

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**Preparación y Estabilización de una
Solución Tampon de Fosfatos Acidos
de Sodio y su Aplicación en la Prueba de
Anticuerpos Fluorescentes para
el Diagnóstico de la Rabia**

Trabajo de Graduación

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

PRESENTADO POR

NORMA ESTHELA MOLINA VELASQUEZ

AGOSTO DE 1987





5.42

422 p

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

Lic. José Luis Argueta Antillón

Secretario General

Ing. René Mauricio Mejía Méndez

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Decano en Funciones

Lic. José Luis Argueta Antillón

Secretaria

Dra. Aminta Aceituno de Kafie

DEPARTAMENTO DE ANALISIS QUIMICO E INSTRUMENTAL

Jefe de Departamento

Lic. Consuelo Isabel Molina

ASESORES

LICENCIADA ANA ISABEL GRANADOS
DOCTOR HECTOR RAUL GAVIDIA CORDERO

JURADO CALIFICADOR

DOCTORA MERCEDES RAMOS VELASQUEZ
LICENCIADA CONSUELO ISABEL MOLINA
LICENCIADO MAURICIO MENJIVAR GONZALEZ

LUGAR DE PRACTICAS :

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
UNIDAD DE LABORATORIO DEL MINISTERIO DE
SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

AGRADECIMIENTO

A mis asesores: Licenciada Ana Isabel Granados y Doctor Héctor Raúl Gavidia Cordero deseo expresarles mi más sincero agradecimiento por su valiosa y acertada orientación durante el desarrollo del presente trabajo.

Con profundo agradecimiento al Honorable Tribunal Examinador por la revisión y corrección de este trabajo.

Lic. Consuelo Molina

Dra. Mercedes Ramos Velásquez

Lic. Mauricio Menjivar González

A mis familiares, compañeros y amigos por su constante aliento.

A todas las personas que gentilmente colaboraron en una u otra forma, al desarrollo de este trabajo.

Gracias

DEDICATORIA

- A DIOS Todopoderoso, que me ha permitido llegar al final de la jornada emprendida,

- A mis padres con inmenso amor y agradecimiento :
José Gustavo Molina Reyes
Victorina Velásquez de Molina

- A mi esposo, con el amor que se merece por su apoyo y comprensión.
Manuel Enrique Pacheco Chacón.

- A mi hijo con el cariño que se merece:
Mario José Enrique Pacheco Molina

- A mis queridos hermanos:
Gustavo, Elsy Concepción, Mirta Bella, Xenia Iris.

- A mi abuelita con cariño :
Herminia Escobar vda. de Velásquez

- A mi querida suegra :
María Teresa Chacón.

- A mis apreciadas tias :
Graciela Chacón
Marta Lidia Chacón
Ana Josefa Chacón de Zelaya

- A mis apreciables cuñadas :
Margarita y
Regina

INDICE DE CONTENIDO

	página
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	3
III. JUSTIFICACIONES	5
IV. REVISION BIBLIOGRAFICA	6
1. Consideraciones Generales sobre las Soluciones Tam pón	6
1.1 Definición y Clasificación de las Soluciones Tampón	6
1.2 Acción de las Soluciones Tampón	7
2. Diagnóstico de la Rabia	8
2.1 Introducción	8
2.2 Características del virus de la Rabia	10
2.3 Epidemiología	10
2.4 Metodología de Diagnóstico	11
V. MATERIALES Y EQUIPO UTILIZADO	12
1. Equipo	12
2. Materiales	12
3. Reactivos, soluciones	13
3.1 Para método químico	13
3.2 Para método microscópico	14
4. Otros	14
VI. PARTE EXPERIMENTAL	15
1. Preparación de soluciones tampón de fosfatos áci-- dos de sodio	15

I. INTRODUCCION

Frecuentemente, se hace necesario preparar soluciones que sean capaces de mantener o regular, dentro de ciertos límites, la concentración de los iones hidronio u oxidrilos, tales como las soluciones tampón, que están constituidas por la disolución acuosa de un electrolito débil y su sal correspondiente, se comporta como un electrólito fuerte en medio acuoso.

Estas soluciones tampón son frecuentemente utilizadas en diferentes pruebas de análisis y en este trabajo especialmente para poder realizar, los correspondientes lavados de las láminas portaobjeto con el complejo antígeno-anticuerpo, en la prueba de anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico de la rabia.

La rabia es una enfermedad endémica aguda del sistema nervioso central, causada por un virus, que se encuentra a menudo presente en la saliva de los animales rabiosos y que normalmente se transmite al hombre, por la mordedura de un animal con rabia.

Durante los últimos años en El Salvador, la rabia ha tomado gran importancia debido a que la incidencia de casos en humanos ha aumentado considerablemente. Esto ha permitido que se le considere como uno de los problemas prioritarios de salud en nuestro país.

Tomando en cuenta el campo de acción del Químico Farmacéutico se considera, que la realización de este trabajo contribuirá a integrar conocimientos adquiridos en algunas áreas de estudio, iniciándose en la preparación y estabilización de la disolución tampón, hasta llegar a la determinación de la efectividad de la misma, mediante la Prueba de Anticuerpos -

Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia. Actualmente dicha prueba únicamente se efectúa, en la Unidad de Laboratorio del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y en el Laboratorio de Diagnóstico de Patología Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería. De los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se pretende proponer la fórmula adecuada que aporte valores de pH exactos, que sean efectivos para realizar dicha prueba. Y en esta forma se contribuirá a elaborar soluciones tampón en forma más rápida, segura y a menor costo, lo que garantizará un diagnóstico confiable y rápido.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un trabajo práctico sobre la Preparación y Estabilización de una solución tampón (pH 7,2 - 7,4) preparada, mezclando una solución - de fosfato de sodio dibásico 0,01 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), con fosfato de sodio monobásico 0,01M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), que posteriormente servirá a los laboratorios del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y Agricultura y Ganadería, para la elaboración de sus soluciones tampón, que serán utilizadas en la Prueba Directa de Anticuerpos Fluorescentes para el diagnóstico de la rabia, resolviendo de esta manera los problemas presentados en la realización de dicha prueba.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Elaborar una curva de perfil de pH para interpolar distintos valores de pH de la disolución tampón 0,01 M, utilizada en la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia.
2. Preparar la disolución tampón pH 7,2 - 7,4 utilizada en la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia.
3. Comprobar la efectividad de la disolución tampón pH 7,2 - 7,4 realizando la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia.

4. Proporcionar resultados exactos de valores de pH, que contribuyan a efectuar un diagnóstico confiable y rápido.
5. Determinar la estabilidad de la disolución tampón pH 7,2 - 7,4, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración.

III. JUSTIFICACIONES

En El Salvador la rabia, es una enfermedad endémica que causa estragos en la población humana y animal, lo que amerita un esfuerzo para su control y erradicación, aspectos en los cuales juega un papel importante el diagnóstico. En base a lo anterior se hacen seguimientos epidemiológicos, con el fin de delimitar en regiones o áreas el curso de la enfermedad.

