

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RABIA

**Serie de Normas
Técnicas N° 31**

Lima - 2002



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RABIA**

**Serie de Normas
Técnicas N° 31**

Lima - 2002

MINISTERIO DE SALUD
Ministro
Dr. Fernando Carbone Campoverde

Vice-Ministro
Dr. Oscar Ugarte Ubillúz

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Jefe
Dr. Luis Fernando Llanos Zavalaga

Sub-Jefe
Dra. Aída Cecilia Palacios Ramírez

Centro Nacional de Salud Pública
Dra. Susana Zurita Macalupú
Directora General

**Centro Nacional de Alimentación
y Nutrición**
Dr. Napoleón Chávez Campoverde
Director General

Centro Nacional de Control de Calidad
Dra. Rosa Guevara Ormeño
Directora General

Centro Nacional de Producción de Biológicos
Q. F. Ricardo Valera Sánchez
Director General

Sub-Comité Editor
Instituto Nacional de Salud

Presidente
Dra. Aída Palacios Ramírez

Secretario Técnico
Dr. César Cabezas Sánchez

Miembros
Dr. Jorge Alarcón Villaverde
Q.F. Zulema Arévalo Chong
Dr. Jorge Barnaby Rodríguez
Dr. Zuño Burstein Alva
Lic. Iván Gómez-Sánchez Prieto
Dra. Ivonne Guerrero Alva
Dr. Alfredo Guillén Oneeglio
Dr. César Náquira Velarde
Dr. Enrique Pérez Ramos
Lic. Margarita Rodríguez Gutarra
Dr. Víctor Suárez Moreno

Editor
Dr. Leonid Lecca García

Portada: Frontis del local central del Instituto Nacional de Salud.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RABIA

ELABORACIÓN:

*MPVM, MV Ricardo López Ingunza
Blgo. René Edgar Condori Condori
Blga. Albina Díaz Olivera*

*Laboratorio de Referencia Nacional de Rabia
División de Virología
Centro Nacional de Salud Pública
Instituto Nacional de Salud*

Catalogación hecha por el Centro de Documentación e Información del INS

López Ingunza, Ricardo

Manual de procedimientos para el diagnóstico de la rabia / Elaborado por Ricardo López Ingunza, Rene Edgar Condori Condori y Albina Díaz Olivera. — Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.

46 p. : 30 cm. — (Serie de Normas Técnicas; 31)

1. RABIA /diagnóstico 2. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DIAGNOSTICOS

- I. López Ingunza, Ricardo
- II. Condori Condori, Rene Edgar
- III. Díaz Olivera, Albina
- IV. Instituto Nacional de Salud (Perú)
- V. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972 - 857 - 26 - 3 (O.C.)

ISSN 9972 - 857 - 28 - X (Nº 31)

ISSN 1607 - 4904

Hecho el Depósito Legal Nº 1501012002-3959

©Ministerio de Salud, 2002

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Telf.: 431-0410

©Instituto Nacional de Salud, 2002

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Telf.: 471-9920 Fax 471-0179

e-mail: postmaster@ins.sld.pe

Página Web: www.ins.sld.pe

Publicación aprobada con R.J. Nº 322 -2002-J-OPD/INS

Se autoriza su reproducción total o parcial siempre y cuando se cite la fuente.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN		VII
VIRUS RÁBICO		VIII
SECCIÓN 1	GENERALIDADES	1
1.1	Objetivo	1
1.2	Campo de aplicación	1
1.3	Responsabilidades	1
1.4	Documentos de referencia	1
1.5	Definiciones y abreviaturas	1
SECCIÓN 2	MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	3
2.1	Disposiciones	3
2.2	Principales medidas de bioseguridad	3
SECCIÓN 3	PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS	5
3.1	Obtención de muestras de cerebro, cerebelo y médula de animales pequeños	5
3.2	Obtención de muestras de cerebro, cerebelo y médula de animales medianos	6
3.3	Obtención de muestras de cerebro, cerebelo y médula de animales grandes	7
SECCIÓN 4	CONSERVACIÓN, EMBALAJE Y TRANSPORTE DE MUESTRAS	9
4.1	Conservación de la muestra	9
4.2	Embalaje	9
4.3	Transporte	10
SECCIÓN 5	MICROSCOPIO DE INMUNOFLUORESCENCIA	11
5.1	Fundamento	11
5.2	Objetivo	11
5.3	Materiales	
5.4	Procedimientos de uso	11
5.5	Procedimientos de mantenimiento	12
SECCIÓN 6	ENSAYOS O ANÁLISIS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA	13
6.1	Resumen de los ensayos	13
6.2	Principio y utilidad del ensayo de inmunofluorescencia directa	13
6.3	Principio y utilidad del ensayo de inoculación en ratones	13
6.4	Principio y utilidad del ensayo de seroneutralización para la determinación de anticuerpos antirrábicos	13
SECCIÓN 7	TITULACIÓN DEL CONJUGADO ANTIRRÁBICO	14
7.1	Explicación del procedimiento	14
7.2	Objetivo	14
7.3	Equipos, materiales y reactivos	14
7.4	Procedimiento	15
7.5	Interpretación de resultados	17
7.6	Precauciones a tener en cuenta	17

SECCIÓN 8	TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO RÁBICO	18
8.1	Principio y utilidad	18
8.2	Esquema y simbología	18
8.3	Fundamento	18
8.4	Materiales y reactivos	19
8.5	Procedimiento	20
8.6	Interpretación de resultados	21
8.7	Precauciones	21
8.8	Problemas en la fluorescencia	22
SECCIÓN 9	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS	23
9.1	Láminas control positivo y negativo	23
9.2	Conjugado antirrábico	23
9.3	Preparación de solución salina tamponada (PBS) 0,01M pH 7,2-7,4	23
9.4	Preparación de suspensión de cerebro de ratón normal 20% (CRN)	24
9.5	Preparación de suspensión de cerebro de ratón infectado 20% (CVS)	24
SECCIÓN 10	PRUEBA BIOLÓGICA DE INOCULACIÓN EN RATONES	25
10.1	Principio y utilidad	25
10.2	Animales de laboratorio	25
10.3	Materiales y equipos	25
10.4	Procedimiento	26
10.5	Observación de ratones inoculados	27
10.6	Interpretación de resultados	27
SECCIÓN 11	PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIRRÁBICOS	28
11.1	Principio y utilidad	28
11.2	Animales de laboratorio	28
11.3	Materiales y equipos	28
11.4	Procedimiento	29
11.5	Interpretación de resultados	31
SECCIÓN 12	MANTENIMIENTO DE RATONES EN EL LABORATORIO	32
12.1	Objetivo	32
12.2	Campo de aplicación	32
12.3	Materiales y equipos	32
12.4	Cronograma	32
12.5	Procedimiento de cambio de jaula de ratones	34
12.6	Procedimiento de chequeo diario de ratones	34
BIBLIOGRAFÍA		35
ANEXOS		
ANEXO A	DISPOSITIVO DE SUJECIÓN PARA CABEZAS DE LOS ANIMALES PARA LA TOMA DE MUESTRAS	36

ANEXO B	FORMULARIO PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA ANIMAL	37
ANEXO C	FORMULARIO PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE RABIA HUMANA	38
ANEXO D	FLUJOGRAMA PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS	40
ANEXO E	REGISTRO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA	41
ANEXO F	FICHA DE REGISTRO DE RATONES INOCULADOS	42
ANEXO G	PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN	43
ANEXO H	MÉTODO DE REED Y MUENCH	44

INTRODUCCIÓN

“La naturaleza nos ha dado las semillas del conocimiento, pero no el conocimiento mismo”.

Pocas enfermedades causan tanta ansiedad y temor como la rabia. Esta enfermedad produce una encefalitis vírica aguda casi siempre mortal. La rabia se presenta en todos los continentes, con excepción de la mayor parte de Oceanía, y se puede presentar en dos ciclos: urbano y selvático o silvestre. En el Perú, se ha confirmado la presencia de ambos ciclos y la mayoría de los casos humanos se debieron a mordeduras de perros rabiosos. Sin embargo, en los dos últimos años, los casos humanos registrados se debieron a rabia silvestre.

El laboratorio ocupa un rol central en el control y prevención de esta enfermedad. En el Perú se inició el diagnóstico de rabia en el año 1938, cuando el Director del Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública, Dr. Telémaco Battistini, instituye el método rápido de Sellers para la confirmación histopatológica de la rabia. Durante 25 años este diagnóstico estuvo a cargo del Dr. Oscar Rondón Salas y al retirarse, en 1961, asumió la Jefatura de la División el Dr. Germán Battistini Moore quien, en 1965, contribuyó a mejorar las posibilidades del diagnóstico al introducir la prueba de inmunofluorescencia. Es así, que hasta la fecha se sigue empleando la prueba de inmunofluorescencia debido a que es una técnica simple, de alta sensibilidad y especificidad y de bajo costo.

Sin embargo, para el diagnóstico de rabia es necesario que los resultados negativos encontrados por inmunofluorescencia sean confirmados mediante la prueba de inoculación en ratones. Esta prueba es de mayor especificidad, aunque el período de duración es considerablemente mayor que el procesamiento de la prueba de inmunofluorescencia. Por otro lado, la prueba de seroneutralización sirve para determinar la cantidad de anticuerpos antirrábicos presentes en sueros humanos o animales luego de las inmunizaciones preventivas.

La vigilancia epidemiológica a nivel nacional necesita de la ayuda del laboratorio para obtener información valedera que permitan establecer programas de control a través de las diferentes Direcciones Regionales de Salud. Por ello, es que el presente “Manual de procedimientos para el diagnóstico de la rabia”, busca proveer a los laboratorios referenciales regionales de los procedimientos estandarizados básicos que se emplean actualmente en el Laboratorio de Referencia Nacional de Rabia del Instituto Nacional de Salud. Estos procedimientos pueden ser implementados en los diferentes laboratorios con equipamiento básico, un microscopio de inmunofluorescencia y animales de laboratorio. Este manual, además de estar en concordancia con los procedimientos utilizados internacionalmente, recoge las experiencias obtenidas en nuestro laboratorio.

VIRUS RÁBICO

Taxonómicamente, el virus de la rabia pertenece al orden Mononegavirales, familia Rhabdoviridae, género *Lyssavirus* y serotipo/genotipo 1. Los viriones tienen forma de bala con un diámetro de 75 nanómetros (nm) y un largo de 100 a 300 nm, aproximadamente. Cada partícula contiene una ribonucleocápside helicoidal rodeada de una doble capa de lípidos (Figura N° 1). La superficie exterior está cubierta de proyecciones en forma de espigas de 10nm de longitud, ancladas en la doble capa de lípido. Cada virión contiene una sola cadena de ARN con cinco proteínas. La ribonucleoproteína que contiene el ARN genómico está asociado a tres proteínas internas: el ARN polimerasa dependiente (proteína L), la nucleoproteína (N), y una fosfoproteína (M1). Estas proteínas, juntamente con el ARN, forman un complejo activo de ARN, que controla tanto la transcripción como la replicación. Las otras proteínas estructurales son la proteína de membrana (M2) o matriz y la glicoproteína (G), las que forman las proyecciones de las superficies responsables de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T (Figura N° 2). El virión contiene un genoma de ARN acordonado negativo y no segmentado. En este caso, la polaridad negativa indica que el genoma es incapaz de ser traducido en proteínas víales por la maquinaria celular. Consecuentemente un paso preliminar de transcripción autónomo es necesario para producir la hebra positiva complementaria del ARN mensajero, que sucede tan pronto como la ribonucleocápside es liberada en el citoplasma. Este paso es asegurado por una enzima codificada genéticamente, la ARN polimerasa ARN dependiente.

El sistema nervioso periférico es la vía de transporte viral y, luego de producirse la mordedura, el virus inicia su recorrido en sentido centripeto hasta llegar al sistema nervioso central. Después de su replicación en las neuronas, el virus inicia a través de las vías nerviosas su salida hacia diferentes órganos periféricos y llega así, a las glándulas salivales y otros tejidos, dando inicio así a su propagación a otro hospedero.

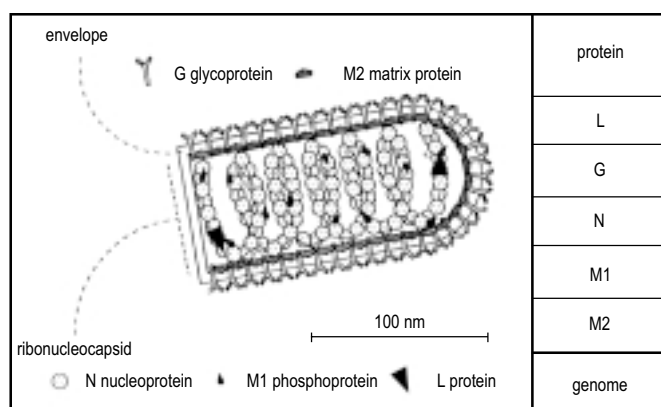


Figura N° 1. Estructura del virus rábico (Tomada de Laboratory Techniques in Rabies, 1996).

