5) Sueros normales de ratón y caballo, utilizados previa inactivación, para fines de control.

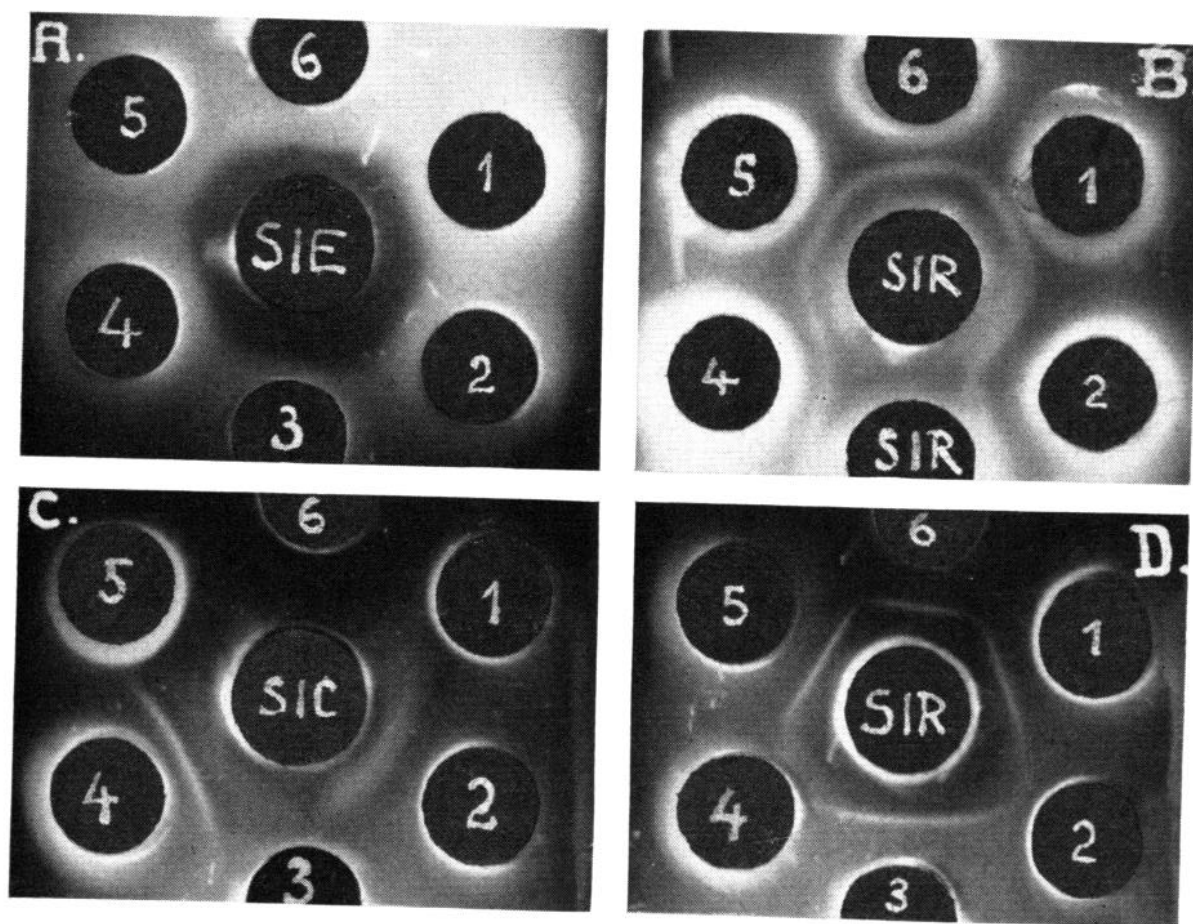
Gelosa

Se preparó agregando a la solución salina isotónica con 0,5% de fenol, 0,7% de ionagar No. 2 (Oxoid) y hervida en autoclave a baja temperatura. Luego se ajustó su pH a 7,4 con NaOH normal y se filtró. Repartida en pequeños tubos con tapón de rosca, se mantuvo a temperatura de $6^{\circ}C$ hasta el momento de usarla.

Prueba de precipitación

Se practicó el micrométodo en la forma siguiente: en láminas portaobjetos estándar

FIGURA 1



A. Cerebros caninos normales (1, 2) y rábicos (3-6), frente al suero antirrábico equino-SIE; no hay precipitación; intenso velo en materiales hemorrágicos (1, 6); zona central aclarada a causa del antisuero.

