

ESTUDIO CON EL MICROSCOPIO ELECTRONICO
DE ONCE CASOS DE RABIA EN HUMANOS.
Comunicación Preliminar

- Dr. Jorge García Tamayo *
- Dr. Alfonso Avila Mayor **
- Dr. Elías Anzola Pérez ***

* Hospital General del Sur de Maracaibo.

** Hospital General de Cabimas.

*** Servicio de Epidemiología de la Unidad Sanitaria de Maracaibo, Venezuela.

La rabia es una enfermedad muy antigua; conocida por los griegos como "lissa", fue descrita por Hipócrates y por Celsus. Durante esta época y posteriormente en el transcurso de la historia se relacionó la enfermedad con la mordedura de animales.

En el año 1881 Louis Pasteur demostró que el agente patógeno de la rabia podía inocularse a los animales, y años más tarde, en el mismo Instituto Pasteur, se aisló el agente infeccioso de los nervios de humanos y de animales, sugiriéndose que esta es la ruta por la cual viaja el germen hacia el sistema nervioso central. Con el progreso de las investigaciones microbiológicas, en 1936 se pudo demostrar que el agente etiológico de la rabia era filtrable a través de membranas porosas, estimándose su tamaño entre 100 y 150 milimicras y considerándosele entonces como un virus. No fue sino hasta 1962 cuando Matsumoto observó por primera vez el virus de la rabia en el tejido nervioso de ratones inoculados intracerebralmente con una suspensión de material infectado con ese virus⁵. Las partículas virales observadas por Matsumoto, tenían forma de bala.

En base a estudios ulteriores de microscopía electrónica se ha clasificado al virus de la rabia entre el grupo de los rabdovirus, conjuntamente con otros virus de animales y de plantas cuyas partículas se caracterizan por tener forma de bala⁶. Se ha demostrado la presencia del virus de la rabia en el sistema nervioso de ratones^{4 5 6}, perros y gatos⁷, en las glándulas salivales de zorros² y en células cultivadas³. No conocemos estudios previos de microscopía electrónica en casos de rabia humana.

El objeto de la presente comunicación es informar sobre la visualización del virus rábico en el sistema nervioso de once casos de rabia humana; y comparar estos hallazgos con otros métodos usados para hacer el diagnóstico de la enfermedad.

Para estudiar el material de autopsia sospechoso de rabia con el microscopio electrónico, hemos utilizado el cerebelo, por habernos convencido durante el estudio de los primeros casos que las partículas virales y las inclusiones de Negri son encontradas más fácilmente en las células de Purkinje que en las células piramidales del asta de Ammon o en la corteza cerebral.

En dos de los casos el tejido nervioso estuvo congelado durante 48 horas antes de fijarse en glutaraldehído al 3%. El tiempo posmortem en los otros casos osciló entre 3 y 20 horas; la fijación se hizo en glutaraldehído, con excepción del noveno caso, en el cual el tejido nervioso había sido fijado en formol al 10%. Todos los fragmentos de tejido fueron post-fijados en tetraóxido de osmio al 2%, deshidratados en acetona e incluidos en Araldita. Los cortes gruesos, coloreados con azul de toluidina y safranina, fueron necesarios para ubicar las células de Purkinje con el microscopio de luz.

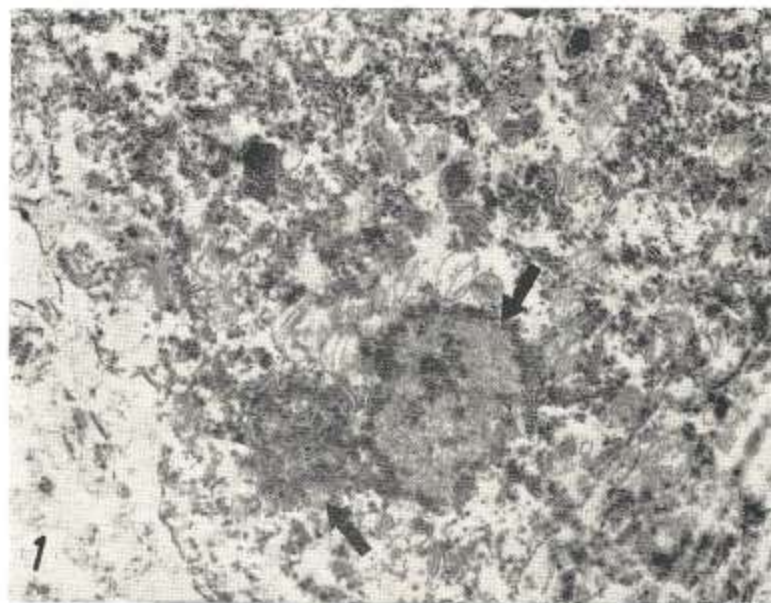


Fig. 1. Citoplasma de una célula de Purkinje del cerebelo humano que muestra dos inclusiones de Negri (flechas). El centro de las inclusiones está formado por material reticulogranular y en la periferia se sitúan las partículas virales. X 9.750.