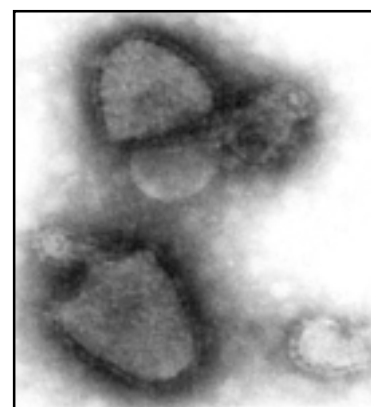


Figura N° 2. Microfotografía del virus rábico, cepa Pasteur (Tomada de Laboratory Techniques in Rabies, 1996).

SECCIÓN 1

GENERALIDADES

1.1 OBJETIVO

Establecer las disposiciones que se deben cumplir para realizar el diagnóstico del virus de la rabia utilizando los métodos de inmunofluorescencia directa y la inoculación en ratones, y para determinar los títulos de anticuerpos de sueros mediante la prueba de seroneutralización.

1.2 CAMPO DE APLICACIÓN

Se aplica en los laboratorios regionales referenciales o establecimientos de salud que cuenten con personal calificado, instalaciones, equipos y materiales idóneos para llevar a cabo el diagnóstico de rabia a partir de muestras obtenidas de personas o animales.

1.3 RESPONSABILIDADES

1.3.1 Los directores o jefes de departamento o sección de un establecimiento de salud que realizan el diagnóstico de rabia, son responsables de supervisar el cumplimiento de las disposiciones contenidas en el presente manual.

1.3.2 Los jefes de laboratorio son responsables de mantener la competencia técnica de su personal, la idoneidad y confiabilidad de sus equipos, materiales, sustancias, reactivos e instalaciones, verificar la calidad de los resultados y supervisar el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio y las medidas de bioseguridad.

1.3.3 Los profesionales designados para realizar el diagnóstico son responsables de controlar el cumplimiento de las disposiciones contenidas en este manual e informar a su jefatura inmediata superior en caso ocurran desviaciones de las especificaciones de los procedimientos establecidos.

1.3.4 El personal asignado a los procesos descritos en el presente manual deben estar calificados en las técnicas y métodos de ensayo, y aplicar las medidas de bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio.

1.4 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

1.4.1 **Larghi OP.** Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Centro Panamericano de Zoonosis; 1975. Nota Técnica N° 8.

1.4.2 **Meslin F - X, Kaplan MM, Koprowski H.** Laboratory techniques in rabies. Geneva:WHO; 1996.

1.5 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

1.5.1 **CRN:** suspensión de cerebro de ratón normal

1.5.2 **CVS:** virus estándar de desafío (challenge virus standard) de la rabia

- 1.5.3 **conjugado antirrábico:** inmunoglobulinas G contra el virus de la rabia marcadas con un fluorocromo (Ejemplo: isotiocianato de fluoresceína).
- 1.5.4 **DL₅₀:** dosis letal 50
- 1.5.5 **IFD:** inmunofluorescencia directa
- 1.5.6 **IFI:** inmunofluorescencia indirecta
- 1.5.7 **IR:** inoculación en ratones
- 1.5.8 **inóculo:** alícuota de una muestra que es inoculada a un ser vivo u otro medio de cultivo.
- 1.5.9 **patógeno:** cualquier virus, microorganismo o sustancia que causa enfermedad.
- 1.5.10 **SST:** solución salina tamponada (PBS).
- 1.5.11 **seroneutralización:** prueba utilizada para determinar la cantidad de anticuerpos neutralizantes presentes en un suero
- 1.5.12 **título viral:** inverso de la dilución de virus que produce 50% de mortalidad en los ratones inoculados.
- 1.5.13 **virus:** nombre de un grupo de microbios que, con pocas excepciones, son capaces de atravesar filtros finos que retienen a casi todas las bacterias y son incapaces de crecer o reproducirse fuera de células vivas.
- 1.5.14 **virus calle:** virus virulento de la rabia de un animal doméstico que ha contraído la enfermedad en la forma habitual, por mordedura o rasguño de otro animal.
- 1.5.15 **virus de desafío:** virus CVS que se emplea para enfrentar a los anticuerpos neutralizantes.
- 1.5.16 **virus fijo:** virus modificado en el laboratorio, como el CVS, que posee características especiales como un período de incubación corto, altamente patógeno y mantiene constante su DL₅₀.

SECCIÓN 2

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

2.1 DISPOSICIONES

- 2.1.1 La Bioseguridad son un conjunto de medidas preventivas de sentido común para proteger la salud y la seguridad del personal que trabaja en el laboratorio, frente a diferentes riesgos producidos por los agentes infecciosos.
- 2.1.2 Las disposiciones contenidas en el Manual de Normas de Bioseguridad, Serie de Normas Técnicas N° 18 (editado por el Instituto Nacional de Salud), son aplicables para el cumplimiento del presente manual.
- 2.1.3 Para establecer niveles de bioseguridad aceptables dentro del laboratorio, se recomienda manejar todas las muestras de sangre, suero o cerebro como material potencialmente infectante, es decir, capaz de transmitir agentes patógenos.
- 2.1.4 Se deben aplicar las medidas de bioseguridad pertinentes, especialmente las referidas al ambiente, el personal, el vestido, las muestras y su procesamiento y la esterilización terminal.
- 2.1.5 Es responsabilidad de la dirección del laboratorio establecer una organización para garantizar la seguridad en todas sus áreas, mediante la aplicación de normas y procedimientos de seguridad, claramente detallados por escrito.
- 2.1.6 La administración del establecimiento de salud debe dar las facilidades para que las normas de bioseguridad se cumplan.
- 2.1.7 El virus rábico ha sido aislado de cerebro, cerebelo, saliva y terminaciones nerviosas de las cavidades nasal y oral, papilas gustativas, glándulas adrenales, páncreas, riñón, músculo cardíaco, grasa parda, foliculos pilosos, retina y córnea. Al obtener y procesar cualquier tipo de muestra en el laboratorio se deben tomar las precauciones universales, ya que se desconoce el tipo de agente infeccioso presente.
- 2.1.8. El principal peligro es la exposición directa del material contaminado a las membranas mucosas o piel cortada del personal, o por pinchazo accidental con una aguja con este material.

2.2 PRINCIPALES MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

- 2.2.1 Todo personal que trabaja en el laboratorio, sala de animales inoculados y otros ambientes que tengan contacto con el virus de la rabia debe ser vacunado con el esquema de pre-exposición (3 dosis a los 0, 7 y 21 días utilizando la vacuna tipo CRL).
- 2.2.2 Todas las muestras deben ser tratadas como altamente infecciosas para evitar posibles contaminaciones.

- 2.2.3 El ingreso al laboratorio debe estar restringido
- 2.2.4 Siempre debe utilizarse un mandil limpio y de mangas largas en la zona de trabajo. El guardapolvo no debe salir de la zona de laboratorio, salvo para ser lavado.
- 2.2.5 No se debe pipetear con la boca
- 2.2.6 Está prohibido comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicarse cosméticos en el laboratorio
- 2.2.7 El cabello largo debe usarse recogido
- 2.2.8 Lavarse las manos luego de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio
- 2.2.9 Utilizar protección para las mucosas (mascarillas y lentes de seguridad) cuando el procedimiento pueda generar salpicaduras y/o aerosoles.
- 2.2.10 Utilizar guantes descartables y opcionalmente mascarillas en el trabajo de improntas
- 2.2.11 Trabajar de manera tal que se minimice la formación de aerosoles
- 2.2.12 Nunca expeler el aire de la jeringa conteniendo una suspensión de virus rábico directamente al ambiente.
- 2.2.13 Las cortaduras o rasguños en las manos deben cubrirse y protegerse adecuadamente
- 2.2.14 Utilizar zapatos protectores que cubran completamente los pies (No usar zapatos abiertos)
- 2.2.15 El operador debe descontaminar las superficies de trabajo antes y después de cada actividad o en caso de derrame de material contaminado.
- 2.2.16 Los reactivos deben estar rotulados con letra clara, indicando la fecha de formulación
- 2.2.17 El laboratorio debe tener a disposición un equipo de primeros auxilios
- 2.2.18 Informar inmediatamente cualquier accidente al jefe del laboratorio y al comité de bioseguridad
- 2.2.19 Todos los desechos del laboratorio deben descontaminarse adecuadamente antes de eliminarse, ya sea en solución desinfectante, autoclavados (a 121° C durante 20 minutos) o incinerados.
- 2.2.20 Limpiar diariamente los pisos con solución desinfectante
- 2.2.21 El personal del laboratorio seguirá las instrucciones de manejo de los equipos e instrumentales, sin utilizar la fuerza o presión excesiva para evitar posibles accidentes.

SECCIÓN 3

PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS

El diagnóstico laboratorial de rabia *post mortem* es realizado en muestras de cerebro y cerebelo. Sin embargo, para que el diagnóstico sea correcto, la muestra debe llegar al laboratorio en buen estado, esto implica que los miembros del equipo de salud involucrados entiendan la naturaleza crítica de mantener la muestra en condiciones apropiadas. Por otro lado, para realizar el diagnóstico *in vivo* se requiere de muestras de suero, saliva y biopsia de piel de nuca. Los resultados de las pruebas del diagnóstico *in vivo* solo son confirmatorios cuando son positivos.

3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CEREBRO, CEREBELO Y MÉDULA DE ANIMALES PEQUEÑOS

3.1.1 Objetivo

Establecer y uniformizar el procedimiento de obtención de muestras de cerebro, cerebelo y médula de animales pequeños (murciélagos, ratones, hamsters, etc.) para realizar el diagnóstico del virus rábico.

3.1.2 Materiales y equipos

- 3.1.2.1 Bisturí o cuchillo afilado
- 3.1.2.2 Tijera de disección
- 3.1.2.3 Pinzas diente de ratón
- 3.1.2.4 Placa petri
- 3.1.2.5 Guantes de cirugía
- 3.1.2.6 Mandil
- 3.1.2.7 Recipiente con desinfectante (solución jabonosa)

3.1.3 Procedimiento

- 3.1.3.1 Sujetar con una pinza diente de ratón la piel de la parte posterior de la cabeza y realizar un corte con la tijera aperturando la piel, para luego extender el corte longitudinalmente hasta la altura de las órbitas de los ojos.
- 3.1.3.2. Sujetar con la pinza diente de ratón la cabeza del animal tomándolo por las órbitas y penetrar por la parte posterior del cráneo con la punta de la tijera, cortando alrededor del cráneo.
- 3.1.3.3. Retirar la tapa del cráneo, dejando de esta manera expuesto el cerebro
- 3.1.3.4. Con la tijera a medio abrir, levantar el cerebro cortando la base, teniendo la seguridad de incluir el cerebelo al momento de retirar la masa encefálica.
- 3.1.3.5. Rotular la muestra con el código correspondiente

3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CEREBRO, CEREBELO Y MÉDULA DE ANIMALES MEDIANOS

3.2.1 Objetivo

Establecer y uniformizar el procedimiento de obtención de muestras de cerebro, cerebelo y médula de animales medianos (perros, gatos, etc.) para realizar el diagnóstico del virus rábico.

3.2.2 Materiales y equipos

- 3.2.2.1 Bisturí o cuchillo afilado
- 3.2.2.2 Mango y hoja de sierra
- 3.2.2.3 Tijera de disección
- 3.2.2.4 Pinzas diente de ratón
- 3.2.2.5 Placa petri
- 3.2.2.6 Frascos de plástico con tapa hermética
- 3.2.2.7 Guantes de jebe grueso
- 3.2.2.8 Mandil de hule
- 3.2.2.9 Mascarilla
- 3.2.2.10 Recipiente con desinfectante (solución jabonosa)

3.2.3 Procedimiento

- 3.2.3.1 Sujetar firmemente la cabeza del animal sobre la mesa, si fuera posible con la ayuda de algún dispositivo mecánico. Un método simple consiste en utilizar una madera de 30x40x3 cm con dos agujeros, por cuyo interior se colocará un alambre que sujete firmemente el hocico del animal (Figura N° 3 y Anexo A).