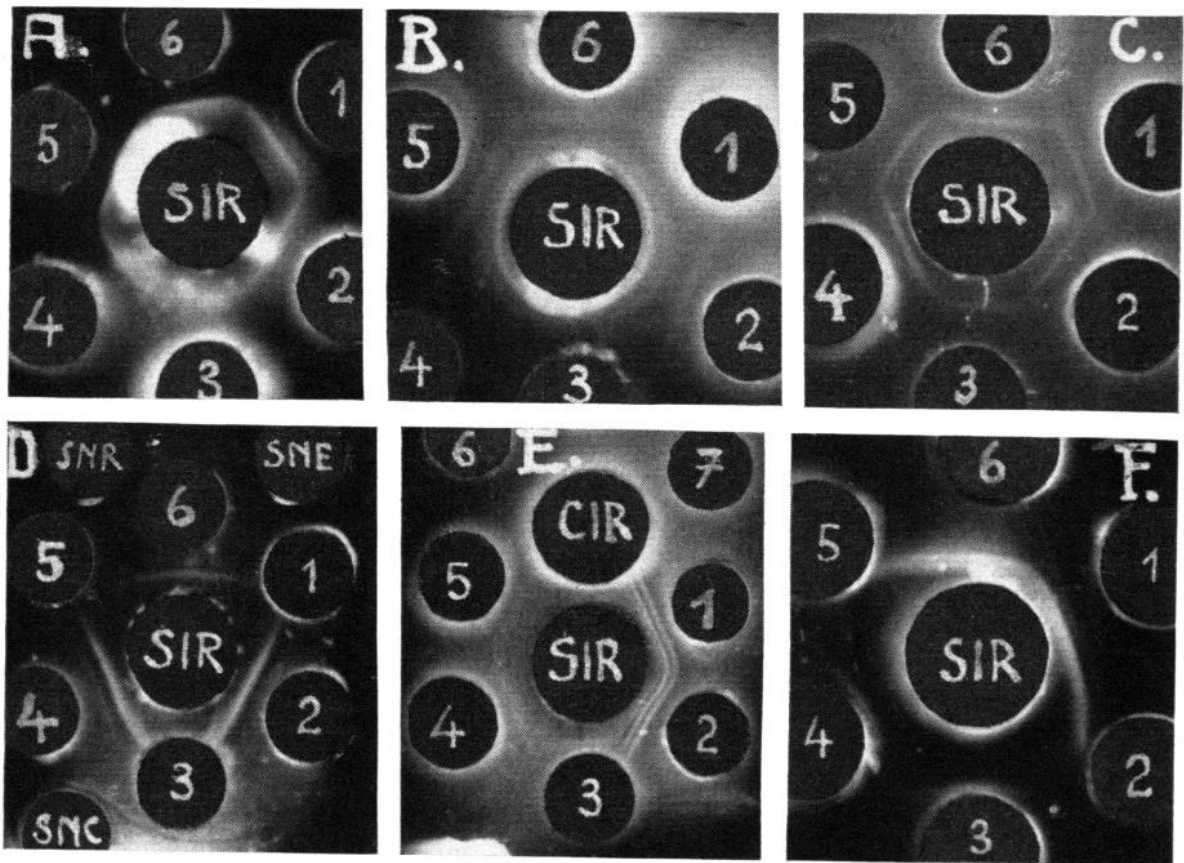
B. Isoprecipitación—Cerebros de ratones normales (5, 6) y rábicos (1, 2, 4), sometidos a repetida congelación-descongelación, frente al suero antirrábico de ratón-SIR: todos los antígenos precipitan; la línea rábica, si la hay, está encubierta por la proteínica.

C-D. Sueros antirrábicos de conejo y de ratón, frente al cerebro normal (6), cerebro rábico (1, 5-virus fijo), vacuna antirrábica cerebral al 1,5%-irradiada (3), todo de conejo y cepa rábica Flury en embrión de pollo (2, 4): El antisuero de conejo-SIC, de bajo título (4 inyecciones de cepa avianizada Flury), sólo precipita el antígeno proteínico de embrión de pollo (2, 4). El antisuero de ratón-SIR, precipita fuertemente los antígenos cerebrales (1, 3, 5, 6) y débilmente los de embrión de pollo (2, 4); estas últimas reacciones se suponen rábicas; las anteriores, principalmente proteínicas.

bien limpias y desengrasadas, se hicieron con lápiz grueso dos líneas transversales separadas por una distancia de 3 cm. Luego, el área central resultante recibió 1 cc. de la gelosa recién disuelta. Vuelta a solidificar, cortáronse en ella, por succión y mediante tubo metálico, una cavidad central de 0,4 mm. de diámetro y 6 circundantes de 0,3 mm.

de diámetro, formando la clásica figura hexagonal. La distancia entre la cavidad central y las exteriores fue igualmente de 0,3 mm. Los antígenos se colocaban en cavidades exteriores, y generalmente se ocupaban 2 por cada muestra. Los sueros, aplicados tan sólo una vez, iban a la cavidad central. Terminada la operación de relleno, las

FIGURA 2



A-B. Absorción de anticuerpos cerebrales proteínicos.

A. Cerebros normales (3, 4) y rábicos (5, 6-virus fijo, 1, 2-virus de calle), todos procedentes de conejo, frente al suero antirrábico de ratón-SIR, sin absorber: intensa precipitación en todos los antígenos, sean rábicos o no.

B. Los mismos antígenos con el citado antisuero-SIR, previamente absorbido: antígenos normales (3, 4), negativos; los rábicos (1, 2, 5, 6) positivos; la cavidad sérica es bordeada por dos anillos de precipitación concéntricos, producto de la absorción.

C. Cerebros rábicos del hombre (1), gatos (2, 3) y perros (4, 5, 6), frente al suero antirrábico de ratón-SIR: línea de precipitación proteínica en todos los antígenos; la del hombre aparece distinta; sobre la línea rábica, imposible de opinar.

D. Cerebros, sobre todo rábicos, frente al suero antirrábico de ratón y tres sueros normales: antisuero-SIR precipita antígenos cerebrales de conejo normal (2) y rábico (4, 6); no precipita los de cerebros rábicos frescos de gato (1), ternera (3) y perro (5); sueros normales (de ratón-SNR, de equino-SNE y de conejo-SNC), negativos.

E. Suero-SIR y cerebro-CIR de ratones hiperinmunes, frente a distintos cerebros rábicos de ratones (3, 4, 5, 6-CVS) y conejos (7, 1, 2-virus de calle): antisuero-SIR produce triple línea de precipitación con antígenos de conejo y una sola con antígenos de ratón (material fresco); esta última es la rábica y coincide con la línea de precipitación interior de conejo; el cerebro-CIR, negativo.

F. Desplazamiento de líneas de precipitación al diluirse el antígeno. Suspensiones de cerebros rábicos al 20%, frente al suero antirrábico de ratón-SIR: intensa línea de precipitación con el antígeno de conejo (1, 6) desplazada al centro, y débil con el de ratón (3, 4) desplazada para afuera; esta última parece ser la rábica; antígenos de gato (5) y perro (2) aparentan ser negativos.

láminas acomodadas en una cámara húmeda envuelta en bolsa de polietileno, se incubaron a 37° C. durante 15 horas; un tiempo mayor, 30 ó 40 horas, por ejemplo, no fue necesario. Las lecturas se hicieron en cámara oscura con ayuda de un potente foco de iluminación indirecta (Figuras 1 y 2).