En todos los casos estudiados se observaron partículas virales en el citoplasma de las células de Purkinja y en la mayoría de ellos también se vieron inclusiones de Negri.

Es interesante señalar que en 4 casos no se observaron histológicamente inclusiones de Negri y un caso presentó signos de meningitis. En los casos que no mostraron inclusiones histológicamente, tampoco se observaron con el microscopio electrónico las características masas de viroplasma, aunque sí se observaron partículas virales. En las figuras 1, 2, 3, y 4 presentamos algunos de los aspectos ultraestructurales de las partículas virales y de las inclusiones de Negri.

Es importante comentar algunos detalles sobre la historia clínica de algunos de los once casos estudiados, y su relación



Fig. 2. Partícula del virus de la rabia cortada transversalmente, se observan de fuera hacia acentro sus capas: la envoltura, representada por una doble línea similar a la unidad de membrana, un espacio claro, una circunferencia que corresponde al cápsido y una masa central, ligeramente osmiofílica, que representa el ácido nucleico viral. X 162,500.



Fig. 4. Fotografía electrónica de alta resolución, que demuestra la continuidad entre la envoltura de una partícula viral en forma de bala, y la membrana del retículo endoplasmático celular. Se observan también partículas virales cortadas transversalmente. X 175.000.

El caso N° 4 es el de un niño de 19 meses de edad, mordido en la cara; el perro se estuvo observando durante 8 días y no presentó manifestaciones de rabia. El niño desarrolló fiebre y se le omitió la vacunación; después nadie supo más detalles sobre el perro y el niño murió un mes y 14 días después de haber sido mordido. Creemos que aquí también se impone la revisión del criterio de los 8 días de observación del animal, pues en este caso falló por completo.

El caso N° 8 es el de una niña de 3 años proveniente del Estado Falcón, y la cual fue clínicamente considerada como rabia por el residente de guardia en la emergencia del hospital. Los familiares negaron antecedentes de mordedura. Las pruebas directas y la inmunofluorescencia fueron negativas; no había inclusiones de Negri en las neuronas aunque sí existían signos histológicos de encefalitis. Cuando ya se pensaba que el caso era una encefalitis viral cuya etiología no podíamos precisar por

falta de recursos, el microscopio electrónico mostró los virus de la rabia, y los ratones, en la prueba biológica, comenzaron a morir mostrando fluorescencia positiva.

El caso Nº 9 correspondió a un joven de 18 años que estuvo durante 3 días en varios centros asistenciales, excitado, hablando incoherentemente, sin llegarse a un diagnóstico preciso; finalmente fue internado en el hospital psiquiátrico donde falleció al siguiente día. El diagnóstico clínico fue de psicosis aguda. Macroscópicamente se pensó en encefalitis. Se fijó el cerebro en formal y los cortes mostraron inclusiones de Negri. No se pudo hacer inmunofluorescencia ni prueba biológica pero el microscopio electrónico demostró las inclusiones típicas y abundantes partículas del virus de la rabia.

Hemos querido llamar la atención sobre estos detalles porque ilustran lo problemático que puede ser cada caso de rabia en particular.

El cuadro 1 expone los resultados de las pruebas, directa, inmunofluorescencia, biológica, y los resultados histológicos y de microscopía electrónica. Allí se pone de manifiesto la precisión diagnóstica que ofrece el estudio con el microscopio electrónico, el cual nos ha demostrado ser exacto en todos los casos, comparándose en positividad a la prueba biológica y aventajándola en tiempo, pues sólo se demora 5 días entre la toma de la muestra y el examen de la misma con el microscopio electrónico.