Actualmente en El Salvador la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia, solamente la realizan la Unidad de Laboratorio del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y el Laboratorio de Patología Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería. En esta prueba es muy importante la acción del pH de la disolución tampón para los correspondientes lavados, por lo que se consideró necesario realizar un trabajo práctico para la Preparación y Estabilización de la disolución tampón pH 7,2 - 7,4, con el fin de superar los inconvenientes que se presentan, cuando dicha solución de lavado no tiene el pH adecuado.

Hasta la fecha en El Salvador no existe un estudio experimental acerca de la Preparación y Estabilización de la disolución tampón, utilizada en la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia, ni que evalúe la efectividad de la solución tampón en dicha prueba. Con el presente trabajo, se subsanará tal problema y los datos obtenidos servirán a todas aquellas Instituciones que se encargan del diagnóstico de la rabia por medio de la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes permitiéndoles elaborar sus soluciones tampón en forma rápida, exacta y a menor costo.

IV, REVISION BIBLIOGRAFICA

1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LAS SOLUCIONES TAMPON.

Las soluciones tampón son frecuentemente utilizadas en las diferentes áreas del análisis, en este caso particularmente, se utiliza la combinación de solución de fosfato de sodio monobásico y dibásico para eliminar la inmunofluorescencia inespecífica en la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia.

1.1 Las soluciones tampón.

Son las que reducen al mínimo los cambios en el valor de pH, cuando se les añaden ácidos o bases y están constituidas por la disolución acuosa de un electrólito débil y su sal correspondiente y se comporta como un electrólito fuerte en medio acuoso.

Las soluciones tampón se clasifican en ácidas y básicas. Las ácidas, constan de la mezcla de un ácido débil y una sal que contenga el anión del ácido. Las básicas contendrán una base débil y una sal que contenga el catión de la base (17, 21).

El pH particular para el cual es efectiva una solución tampón está determinado por la relación de la concentración del ácido o base y su sal correspondiente y por la magnitud de la constante de ionización del ácido o base.

El término pH fue introducido en 1909 por Sørensen, quien definió el

pH como el logaritmo negativo de la concentración de los iones hidrógeno,

MacIlvaine ha descrito la forma de preparar soluciones tampón de un intervalo de pH que oscila entre 3,4 y 8,0 con intervalos de variación de 0,2 unidades, mediante el uso de fosfato disódico y el ácido cítrico en diversas proporciones (18).

Se han realizado investigaciones sobre la elaboración de soluciones tampón en forma rápida y segura. Castillo en 1976, trabajó en la elaboración de diluentes tamponizados para la elaboración de la vacuna bivalente antiaftosa en ratones lactantes, mediante dicho estudio logró corregir ciertos errores con la factibilidad de preparar distintas soluciones tampón en forma rápida y segura (5).

1.2 Acción de las soluciones tampón.

La acción de una solución de ácido débil en presencia de una de sus sales se explica de la manera siguiente: en cualquier combinación de ácido y su sal, el equilibrio de ionización del ácido determina la concentración del ión hidrógeno por adición del ácido, el equilibrio se altera y para reestablecerse de nuevo los iones hidrógeno en exceso se recombinan con los aniones de la sal para formar moléculas de ácido sin disociar: -- Ejemplo : $\text{Na}_2\text{PO}_4^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}$, y por lo tanto el pH de la solución se mantiene en un valor no muy distinto del original. Si por el contrario se adiciona alguna base a la combinación de ácido y su sal, el exceso de iones oxidrilos altera el equilibrio del agua: Ejemplo : $\text{NaPO}_4^- + \text{OH}^- \longrightarrow \text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$. El resultado de todos estos cambios es que el exceso de iones hidrógeno está neutralizado esencialmente,

y la solución se mantiene a un pH muy próximo a su valor original (18).

Uno de los tampón más comúnmente usado en los laboratorios de Pruebas Biológicas es una combinación de fosfato monobásico y dibásico en solución acuosa. Estos se disocian relativamente poco en solución acuosa, es decir, no son ni fuertemente ácidos ni fuertemente básicos. Cuando se añade ácido, la sal dibásica absorbe H^+ , y se transforma en monobásica y con el ácido disuelto produce una sal de sodio, ejemplo:

$Na_2HPO_4 + HCl \rightleftharpoons NaH_2PO_4 + NaCl$. Cuando se adiciona un álcali la sal monobásica desprende iones H^+ para formar agua con el ión OH^- y la sal incompleta se combina con el catión del álcali, ejemplo:



Las soluciones tampón se pueden diluir apreciablemente sin que se produzca una alta variación en el valor de pH; pero al diluirse, se va reduciendo su capacidad tampón con respecto a las variaciones del pH, provocadas por la adición ya sea de un ácido o de una base. El efecto tampón de estas soluciones, depende del valor de la concentración de los componentes de la combinación que está disponible para reaccionar ante el agregado de un ácido o de una base fuerte y evitar por neutralización, que varíe demasiado el pH del medio en el cual está la solución tampón (17).

2. DIAGNOSTICO DE LA RABIA,

2.1 Introducción.

Hace unos 20 años se adaptó al diagnóstico de la rabia una técnica serológica llamada microscopía inmunofluorescente. Y las reacciones serológicas

gicas comprendidas son; la neutralización y la inmunofluorescencia, que dependen de lo que se llama especificidad inmunológica. Una sustancia que estimula la producción de anticuerpos por un animal es lo que se denomina antígeno. Y los antígenos se combinan específicamente con los anticuerpos complementarios, habiendo varios métodos de demostrar dicha combinación (14).

El marcado de proteínas con sustancias químicas se viene haciendo -- desde fines del siglo pasado. En 1933 se marcaron por primera vez anticuerpos con sustancias coloreadas y, en 1941 se inició el uso de compuestos fluorescentes con este propósito. Coons y Col en 1942 fueron quienes aplicaron por primera vez, las técnicas de anticuerpos fluorescentes en Microbiología y a partir de 1950, aparecieron una serie de trabajos describiendo el uso de estas técnicas para distintos microorganismos.

Golwasser y Kissling (12) adaptaron el método de anticuerpos fluorescentes para la rabia en 1958 y desde entonces se ha venido usando cada vez más para el diagnóstico de esa enfermedad (6).

La técnica de anticuerpos fluorescentes (AF) es una prueba serológica en la que, para detectar la reacción antígeno-anticuerpo se usa como sistema indicador al Isotiocianato de fluoresceína, unida al anticuerpo. Esta sustancia es visualizada en el microscopio, al ser excitada por la luz ultravioleta.

La técnica de anticuerpos fluorescentes tiene las ventajas de demostrar el antígeno ya sea infectante o no, en contraste con los métodos de tinción directa (Seller, Mann y otros) que revelan solamente las inclusiones celulares y además poder obtener con ella resultados positivos específicos mucho más rápidamente que por inoculación de ratones (15).