Absorción de sueros inmunes

Se empleó el sencillo método de Björklund (27) para eliminar la reacción precipitante y, con ello, la falsa positividad que puede ocurrir entre sueros inmunes y cerebros normales, o bien sus extractos. A tal efecto, unas 10 horas antes de iniciarse la reacción, la substancia absorbente, en este caso la papilla de cerebro normal, fue depositada en la cavidad sérica central, para que impregnara la gelosa de la lámina, mantenida en humedad y a temperatura ambiente. Vaciado luego el residuo cerebral, la gelosa quedó lista para recibir, en forma habitual, los correspondientes reactivos.

Es de aclarar que la absorción para cerebros rábicos de ratón, de conejo y de perro, se hizo con cerebros normales de las especies respectivas; ahora, tratándose de casos de felinos, bovinos y humano, sólo se absorbieron por el cerebro canino.

Resultados

1. Reacciones no específicas originadas por sueros o antígenos, o bien por diluyentes o desinfectantes empleados en la gelosa

Las lecturas hechas después de 15 horas de incubación mostraron lo siguiente:

El suero de ratón, normal o inmune, hemolítico o no, contribuyó a conservar la gelosa, preparada en la forma antes descrita, en perfectas condiciones de claridad, sin mayores velos ni nebulosidades, aun en presencia de antígenos difíciles, como son las papillas cerebrales hemorrágicas, siempre que éstas no fuesen de especies pequeñas, como el ratón, el murciélago o el embrión de pollo.

En estos últimos, cualquier contenido de sangre perjudicaba, formando velo entre el antígeno y el suero, tanto mayor cuanto más sangre había. Los extractos hemolíticos cerebrales de cualquier especie animal perjudicaban aun más. También antígenos de cerebros en descomposición tienden a formar velos.

Sueros de conejo, normales o parcialmente inmunes, portáronse en forma igual que los de ratón.

El comportamiento de sueros equinos hiperinmunes fue distinto; en ellos cualquier antígeno con residuos de sangre o de hemólisis producía intensos velos entre su cavidad y la del suero inmune, al parecer tanto mayor cuanto mejor fuere el título precipitante del suero. Es de notar que sueros equinos normales carecían de esta propiedad.

También la temperatura de la reacción influye en el fenómeno de la nebulosidad, pues ésta resultó inexistente o leve a temperatura ambiente, y muy acentuada a 37° C. Asimismo, incluyó al respecto cualquier adición a la gelosa del tampón fosfado, incluyendo la solución P.B.S., operación que solía acrecentar el fenómeno durante la incubación a 37° C., al extremo de impedir la lectura de la reacción. Sin embargo, a temperaturas menores, tales como 20–25° C., la adición de fosfatos no perjudica. También se abandonó el intento de mejorar la propiedad bactericida de la gelosa, sustituyendo el fenol (0,5%) por el mertiolato (1:10.000) debido a las nebulosidades consiguientes.

Pese a estos ensayos, el empleo de la gelosa de la composición arriba citada, junto con la incubación a 37° C., fue lo usual, dada su bondad revelada en presencia del antisuero más usado, el de ratón, y la elevada sensibilidad y rapidez de la reacción.

Finalmente se observó un fenómeno, propio sólo de sueros inmunes, consistente en que, al ser éstos absorbidos de la cavidad, clarificaban la gelosa adyacente en medida tanto mayor cuanto más potente era el anti-

suelo. Los sueros normales, en cambio, no lo hacían, o lo hacían tan sólo en forma reducida. El área aclarada fue menor en sueros inactivados y mayor en los frescos no inactivados. El fenómeno es de importancia ya que, salvo casos especiales, es en el área clarificada donde suele ocurrir la reacción precipitante. En materiales a cuya interacción se deben las nebulosidades de la gelosa, como son los antisueros equinos con los antígenos hemolíticos, la línea divisoria entre el área clara y la nebulosa ha sido siempre muy intensa y bien definida al extremo de poder dar la impresión de una positividad, naturalmente falsa.

2. *Precipitaciones específicas no rábicas inducidas por los materiales de inmunización y, por lo mismo, inexistentes en sueros normales*

a) *Con antisueros rábicos de ratón:* La mayoría de los cerebros, sin distinción de la especie, fuesen rábicos o no, producían una línea de precipitación recta, situada a media distancia entre la cavidad sérica y la antigénica; en raras ocasiones aparecían una o dos líneas secundarias más débiles y paralelas, situadas de uno o del otro lado de la línea original o primaria. La del lado exterior fue más frecuente que la interna. Es de notar que antisueros de ratón concentrados por el método de congelación*, precipitaron invariablemente toda muestra de un grupo de 29 cerebros frescos, a pesar de que antisueros de título corriente precipitaron sólo parcialmente los cerebros frescos no congelados (Cuadro 2).

Al debilitarse los usuales sueros antirrábicos por envejecimiento o por el factor de la descongelación parcial, las líneas de precipitación, antes finas y delgadas, solían convertirse en anchas y difusas, y de límites inseguros. Y fue en estos casos donde aparecieron con más frecuencia las líneas secun-

darias de aspecto difuso. Los antisueros aun más débiles dejaban de precipitar, primero en muestras de ciertos cerebros y luego en la totalidad. También había casos donde, de dos cavidades antigénicas llenadas con el mismo material, precipitaba sólo una.

La línea de precipitación de cerebros de distintas especies colocados en la misma lámina, aparecía por lo general en forma de un perfecto hexágono concéntrico, sin cruzamiento en las esquinas. No obstante este fenómeno de cruce de líneas, sí tuvo lugar en contados casos, particularmente al utilizar los antisueros excepcionalmente potentes.

Estas precipitaciones de origen cerebral, que suponemos principalmente proteínicas, siguieron ocurriendo aun en materiales conservados en glicerina, o bien en materiales cerebrales ya descompuestos. En estos últimos, al ser de origen bovino, aparte de la línea de precipitación habitual, solía aparecer otra más, totalmente distinta, muy intensa y curva, próxima a la cavidad antigénica.