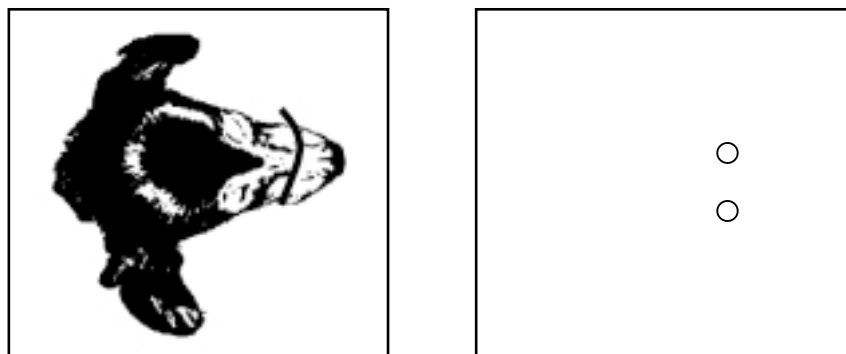


Figura N°3. Dispositivo de sujeción simple para la obtención de una muestra de cerebro de can

- 3.2.3.2 Realizar una incisión profunda a lo largo de la línea media del cráneo, empezando por delante y encima de los ojos hasta la base del cráneo o cuello, a través de la piel, fascia y músculo.
- 3.2.3.3 Separar la piel lo máximo posible, exponiendo los músculos temporales que están adosados al cráneo
- 3.2.3.4 Cortar los músculos temporales y levantarlos lateralmente para exponer el cráneo
- 3.2.3.5 Realizar cuatro cortes al cráneo con la sierra: un corte transversal inmediatamente por detrás de la órbita ocular, un corte transversal en la base del occipital y dos cortes longitudinales en ambos parietales uniendo los cortes anteriores.
- 3.2.3.6 Levantar la tapa del cráneo y exponer el cerebro
- 3.2.3.7 Cortar las meninges, con ayuda de una pinza levantar el cerebro hasta llegar al bulbo y cortar a ese nivel, retirando de esta manera el cerebro.
- 3.2.3.8 Rotular la muestra con el código correspondiente

3.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CEREBRO, CEREBELO Y MÉDULA DE ANIMALES GRANDES

3.3.1. Objetivo

Establecer y uniformizar el procedimiento de obtención de muestras de cerebro, cerebelo y médula de animales grandes (equinos, bovinos, etc.) para realizar el diagnóstico del virus rábico.

3.3.2 Materiales y equipos

- 3.3.2.1 Bisturí o cuchillo afilado
- 3.3.2.2 Tijera de disección
- 3.3.2.3 Mango y hoja de sierra
- 3.3.2.4 Pinzas diente de ratón
- 3.3.2.5 Placa petri
- 3.3.2.6 Guantes gruesos de jebe
- 3.3.2.7 Mandil simple y de hule
- 3.3.2.8 Recipiente con desinfectante (solución jabonosa)

3.3.3. Procedimiento

- 3.3.3.1 Sujetar firmemente la cabeza del animal a una superficie de trabajo
- 3.3.3.2 Realizar una incisión profunda a lo largo de la línea media del cráneo, empezando por delante y encima de los ojos hasta la base del cráneo o cuello, a través de la piel, fascia y músculo.

- 3.3.3.3 Separar la piel lo máximo posible, exponiendo los huesos del cráneo
- 3.3.3.4 Realizar cuatro cortes al cráneo con una sierra, asegurándose de atravesar todo el cráneo: un corte transversal inmediatamente detrás de los cuernos, dos cortes longitudinales al lado izquierdo y derecho del hueso frontal y un corte transversal encima de los ojos uniendo los dos cortes anteriores.
- 3.3.3.5 Levantar la tapa del cráneo con un desarmador para exponer las meninges y el cerebro
- 3.3.3.6 Cortar las meninges, levantar el cerebro y colocarlo en un papel absorbente limpio
- 3.3.3.7 Retirar porciones (del tamaño del cerebro de un can) de corteza, cerebelo, asta de Ammon y médula, y depositarlas en una placa petri o en envases primarios para su envío respectivo.
- 3.3.3.8 Rotular la muestra con el código correspondiente

SECCIÓN 4

CONSERVACIÓN, EMBALAJE Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

4.1 CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 4.1.1 Con el propósito de conservar la muestra por varios días y remitirla al laboratorio se procederá a depositar el cerebro y cerebelo del can en un recipiente de plástico resistente, hermético y de boca ancha, conteniendo 50% de glicerina y 50% de solución fisiológica estéril, agua destilada o agua hervida, en último caso. En caso de animales mayores, se tomarán porciones de un tamaño semejante al cerebro de un can.
- 4.1.2 Las muestras de cerebro y cerebelo que se encuentren en el laboratorio, que no puedan ejecutarse el mismo día y no estén conservadas en glicerina, se podrán conservar a -20°C o menor temperatura. Sin embargo, es necesario evitar congelaciones y descongelaciones repetidas ya que esto aumenta su deterioro.
- 4.1.3 No usar formol, ni alcohol para la conservación de la muestra, ya que esto hace insatisfactoria la prueba de inmunofluorescencia.

4.2 EMBALAJE

- 4.2.1 Para el embalaje de las muestras se deberá emplear en lo posible el sistema de triple envase:
- 4.2.1.1 Recipiente primario: recipiente de plástico, impermeable, con tapa rosca hermética, etiquetado, que contiene el espécimen y que se envolverá en material absorbente (toallas, algodón hidrófilo o celulosa) en cantidad suficiente.
- 4.2.1.2 Recipiente secundario: recipiente resistente, impermeable, a prueba de filtraciones, que encierra y protege el (los) recipiente(s) primario(s). Cuando se colocan varios recipientes primarios dentro de uno secundario, los primarios deberán ser envueltos en forma individual. Se debe usar suficiente material absorbente para proteger todos los recipientes primarios y evitar los choques entre ellos.
- 4.2.1.3 Recipiente terciario o envoltura exterior de envío: envoltura de envío que protege el recipiente secundario de elementos externos, tales como daños físicos, agua y de posibles manipulaciones. Debe ser de material suficientemente sólido como para asegurar su protección (Ejemplo: caja de tecnoport forrada con cartón). A él irán adheridas las señas del destinatario y del remitente, así como los adhesivos que exija el transportista sobre su contenido: etiqueta de sustancia infecciosa o de sustancia biológica perecedera. Además, irán adheridos los oficios y fichas que identifican al animal, dueño, procedencia y responsable del envío.
- 4.2.2. Marcado del embalaje**
- 4.2.2.1 Cada bulto de embalaje que contenga material biológico peligroso debe estar marcado legiblemente en la parte exterior con lo siguiente:
- a. Nombre de expedición del contenido. Ejemplo: sustancias infecciosas que afectan a humanos

- b. Nombre, dirección del expedidor y destinatario
- c. Nombre y número de teléfono de la persona responsable del envío
- d. Una etiqueta, en forma de diamante (100 mm x 100 mm), que en la parte inferior debe llevar escrito las palabras "SUSTANCIA INFECCIOSA".

4.2.3 Requisitos de documentación

- 4.2.3.1 Las muestras se enviarán individualmente rotuladas, indicando el número de muestra y su procedencia.
- 4.2.3.2 Además del oficio de solicitud de atención, cada muestra deberá poseer una ficha epidemiológica con los datos mínimos (procedencia, especie, dueño del animal, vacunación, número de muestra y nombre y número telefónico de la persona responsable del envío. Ver Anexos B y C).

4.3 TRANSPORTE

- 4.3.1 Elegir el itinerario más directo, con el menor número de transbordos y esperas de tránsito. Se procurará que el envío no llegue sábado, domingo o días feriados.
- 4.3.2 Es conveniente que el personal de laboratorio y el que recepcionará las muestras sepan con antelación la procedencia y el número de muestras que recibirán, con la finalidad de evitar muestras perdidas o en paradero desconocido.

SECCIÓN 5

MICROSCOPIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

5.1 FUNDAMENTO

- 5.1.1 La función del microscopio de fluorescencia es proveer luz necesaria para excitar un colorante fluorescente y luego transmitir esta luz al observador. En inmunofluorescencia, el colorante más utilizado es el isotiocianato de fluoresceína (ITCF), debido a su gran afinidad por las proteínas (globulinas).
- 5.1.2 Para entender el fundamento de esta técnica es necesario conocer el fenómeno que ocurre cuando un compuesto es irradiado con energía luminosa. Al irradiar el colorante ITCF, la energía excita las moléculas, desubicando los electrones de los átomos de su núcleo central (absorción de energía). Como el ITCF es un compuesto luminiscente, emitirá nuevamente energía luminosa en forma de luz visible de una longitud de onda más larga.
- 5.1.3 Para el diagnóstico de rabia se emplea este principio, utilizando un microscopio de fluorescencia que presenta una fuente de iluminación de luz ultravioleta y mediante un sistema de lentes y filtros se amplifica la imagen de la reacción del compuesto marcado con ITCF con el antígeno. Para realizar la observación es necesario contar con una habitación poco iluminada (“cuarto oscuro”).

5.2 OBJETIVO

Establecer los procedimientos a seguir para el empleo y mantenimiento del microscopio de fluorescencia

5.3 MATERIALES

- 5.3.1 Microscopio de fluorescencia (epifluorescente)
- 5.3.2 Aceite de inmersión no fluorescente (Merck) o glicerina pura
- 5.3.3 Lámina control positiva (coloreada con ITCF)

5.4 PROCEDIMIENTOS DE USO

- 5.4.1 Antes de encender el microscopio, verificar que los objetivos y oculares estén limpios. Si es necesario, limpiar con papel lente seco. Nunca tocar los lentes con los dedos.
- 5.4.2 Enchufar el microscopio y encender la fuente de poder (algunos microscopios poseen un indicador de prendido). El encendido debe realizarse de 3 a 5 minutos antes de iniciar cada sesión de lectura, para permitir que la lámpara emita energía con adecuada intensidad.
- 5.4.3 Colocar la lámina porta-objeto coloreada en la platina, sin tocar el objetivo
- 5.4.4 Enfocar el campo con el objetivo de 40X, utilizando el macrométrico, evitando que la lámina toque al objetivo. Con el micrométrico, enfocar para lograr una imagen clara.

5.4.5 Mover el sistema, agregar aceite de inmersión no fluorescente o glicerina pura y enfocar con el objetivo de 100X.

5.4.6 Ubicarse en el extremo superior izquierdo, recorrer la lámina a la derecha y luego hacia abajo recorriendo ordenadamente toda la lámina.

5.5 PROCEDIMIENTOS DE MANTENIMIENTO

5.5.1 El microscopio presenta una lámpara de mercurio, la cual debe encenderse en una sola sesión de lectura debido a que cada encendido equivale a 3 horas de vida de la lámpara. Cuando la intensidad de luz disminuye notoriamente es necesario cambiar la lámpara por otra, de acuerdo a los siguientes pasos:

5.5.1.1 Desconectar el equipo y dejar enfriar la lámpara a temperatura ambiente (caso contrario, existe el peligro de explosión).

5.5.1.2 Abrir la caja que contiene la lámpara y retirarla aflojando los tornillos ubicados en ambos lados.

5.5.1.3 Coger la nueva lámpara por los extremos (sin tocar el bulbo con los dedos) y colocarla en la caja portadora ajustando en ambos lados.

5.5.1.4 Cerrar adecuadamente la caja portadora.

5.5.1.5 Si hubieran manchas en la superficie de la lámpara, limpiarla con un algodón embebido en alcohol.

5.5.1.6 Los objetivos y oculares se limpiarán al inicio y término de cada sesión de lectura con bencina ligera o alcohol, para remover las manchas y/o el aceite de inmersión.

5.5.1.7 Proteger el equipo contra temperaturas superiores a 50°C, humedad, sustancias químicas y contra el polvo, utilizando fundas protectoras de tela.

SECCIÓN 6

ENSAYOS O ANÁLISIS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA

6.1 RESUMEN DE LOS ENSAYOS (Anexo D)

- 6.1.1 Para el diagnóstico de rabia se emplean dos pruebas de rutina: la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) y la prueba biológica de inoculación en ratones (IR). Ambas pruebas poseen una alta sensibilidad y especificidad.
- 6.1.2 La prueba de IFD es una prueba rápida, con alta sensibilidad y que permite obtener resultados en unas pocas horas. Por el contrario, la prueba de IR posee una mayor especificidad, pero los resultados se obtienen en 21 días, además que confirma el diagnóstico de pruebas negativas por IFD.
- 6.1.3 En la prueba de IFD es necesario titular el conjugado antirrábico, buscando encontrar la dilución óptima de éste.
- 6.1.4 De acuerdo a las recomendaciones del Comité de Expertos de Rabia de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un diagnóstico positivo en cualquiera de las dos pruebas es concluyente.
- 6.1.5 La prueba de seroneutralización (neutralización del suero) en ratones es un procedimiento serológico que se utiliza para determinar si una persona o un animal está protegido contra la rabia.

6.2 PRINCIPIO Y UTILIDAD DEL ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

La IFD, debido a su rapidez y sencillez, es la primera prueba que se utiliza para el diagnóstico de rabia. Si el resultado de la prueba es negativo, se procederá a realizar la inoculación en ratones. La prueba de IFD detecta el antígeno rábico de la impronta mediante el uso del conjugado antirrábico que contiene globulinas marcadas con ITCF.

6.3 PRINCIPIO Y UTILIDAD DEL ENSAYO DE INOCULACIÓN EN RATONES

La prueba de inoculación en ratones es una técnica sencilla, basada en procedimientos rigurosos. Esta inoculación se realiza en ratones debido a su alta susceptibilidad al virus rábico y se manifiesta con una sintomatología clásica (erizamiento, parálisis, postración y muerte). Una vez muerto el animal se procede a realizar la prueba de IFD para determinar si la muestra inoculada es positiva a rabia.

6.4 PRINCIPIO Y UTILIDAD DEL ENSAYO DE SERONEUTRALIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIRRÁBICOS

La prueba de neutralización del suero en ratones es un procedimiento serológico que se utiliza para determinar si una persona o un animal está protegido contra la rabia. Este método determina la cantidad de anticuerpos presentes en el suero y se basa en la neutralización de una serie de diluciones de suero con una dosis constante de un virus de desafío previamente titulado. Los resultados son expresados en términos de títulos serológicos, definidos como la dilución más elevada que neutraliza una cantidad estándar de virus.