2.2 Características del Virus de la Rabia.

El virus de la rabia es un rhabdovirus género Lyssavirus especie Formido inexorabilis, sus partículas tienen forma de bastón o bala que miden 60-40 nm x 60-85 nm. Las partículas están englobadas por una envoltura membranosa con espigas protuberantes de 10 nm de longitud.

El virus de la rabia contiene ácido ribonucleico. Se inactiva por solventes lipídicos, produce cuerpos de inclusión citoplasmáticos y tiene una afinidad por tejidos que segregan mucosa especialmente con los asociados al sistema respiratorio (16).

2.3 Epidemiología.

En nuestro país así como en muchos otros países del mundo y sobre todo en los países tropicales, el reservorio de la rabia es el perro y la magnitud del problema que la enfermedad plantea depende, sobre todo de las relaciones que existen entre la población y el perro. La enfermedad se mantiene esencialmente a causa de la transmisión del virus de los perros a otros animales domésticos y al hombre, siendo el ser humano el huésped definitivo.

La rabia canina se encuentra en más de 80 países y territorios, sobre todo en zonas en desarrollo. La enfermedad va difundiéndose y está transformándose en un peligro importante para la salud y la economía no sólo en zonas urbanas, como siempre había sucedido, sino también en zonas rurales (10).

Cerca de 700 defunciones de personas por rabia se reportan a la O.M.S.

pero este número no revela la realidad mundial, ya que no todos los países reportan sus casos positivos. Aún no están en capacidad de proporcionar estadísticas precisas. Aún en las regiones donde la rabia es endémica y donde no hay prácticamente control, las defunciones notificadas no reflejan la realidad del problema.

En El Salvador en los últimos años se ha notado una tendencia al aumento de casos de rabia humana (ver gráfico No. 1, página 38), lo cual se agrava más con el crecimiento de las poblaciones urbanas y por la situación política existente en nuestro país. En la actual situación demográfica del país, se favorece la difusión del virus de la rabia en la población humana y la posible propagación a otras especies de animales, que haría más difícil su control.

2.4 Metodología de Diagnóstico.

Al ser reportado un caso de persona mordida por un perro, si es factible, se observa el perro por 10 días, si el animal muere, se extrae el encéfalo y se hacen los cortes necesarios.

Se efectúa primariamente la tinción directa de cortes de tejido cerebral, por medio de la coloración de Seller, si ésta es negativa, se continúa con la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes, en el caso, de ser ésta negativa se inoculan ratones lactantes con el material sospechoso, la sobrevivencia de los ratones inoculados después de 21 días, da por negativo el caso de posible rabia que se ha investigado.

V. MATERIALES Y EQUIPO UTILIZADO

1. Equipo :

Autoclave de construcción vertical Modelo B-C-H, Webeco.

Balanza analítica Metler H78AR.

Balanza Granataria

Cocina eléctrica

Congelador de 40°a - 100°C.

Microscopio de fluorescencia standard con fuente de luz ultra violeta "Leitz".

Potenciómetro Chemtrix Type 40E.

Refrigeradora

2. Materiales :

Agitadores de vidrio

Balones volumétricos de 1000 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml, 25 ml.

Beakers de 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml.

Bandejas de coplin.

Baja lengua de madera

Bureta de 50 ml.

Espátula pequeña

Frascos plásticos de 1000 ml, 500 ml.

Guantes quirúrgicos

Láminas cubreobjeto

Láminas portaobjeto

Lápiz marcador Tech pen

Malla de asbesto

Mascarilla quirúrgica

Palillos

Papel absorbente

Papel glasil

Pinzas de sostén

Pipetas volumétricas de 25 ml, 5 ml, 1 ml.

Soporte

Termómetro de -0° a 250°C

Tijeras pequeñas

Vidrio de reloj grande y pequeño

3. Reactivos, soluciones :

3.1 Para método químico :

Acido clorhídrico concentrado HCl

Acido clorhídrico 1 N HCl 1N

Biftalato de potasio $[\text{KHC}_6\text{H}_4(\text{COO}_2)]_2$

Fosfato de sodio dibásico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Fosfato de potasio monobásico $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Hidróxido de sodio NaOH

Hidróxido de sodio 1 N NaOH 1N

Hidróxido de sodio 0,2N NaOH 0,2N

Agua bidestilada

Tetraborato de sodio $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

3.2 Para método microscópico :

Agua destilada

Aceite de inmersión

Acetona

Alcohol yodado

Formalina al 10%

Glicerina

Solución tampón pH 7,2 - 7,4 de fosfatos ácidos de sodio.

Solución conjugado antirrábico.

4. Otros :

Láminas control negativo

Láminas control positivo.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

1. Preparación de la combinación de Soluciones Tampón 0,01M de Fosfato de sodio dibásico y monobásico, utilizados para elaborar la curva de perfil de pH.

1.1 Para calcular las cantidades necesarias de sales de fosfatos a combinar se usó la fórmula siguiente:

$$V \times G \times F = \text{Gramos de sal}$$

Donde : V = Volumen de la solución 0,01M en fosfatos (ml/lt).

G = Gramos de fosfatos (dibásico y monobásico) por ml de solución 0,01M (gr/ml)

F = Factor de molaridad

$$= \frac{M \text{ real}}{M \text{ teórica}}$$

Para el fosfato de sodio dibásico el valor de G es :

$$G = 0,00268 \text{ gr/ml.}$$

Para el fosfato de sodio monobásico el valor de G es :

$$G = 0,00138 \text{ gr/ml.}$$

1.2 Preparación de la combinación de soluciones 0,01M de fosfatos - de sodio dibásico y monobásico.

Primeramente se verificó la calidad de los reactivos a utilizar.

Luego se pesaron cantidades exactas de las sales y se disolvie-

ron por separado con agua libre de CO_2 llevándose cada una a un volumen de 1000 ml en balón volumétrico.

1.2.1 Ejemplo de cálculos realizados para preparar la combinación de solución tampón 0,01M de pH 5,0 - 5,2 según tabla No. 1, indica que para un pH 5,0 - 5,2 se debe tomar una alicuota de 990 ml de la solución de 0,01M de fosfato de sodio monobásico y 10 ml de la solución 0,01M de fosfato de sodio dibásico por litro de solución.

De acuerdo a la fórmula, para el fosfato de sodio monobásico el cálculo es el siguiente:

$$V \times G \times F = \text{Gramos de la sal}$$

$$\text{Donde : } V = 990 \text{ ml/lit.}$$

$$G = 0,00138 \text{ gramos/ml}$$

$$F = 1$$

Aplicando la fórmula :

$$990 \text{ ml} \times 0,00138 \text{ gramos/ml} \times 1 = \text{Gramos de la sal}$$

1,3662 gramos de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para preparar un litro de solución.