La eficacia del antígeno común para cerebros de todas las especies ensayadas, tuvo sin embargo una excepción: el cerebro fresco de ratón, es decir, cerebro de la especie productora del antisuero. En él la reacción fue negativa aun con los sueros más potentes. Este fenómeno lo alteró la congelación-descongelación repetida, según más adelante se explica.

Todas estas reacciones con el antisuero de ratón refiérense a materiales cerebrales normales o rábicos de especies, que no han sido utilizados en su elaboración. En aquellos que lo fueron, en este caso el cerebro de conejo o sus derivados, la reacción de precipitación fue muy distinta, y se destacó por su intensidad y por su presencia aun en sueros débiles, negativos para cerebros de otras especies. La reacción producida consistía por lo general en dos líneas paralelas, muy intensas en sueros potentes, y situadas a media distancia entre la cavidad sérica y la antigénica. Se observaron aun en suspensiones o extractos cerebrales muy débiles, como lo fue, por ejemplo, la vacuna comercial antirrábica irradiada, de

* El método será objeto de una publicación posterior.

CUADRO 2 — Resultados de las reacciones de precipitación entre sueros antirrábicos de ratón y cerebros de caninos, bovinos y felinos (en su mayoría rábicos) obtenidos en distintos períodos de conservación a -20°C . (Los cerebros de cada período fueron examinados, un promedio de cinco veces cada uno, a intervalos razonables.)

Período de conservación	Cerebros rábicos			Cerebros no rábicos		
	No. examinado	Precipitación		No. examinado	Precipitación	
		Positiva	Negativa		Positiva	Negativa
1) <i>Caninos</i> (156: 111 rábicos y 45 no rábicos)						
Frescos recién extraídos.....	21	11	10	13	7	6
Congelados:						
1-15 días.....	65	49	16	33	18	15
15-30 “.....	41	34	7	19	12	7
1-2 meses.....	49	46	3	20	13	7
2-3 “.....	23	22	1	13	10	3
3-4 “.....	18	18	—	8	7	1
4-5 “.....	5	5	—	—	—	—
2) <i>Bovinos</i> (13: 8 rábicos y 5 no rábicos)						
Frescos recién extraídos.....	3	2	1	3	2	1
Congelados:						
1-15 días.....	2	2	—	3	2	1
15-30 “.....	1	1	—	2	1	1
4-5 meses.....	6	3	3	1	1	—
7-8 “.....	4	2	2	—	—	—
3) <i>Felinos</i> (7: 4 rábicos y 3 no rábicos)						
Frescos recién extraídos.....	3	2	1	—	—	—
Congelados:						
1-15 días.....	2	1	1	2	2	—
15-30 “.....	2	1	1	1	1	—
1-2 meses.....	1	1	—	—	—	—
4-5 “.....	1	1	—	—	—	—

Sanidad Pública de Guatemala, con suspensión cerebral de conejo al 1,5 %.

b) *Con antisueros rábicos equinos*: La capacidad de precipitación de los antisueros equinos, comparada con la de los de ratón, resultó muy pobre. En efecto, entre centenares de pruebas repetidas hechas con cerebros caninos, frescos o congelados, el resultado fue siempre negativo. También 2 cerebros humanos, 2 equinos, varios de gato y numerosos de ratón y murciélago, frescos o congelados, resultaron negativos, lo mismo que los cerebros bovinos frescos. Sin embargo, en varios cerebros de esta última especie, conservados hace meses en congelación y descongelados repetidas veces, la precipitación ocurrió, poco más o menos, en un tercio.

Sólo en cerebros de conejos o sus deriva-

dos, frescos o congelados, aparecían las dos líneas de precipitación, tal vez debidas al proceso de inmunización relacionado con dicho cerebro. En este sentido, el efecto del suero Lederle, aunque mucho más potente que el de México, nunca ha podido compararse con la potencia de precipitación del antisuero de ratón.

c) *Con antisueros rábicos de conejo*: Sueros de conejos inmunizados con suspensión embrional de cepa rábica Flury (4 inyecciones intramusculares, una cada cuarto día y sangrados 7 días más tarde) precipitaban muy bien las suspensiones de embrión normal o rábico, pero carecían de efecto alguno ante cerebros, rábicos o no, y frescos o congelados.

Finalmente, es de aclarar que ninguno de

los sueros normales, fuesen de ratón, de conejo o de equino, provocaba reacción de precipitación alguna.

3. *Factor congelación-descongelación repetida en el material cerebral, y su influencia en la reacción de precipitación*

En muchos casos, cuando las papillas cerebrales o sus derivados procedían de materiales frescos, éstos no precipitaban ni siquiera ante potentes antisueros de ratón. Pero lo hicieron sin falla, por lo menos tratándose de cerebros caninos, cuando tales materiales fueron objeto de congelación-descongelación repetida. Y aun más, los cerebros de ratones, en especial resistentes a la precipitación proteínica cerebral con el antisuero homólogo, también precipitaron, sobre todo si el proceso congelación-descongelación había tenido ya lugar varias veces.

Al igual que en material fresco, también aquí la reacción de precipitación dependía del título del suero. Sin embargo, el proceso antes citado la favoreció, al extremo de que sueros inmunes sin reacción en material fresco, como por ejemplo los antisueros equinos o los débiles de ratón, sí lo hicieron en muchos materiales viejos ya procesados. Otros detalles relacionados con el fenómeno se desprenden del Cuadro 2 que corresponde a antisueros de ratón de título de precipitación promedio. Sueros normales como de costumbre han continuado negativos.

4. *Influencia de la concentración del antígeno cerebral sobre la reacción de precipitación*

El cerebro homogeneizado, la papilla, fue el mejor antígeno, superior a simples partículas cerebrales, recomendadas por algunos autores (Villemot-Provost, Mansi y otros). También suspensiones cerebrales bastante concentradas, por ejemplo al 50 %, resultaron viables. Sin embargo, diluciones bastante mayores, por ejemplo al 20 ó al 10 %, atenuaban la intensidad de la reacción resultante, y hasta la anulaban en muchos casos.