En conclusión, llamamos la atención sobre estos casos de rabia en seres humanos, no solamente por ser ésta la primera

CUADRO 1

PACIENTE	FECHA	EDAD	SELLERS	IMMUNOFL.	BIOLÓGICA	H.E.	HISTOLOGIA ENCEFALITIS	
							INCLUSION	EMEEFALLTIS
J.A.A.	17-5-69	64 a.	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
M.P.	17-8-69	54 a.	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
M.P.S.	23-6-69	21 a.	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
H.T.	2-8-69	19 m.	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
E.R.	28-10-69	5 a.	ND	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
A.R.G.	26-1-70	15 a.	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
B.S.	17-3-70	6 a.	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
M.M.	10-9-70	3 a.	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
H.V.B.	30-9-70	10 a.	ND	ND	ND	(+)	(+)	(+)
J.L.G.	16-12-70	28 a.	ND	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
S.P.	25-12-70	30 a.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

publicación de once casos de rabia humana estudiados con el microscopio electrónico, sino que queremos también destacar la ayuda que el microscopio electrónico ofrece para estudiar la etiopatogenia y la epidemiología de esta enfermedad. Los resultados presentados demuestran la importancia del microscopio electrónico como medio de diagnóstico y su superioridad para precisar el diagnóstico de rabia, si se compara con el examen directo y con la inmunofluorescencia. También hacemos notar que el examen histológico puede no ser del todo concluyente, pues cuatro de nuestros casos no presentaron inclusiones de Negri; en estos casos, también el microscopio electrónico demostró ser tan exacto como la prueba biológica para diagnosticar la rabia.

Consideramos que son necesarios estudios experimentales aplicando los conocimientos que se obtienen de la observación submicroscópica del tejido nervioso humano afectado por el virus rábico, si queremos comprender los mecanismos de acción patógena de los virus en las células nerviosas. En la actualidad, es muy poco lo que se conoce sobre la patogenia de la rabia y sobre las bases morfológicas de las alteraciones que el virus provoca en los tejidos².

Investigaciones a nivel histoquímico y ultraestructural sobre el neurotropismo del virus de la rabia en ratones, y estudios comparativos sobre la morfología del virus rábico "de la calle" en humanos y en perros y el virus "fijo" en ratones, están actualmente desarrollándose en nuestro laboratorio. Presentamos este trabajo, como una comunicación preliminar sobre un aspecto interesante de la investigación, aplicada a un problema de salud pública.

RESUMEN

Se presentan once casos de rabia en humanos, estudiados con el microscopio electrónico. Se comparan los resultados diagnósticos obtenidos utilizando las pruebas de Sellers, de inmunofluorescencia, las histológicas y biológicas, con los hallazgos de microscopía electrónica; este último método demuestra ser tan exacto como la prueba biológica, obteniéndose los resultados diagnósticos en menor tiempo.

SUMMARY

Eleven cases of human rabies, studied with the electron microscope (EM) are reported. Seller's, immunofluorescence, histology and biologic tests are compared to the electron microscopic results. Positivity of electron microscopic results proved to be similar to the biologic tests. EM findings may also be obtained in a shorter period of time.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — CAMPBELL, J. B.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H.; KUWERT, E.; SOKOL, F.; WIKTOR, T. J. "Present trends and the future in rabies research". *Bull. Wld. Hlth. Org.* 38: 373-381. 1968.
 - 2 — DIERKS, R. E.; MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K. "Extra-neural rabies virus infection". *Amer. J. Path.* 54: 251-273. 1969.
 - 3 — HUMMLER, K.; KOPROWSKI, H.; WIKTOR, T. J. "Structure and development of rabies virus in tissue culture". *J. Virol.* 1: 152-170. 1967.
 - 4 — JENSON, A. B.; RABIN, E. R.; WENDE, R. W.; MELNICK, J. L. "Comparative light and electron microscopic study of rabies and Hart Park virus encephalitis". *Exper. Mol. Path.* 7: 1-10. 1967.
 - 5 — MATSUMOTO, S. "Electron microscope studies of rabies virus in mouse brain". *J. Cell. Biol.* 19: 565-592. 1963.
 - 6 — MIYAMOTO, K.; MATSUMOTO, S. "The nature of the Negri body". *J. Cell. Biol.* 27: 677-682. 1965.
 - 7 — PAYAN, H.; GAMBARELLI, D.; GARBE, L.; REGIS, H.; TAMALET, J.; TOGA, M. "Pathologie de l'encephalite rabique experimentale a virus fixe chez le chat". *Ann d'Anat. Path. Paris* 14: 57-76. 1969.
 - 8 — Provisional Committee for the Nomenclature of Viruses. "Proposals and Recommendations". *Ann Inst. Pasteur.* 109: 625-637. 1965.
-