SECCIÓN 7

TITULACIÓN DEL CONJUGADO ANTIRRÁBICO

7.1 EXPLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- 7.1.1 El Laboratorio de Referencia Nacional de Rabia del Instituto Nacional de Salud produce el conjugado antirrábico desde el año 1996, el que es distribuido anualmente a la Red Nacional de Laboratorios.
- 7.1.2 El conjugado antirrábico es un reactivo del suero de animales hiperinmunizados con vacuna antirrábica
- 7.1.3 El conjugado antirrábico debe ser titulado en cada laboratorio a fin de utilizarse en la dilución óptima que asegure un diagnóstico eficiente.
- 7.1.4 Para titular el conjugado antirrábico es necesario realizar diluciones seriadas. En cada dilución se tiñen láminas controles positivas y negativas, las que se observan al microscopio de inmunofluorescencia buscando determinar la dilución óptima de trabajo.
- 7.1.5 Las condiciones a evaluar en un conjugado son las siguientes:
 - 7.1.5.1 Intensidad específica: es la intensidad del brillo fluorescente
 - 7.1.5.2 Cantidad de inclusiones: capacidad de detectar la cantidad de inclusiones o pequeñas partículas de virus rábico fluorescente.
 - 7.1.5.3 Coloración de fondo: capacidad de mantener una imagen en la que exista un buen contraste

7.2 OBJETIVO

Determinar experimentalmente la dilución óptima de trabajo

7.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

- 7.3.1 Láminas pavonadas en un extremo (75 x 25 mm)
- 7.3.2 Conjugado antirrábico
- 7.3.3 Tubos 12 x 75 mm
- 7.3.4 Coplin con acetona
- 7.3.5 Solución salina tamponada (PBS), pH 7,2-7,4
- 7.3.6 Suspensión de cerebro de ratón normal al 20%(CRN)
- 7.3.7 Suspensión de cepa estándar de desafío al 20% (CVS)
- 7.3.8 Aceite de inmersión (MERCK) ND 1,515 o glicerina pura

- 7.3.9 Cámara húmeda
- 7.3.10 Micropipeta de 1000 μ L
- 7.3.11 Reloj o timer
- 7.3.12 Agua destilada
- 7.3.13 Microscopio de inmunofluorescencia
- 7.3.14 Balanza
- 7.3.15 Potenciómetro
- 7.3.16 Incubadora de 37°C

7.4 PROCEDIMIENTO

- 7.4.1 Leer las instrucciones del conjugado sobre el título encontrado por el fabricante. El siguiente procedimiento toma las diluciones para el caso de un conjugado con título 1/80.
- 7.4.2 Tomar dos tubos de ensayo 12 x 75 mm y rotularlos 1/10 CRN y 1/10 CVS. De la misma manera, tomar ocho tubos de ensayo para las diluciones: 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160.
- 7.4.3 Tomar dos láminas pavonadas y rotularlas 1/10p y 1/10n. De la misma manera, tomar ocho láminas y rotularlas para las diluciones: 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160.
- 7.4.4 En cada una de las 5 láminas rotuladas (1/10p, 1/20p, 1/40p, 1/80p y 1/160p), realizar dos impresiones de un cerebro **positivo** a rabia.
- 7.4.5 En cada una de las otras 5 láminas rotuladas (1/10n, 1/20n, 1/40n, 1/80n y 1/160n), realizar dos improntas a cada lado de la lámina de un cerebro **negativo** a rabia.
- 7.4.6 Colocar las 10 láminas en un coplin con acetona y llevarlas al freezer (-20°C) por 20 minutos
- 7.4.7 Agregar 0,9 mL de CRN al primer tubo y 0,2 mL al segundo, tercero, cuarto y quinto tubo
- 7.4.8 Agregar 0,1 mL de conjugado antirrábico al primer tubo con el CRN, agitar y pasar 0,2 mL al segundo tubo. Descartar el tip, agitar y tomar 0,2 mL del segundo tubo y agregarlo al tercer tubo, y así sucesivamente, obteniendo de esta manera las diluciones 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160.
- 7.4.9 Proceder de la misma forma con el CVS
- 7.4.10 Agregar una gota del tubo conteniendo conjugado con CRN 1/10 a la lámina marcada 1/10 en la impronta cercana al borde pavonado de las láminas positivas y negativas. Proceder de la misma forma con las otras 4 diluciones.

- 7.4.11 Agregar una gota del tubo conteniendo conjugado con CVS 1/10 a la lámina marcada 1/10 en la impronta alejada del borde pavonado de las láminas positivas y negativas. Proceder de la misma forma con las otras diluciones.
- 7.4.12 Incubar los porta-objetos en una cámara húmeda a 37°C por 30 minutos
- 7.4.13 Retirar las láminas y sumergirlas en PBS por 10 minutos
- 7.4.14 Enjuagar con agua destilada
- 7.4.15 Dejar secar los porta-objetos a temperatura ambiente (20°C-25°C)
- 7.4.16 Colocar una gota de aceite de inmersión (sin fluorescencia) o glicerina pura y observar a 100X

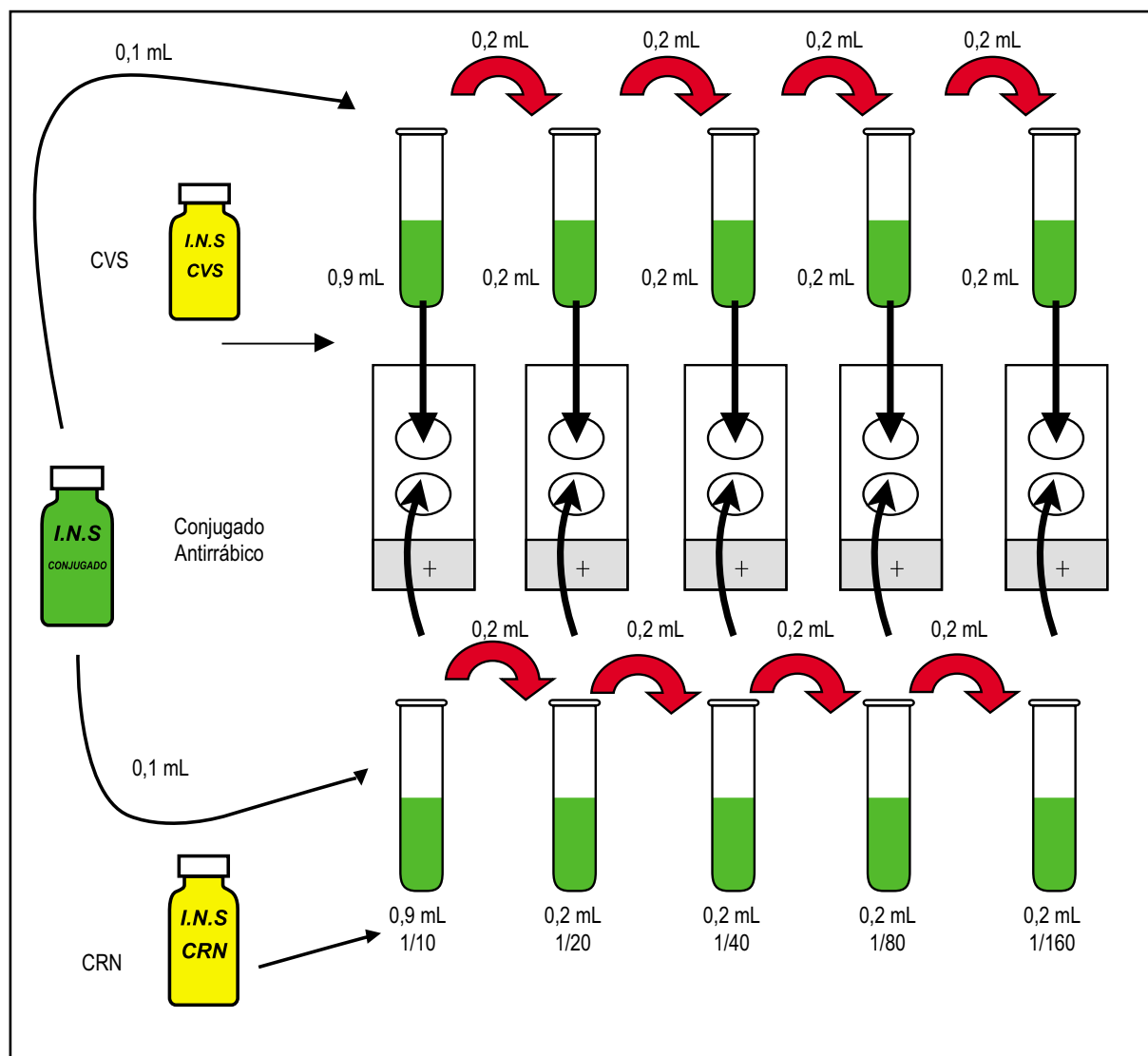


Figura N° 4. Esquema de la titulación de conjugado antirrábico

7.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 7.5.1 La dilución ideal de conjugado es la más alta dilución con una intensidad de 4+ en la impronta con CRN, una coloración de fondo con 0+ y con una cantidad de inclusiones de 4+. En la impronta correspondiente con CVS no se deberá observar fluorescencia.
- 7.5.2 Si el título del conjugado fuera de 1/50 se procederá a calcular la primera dilución de almacenamiento dividiendo el denominador entre 5 ($50/5=10$). Se diluye entonces el conjugado 1/10 con agua destilada estéril y se distribuye 300 μ L en frasquitos o viales conservándolos a una temperatura $\leq 20^{\circ}\text{C}$. La siguiente dilución será 1/5 y para esto se utilizará 1,2 mL de CRN y CVS, logrando una dilución final de 1/50.

7.6 PRECAUCIONES A TENER EN CUENTA

- 7.6.1 No hay disminución de fluorescencia en la impronta que contiene el CVS + conjugado o la impronta que contiene el CRN + conjugado.
Recomendación: Ante la presencia de precipitado o fluorescencia inespecífica, proceder a centrifugar el conjugado (5,000 x 10 minutos).
- 7.6.2 Las láminas positivas se trabajarán con no más de una semana de preparación. Ello debido a la pérdida de fluorescencia.
- 7.6.3 El CRN y el CVS deberán centrifugarse ligeramente antes de su utilización (1500 r.p.m. x 10 minutos).
- 7.6.4 El CRN puede ser reemplazado por agua destilada
- 7.6.5 La acetona que se emplee en las pruebas podrá ser reutilizada siempre y cuando sea filtrada y no muestre una coloración amarillenta.
- 7.6.6 Los porta-objetos no deberán poseer un fondo verdoso porque no ofrecen un buen contraste
- 7.6.7 Se deberá tener cuidado de que el CRN + conjugado no se mezcle con el CVS + conjugado
- 7.6.8 La prolongada observación microscópica de la muestra disminuye la fluorescencia. No exponer cada campo por más de 5 segundos.
- 7.6.9 Asegurar que el microscopio de inmunofluorescencia (filtros, objetivos, oculares y lámpara) esté en buenas condiciones. La lámpara deberá estar debidamente centrada, para esto será conveniente utilizar un control positivo para constatar el correcto funcionamiento del microscopio. Leer el manual de instrucciones del microscopio.

SECCIÓN 8

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO RÁBICO

8.1 PRINCIPIO Y UTILIDAD

La técnica de inmunofluorescencia directa está basada en la reacción antígeno-anticuerpo que ocurre al enfrentarse la impronta positiva (antígeno) con el conjugado antirrábico (anticuerpos). Esta reacción puede ser detectada mediante la luz ultravioleta del microscopio de inmunofluorescencia.