Tampoco favorecieron la reacción los

intentos de concentrar los antígenos cerebrales, incluso el rábico, por el método de la liofilización, pues 12 materiales liofilizados (6 líquidos sobrenadantes obtenidos de igual número de cerebros congelados y centrifugados a 18.000 r.p.m., y 6 papillas de los mismos cerebros) de origen canino, 5 rábicos y uno normal, no dieron resultados satisfactorios.

Los extractos eterizados según Sharma (16), ensayados repetidas veces en un total de 36 materiales, la mayoría rábicos, producían reacciones de precipitación más tenues y en algunos casos parecidas a las de papillas cerebrales que les dieron origen. Sin embargo, tuvieron la ventaja de mantener la gelosa en óptimas condiciones de claridad, cosa difícil de conseguir con las propias papillas cerebrales.

Los líquidos sobrenadantes logrados con la centrifugación a 18.000 r.p.m., de papillas mantenidas en congelación, tampoco pudieron mejorar la reacción. Por el contrario, al estar hemolíticos, causaban intensas nebulosidades perjudiciales para la lectura.

Finalmente, cabe mencionar aquí un fenómeno: el cambio de lugar de la línea de precipitación de acuerdo con la concentración del antígeno. En efecto, las líneas de precipitación originadas por los extractos, ya fuesen derivadas de simple solución fisiológica o tratadas adicionalmente con éter (Sharma), solían formarse más cerca del depósito sérico, y estaban separadas de él sólo por un tercio o un cuarto de la distancia antisuero-antígeno. (Este hecho fue ventajoso, ya que la reacción ocurría en el campo de óptima claridad.) En consecuencia, las láminas con algunas cavidades de extracto y otras de papilla originarios del mismo cerebro, en vez de presentar un hexágono de precipitación normal concéntrico, lo hicieron deformar excéntricamente según el número de cavidades con el extracto.

5. *Observación de líneas precipitantes rábicas, facilitada por el proceso de absorción*

Considerando que son numerosas las reacciones de precipitación, antes descritas, aje-

nas a la rabia, muchos ensayos de absorción se orientaron a revelar si realmente es factible la observación de líneas de precipitación rábicas y, en caso positivo, conocer su localización para poder distinguirlas de las de otra índole. A este respecto, sólo ha sido parcialmente útil el antisuero de ratón; los demás nunca pudieron presentar reacción alguna referente al complejo antígeno-anticuerpo rábico. Sencillamente fueron negativos como los sueros normales.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

a) Suspensiones concentradas de embrión de pollo con cepa rábica Flury, de 60 ó 180 pases, producían línea de precipitación al paracer específica de rabia, situada a mitad de la distancia entre la cavidad cerebral y la sérica. Al contrario, suspensiones de control con embriones normales fueron siempre negativas, así que no hubo necesidad de la absorción.

b) La papilla o suspensiones cerebrales de conejo con el virus P.V., o bien con la correspondiente vacuna antirábica irradiada, presentaron además de una o dos líneas de precipitación proteínicas, otra más, situada muy cerca de la cavidad antigénica. Esta parece ser la rábica, ya que no se veía en cerebros normales y, sobre todo, fue la única que persistió en su lugar, si bien algo más débil, después de la absorción.

c) Los virus de calle o bien el virus C.V.S. en cerebros de conejos o ratones, no siempre podrían revelarse, y en caso afirmativo, la línea por lo general coincidía con otras proteínicas y, por consiguiente, visible en forma muy débil sólo después de la absorción.

d) Sesenta y seis cerebros de perro, varios de gato y de bovino, y 2 de hombre, todos ellos procedentes de casos de infección natural, revelaron una línea rábica débil, sólo en un 30 % de casos, y siempre coincidiendo con la proteínica. Al contrario, la absorción mantuvo siempre negativos a los controles, representados por 58 cerebros no rábicos. El tiempo de conservación de tales muestras a -20°C . no parecía influir en la reacción resultante. En cuanto al fenómeno de la

CUADRO 3 — Resultado de la reacción de precipitación entre sueros antirrábicos absorbidos y 124 cerebros de distintas especies en su mayoría rábicos. (La positividad o negatividad que se indica fue comprobada por inoculación en animales de laboratorio.)

Cerebros en congelación a -20°C .

de 1 a 30 días		más de 30 días	
45 rábicos	21 no rábicos	16 rábicos	42 no rábicos

Los mismos cerebros después de la absorción

14 positivos	21 negativos	5 positivos	42 negativos
--------------	--------------	-------------	--------------

absorción de anticuerpos propiamente cerebrales, es decir, no rábicos, ésta pudo apreciarse en forma de uno o dos anillos de precipitación situados casi en el borde de la respectiva cavidad sérica. Los demás detalles aparecen en el Cuadro 3.

Discusión

A pesar de que los estudios anteriores señalaron la reacción de precipitación en gelosa como método aplicable al diagnóstico de la rabia, los resultados del presente trabajo coinciden con tal criterio sólo en parte. En efecto, hay muchas reacciones secundarias no específicas que la pueden encubrir, falsear o anular, y mientras estas últimas no logren eliminarse, es imposible confiar en ella. Uno de los primeros obstáculos de estas reacciones es la propia sustancia cerebral o sus suspensiones, por la tendencia a producir densas nebulosidades en la gelosa (15). Asimismo, puede perjudicar los resultados, el uso de antígenos hemolíticos, o bien de antígenos con sangre, por intensificar aun más dichas nebulosidades. En este sentido los más nefastos han sido los extractos hemolíticos. Y fue el conjunto de estos factores lo que prácticamente impuso el uso de la gelosa ya conocida, por ser, entre varios, la que mejor se comportó.