De acuerdo a la fórmula, para el fosfato de sodio dibásico el cálculo es el siguiente:

$$V \times G \times F = \text{Gramos de la sal}$$

$$\text{Donde : } V = 10 \text{ ml /lit.}$$

$$G = 0,00268 \text{ gramos/ml}$$

$$F = 1$$

Aplicando la fórmula

$$\begin{aligned} \text{Gramos de Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} &= 10 \text{ ml} \times 0,00268 \text{ gr/ml} \times 1 \\ &= 0,0268 \text{ gr/ml para preparar -} \\ &\text{un litro de solución.} \end{aligned}$$

1.2.2 Preparación de la combinación de solución tampón 0,01M de pH 5,0 - 5,2.

Se mezclaron 990 ml de la solución de fosfato de sodio monobásico -- 0,01M y 10 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico 0,01M, en un balón volumétrico de 1000 ml, luego a la combinación de solución tampón se le determinó el pH a 25°C, y se esterilizó a 121° C durante 15 minutos - con 15 libras de presión. Se enfrió la solución tampón preparada a tempe_ratura ambiente, luego se le determinó el pH controlando de que la tempe_ratura fuera de 25°C al momento de realizar la lectura.

Debido a que después del proceso de esterilización de la solución tam_pón, el valor del pH observado se desviaba un poco del valor esperado se_gún tabla No. 1, se consideró que era necesario corregir los valores obte_nidos por la fórmula utilizada, sumándole una pequeña cantidad de la sal para obtener valores de pH idénticos al valor esperado según la tabla No. 1, página 19,

Corregidos los valores de las sales a utilizar se prepararon las dife_rentes combinaciones de soluciones de fosfatos de sodio 0,01M, como se indi_ca en la tabla No. 1 en la página 19. Iniciándose con la preparación de - la solución de fosfato de sodio monobásico 0.01M. hasta llegar a la solu--

ción de fosfato de sodio dibásico 0,01M, completando los 38 valores de pH, que sirvieron para elaborar la curva de perfil de pH. Ver figura No. 1, - página 22.

Las soluciones cuyos valores de pH no fueron idénticos a los valores esperados, se les adicionó gotas de NaOH 1N ó HCl 1N según fuese necesario hasta obtener valores de pH idénticos a los esperados.

Todo el material utilizado para ajustar el pH se esterilizó previamente y el agua utilizada en la preparación de la solución de NaOH 1N y HCl 1N también. Además se colocaron mecheros en la mesa de trabajo, para evitar cualquier posible contaminación microbiana.

Las lecturas de pH de las soluciones tampón elaboradas, se realizaron tomando pequeñas porciones de las soluciones tampón en beaker de 100 ml, - con el objeto de no contaminar la solución, además se controló que la temperatura fuera de 25°C al momento de realizar dichas lecturas.

Las soluciones tampón se envasaron en frascos plásticos de 1000 ml previamente lavados y enjuagados con agua estéril.

Tabla No. 1. Valores de pH para mezclas de soluciones: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 M y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,01 M, Obtenidos en la investigación, con los cuales se elabora la curva de perfil de pH.

m1. H_2O	m1 0,01 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	m1 0,01 M. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	pH
900	----	----	5.5 - 5.7
---	1000	----	9.0 - 9.2
---	990	10	8.8 - 8.9
---	980	20	8.6 - 8.7
---	970	30	8.5 - 8.6
---	960	40	8.3 - 8.4
---	950	50	8.2 - 8.3
---	940	60	8.1 - 8.2
---	930	70	8.0 - 8.1
---	920	80	8.0 - 8.1
---	910	90	7.9 - 8.0
---	900	100	7.9 - 8.0
---	880	120	7.8 - 7.9
---	860	140	7.7 - 7.8
---	820	180	7.6 - 7.7
---	800	200	7.5 - 7.6
---	750	250	7.4 - 7.5
---	700	300	7.3 - 7.4
---	650	350	7.2 - 7.3
---	600	400	7.2 - 7.3
---	550	450	7.1 - 7.2
---	500	500	7.0 - 7.1
---	450	550	6.9 - 7.0
---	400	600	6.8 - 6.9
---	350	650	6.7 - 6.8
---	300	700	6.6 - 6.7
---	250	750	6.5 - 6.6
---	200	800	6.4 - 6.5
---	150	850	6.2 - 6.4
---	100	900	6.0 - 6.2
---	80	920	5.9 - 6.0
---	60	940	5.8 - 5.9
---	50	950	5.7 - 5.8
---	40	960	5.6 - 5.7
---	30	970	5.5 - 5.6
---	20	980	5.3 - 5.4
---	10	990	5.0 - 5.2
---	0	1000	4.6 - 4.7

2. ESTANDARIZACION DEL POTENCIOMETRO.

La estandarización del potenciómetro se realizó según el procedimiento descrito por la Farmacopea XXI de los Estados Unidos de América.

Para estandarizar el potenciómetro, se seleccionaron dos soluciones - buffer estandars, cuya diferencia en el valor de pH no exceda de cuatro - unidades; tal que el pH esperado de la solución bajo ensayo esté entre -- ellos. La temperatura utilizada en el potenciómetro, las soluciones ---- buffer standard y las soluciones bajo ensayo fue de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$. Algunas veces fué necesario ajustar las soluciones a dicha temperatura mediante - la aplicación de calor (baño de agua caliente) o enfriamiento (baño de -- agua helada) según fuese necesario.

Antes y después de medir el pH de las soluciones buffer standard y - la solución bajo ensayo, los electrodos se lavan con agua bidestilada li- bre de CO_2 y estéril.

Los electrodos se lavan con la solución buffer standard luego se in- troducen los electrodos en dicha solución y se ajusta con el control el - valor de pH de la solución buffer standar tabulado en la Farmacopea XXI de los Estados Unidos de América. Luego se retiran los electrodos de la solución buffer standard y se repite el procedimiento anterior con una - segunda solución buffer standard.

Una vez estandarizado el potenciómetro se procede a medir el pH de la solución buffer bajo ensayo, lavando primero los electrodos con dicha solu- ción, luego se introducen los electrodos en la solución buffer bajo ensa- yo y finalmente se observa el valor de pH de dicha solución buffer: Use agua libre de CO_2 (vea agua, en la sección Reactivos, Indicadores y Solu-

ciones), para solución o dilución de la solución a examinar en la determinación de pH, en la Farmacopea XXI de los Estados Unidos de América.

3. ELABORACION DE LA CURVA DE PERFIL DE pH.

Los datos de pH obtenidos de las preparaciones de las disoluciones - tampón, ver tabla No. 1, página 19. Se utilizaron para elaborar la curva de perfil de pH, graficándose en el eje de las ordenadas, los ml de la solución de fosfato de sodio dibásico 0,01M al lado izquierdo y los ml de - fosfato de sodio monobásico 0,01M al lado derecho. En el eje de las abcisas se dan los valores de pH obtenidos en las lecturas de las combinaciones de dichas soluciones tampón a una temperatura de 25°C (Ver figura No. 1, página 22).