8.2 ESQUEMA Y SIMBOLOGÍA

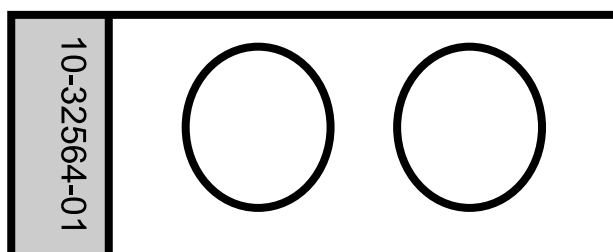


Figura N° 5. Esquema de lámina de IFD para rabia

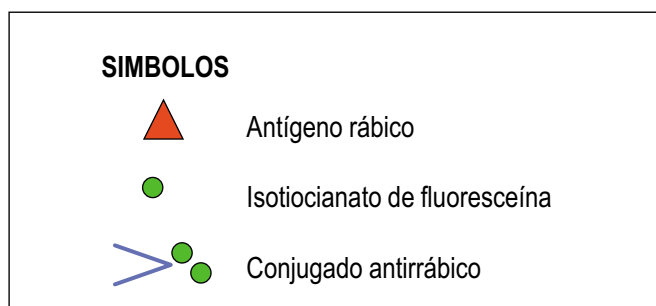


Figura N° 6. Simbología empleada en la técnica de inmunofluorescencia

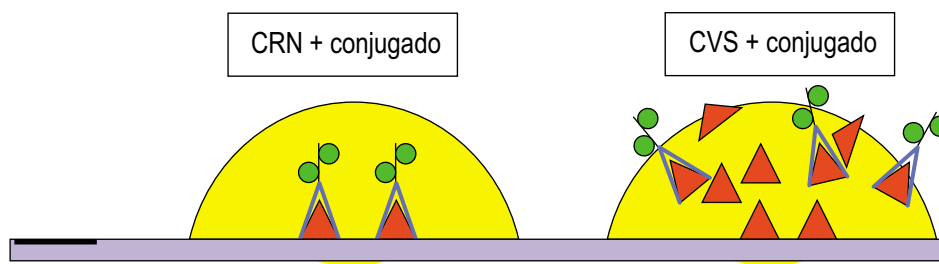
8.3 FUNDAMENTO

8.3.1 Si las improntas de cerebro y cerebelo contienen virus rábico, el resultado de la prueba será positiva

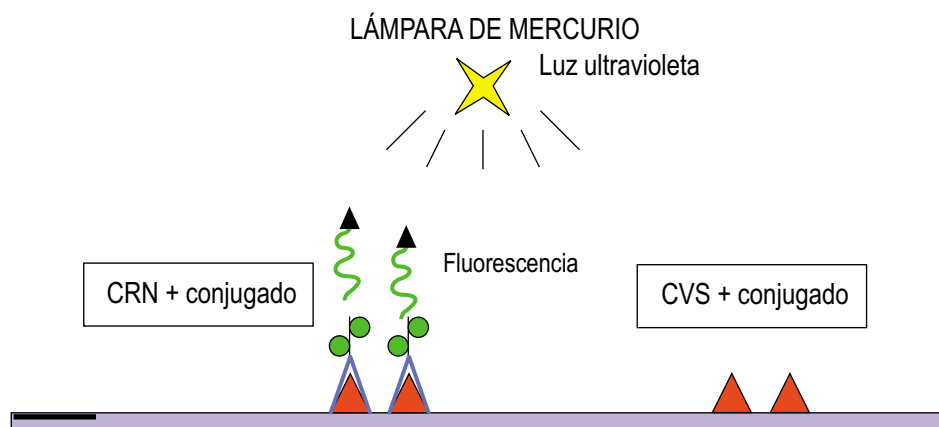


8.3.2 El antígeno está fijado y permeabilizado. Se añade una gota de conjugado antirrábico + CRN a la impronta cercana al lado pavorado y otra gota de conjugado antirrábico + CVS a la impronta alejada

del lado pavonado. Luego, se incuban los porta-objetos a 37°C por 30 minutos. Si la impronta tiene antígeno rábico, se unirá el conjugado antirrábico + CRN a la impronta del lado izquierdo, formando el complejo antígeno-anticuerpo. En la impronta que contiene el conjugado + CVS no se unirán los anticuerpos a la impronta porque ya están tomados por el CVS. Estos complejos conjugado + CVS serán retirados durante los lavados con el PBS.



8.3.3 La unión del conjugado antirrábico al antígeno rábico es detectada mediante la excitación de la luz ultravioleta que se observa por la fluorescencia de color verde limón emitida por el fluorocromo (FITC).



8.4 MATERIALES Y REACTIVOS

- 8.4.1 Solución salina tamponada, pH 7,2-7,4
- 8.4.2 Conjugado antirrábico diluido 1/5 con CRN al 20%
- 8.4.3 Conjugado antirrábico diluido 1/5 con CVS al 20%
- 8.4.4 Acetona Q.P.
- 8.4.5 Aceite de inmersión (Merck) ND 1,515 o glicerina pura
- 8.4.6 Porta-objetos pavonados en un extremo
- 8.4.7 Pipeta de transferencia o gotero

8.4.8 Agua destilada

8.4.9 Beaker de 1000 mL

8.5 PROCEDIMIENTO

8.5.1 Examen y lavado de la muestra

8.5.1.1 Luego de desembalar y verificar la codificación de las muestras se procede a codificar las fichas con el código del laboratorio y el respectivo día de procesamiento, así como su ingreso en el registro de muestras para diagnóstico de rabia (Anexo E).

8.5.1.2 Si la muestra fue remitida conteniendo glicerina 50%, se procederá a realizar un lavado utilizando suero fisiológico (solución salina estéril 0,09%).

8.5.1.3 Colocar el cerebro y cerebelo en una placa petri y llevar a una mesa de trabajo

8.5.1.4 Realizar con la tijera un corte longitudinal al nivel de la primera circunvolución caudal cortando paralelamente a la línea que divide ambos hemisferios. El corte se extenderá de 3 a 5 cm hacia delante, profundizándose hasta ubicar el ventrículo lateral a nivel de una estructura de color blanco nacarado en forma de cuerno, que sobresale lateralmente del suelo del ventrículo. Esta estructura es el hipocampo o asta de Ammon, que al corte transversal muestra una estructura típica de contorno espiralado ("pionono").

8.5.1.5 Se realizarán dos cortes más, uno a nivel de la corteza cerebral y otro en el cerebelo, siempre procurando coger la sustancia gris con un espesor de 3 a 4 mm.

8.5.1.6 Realizar dos láminas de la corteza, asta de Ammon y cerebelo en el caso de animales menores (felinos y caninos). Para el caso de animales mayores (bovinos) se realizarán cuatro láminas de las mismas zonas, con especial interés en el cerebelo.

8.5.1.7 Los cortes de cada una de las estructuras se colocan sobre una tira de papel secante o filtro y éste sobre un bajalengua.

8.5.1.8 Tomar un porta-objeto limpio y colocarlo con el bajalengua, formando una cruz. Realizar dos impresiones en cada lámina procurando que la impronta no sea muy gruesa. Si la impronta fuera muy gruesa, se podrá adelgazar presionando la impronta sobre el papel filtro.

8.5.1.9 Colocar las láminas secas en un coplin con acetona fría (-20°C) por un mínimo de 30 minutos.

8.5.1.10 Una vez seca la impronta, se procederá a delinear los bordes de ambas improntas con un corrector líquido (liquid paper).

8.5.1.11 Diluir el conjugado antirrábico previamente titulado 1/5 con la suspensión de CRN o agua destilada

8.5.1.12 Diluir el conjugado antirrábico con la suspensión de CVS 1/5

8.5.1.13 Agregar una gota de la mezcla del CRN + conjugado a la impronta más cercana del extremo pavonado o que contenga el código.

- 8.5.1.14 Agregar una gota de la mezcla del CVS + conjugado a la impronta más alejada del extremo pavonado
- 8.5.1.15 Llevar a la estufa a 37°C por 30 minutos
- 8.5.1.16 Lavar con solución salina tamponada pH 7,2-7,4 y dejar reposar por 10 minutos
- 8.5.1.17 Lavar con agua destilada
- 8.5.1.18 Dejar secar y observar a 100X con aceite de inmersión o glicerina pura, sin colocar laminilla a la impronta
- 8.5.1.19 La observación de las láminas se iniciará en el extremo superior izquierdo y proseguirá hacia la derecha y luego hacia abajo, asegurando la observación ordenada de toda la impronta.

8.6 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 8.6.1 **Lámina control positivo:** La impronta teñida con CRN + conjugado muestra un campo oscuro con células nerviosas, en cuyo interior o exterior, se observan estructuras redondeadas (corpúsculos rábicos) o pequeños puntos de color verde limón (Figura N° 7). En el lado de la impronta teñida con CVS + conjugado, no deberá observarse fluorescencia de color verde limón.
- 8.6.2 **Lámina control negativo:** Ambas improntas no mostrarán ningún tipo de fluorescencia.
- 8.6.3 **Láminas problema:** Si la lámina se asemeja al control positivo, significará que la muestra es positiva; si se asemeja al control negativo, significa que la muestra es negativa, hasta que se emita el resultado de inoculación en ratones.

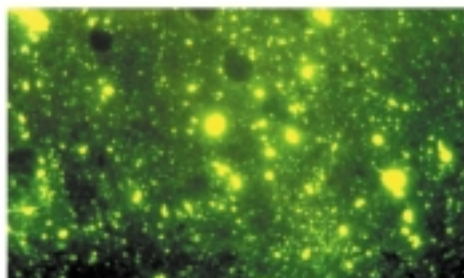


Figura N° 7. Fotografía microscópica de una impronta de cerebro positivo a rabia marcada con conjugado antirrábico. (Fotografiada por R López, Laboratorio de Referencia Nacional de Rabia)

8.7 PRECAUCIONES

- 8.7.1 Cuando las muestras contienen glicerina 50% en agua destilada se lavará con solución salina fisiológica 0,09% por 5 a 10 minutos, pudiéndose utilizar agua destilada.
- 8.7.2 Si la muestra contiene preservantes como alcohol o formol, descartarla y obtener -en lo posible- una nueva muestra que reúna las condiciones indicadas.
- 8.7.3 Si la muestra está demasiado contaminada (al punto de liquefacción), descartarla y avisar al remitente.

8.8 PROBLEMAS EN LA FLUORESCENCIA

- 8.8.1 La lámina control positivo de la impronta de CRN + conjugado no presenta fluorescencia.
Explicación: La lámina tiene muchos días de preparación. En este caso es necesario volver a preparar láminas control.
- 8.8.2 La impronta de CVS + conjugado presenta fluorescencia en la lámina control positivo.
Explicación: El CVS ha bajado su título y ya no inhibe a los anticuerpos coloreados del conjugado.
- 8.8.3 La impronta de CRN + conjugado y la del CVS + conjugado presentan fluorescencia en la lámina control negativo.
Explicación: Presencia de precipitado o fluorescencia inespecífica. Observe si la morfología es irregular debido a las sales de fluoresceína.
- 8.8.4 En la lámina problema la impronta de CRN + conjugado y la del CVS + conjugado presentan fluorescencia.
Explicación: Posible contaminación bacteriana. Observe la morfología característica de bacilos o coco bacilos. Pudiera ser también conjugado inespecífico que se presenta en forma de cristales. En estos casos, centrifugue el conjugado para eliminar la coloración inespecífica.

SECCIÓN 9

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

9.1 LÁMINAS CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO

- 9.1.1 Retirar un cerebro positivo y otro negativo a rabia del congelador y realizar cortes preferentemente del asta o cerebelo.
- 9.1.2 Rotular 10 láminas con la indicación "Control positivo" y 10 "Control negativo"
- 9.1.3 Realizar 10 láminas con dos impresiones por lámina con el cerebro positivo y 10 con el cerebro negativo
- 9.1.4 Fijar con acetona por 20 minutos a -20°C
- 9.1.5 Retirar las láminas de la acetona y almacenarlas congeladas en un porta-láminas de plástico, preferentemente a -70°C y, de no ser posible a -20°C . Se recomienda utilizar porta-objetos positivos con menos de 10 días de antigüedad.

9.2 CONJUGADO ANTIRRÁBICO

- 9.2.1 Mantener el conjugado a -20°C o si es posible a menor temperatura
- 9.2.2 Se recomienda fraccionar el conjugado en alícuotas (300 μL) para evitar que se formen precipitados inespecíficos o se contamine.

9.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA (PBS) 0,01M, pH 7,2 – 7,4

9.3.1 Fórmula (Tabla N°1)

Tabla N°1. Fórmulas para la preparación de solución salina tamponada (PBS) 0,01M, pH 7,2-7,4

	Fórmula para 1 litro	Fórmula para 9 litros
NaCl	8,5 g	76,5 g
K_2HPO_4	1,46 g	13,1 g
KH_2PO_4	0,23 g	2,04 g
Agua destilada	1L de agua destilada	9 L de agua destilada

9.3.2 Preparación

- 9.3.2.1 Pesar los reactivos y colocarlos en un matraz de 1000 mL
- 9.3.2.2 Agregar agua destilada y disolver completamente
- 9.3.2.3 Colocar la solución en frasco de 9 L y mezclar completamente
- 9.3.2.4 Tomar una alícuota y medir el pH que debe estar dentro del rango 7,2 – 7,4

9.3.2.5 Utilizar esta solución sin esterilizar en un lapso de dos semanas. Para almacenar por períodos mayores deberá procederse al autoclavado de la solución para evitar la formación de hongos.

9.4 PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE CEREBRO DE RATÓN NORMAL 20% (CRN)

9.4.1 Sacrificar un número apropiado de ratones albinos suizos de 3 o 4 semanas de edad o mayores con cloroformo en un envase hermético.

9.4.2 Extraer los cerebros de los ratones con doble juego de tijeras y pinzas estériles

9.4.3 Pesar los cerebros y triturarlos en un mortero estéril, agregando cuatro volúmenes de suero de caballo 2% en agua destilada. Este diluyente debe contener 1000 UI de penicilina y 2 mg de estreptomina por mL.

9.4.4 Centrifugar a 1500 r.p.m. por 10 minutos

9.4.5 Colectar el sobrenadante y distribuirlos en viales de 2 mL

9.4.6 Mantener la suspensión congelada o liofilizada

9.5 PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE CEREBRO DE RATÓN INFECTADO 20% (CVS)

9.5.1 Preparar una dilución 1/1000 del virus CVS (cepa estándar de desafío)

9.5.2 Inocular intracerebralmente un número apropiado de ratones albinos suizos de 3 semanas de edad con 0,03 mL de una suspensión del virus.