Otro de los problemas de la reacción, y quizás el principal, es la poca concentración

del antígeno rábico en los cerebros, común, ante todo, en las infecciones naturales (bajo título del virus). Mead (18), quien trató de concentrarlo mediante procesos complicados, obtuvo sólo resultados mediocres. La liofilización de extractos o de cerebros rábicos, intentada por nosotros, tampoco resultó. Así que teniendo en cuenta estos problemas, preferimos usar en nuestros ensayos, salvo excepciones, sólo la papilla cerebral, ya que los extractos, bien simples o eterizados, debilitaban la visibilidad de la precipitación resultante, reacción que, en la gran mayoría de casos, correspondía al antígeno cerebral, es decir, antígeno no rábico.

La dilución del antígeno cerebral contenido en la papilla solía ir acompañada de otro fenómeno: el desplazamiento de su línea de precipitación del centro de la distancia antígeno-anticuerpo, hacia el depósito sérico. Consideramos que en ello pudo influir la mayor difusibilidad del antígeno inducida por el diluyente (solución fisiológica), no obstante que otros autores (28) lo interpretan como señal del aumento de la concentración del antígeno.

También es de señalar la notable resistencia de estos antígenos cerebrales no rábicos a las sustancias conservantes, como la glicerina o formalina y hasta a la putrefacción, fenómeno mencionado antes de nosotros por Villemot y Provost (15); sólo que ellos lo consideraron como reacción de precipitación rábica.

Cabe también mencionar que la distribución de antígenos causantes de esta reacción cerebral suele ser desigual, al extremo de que materiales nerviosos, al parecer iguales, pueden reaccionar en forma positiva en una cavidad y en forma negativa en otra. Fue esta la razón de homogeneizar perfectamente todo el material, aparte de ayudar a su licuación mediante la congelación-descongelación repetida.

Siendo la precipitación de antígenos cerebrales no rábicos consecuencia natural del proceso de inmunización, su intensidad ha de ser tanto mayor cuanto más sustancias cerebrales, conjuntamente con el virus, reci-

ban los animales inmunizados. Y ésta fue la causa de que los antisueros de nuestros ratones, al recibir repetidas inyecciones inmunizantes y de refuerzo a lo largo de meses, precipitaron en forma intensa no sólo antígenos de la sustancia cerebral de especie homóloga, es decir la misma utilizada en la inmunización (en este caso cerebro de conejo), sino también antígenos cerebrales de otras especies, es decir, heterólogas. Este fenómeno se parece al observado en reacciones de especificidad, en sueros sanguíneos, donde la precipitación en gelosa, aparte de antígeno proteínico homólogo, revela la existencia de otros heterólogos, comunes a otros sueros (29).

La existencia de tales precipitaciones no rábicas registrada sistemáticamente por nosotros, sólo la mencionaron anteriormente Ver y colaboradores (20), quienes describieron dos líneas de precipitación de todo cerebro normal: ratón, cobayo, conejo y oveja.

El fenómeno más interesante en estas precipitaciones, según parece propias de todo cerebro, sea normal o no, es que el mantenimiento de tales órganos en estado de congelación, seguida ésta de descongelación periódica, acrecienta poderosamente la intensidad de la reacción, como si con ello aumentara la concentración del respectivo antígeno cerebral. Es de suponer que esto ocurre, en efecto, durante la congelación, debido a la ruptura celular o tisular y a la consiguiente liberación del contenido. Y es por este aumento de la concentración antigénica, por la que muchos antisueros rábicos incapaces de precipitar cerebros frescos, sí lo hacen después de experimentar tales materiales el proceso de la congelación-descongelación.

Lo que más llama la atención en este fenómeno es la isoprecipitación, es decir, la reacción de precipitación entre el antisuero de ratón y las muestras cerebrales congeladas procedentes de la misma especie. Es muy probable que tal fenómeno sea consecuencia de algún cambio o alteración de la estructura antigénica de los cerebros congelados, al extremo que éstos se comporten, hasta

cierto punto, como cerebros heterólogos. Otros autores, al referirse a las proteínas y su parcial desnaturalización, admiten tal posibilidad serológica (30, 31) y la designan con el término de "despeciación". Sin embargo, no hemos encontrado evidencia concreta de algún estudio anterior referente a este tema (influencia de la congelación sobre los antígenos cerebrales) al revisar lo publicado ya. Para aclarar la identidad de estos antígenos cerebrales criogénicos, será preciso recurrir a la electroforesis y tal vez a la inmunoelectroforesis. Y para terminar la discusión, consideramos de importancia mencionar todavía lo siguiente:

1) Que la reacción del antígeno netamente cerebral puede servir también, indirectamente, de indicador de la potencia precipitante del respectivo suero hiperinmune, para con el antígeno rábico. En efecto, hemos observado que los antisueros de ratón, potentes precipitadores de antígenos cerebrales, fueron también los únicos capaces de revelar la presencia de una reacción rábica, mientras que los dos antisueros equinos, ineptos casi para ocasionar precipitaciones cerebrales (lo hacían sólo con cerebros de ciertas especies utilizados probablemente en su elaboración), también lo fueron para la rabia.

2) Que la misma reacción suele encubrir la propia precipitación rábica al ocupar en la gelosa el mismo lugar. Es natural que tal hecho imposibilite prácticamente la observación de las reacciones de precipitación rábicas, y a la luz de nuestros experimentos, ningún diagnóstico hecho con antisueros usuales debía tomarse en cuenta sin la simultánea prueba-control con el suero absorbido.

3) Que el procedimiento de absorción, según Björklund (27), de ninguna manera intensifica la reacción de precipitación rábica. Esto lo sugiere el que la intensa línea supuesta rábica y observable en cerebros de conejo contentivos del virus P.V., sólo resultaba insignificante después de la absorción; y luego, que la positividad de cerebros cani-

nos, sin duda rábicos, se redujo con la absorción a tan sólo un 30 %.