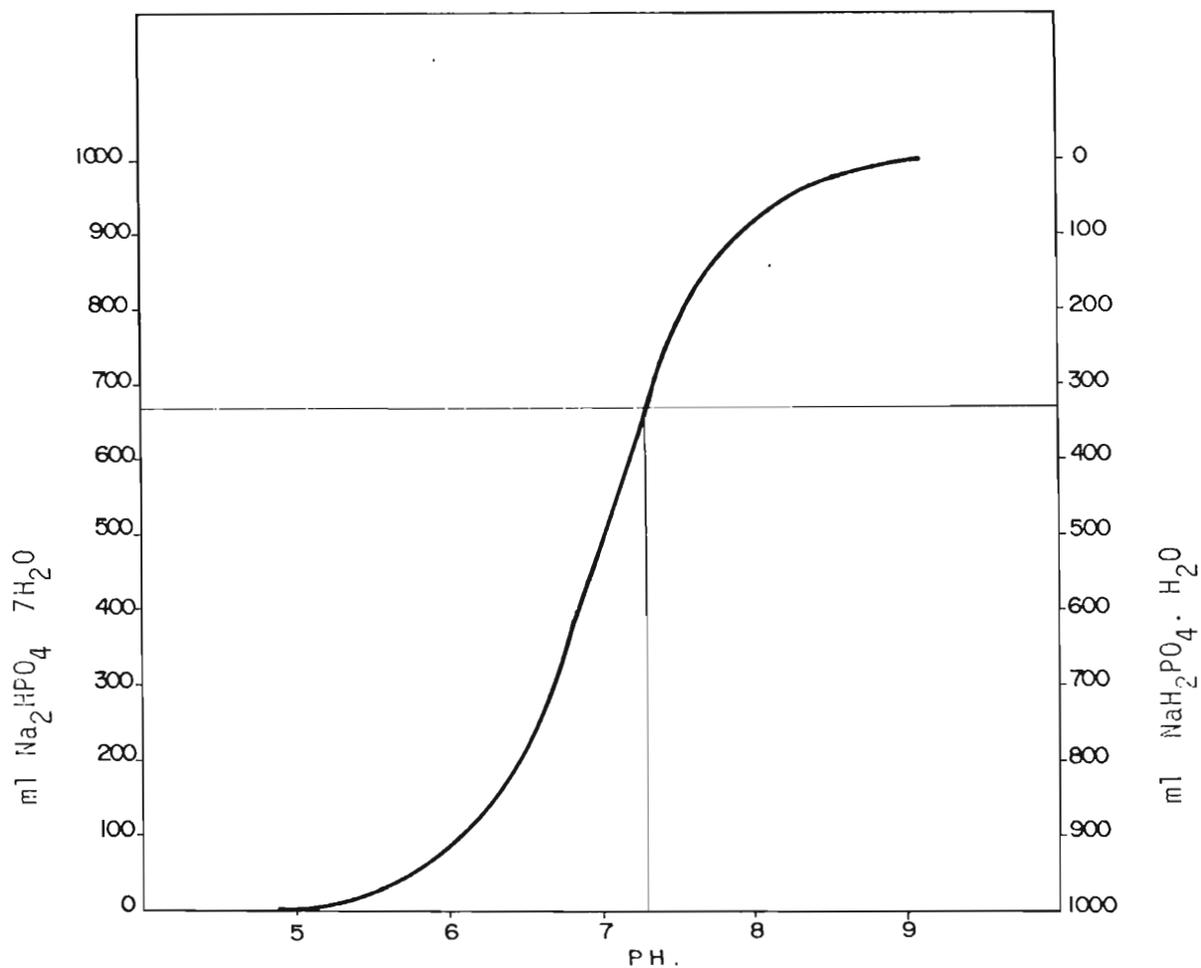


FIGURA No. 1.- Curva de perfil de pH en el cual se interpoló el valor de pH 7,2 - 7,4 para determinar los volúmenes de las soluciones a mezclar a fin de obtener el pH deseado.

4. PREPARACION Y DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE FOSFATOS DE SODIO 0,01M de pH 7,2 - 7,4.

4.1 Preparación de la Solución Tampón de Fosfatos de Sodio 0,01M de pH 7,2 - 7,4.

Para la preparación de la solución tampón de fosfatos de sodio 0,01M de pH 7,2 - 7,4 se partió de las soluciones previamente preparadas de fosfato de sodio dibásico 0,01 M y de fosfatos de sodio monobásico 0,01M, las cuales fueron combinadas para obtener el pH 7,2 - 7,4.

Se interpoló el valor de pH 7,2 - 7,4 en el gráfico de perfil de pH - (ver figura No. 1 página 22), se obtuvo un valor de 570 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico 0,01M y 330 ml de la solución de fosfato de sodio monobásico 0,01M a combinar para obtener el pH 7,2 - 7,4. Las soluciones se prepararon por separado con agua libre de CO_2 , se combinaron a ambos volúmenes en un frasco volumétrico de 1000 ml. El pH de la disolución tampón se determinó a una temperatura de 25°C, luego se esterilizó a 121° C durante 15 minutos con 15 libras de presión, enfriándose a temperatura ambiente para luego determinarle el pH a 25°C.

Todo el material empleado en la determinación del pH de la solución - tampón se esterilizó previamente. Para realizar dicha determinación de pH se tomaron porciones de la solución para evitar la contaminación de la misma, luego se descartaba la solución a la cual se le realizaba la determinación, corrigiendo el pH de la solución tampón en el volumen restante.

4.2 Determinación de la estabilidad de la Solución Tampón de fosfatos de sodio 0,01M de pH 7,2 - 7,4.

Se prepararon 10 soluciones tampón pH 7,2 - 7,4, tal como se describe en el literal 4.1. Luego se les determinó el pH a 25°C antes y después del proceso de esterilización, envasándose en frascos plásticos de 1000 ml los cuales fueron tratados previamente tal como se describe en la página 18, para evitar cualquier posible contaminación. Cinco de estas soluciones fueron conservadas en refrigeración y cinco a temperatura ambiente, por un período de seis meses, controlando el pH de cada una de las soluciones cada 15 días, para comprobar si mantenían el mismo valor de pH. Al mismo tiempo se realizaba el diagnóstico del virus de la rabia cada mes, mediante la prueba de Anticuerpos Fluorescentes, con el fin de comprobar la efectividad de dichas soluciones tampón.

5. DIAGNOSTICO DE LA RABIA, REALIZADA MEDIANTE EL METODO DIRECTO DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES (AF).

5.1 Recolección de la Muestra.

La muestra es remitida a la Unidad de Laboratorio del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y al Laboratorio de Diagnóstico de Patología Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Esta puede ser, el cadáver del animal o sólo su cabeza debiéndose enviar en un ambiente frío (con hielo) para su preservación y debidamente identificadas. Además las muestras deben de ser remitidas con los datos del formulario corres-

pondiente a la encuesta Epizootiológica (epidemiología de animales). -- (Ver anexos 1 y 2, páginas 39-40), del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Los resultados obtenidos son remitidos a las correspondientes Unidades de Epidemiología, las que procesan la información y notifican a CEPANZO, Buenos Aires, Argentina.