9.5.3 Al cabo de 6 a 7 días después de la inoculación y cuando la mayoría de animales estén postrados, sacrificarlos utilizando cloroformo.

9.5.4 Extraer los cerebros de los ratones con doble juego de tijeras y pinzas estériles

9.5.5 Pesar los cerebros y triturarlos en un mortero estéril

9.5.6 Agregar cuatro volúmenes de suero de caballo 2% en agua destilada. Este diluyente debe contener 1000 UI de penicilina y 2 mg de estreptomina por mL

9.5.7 Centrifugar a 1500 r.p.m. por 10 minutos en una centrifuga refrigerada

9.5.8 Colectar el sobrenadante y distribuirlo en viales de 2 mL

9.5.9 Mantener la suspensión congelada o liofilizada

9.5.10 Esta suspensión debe tener un título en ratón de por lo menos $10^5 DL_{50} / 0,03mL$

9.5.11 Por razones de seguridad, esta suspensión de CVS puede inactivarse utilizando betapropiolactona

SECCIÓN 10

PRUEBA BIOLÓGICA DE INOCULACIÓN EN RATONES

10.1 PRINCIPIO Y UTILIDAD

- 10.1.1 Cuando una muestra resulte negativa o no concluyente a la prueba de inmunofluorescencia, se procederá a realizar la prueba de inoculación en ratones. Si en la muestra a inocularse en los ratones existe virus rábico, éste se manifestará con una sintomatología característica. Posterior a la muerte de los animales, sus cerebros serán sometidos a la prueba de inmunofluorescencia directa para la detección del antígeno rábico.
- 10.1.2 Los ratones son animales muy susceptibles al virus de la rabia, sin embargo, puede obtenerse un resultado positivo en la prueba de inmunofluorescencia y negativa en la prueba de inoculación en ratones. Esto puede ocurrir cuando el virus no es viable pero todavía es antigénico o cuando la cantidad de virus es insuficiente para iniciar la infección.

10.2 ANIMALES DE LABORATORIO

- 10.2.1 Se utilizan ratones albinos suizos cepa Balb-C debido a su susceptibilidad, pureza y facilidad de criarlos en el laboratorio.
- 10.2.2 Los ratones son susceptibles a cualquier edad. Sin embargo, se recomienda emplear ratones de 21 días y de 11 a 14 g de peso, por su fácil manejo en el momento de la inoculación.
- 10.2.3 Los ratones de ambos sexos tienen la misma susceptibilidad, pero no es recomendable tenerlos en una misma jaula, debido al daño que se pueden infligir al estar juntos.
- 10.2.4 Es indispensable que los animales vengan de un bioterio de producción con condiciones óptimas de crianza. Se desechará cualquier animal que tenga ectoparásitos, pelo erizado o signos de diarrea. Si los ratones han sido enviados desde lejos, es conveniente esperar por lo menos 2 días antes de la inoculación.

10.3 MATERIALES Y EQUIPOS

- 10.3.1 Mortero y pilón (fríos)
- 10.3.2 Diluyente (agua destilada, 2% suero equino, 1000 UI penicilina y 2 mg de estreptomicina / mL)
- 10.3.3 Tubo de ensayo 12 x 75
- 10.3.4 Jeringa (tuberculina) de 1 mL (una jeringa por muestra)
- 10.3.5 Aguja 27 x 1/2"
- 10.3.6 Recipiente para descartar agujas
- 10.3.7 Pinza y tijera
- 10.3.8 Jaulas de ratones de metal o polipropileno con sus respectivas rejillas

10.4 PROCEDIMIENTO

- 10.4.1 Realizar una lista de las muestras negativas a IF a inocular y otras que se hayan indicado
- 10.4.2 Ingresar los números de muestra en el formato (Anexo F) de registro de ratones indicando los siguientes datos:
 - 10.4.2.1 Fecha de inoculación
 - 10.4.2.2 Fecha de término de prueba
 - 10.4.2.3 Resultado de la prueba de IF
- 10.4.3 Luego de desembalar e identificar la muestra, lavarla con solución fisiológica o con agua destilada, si ésta ha sido recepcionada con glicerina al 50% .
- 10.4.4 Colocar en un mortero estéril 0,3 g de la muestra (incluyendo asta, corteza y cerebelo) y homogenizar
- 10.4.5 Agregar 1,2 mL de diluyente y homogenizar nuevamente, obteniendo una suspensión al 20%
- 10.4.6 Vaciar en un tubo de ensayo 12 x 75 mL
- 10.4.7 Dejar reposar por una hora en la refrigeradora, aunque también se pueden preparar las suspensiones la tarde anterior, dejándolo refrigerado para que el virus drene de las células.
- 10.4.8 Centrifugar a 4°C a 2000 r.p.m. por 10 minutos
- 10.4.9 Mantener permanentemente las suspensiones en frío
- 10.4.10 Preparación de las jaulas para inoculación**
 - 10.4.10.1 Colocar en una jaula limpia, viruta en cantidad suficiente para que cubra el suelo de la jaula
 - 10.4.10.2 Colocar de 5 a 8 ratones albinos suizos Balb-C
 - 10.4.10.3 Colocar una etiqueta (masking-tape) con el código de la muestra, la fecha de inoculación, el día de término y el resultado de la IF.
- 10.4.11 Inoculación del ratón**
 - 10.4.11.1 Retirar de 0,03 a 0,025 de inóculo por animal
 - 10.4.11.2 Eliminar las burbujas de aire dentro de un tubo con algodón
 - 10.4.11.3 La aguja deberá ir a la altura de la sien del ratón (en la frente, en el caso de ratones lactantes)
 - 10.4.11.4 Después de inoculado, observar que una gota del inóculo aparezca en el sitio de la inoculación

10.4.11.5 Observar a los ratones un mínimo de 21 días. En caso de murciélagos, se mantendrán 28 días en observación.

10.5 OBSERVACIÓN DE RATONES INOCULADOS

10.5.1 Examinar diariamente los ratones desde el momento de la inoculación

10.5.2 Anotar cada día el número de ratones normales, enfermos o muertos en una ficha que quedará archivada como testimonio del experimento (Anexo F).

10.5.3 El ratón raramente produce síntomas de rabia antes de los 5 días, contados a partir del día de la inoculación. La muerte no se le imputará al virus de la rabia cuando sobrevenga a las 24 o 48 horas, las cuáles pueden ser por causa traumática o contaminación bacteriana.

10.5.4 Deberán sobrevivir por lo menos 3 de los 6 animales inoculados; si éste no fuera el caso, se procederá a reinocular la muestra de la siguiente manera:

10.5.4.1 Retirar la muestra de la congeladora

10.5.4.2 Descongelar y preparar la suspensión al 20% con el diluyente al doble de concentración de antibiótico o pasar la muestra a través de un filtro de 0,45 micras.

10.5.4.3 Anotar en el registro que se está repitiendo la muestra

10.5.4.4 Si los ratones mueren nuevamente dentro de los cuatro primeros días:

a. No haga una prueba de IF

b. Si la muestra proviene de un equino, notificar al Laboratorio de Arbovirus y proporcionar el ratón para que se le realice la prueba de IFI para la detección de arbovirus.

10.5.4.5 Si uno o más ratones mueren después de los cuatro días:

a. Realizar la prueba de inmunofluorescencia

b. Anotar el resultado de la prueba de inmunofluorescencia en el cuaderno de ratones inoculados y en el registro de identificación de las muestras.

10.6 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

10.6.1 Generalmente los ratones inoculados con muestras positivas empiezan a manifestar los primeros síntomas a partir del décimo al décimo segundo día de inoculación. Primero mostrarán erizamiento, seguido de parálisis progresiva, postración y muerte.

10.6.2 Una vez que estén postrados, se sacrifican con cloroformo en un envase hermético y se les extrae el cerebro.

10.6.3 Realizar la prueba de inmunofluorescencia directa para la detección del antígeno rábico

SECCIÓN 11

PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIRRÁBICOS

11.1 PRINCIPIO Y UTILIDAD

11.1.1 La prueba de neutralización del suero en ratones es un procedimiento serológico que se utiliza para determinar si una persona o un animal está protegido contra la rabia.

11.1.2 Este método determina la cantidad de anticuerpos presentes en el suero y se basa en la neutralización de una serie de diluciones de suero con una dosis constante de un virus de desafío previamente titulado. Los resultados son expresados en términos de títulos serológicos definidos como la dilución más elevada que neutraliza una cantidad estándar de virus.

11.1.3 El método comprende tres etapas:

11.1.3.1 Preparación y titulación del virus desafío (CVS)

11.1.3.2 Seroneutralización del virus: preparación del suero y las mezclas suero-virus e inoculación en ratones

11.1.3.3 Interpretación de resultados

11.2 ANIMALES DE LABORATORIO

Se utilizan ratones albinos suizos, cepa Balb-C de 21 días y de 11 a 14 g de peso. Se deben tener las mismas consideraciones mencionadas acerca de los ratones en la prueba de inoculación de ratón.

11.3 MATERIALES Y EQUIPOS

11.3.1 Diluyente (agua destilada con 2% suero equino)

11.3.2 Tubos de ensayo 12 x 75 mm

11.3.3 Gradillas para tubos 12 x 75 mm

11.3.4 Jeringa (tuberculina) de 1mL (una jeringa por suero) con aguja 27 x 1/2"

11.3.5 Recipiente para descartar agujas

11.3.6 Micropipeta de 1000 μ L

11.3.7 Micropipeta de 40 – 200 μ L

11.3.8 Tips amarillos (200 μ L) y azules (1000 μ L)

11.3.9 Jaulas de ratones de metal o polipropileno con sus respectivas rejillas

11.3.10 Suero de referencia internacional

11.3.11 Suero problema

11.4 PROCEDIMIENTO

El principio de la titulación consiste en realizar una serie de diluciones del virus para poder establecer en que dilución se encuentra la dosis que produce un 50% de mortalidad de los ratones inoculados. El virus CVS se conserva en forma de suspensión al 20%, distribuída en ampollas y congeladas a temperatura baja. Cuando se va a realizar la prueba, se toma una ampolla y se descongela rápidamente bajo chorro de agua fría de caño.

11.4.1 Cálculo de las dosis de desafío

11.4.1.1 Suponiendo que la cepa CVS contiene $10^{6,0}$ DL₅₀ por 0,03, es decir, existe una dosis letal 50 en 0,03 mL de una dilución de $10^{-6,0}$ del virus CVS, con sueros de personas vacunadas se emplearán diluciones de sueros a partir de 1/5, 1/25 y 1/125 y la dilución final de virus corresponderá a 20 - 50 DL₅₀. Por ejemplo, para encontrar la dilución de CVS que contenga 64 DL₅₀ en 0,03 mL, se resta el logaritmo de 64 del título de la preparación del virus CVS ($10^{6,0}$):

$$\begin{aligned} 64 \text{ DL}_{50} \text{ de virus en } 0,03 \text{ mL} &= \log(10^{6,0}) - \log(64) \\ &= 6,0 - 1,8 \\ &= 4,2 \end{aligned}$$

11.4.1.2 Como $4,2 = \log 16\ 000$, consecuentemente la preparación de CVS habrá de diluirse al 1:16 000. Sin embargo, al iniciar las diluciones se debe tener en cuenta que el CVS viene de una suspensión al 20%, esto quiere decir que ya tiene una dilución inicial que equivale a $10^{-0,7}$ (una dilución al 20% es igual a 1/5 y el logaritmo de 5 es 0,7). Entonces, desde esta dilución de $10^{-0,7}$ se tiene que llegar a la dilución de $10^{-4,2}$. Las diluciones se van haciendo desde la $10^{-0,7}$ hasta $10^{-3,7}$ en progresión decimal y para pasar de $10^{-3,7}$ a dilución $10^{-4,2}$ se restan los logaritmos de la siguiente manera:

$$4,2 - 3,7 = 0,5$$

11.4.1.3 De manera inversa se obtiene el antilogaritmo de 0,5 = 3,16, el que se redondea a 3. Esto quiere decir que se necesita hacer una dilución de 1:3 para pasar de $-3,7$ a $-4,2$. Hecho esto, se realiza tres diluciones más ($10^{-5,2}$, $10^{-6,2}$ y $10^{-7,2}$) para poder realizar la titulación simultánea de comprobación de las dosis letales utilizadas.

11.4.2 Preparación y titulación del virus de desafío CVS

11.4.2.1 Calcular la cantidad de CVS conteniendo las 64 DL₅₀ que se necesita de acuerdo al número de sueros problema que tenga.

11.4.2.2 De acuerdo a la dilución que contendrá 64 DL₅₀ (para este caso la dilución $10^{-4,2}$), rotular los tubos 12x75 mm con $10^{-1,7}$, $10^{-2,7}$, $10^{-3,7}$, $10^{-4,2}$, $10^{-5,2}$, $10^{-6,2}$ y $10^{-7,2}$.