Para obviar todas estas dificultades, así como para mejorar el título de sueros precipitantes antirrábicos, será indispensable cambiar la técnica de elaboración de éstos. A este respecto conviene citar a Villemot y Provost (15) quienes, trabajando con anti-suero rábico de un asno, inmunizado con cepas avianizadas Flury, lo hallaron de igual potencia precipitante que los antisueros equinos clásicos. También suponemos factible la elaboración de tales antisueros a base de virus multiplicado en histocultivos, donde la concentración del mismo es relativamente fácil usando la centrifugación. Estos temas serán abordados en nuestros futuros trabajos.

Conclusiones

Se pueden resumir en la forma siguiente:

1) Los antisueros rábicos hiperinmunes de ratón y equino, elaborados mediante inoculación de sustancias cerebrales contentivas de virus, suelen precipitar: a) Cerebros o sus extractos que sirvieron de inóculo inmunizante y proceden de una especie animal heteróloga; esto solía observarse en sueros de título muy bajo. b) Cerebros o sus extractos derivados de otras especies, heterólogas; esto solía ocurrir, lo mismo que la propia reacción rábica, sólo en antisueros muy potentes (de ratón), logrados con intensa hiperinmunización.

Los antisueros de bajo título, procedentes de conejos tratados sólo con 4 inyecciones de cepa Flury en embrión de pollo, sólo precipitaron el respectivo embrión normal.

2) Los antígenos ajenos a la rabia suelen aparecer en todo cerebro, normal o rábico, y acusaron menor concentración cuando tales órganos fueron recién extraídos y frescos, y muy alta cuando han sido sometidos al proceso de congelación-descongelación repetidas veces.

Los antisueros rábicos de ratón, incapaces de precipitar cerebros frescos homólogos, es decir de la misma especie, sí lo hacían al ser

dichos órganos objeto de la citada congelación-descongelación.

3) Sueros normales de ratón, de conejo, o de caballo, inactivados o no, al ser comparados con cerebros frescos, o con los sometidos a congelación-descongelación, se mantuvieron siempre negativos.

4) La precipitación específica propia de la sustancia cerebral, interfiere con la reacción de precipitación del antígeno-anticuerpo rábico, al extremo de desviar o imposibilitar su lectura, hecho tanto más grave cuanto que el lugar de la línea de precipitación rábica en materiales con virus de calle, solía coincidir con la anterior.

5) La inevitable absorción a que fueron sometidos tales antisueros parecía debilitar la reacción rábica resultante, al extremo de que sólo un 30 % de cerebros, a todas luces infectados, acusaron cierta positividad.

6) Se sugiere la posibilidad de mejorar el valor diagnóstico de esta reacción cerebral, utilizando sólo antisueros precipitantes preparados con cepas rábicas avianizadas, o bien con aquellas reproducidas en histocultivos.

Resumen

Desde el año 1958 vienen apareciendo trabajos referentes al diagnóstico de la rabia mediante la precipitación en gelosa, según la técnica de Ouchterlony, y llaman la atención los prometedores resultados obtenidos en tales estudios, así como la alta sensibilidad y la rapidez de la reacción.

El autor, después de utilizar el citado método—la microrreacción—, en análisis repetidos en más de 300 cerebros, la mayoría rábicos, valiéndose para ello de antisueros altamente hiperinmunes (principalmente de ratón y de equino), si bien no coincide en sus resultados con los anteriormente obtenidos, considera el método de Ouchterlony como muy prometedor al respecto, siempre que se logre controlar las concurrentes reacciones de precipitación no específicas, es decir, no rábicas, propias de la sustancia cerebral.

En relación con este problema el autor concluyó:

1) Los antígenos de una sustancia cerebral, sea de animal rábico o no, pueden reaccionar positivamente con sueros hiperinmunes cuando éstos proceden de animales inmunizados con virus rábico más la sustancia cerebral.

2) La congelación-descongelación repetida de una sustancia cerebral suele modificar su reactividad y hasta su estructura antigénica, al extremo de que cerebros frescos con reacción de precipitación manifiestamente negativa, acusan después del procedimiento reacción positiva, incluyendo entre ellos cerebros homólogos, es decir, procedentes de la especie animal productora del respectivo antisuero rábico; esto último nunca ocurre tratándose de cerebros homólogos frescos.

3) Absorbidas las precipitinas cerebrales de tales antisueros mediante sustancias tisulares de cerebros no rábicos, se obtiene en ellos reacción de precipitación específica de rabia, pero tan sólo en un tercio de cerebros claramente infectados.

Basándose en esto, el autor sugiere la posibilidad de mejorar el valor diagnóstico de la reacción usando, al respecto, sólo antisueros elaborados con cepas rábicas de virus avianizado, o bien, mediante aquellas reproducidas en histocultivos.

Agradecimiento

En el presente estudio se recibió la ayuda del Dr. Rodrigo Sánchez, Director del Instituto Biológico de la Sanidad Pública, Guatemala, quien en unión de sus colaboradores tuvo a cargo la titulación de los virus y de los antisueros, así como las inoculaciones diagnósticas de las muestras cerebrales analizadas mediante la precipitación. A todos ellos expreso mi sincero reconocimiento. Agradezco también a mi colaborador en el Departamento de Microbiología, Dr. Federico Richter, la labor fotográfica pertinente, y al Dr. Leonardo Mata, del INCAP, la desinteresada ayuda de orden bibliográfico.