Los casos de personas mordidas por perros que son tratados en las Unidades de Salud, informan a las respectivas regiones y luego pasan al Departamento de Estadística de Salud, del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

En caso de rabia humana, el Centro de Salud inmediato remite al paciente a un Centro Hospitalario; quien en caso de deceso envían muestras de tejido cerebral a la Unidad de Laboratorio Central del Ministerio de Salud - Pública y Asistencia Social y Patología Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería; en los cuales se verifica el diagnóstico confirmativo e informando inmediatamente de estos resultados a la Unidad de Epidemiología - del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

5.2 Método Directo de Anticuerpos Fluorescentes (AF).

El diagnóstico de la rabia se realizó mediante el método directo de - Anticuerpos Fluorescentes, de acuerdo al procedimiento descrito por el -- "INFORME TECNICO DEL CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, OFICINA SANITARIA - PANAMERICANA SOBRE PRUEBA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA LA RABIA" (6).

Esta prueba ofrece ventajas (ver página 9 (15) sobre otros métodos de diagnóstico de la rabia, razón por la cual fue seleccionada por los Labo-

ratorios de los Ministerios de Salud Pública y Asistencia Social y Agricultura y Ganadería, y actualmente es la que se realiza.

5.2.1 Preparaciones de la Muestra a Investigar Rabia.

Se hicieron preparaciones, en primer lugar, de Cuerno de Ammón, después de la Corteza Cerebral y finalmente del Cerebelo.

Con unas tijeras pequeñas se hicieron cortes transversales de (2 - 3 mm de grosor) del tejido encefálico (cuerno de ammón, cerebelo y corteza). Los que se colocaron sobre un depresor de lengua de madera, con la superficie de ésta hacia arriba, presionando con suavidad hacia abajo, se hicieron dos impresiones por región, obteniéndose una película fina bastante homogénea de tejido.

5.2.3 Técnica.

Las impresiones se secaron a temperatura ambiente por espacio de media hora, al cabo de ese tiempo se fijaron en acetona a -20°C por 2-4 horas, luego se secaron a temperatura ambiente. A las impresiones se les delimitó en el portaobjeto con un lápiz marcador Tech pen. Luego se les agregó 0,3 ml de conjugado antirrábico, extendiéndose el conjugado uniformemente utilizando siempre palillos distintos para cada círculo. Los portaobjeto se colocaron sobre una cámara húmeda y se llevaron a incubación a 37°C por espacio de 30 minutos.

Después del período de incubación, se enfriaron los portaobjeto a temperatura ambiente y se lavaron sumergiéndolos en solución salina tampona-

rante diez minutos, luego se hace un segundo lavado igual al primero en otra solución salina tamponada del mismo valor de pH, seguidamente se pasan a otra bandeja conteniendo agua destilada sumergiéndolas y agitándolas periódicamente por espacio de diez minutos. Este lavado nos permite eliminar toda la inmunofluorescencia inespecífica.

A continuación se colocaron las láminas portaobjeto en posición vertical. Una vez secas, se les añadió una gota de glicerina al 50 % amortiguada a un pH 7,4 y luego se les colocó una lámina cubreobjeto y finalmente se examinaron al microscopio de luz ultra violeta las muestras.

5.2.4 Preparaciones Testigos.

Los frotis se prepararon con encéfalo de animales francamente positivos para los controles positivos y a partir de cerebro de ratón de 11,0 a 14,0 gramos los controles negativos. Todas las láminas se fijaron en acetona libre de agua y se conservaron a -20° durante un año.

5.2.5 Técnica.

A las preparaciones testigos se les realizó la misma técnica que la muestra a investigar rabia simultáneamente.

5.2.6 Interpretación de Resultados.

La muestra se compara con los testigos positivos y negativos. Un diagnóstico positivo será la observación de agregados víricos de distintas for

mas y tamaños de un color verde manzano brillante con contraste oscuro, -
dispersados sobre el campo del microscopio.

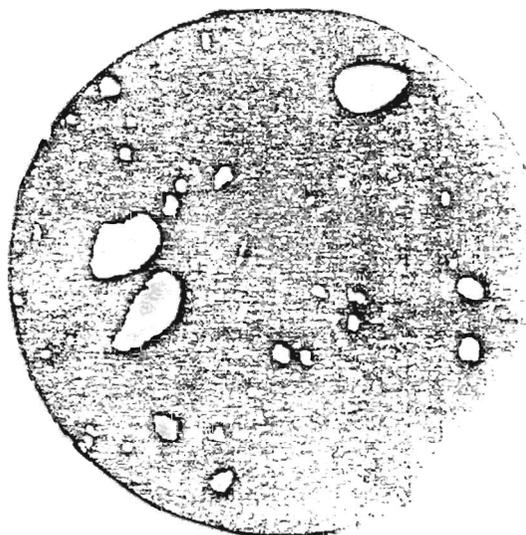


Fig. No. 3.- Agregados víricos de distintas formas y tamaños, observados al microscopio de luz ultra violeta.

VII. RESULTADOS

Como se puede observar en la Tabla No. 2, página 31, todas las muestras de soluciones tampón, se mantuvieron estables durante cuatro meses y al quinto mes se observó una variación en el valor de pH de + 0,05 unidades de pH, lo cual se considera dentro del margen de error tolerable.

En la misma Tabla No. 2, podemos observar que las soluciones tampón se mantuvieron estables por el mismo período, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, debido a que dichas soluciones se conservaron en frascos que no permitieron alguna alteración, ya que estaban estériles y bien cerrados.

En las soluciones tampón preparadas para el presente estudio no se observó ninguna contaminación microbiana después de transcurridos seis meses.

Según la Tabla No. 3 página 32, la efectividad de las soluciones tampón preparadas para el presente estudio, fue satisfactoria, ya que no se observó inmunofluorescencia inespecífica al realizar los lavados con dicha solución, en la prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia.

TABLA No. 2.- Valores de pH obtenidos durante el período Dic./86 a mayo/87, para determinar el período de estabilidad de la solución pH 7,2 - 7,4.

Soluciones.	Tiempo					
	Diciembre/86	Enero/87	Febrero/87	Marzo/87	Abril/87	Mayo/87
	Valores de pH a Temperatura Ambiente					
So1 ₁	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
So1 ₂	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
So1 ₃	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
So1 ₄	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
So1 ₅	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
	Valores de pH en Refrigeración					
So1 ₁	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
So1 ₂	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
So1 ₃	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
So1 ₄	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40
So1 ₅	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,40

TABLA No. 3.- Resultados del diagnóstico de la rabia, realizado mediante la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes durante el período de Diciembre/86 a Mayo/87, para comprobar la efectividad de las soluciones tampón pH 7,2 - 7,4.