11.4.2.3 Distribuir 2,7 mL de diluyente en los tubos rotulados, a excepción del tubo $10^{-4,2}$ al que se le colocará 2,0 mL.

11.4.2.4 Tomar 0,3 mL de la ampolla de CVS recién descongelada y colocarla en el primer tubo $10^{-1,7}$, homogenizar y descartar el tip. Continuar de la misma manera con los tubos $10^{-2,7}$ y $10^{-3,7}$.

- 11.4.2.5 Tomar 1,0 mL del tubo $10^{-3,7}$ y colocarlo en el $10^{-4,2}$, homogenizar y descartar el tip.
- 11.4.2.6 Tomar 0,3 mL del $10^{-4,2}$ y pasar al $10^{-5,2}$, homogenizar y descartar el tip. Realizar el mismo procedimiento con el tubo de $10^{-6,2}$ y $10^{-7,2}$.

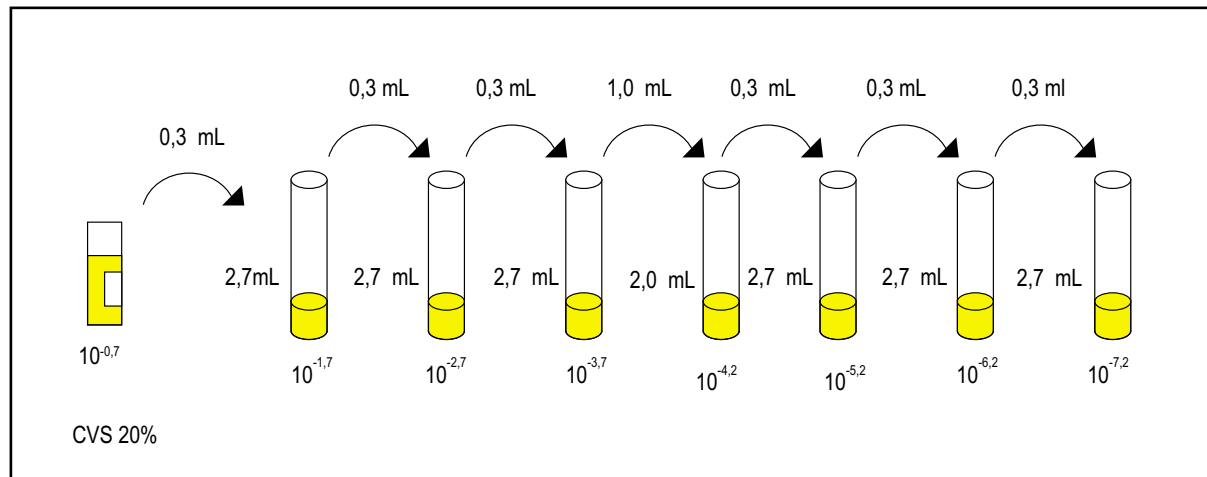


Figura N° 8. Esquema de dilución del virus CVS

11.4.3 Dilución del suero problema

- 11.4.3.1 Inactivar los sueros a 56°C por 30 minutos en Baño María
- 11.4.3.2 Preparar una dilución 1/2,5 del suero de referencia internacional, añadiendo 0,2 mL del suero a 0,3 del diluyente.
- 11.4.3.3 Preparar diluciones al quinto con el suero de referencia a partir de la dilución 1:2,5, hasta la dilución 1:312,5 transfiriendo 0,2 mL de cada dilución a 0,8 mL de diluyente (2% de suero equino en agua destilada).

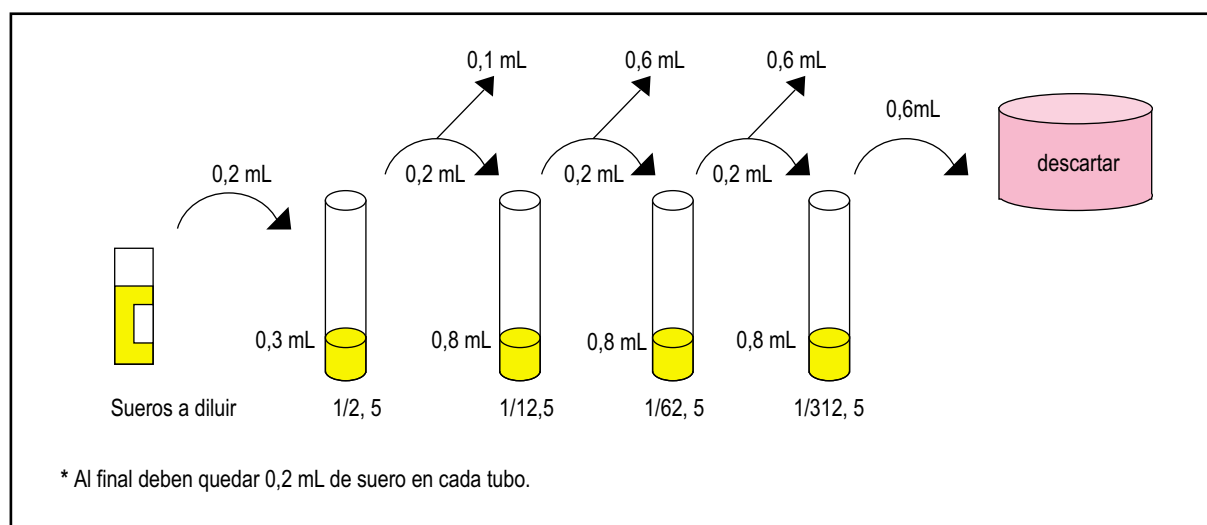


Figura N° 9 Esquema de dilución del suero de referencia y los sueros problema

11.4.4 Mezcla suero virus

- 11.4.4.1 Rotular cuatro tubos 12x75 mm con 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625 suero de referencia internacional + 32 DL₅₀.
- 11.4.4.2 Rotular cuatro tubos 12x75 mm con 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625 suero problema + 32 DL₅₀.
- 11.4.4.3 Combinar 0,2 mL del tubo que contiene 64 DL₅₀ (en este caso 10^{-4,2}) con cada dilución de los suero problema y del suero de referencia internacional que contenga 0,2 mL, logrando reducir a 32 dosis letales efectivas.
- 11.4.4.4 Rotular cuatro tubos 12x75 mm: 32 DL₅₀, 3,2 DL₅₀, 0,32 DL₅₀ y 0,032 DL₅₀.
- 11.4.4.5 Tomar de cada dilución 10^{-4,2}, 10^{-5,2}, 10^{-6,2} y 10^{-7,2} 0,2mL y combinarlo con 0,2 mL de diluyente conteniendo 20% de suero equino.
- 11.4.4.6 Incubar en baño María a 37°C por 90 minutos
- 11.4.4.7 Retirar y colocarlas en una bandeja con hielo

11.4.5 Inoculación en ratones

- 11.4.5.1 Colocar una etiqueta en cada jaula correspondiente a cada mezcla de suero virus
- 11.4.5.2 Inocular 6 ratones por dilución con 0,03 mL de cada mezcla suero-virus intracranealmente en ratones de 21 días de edad.

11.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 11.5.1 Anotar el número de ratones muertos entre los días 6 y 14 de la inoculación (Anexo G)
- 11.5.2 Utilizar la fórmula de Reed-Meunch (vea el Anexo H) para calcular el punto final del 50% de mortalidad de las diluciones de virus. Esta titulación indicará si las dosis letales utilizadas fueron las correctas.
- 11.5.3 Calcular el punto final del 50% con la fórmula de Reed-Meunch del suero de referencia internacional y los sueros problema. El Comité de Expertos de la OMS sobre rabia indica la necesidad de recibir inmunización de refuerzos cuando el título baja de 0,5 UI/mL.

SECCIÓN 12

MANTENIMIENTO DE RATONES EN EL LABORATORIO

12.1 OBJETIVO

Establecer y uniformizar los procedimientos de cuidado y alimentación de los ratones que se utilizan para el diagnóstico del virus rábico.

12.2 CAMPO DE APLICACIÓN

Comprende el mantenimiento de ratones albinos suizos inoculados en el Laboratorio de Rabia

12.3 MATERIALES Y EQUIPOS

12.3.1 Alimento balanceado especial para ratones

12.3.2 Viruta estéril

12.3.3 Pinza simple de 20 cm

12.3.4 Biberones

12.3.5 Jaulas limpias

12.3.6 Recipiente con bolsa autoclavable

12.3.7 Mascarilla 3M

12.3.8 Balde hermético

12.3.9 Cloroformo

12.3.10 Espátula

12.41 CRONOGRAMA

12.4.1 Lunes

12.4.1.1 Chequear el registro diario para determinar animales normales, enfermos y muertos

12.4.1.2 Dar agua y comida a los animales

12.4.1.3 Preparar jaulas limpias con agua, comida y viruta para recepcionar los ratones del día martes

12.4.2 Martes

12.4.2.1 Chequear el registro diario para determinar animales normales, enfermos y muertos

12.4.2.2 Dar agua y comida a los animales

12.4.2.3 Recoger ratones del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Salud y colocar 6 en cada jaula con viruta, agua y comida

12.4.2.4 Enviar ratones muertos sospechosos de rabia

12.4.3 Miércoles

12.4.3.1 Chequear el registro diario para determinar animales normales, enfermos y muertos

12.4.3.2 Dar agua y comida a los animales

12.4.3.3 Cambio de camas a todas las jaulas, con excepción de las jaulas con ratones ingresados el día martes

12.4.3.4 Lavado de las jaulas sucias

12.4.4 Jueves

12.4.4.1 Chequear el registro diario para determinar animales normales, enfermos y muertos

12.4.4.2 Dar agua y comida a los animales

12.4.4.3 Lavar los biberones

12.4.4.4 Envío de ratones muertos sospechosos de rabia

12.4.4.5 Inoculación de ratones

12.4.5 Viernes

12.4.5.1 Chequear el registro diario para determinar animales normales, enfermos y muertos

12.4.5.2 Eliminar ratones

12.4.5.3 Lavar las jaulas de los ratones eliminados

12.4.5.4 Dar agua y comida a los animales

12.4.6 Sábado

12.4.6.1 Chequear el registro diario para determinar animales normales, enfermos y muertos

12.4.6.2 Dar agua y comida a los animales

12.4.6.3 Limpieza y desinfección general del ambiente

12.5 PROCEDIMIENTO DE CAMBIO DE JAULA DE RATONES

- 12.5.1 El cambio de jaulas de ratones se realizarán los días miércoles, con excepción de los ratones ingresados el día martes.
- 12.5.2 Tomar una jaula limpia y agregar una medida de viruta estéril cubriendo el piso de la jaula
- 12.5.3 Colocar la etiqueta de la jaula sucia en la jaula limpia
- 12.5.4 Sacar la rejilla de la jaula sucia y transferir los animales inoculados a la jaula limpia con ayuda de una pinza. Los animales no inoculados pueden transferirse con guantes sin necesidad de pinzas
- 12.5.5 Colocar la rejilla en la jaula limpia y depositar la jaula en el estante respectivo
- 12.5.6 Sacar la viruta de la jaula sucia con ayuda de una espátula y colocarla en la bolsa autoclavable
- 12.5.7 Llevar las jaulas sucias al lavadero y la bolsa con la viruta al incinerador o autoclave
- 12.5.8 Llenar el lavadero con agua y sumergir las jaulas
- 12.5.9 Agregar detergente, mezclar y dejar remojar
- 12.5.10 Enjuagar las jaulas y dejarlas secar

12.6 PROCEDIMIENTO DE CHEQUEO DIARIO DE RATONES

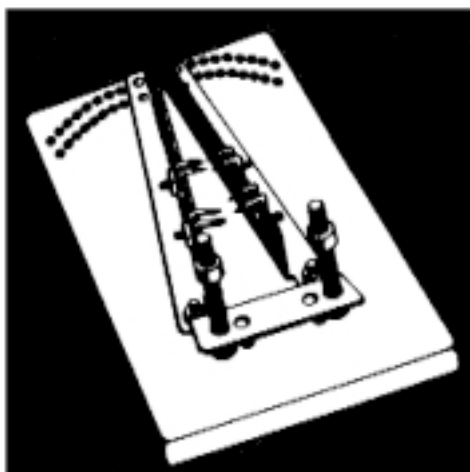
- 12.6.1 El procedimiento de chequeo diario de ratones se realiza utilizando la ficha de revisión de ratones (Anexo D).

BIBLIOGRAFÍA

- **Instituto Nacional de Salud.** Manual de normas de bioseguridad. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N° 18.
- **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N° 15.
- **Larghi OP.** Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Centro Panamericano de Zoonosis; 1975. Nota Técnica N° 8.
- **Meslin F - X, Kaplan MM, Koprowski H.** Laboratory techniques in rabies. Geneva:WHO; 1996.
- **López R, Fernández R.** Producción del primer lote de conjugado antirrábico de origen caprino en el Perú. Rev Med Exp 1997;14(1): 43-4.
- **Organización Mundial de la Salud.** Comité de Expertos sobre Rabia. Ginebra: OMS; 1992. Serie de Informes Técnicos N° 824.
- **Velleca W, Forrester F.** Laboratory methods for detecting rabies. Atlanta: CDC; 1981.