REFERENCIAS

- (1) Bechhold, H.: Strukturbildung in Gallerten, *Ztschr. Phys. Chemie*, 52:185-199, 1905.
- (2) Oudin, J.: Méthode d'analyse immuno-chimique par précipitation spécifique en milieu gélifié, *C. R. Acad. Sci.*, 222:115-116, 1946.
- (3) Ouchterlony, Ö.: In vitro method for testing the toxiproducing capacity of diphtheria bacteria, *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, 25:186-191, 1948.
- (4) Elek, S. D.: The recognition of toxicogenic bacterial strains in vitro, *Brit. Med. Jour.*, 1:493-496, 1948.
- (5) Jensen, K. E., y Francis, T.: Antigen antibody precipitates in solid-medium with influenza virus, *Jour. Immunol.*, 70:321-325, 1953.
- (6) Molnar, I.: Precipitation experiments with swine fever virus-containing material, *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 4:247-251, 1954.
- (7) Bodon, L.: Diagnosis of foot-and-mouth disease by the precipitin-reaction on agar gel, *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 5:157-159, 1955.
- (8) Gispén, R.: Analysis of pox-virus antigens by means of double diffusion: a method for direct serological differentiation of cowpox, *Jour. Immunol.*, 74:134-141, 1955.
- (9) Brown, F., y Crick, J.: Specific precipitin reactions with the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis, *Nature*, 179:316-318, 1957.
- (10) Mansi, W.: The study of some viruses by the plate gel diffusion precipitin test, *Jour. Comp. Path.*, 67:297-303, 1957.
- (11) White, G.: A specific diffusible antigen of rinderpest virus demonstrated by the agar double-diffusion precipitation reaction, *Nature*, 181:1409-1410, 1958.
- (12) Schoop, G., y Wachendorfer, G.: Virus-spezifische Precipitation in Agar-Diffusions-Verfahren bei der Newcastle-Krankheit, *Hühner. Mh. Tierheilk.*, 12:11-26, 1960.
- (13) Fras, A., y Grmovsek, P.: The diagnostic of rabies by gel-diffusion precipitin-test, *Veterinarski Arhiv*, 9-10:253-258, 1958.
- (14) Villemot, J. M., y Provost, A.: Précipitation spécifique du virus rabique en milieu gélifié selon la méthode d'Ouchterlony, *C. R. Acad. Sci.*, 246:2694-2695, 1958.
- (15) Villemot, J. M., y Provost A.: Précipitation en milieu gélifié du virus rabique par le sérum rabique hyperimmun, *Rev. Med. Vet. Pays Trop.*, 11:387-397, 1959.
- (16) Sharma, P. R.: A simple method to diagnose rabies by double diffusion test, *Jour. Vet. Research*, 3:35-39, 1959.
- (17) Grasset, N., y Atanasiu, P.: Étude de la diffusion en gélose d'antigènes de la rage fixe obtenus sur culture tissue, *Annales Inst. Pasteur*, 101:639-647, 1961.
- (18) Mead, T. H.: Purification of rabies soluble antigens, *Jour. Gen. Microbiol.*, 27:397-414, 1962.
- (19) Mead, T. H.: The characterization of rabies soluble antigens, *Jour. Gen. Microbiol.*, 27:415-426, 1962.
- (20) Ver, B. A.; Rao, S. S., y Jhala, H. I.: Antigenic analysis of rabies fixed virus by gel diffusion technic, *Indian Jour. Path. & Bact.*, 5:131-136, 1962.
- (21) Buchnev, K. N.; Shakhmatov, M. M.; Titov, V. L.; Menshikov, L. F.; Krivenko, O. P.; Vovk, V. I.; Laisheva, M. M., y Poluboyarova, G. V.: Diagnosis of rabies by precipitation in agar gel, *Veterinariya, Moskva*, 40:66-70, 1963.
- (22) Wadsworth, C.: A slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel, *Internat. Arch. Allergy*, 10:355-360, 1957.
- (23) Hartmann, L., y Toilliez, M.: Microméthode d'étude en gélose de la réaction antigène anticorps (variante du procédé d'Ouchterlony), *Rev. Fr. Clin. Biol.*, 2:197-199, 1957.
- (24) Crowle, A. J.: A simplified microdouble-diffusion agar precipitin technique, *Jour. Lab. Clin. Med.*, 52:784-787, 1958.
- (25) Mansi, W.: Slide gel diffusion precipitin test, *Nature*, 181:1289, 1958.
- (26) Sorg, D. A., y Beverly Buckner: A simple method of obtaining venous blood from small laboratory animals, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 115:1131-1132, 1964.
- (27) Björklund, B.: Specific inhibition of precipitation as an aid in antigen analysis with gel diffusion method, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 79: 319-324, 1952.
- (28) Crowle, A. J.: *Immunodiffusion*. Academic Press, New York, 1961, págs. 77-79.
- (29) Carpenter, P. L.: *Immunology and serology*. Saunders Co., Philadelphia, U. S. A., 1960, pág. 29.
- (30) Cushing, J. E., y Campbell, D. H.: *Principios de inmunología*. Acribia, Zaragoza, España, 1960, págs. 243-247.
- (31) Landsteiner, K.: *The specificity of serological reaction*. The Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1945, págs. 42-43

The Gel Precipitation Reaction in the Diagnosis of Rabies

(Summary)

Ever since 1958, various references to the Ouchterlony method for diagnosing rabies using gel precipitation have appeared in the literature. The method has shown promising results owing to its high sensitivity and rapidity.

The author, after using this microreaction slide technique in repeated tests in over 300 brains, the majority of which were rabid, and testing them against highly hyperimmune antisera (chiefly murine and equine), reports that although he did not obtain the same results as earlier workers, the Ouchterlony method shows promise, provided it is possible to control the concurrent non-specific precipitation reactions, namely, the non-rabid reactions of the brain substance itself.

The conclusions of the author are as follows:

1. Antigens of brain substance, whether from a rabid animal or not, can give a positive reaction to immune sera from animals immunized with rabies-infected brain substance.

2. Repeated freezing and thawing of brain substance will usually modify its reactivity and even antigenic structure, to the extent that fresh brains with a marked negative precipitation will, after repeated freezing and thawing, become positive, and this includes the homologous brains, that is to say, brains from the animal species used in producing the antisera. This last phenomenon, however, never occurs with fresh homologous brain material.

3. When the brain precipitins of such antisera are absorbed with non-rabid brain tissue, a specific rabies precipitation reaction is obtained, but only in one third of the known rabies-infected brains.

In view of the preceding statements, the author suggests the possibility of improving the diagnostic value of the gel precipitation reaction by using only antisera prepared with strains of rabies produced in chick embryo or tissue culture.