Tiempo					
Diciembre 1986	Enero/87	Febrero/87	Marzo/87	Abril/87	Mayo/87
Temperatura Ambiente					
No Inmuno- fluores-- cencia. Inespecí- fica.					
Refrigeración					
No Inmuno- fluores-- cencia Inespecí- fica	No Inmuno- fluores-- cencia Inespecí- fica	No Inmuno- fluores-- cencia Inespecí- fica	No Inmuno- fluores-- cencia Inespecí- fica	No Inmuno- fluores-- cencia. Inespecí- fica.	No Inmuno- fluores-- cencia. Inespecí- fica.

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Para la elaboración de la solución tampón de fosfatos de sodio de pH 7,2 - 7,4, se tomó en cuenta el trabajo realizado por el Servicio de Química de la Sección de Bioquímica y Control de Productos del I.I.V, Maracay, Venezuela, así como las especificaciones de la Farmacopea XXI de los Estados Unidos de América.

Considerando que algunos valores de pH no coincidían, con el valor esperado; en la elaboración de las disoluciones tampón, utilizadas en la elaboración de la curva de perfil de pH, se consideró necesario corregir los valores obtenidos, por la fórmula utilizada, sumando una pequeña cantidad a las sales, en este caso particular la cantidad fue de 1.2 %, con lo que dió valores de pH idénticos al valor esperado.

El efecto de la esterilización sobre el pH de la solución tampón de pH 7,2 - 7,4 no fue tan drástico ya que las sales de fosfatos proporcionan soluciones tampón con pH termoconstantes.

La estabilidad del pH de la solución tampón pH 7,2 - 7,4 varió en $\pm 0,05$ unidades de pH con respecto al tiempo, durante un período de seis meses, lo cual se considera dentro del margen de error tolerable.

La técnica de Diagnóstico de la Rabia utilizada para comprobar la efectividad de la solución tampón pH 7,2 - 7,4 fue la de Anticuerpos Fluorescentes por ser una técnica de diagnóstico que se está realizando actualmente en nuestro país por los Laboratorios del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y Ministerio de Agricultura y Ganadería,

La Fluorescencia del complejo antígeno-anticuerpo puede ser alterada

por la concentración de los iones hidrógeno y su efecto varía según el colorante empleado. Por lo que en la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el diagnóstico de la rabia, se usa como colorante el Isotiocianato de Fluoresceína que dá su máxima fluorescencia a un pH cercano a 8,0. La solución tampón utilizada en los lavados de dicha prueba tiene un pH 7,2 - 7,4 el cual es un valor cercano al pH 8,0, de esta manera se evita que el complejo antígeno-anticuerpo pueda ser alterado por la acción del colorante y de la concentración de los iones hidrógeno.

IX. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye lo siguiente:

- Que la cantidad de sal utilizada para corregir los valores de pH obtenidos mediante la fórmula utilizada, es bien bajo, debido a que las soluciones tampón de fosfatos poseen valores de pH termoconstantes, (mantienen el valor de pH al aumentar la temperatura).
- Que la esterilización de las soluciones tampón se hace necesario, para evitar la contaminación microbiana y para prolongar el período de estabilidad de dichas soluciones, cuando éstas son diluidas. En el presente estudio la solución tampón pH 7,2 - 7,4, fue estable por más de seis meses.
- Que todas las soluciones tampón sometidas tanto a temperatura ambiente como en refrigeración sin excepción presentaron una fluctuación de valor de pH de +0,05 unidades de pH, durante un período de seis meses, considerándose dentro del margen de error tolerable.
- Que la solución tampón de fosfatos de sodio pH 7,2 - 7,4 elaborada en el presente estudio es efectiva, en los lavados realizados en la Prueba de anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia, ya que es capaz de arrastrar todas las impurezas, obteniéndose resultados satisfactorios. Además dicha solución resulta barata y de rápida preparación.
- Los datos obtenidos en el presente estudio, servirán de base a los

Ministerios de Salud Pública y Asistencia Social y de Agricultura y Ganadería, para elaborar sus propias soluciones tampón de fosfatos - de sodio 0,01 M en forma más rápida, confiable y a menor costo, lo que permitirá ahorrar tiempo y dinero.



X. RECOMENDACIONES

- Todos los reactivos empleados en la preparación de soluciones tampón deben ser grado reactivo de buena calidad, U,S,P, ó A,C,S.
- El agua utilizada en la preparación de soluciones tampón debe ser recién destilada, si es posible bidestilada y libre de CO_2 y enfriada antes de usarla, eliminando de esta manera el CO_2 disuelto en el agua.
- Todas las pesadas de los reactivos empleados en la preparación de las soluciones tampón se deben realizar en balanza analítica.
- La determinación del pH de todas las soluciones tampón deben de hacerse con un potenciómetro estandarizado con dos soluciones tampón estandard de pH conocido, cercanos al de la solución tampón a medir a temperatura de 25°C .
- Las soluciones tampón standard se deben preparar según las especificaciones de la Farmacopea XXI de los Estados Unidos de América.
- Las soluciones tampón diluidas se deben esterilizar, para evitar el crecimiento de bacterias y hongos.
- Las soluciones tampón estériles se deben conservar, en frascos esteriles de polipropileno, con tapón del mismo material para evitar el desarrollo de bacterias y hongos.
- Los frascos de polipropileno se recomienda esterilizarlos con gas de óxido de etileno.

XI. RESUMEN

En vista que en nuestro país, en los últimos años se ha notado una tendencia al aumento de casos de rabia humana, lo cual se agrava más con el crecimiento de las poblaciones urbanas, considerándose como uno de los problemas prioritarios de salud, se ha realizado el presente trabajo, con el objeto de contribuir con la misma, para determinar los casos de rabia mediante la realización del diagnóstico de dicha enfermedad para lo cual se necesita de que las soluciones tampón, utilizadas en los correspondientes lavados, tengan el pH adecuado que garantice eliminar totalmente la inmunofluorescencia inespecífica y así que se efectúe un diagnóstico seguro, evitando los riesgos de diagnósticos falsos positivos.

La preparación de la solución tampón pH 7,2 - 7,4, se llevó a cabo siguiendo la metodología de interpolación del valor de pH, en la curva de perfil de pH (ver figura No. 1, página 22) y luego se siguieron las especificaciones dadas por la Farmacopea XXI de los Estados Unidos de América.

En la determinación de la estabilidad de las soluciones tampón, éstas se sometieron a temperatura ambiente y en refrigeración, durante un período de seis meses, observándose que estas soluciones se mantienen estables en ambas condiciones.

La efectividad de las soluciones tampón pH 7,2 - 7,4 se comprobó mediante la realización de la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para el Diagnóstico de la Rabia, en la cual no se observó inmunofluorescencia inespecífica (ver Tabla No. 3, página).