ANEXO A

DISPOSITIVO DE SUJECIÓN PARA LAS CABEZAS DE LOS ANIMALES PARA LA TOMA DE MUESTRAS



Fuente: Public Health Reports 1997;92(6).

ANEXO B

FORMULARIO PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA ANIMAL

CÓDIGO INS FECHA DE RECEPCIÓN

1. DATOS DEL ESTABLECIMIENTO

NOMBRE DEL ESTABLECIMIENTO	DEPARTAMENTO /PROVINCIA/ DISTRITO
DIRECCIÓN	TELÉFONO/FAX

2. DATOS DEL ANIMAL

FICHA DEL ANIMAL	MUESTRA N°	ESPECIE	EDAD
------------------	------------	---------	------

2.1. PROCEDENCIA

LOCALIDAD	DISTRITO	PROVINCIA	DEPARTAMENTO
-----------	----------	-----------	--------------

VACUNACIÓN: SÍ
 NO
 SE IGNORA

CAUSA DE MUERTE DEL ANIMAL: MURIÓ
 SACRIFICADO

FECHA:

TIPO DE VACUNA UTILIZADA: _____

OBSERVACIONES:

3. RESULTADOS DEL LABORATORIO REGIONAL

· Inmunofluorescencia directa:.....

Nota: La muestra para diagnóstico de rabia es cerebro, cerebelo y médula conservado en glicerina 50% con suero fisiológico.

ANEXO C

FORMULARIO PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA HUMANA

CÓDIGO INS FECHA DE RECEPCIÓN

1. DATOS DEL PACIENTE

NOMBRES Y APELLIDOS	DEPARTAMENTO /PROVINCIA/ DISTRITO
DIRECCIÓN	TELÉFONO/FAX

2. DATOS DE LA INFECCIÓN Y TRATAMIENTO

2.1 Exposición al virus por: Mordedura Contacto Se ignora

2.2 Si fue mordedura: Localización.....

2.3 Herida: Única Múltiple Superficial Profunda 2.4 Fecha de exposición:
Día Mes Año2.5 Tenía vacunación anterior: Si No Se aplicó antirrábica: Si No 2.6 Fecha de 1ra dosis vacuna: Última dosis:
Día Mes Año Día Mes Año2.7 Número de dosis aplicadas: dosis: Fecha de aplicación del suero:
Día Mes Año

2.8 Tipo de vacuna:..... N° de Lote:.....

3. DATOS DE LA ENFERMEDAD

3.1 Fecha de los primeros síntomas:
Día Mes Año3.2 Fecha de muerte:
Día Mes Año

4. DATOS DEL ANIMAL CAUSANTE DE LA EXPOSICIÓN4.1 Especie: Perro Murciélago Otro:.....4.2 Condición del animal mordedor: Huido Observado No sabe **5. TIPO DE MUESTRA**5.1 Cerebro y cerebelo: Saliva: Suero: Biopsia de piel: 5.2 Fecha de obtención de muestra:

--	--

--	--

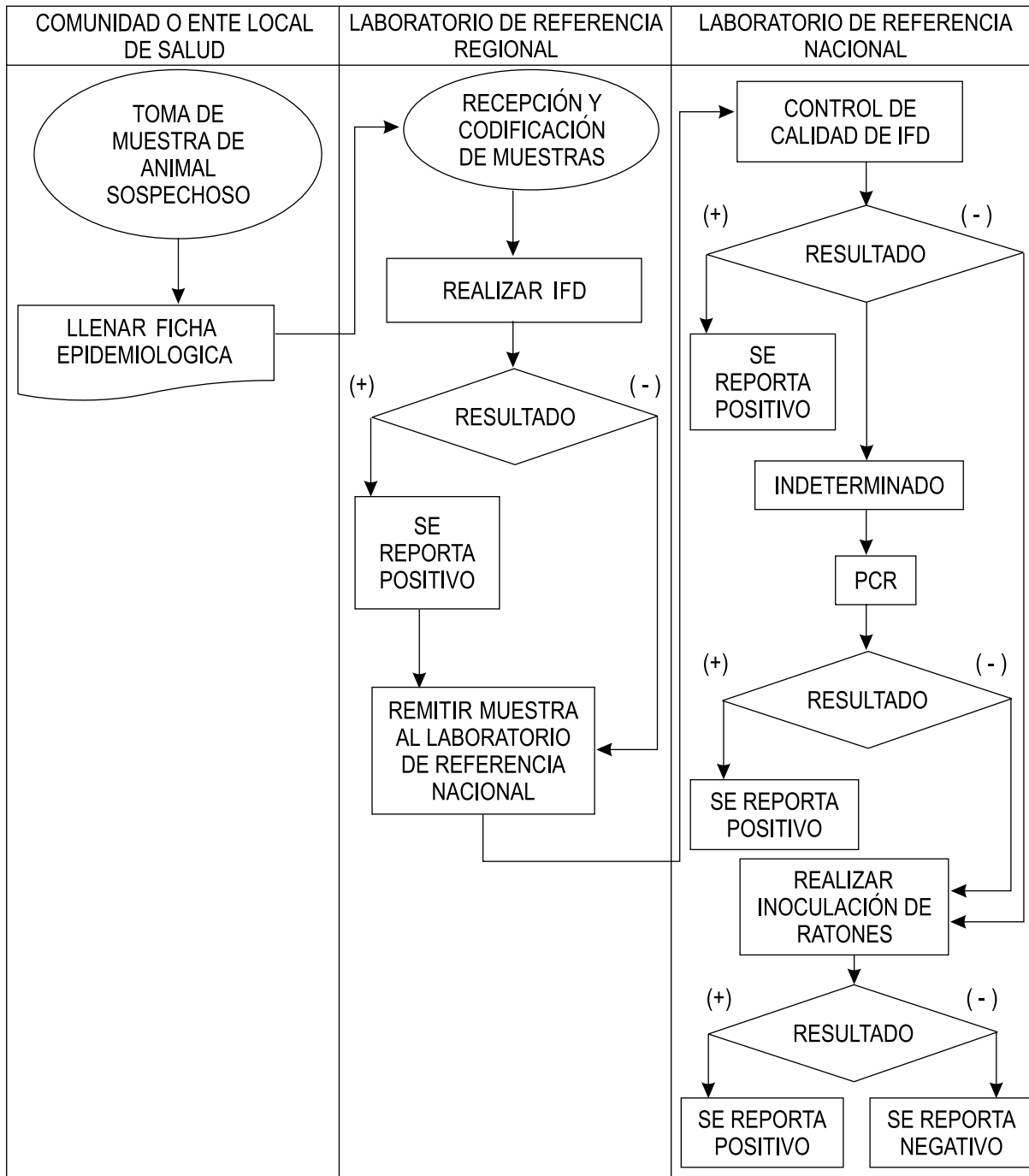
--	--

Día Mes Año**6. DATOS DEL INFORMANTE**

NOMBRE DEL ESTABLECIMIENTO	SOLICITANTE
DIRECCIÓN	TELÉFONO/FAX
FECHA	FIRMA

ANEXO D

FLUJOGRAMA PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS



ANEXO E**REGISTRO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA**

Fecha	Nº muestra	Departamento	Provincias	Distrito	Localidad	Especie	IF	IR
	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
	9							
	10							

IF = Resultado de inmunofluorescencia

IR = Resultado de inoculación en ratones

ANEXO G

PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN

PRUEBA DE:
 MUESTRA DE:
 PROCEDENCIA:

FECHA DE PRUEBA:
 INOCULADOR:
 RESPONSABLE:

DILUCIÓN:

DILUCIÓN:

		DÍAS													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1															
2															
3															
4															
5															
6															

		DÍAS													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

DILUCIÓN:

DILUCIÓN:

		DÍAS													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1															
2															
3															
4															
5															
6															

		DÍAS													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1															
2															
3															
4															
5															
6															

Código: E — erizado

P — parálítico

M — muerto

I — normal

C — comido

Dilución	Ratones		Acumulado		TOTAL	% Mort
	V	M	V	M	M/T	

50% - mortalidad inferior 50%
 Dif log= $\frac{\text{mort sup al 50\%} - \text{mort inf 50\%}}{\text{mort sup al 50\%} + \text{mort inf 50\%}}$ x log del factor dilución

Dif. logaritmos: _____ x _____ =
 Dif. final 50%: recíproco dil partida+/- dif logaritmos
 Dilución final 50%: _____ ± _____ =

ANEXO H

MÉTODO DE REED Y MUENCH

H.1. REQUISITOS PARA UTILIZAR EL MÉTODO DE REED Y MUENCH

- Número constante de animales por dilución
- Factor dilución constante
- Serie de diluciones que abarquen el 100% y 0% de animales positivos
- Ausencia de muertes accidentales (si estas muertes se dará preferencia al método de Spearman-Kärber).

En el método de Reed y Muench, el punto de partida para el cálculo de las diluciones finales del 50% es la dilución que produce una mortalidad inmediatamente inferior al 50% ("dilución de partida"). Para determinar la diferencia entre el logaritmo de la dilución de partida y el logaritmo de la dilución final al 50% (diferencia de logaritmos) se utiliza una fórmula. Si la mortalidad disminuye cuando la dilución aumenta (como sucede en las titulaciones de virus rábico), la dilución final del 50% será inferior a la dilución de partida. En consecuencia, la "diferencia de logaritmos" ha de sustraerse del logaritmo recíproco de la dilución de partida. Por el contrario, la "diferencia de logaritmos" tiene que sumarse si la mortalidad se incrementa con el aumento de las diluciones. Esa diferencia, que aparece ilustrada en los siguientes ejemplos, debe tenerse en cuenta al efectuar los cálculos.

H.2. EJEMPLO DE LA TITULACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DEL VIRUS

Dilución del virus	Ratones		Acumulado		Total	Mortalidad %
	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos		
10 ⁻⁵	0	10	0	17	17	17/17=100
10 ⁻⁶	4	6	4	7	7	7/11 =64
10 ⁻⁷	9	1	13	1	1	1/14 =7

Se acumulan los totales de 10⁻⁵ a 10⁻⁷ para los animales supervivientes y de 10⁻⁷ a 10⁻⁵ para los ratones que se consideran muertos por rabia.

En el presente ejemplo, el factor de dilución es 10 y la dilución de partida (con una mortalidad inmediatamente inferior al 50%) es 10⁻⁷.

La diferencia de logaritmos se calcula con la fórmula:

$$\frac{50\% - \text{mortalidad inferior al } 50\%}{\text{mortalidad superior al } 50\% - \text{mortalidad inferior al } 50\%} \times \text{logaritmo del factor dilución}$$

Según el ejemplo:

$$\frac{50 - 7}{64 - 7} \times 1 = 0,75$$

Teniendo en cuenta que en este ejemplo la mortalidad disminuye al aumentar la dilución, la última dilución positiva al 50% es inferior a la dilución de partida y para el cálculo se sustrae la diferencia de logaritmos del siguiente modo:

$$\text{Log (recíproco de la dilución final del 50\%)} = \text{log (recíproco de la dilución de partida)} - \text{diferencia de logaritmos}$$

$$= \text{log } 10^7 - 0,75$$

$$\text{Log (dilución final del 50\%)} = 6,25$$

$$\text{De aquí, título DL}_{50} = 10^{-6,25}$$

H.3. EJEMPLO DE LA TITULACIÓN DE UN SUERO ANTIRRÁBICO

Supóngase que un protocolo típico de titulación de un suero antirrábico da los siguientes resultados:

Dilución del suero	Ratones		Totales acumulativos		Mortalidad
	Supervivientes	Muertos	Supervivientes	Muertos	%
$10^{-2,7}$ (1:500)	5	0	11	0	0/11 = 0
10^{-3} (1:1000)	4	1	6	1	1/7 = 14
$10^{-3,3}$ (1:2000)	1	4	2	5	5/7 = 71
$10^{-3,6}$ (1:4000)	1	4	1	9	9/10 = 90
$10^{-3,9}$ (1:8000)	0	5	0	14	14/14 = 100

En este ejemplo, el factor de dilución es 2 y la dilución de partida (mortalidad inferior al 50%) es 10^{-3} . Con la misma fórmula del ejemplo anterior, la “diferencia de logaritmos” es:

$$\frac{50 - 14}{71 - 14} \times 0,301 = 0,19$$

Como en este caso la mortalidad aumenta con la dilución, la dilución final del 50% será más elevada que la dilución de partida y para calcular se sumará la “diferencia de logaritmos” del siguiente modo:

$$\begin{aligned} \text{Log (recíproco de la dilución final del 50\%)} &= \text{log (recíproco de la dilución de partida)} + \text{diferencia de log} \\ &= 3 + 0,19 \\ &= 3,2 \text{ (aprox.)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{De aquí, log de la dilución final del 50\%} &= -3,2 \\ &= 10^{-3,2} \end{aligned}$$

ARTES Y DISEÑOS LASER S.R.Ltda.

Teodoro Cárdenas 124 - B
Santa Beatriz
Lima 01 - Perú
Telf.: 470-6172 Telefax: 472-4525

Setiembre 2002
Tiraje: 3,000 ejemplares