NUMERO DE CASOS DE RABIA EN HUMANOS

1974 - 1984

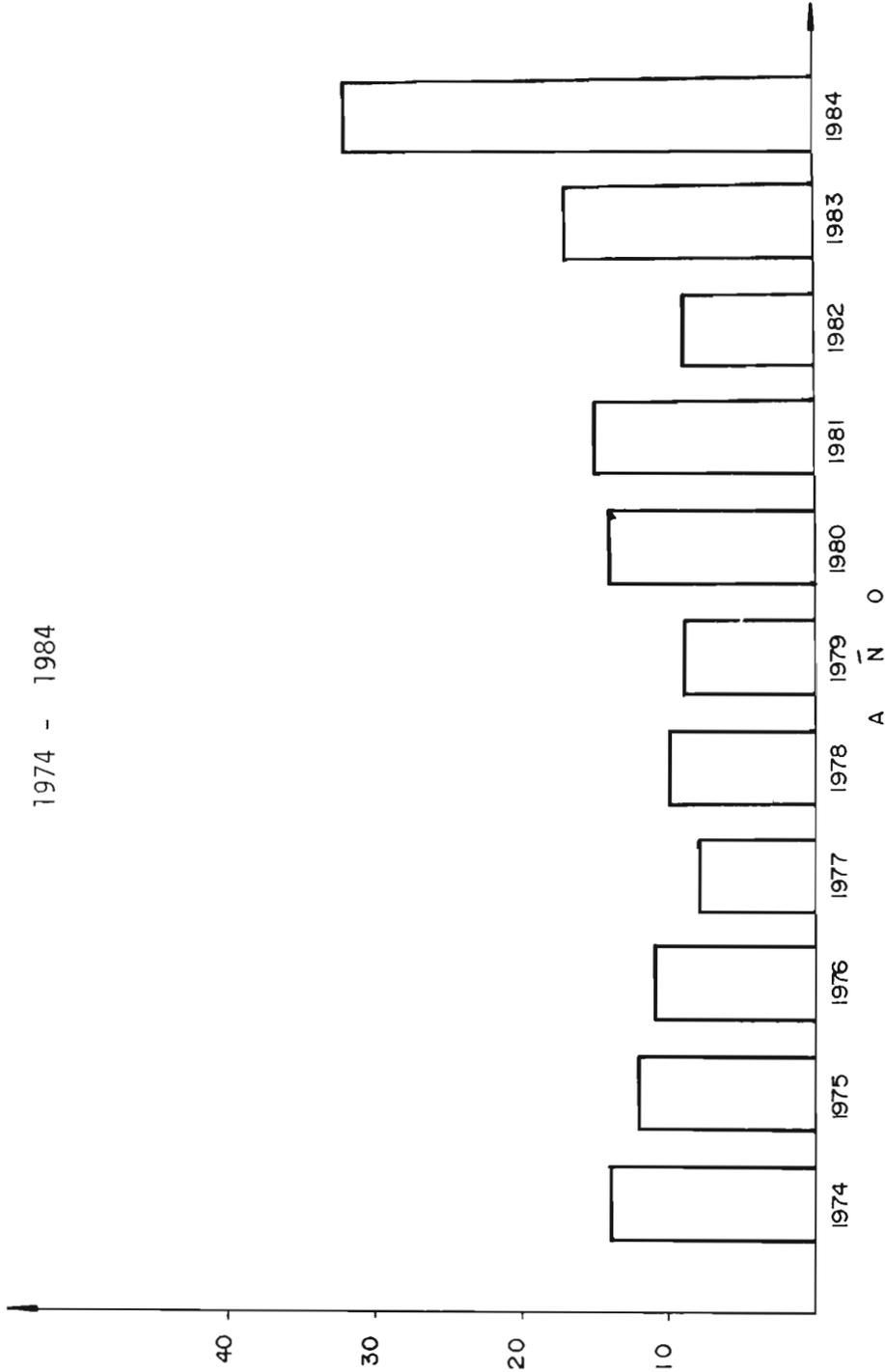


GRAFICO No. 1.- Gráfico de barra que muestra el aumento de casos de rabia humana en El Salvador. Datos obtenidos en El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

INFORMACION OBTENIDA EN EL M.S.P.A.S. EN EL CASO DE RABIA CANINA

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

UNIDAD DE LABORATORIO

SECCION DE PRODUCTOS BIOLOGICOS

AREA DE DIAGNOSTICO DE RABIA.

Caso No. _____

Nombre del dueño _____

Dirección _____

Teléfono : _____

Datos generales :

Animal _____ Edad _____ Sexo _____ Raza _____

Muestra enviada _____

Historia :

Murió el día _____ Espontáneamente/Sacrificado _____

Salía a la calle _____ Mordido por otro animal _____

Vacunado contra rabia _____ Fecha _____

Quedan más animales en casa _____ Fueron

mordidos por éste _____

Sintomatología :

Salivación _____ Agresividad _____ Postra-

ción _____ Incoordinación _____ Dificultad pa-

ra comer _____ Beber _____ Ladrar _____

Mordía objetos _____ Mirada anormal _____

Buscaba refugio _____ Sensible a ruidos y luz _____

Parálisis posterior _____ Desde cuándo apareció enfermo _____

_____ Se ha regado insecticida últimamente _____

Se le efectuó algún tratamiento _____

Caso remitido por :

Propio interesado/Médico Veterinario/Unidad de Salud/otros _____

Personas expuestas _____

Región mordida _____

Han iniciado tratamiento _____

Información adicional _____

San Salvador, _____ de _____

Responsable

INFORMACION OBTENIDA POR EL M.S.P.A.S. A TRAVES DE HOSPITALES EN CASO DE -

RABIA HUMANA

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

DIVISION DE LABORATORIOS DE SALUD

DIAGNOSTICO DE RABIA HUMANA

FECHA _____ CASO # _____ REFERIDO POR _____
REGION _____

DATOS PERSONALES

APELLIDO Y NOMBRE _____
EDAD _____ SEXO _____ DIRECCION _____
REGION DE SALUD _____
CIUDAD O PUEBLO _____ DEPARTAMENTO _____

ANTECEDENTES DE INFECCION

<u>Exposicion al Virus por:</u>	<u>Si es Mordedura :</u>	<u>Herida :</u>
Mordedura _____	Su localización _____	Unica _____
Contacto _____	_____	Múltiple _____
Ignorado _____	_____	Superficial _____
_____	_____	Profunda _____

Fecha de Exposición _____ Fecha de muerte _____

VACUNACION

Se aplicó suero _____ cuántas unidades _____ Se aplicó vacuna _____ qué tipo _____
_____ No. de dosis _____ Fecha inicio Vacunación _____ Fecha término Vac.-
_____ Interrumpió vacunación _____ por qué motivo _____

DIAGNOSTICO :

RESULTADO EXAMEN DE SELLERS _____
RESULTADO EXAMEN ANTICUERPOS FLUORESCENTES _____
RESULTADO DE LA INOCULACION DE RATONES _____

OBSERVACIONES :

TECNICO RESPONSABLE

1. Preparación de las Soluciones Buffer Estandar Utilizadas en la Estandarización del Potenciómetro,

Estas soluciones se prepararon según el procedimiento descrito por la Farmacopea XXI de los Estados Unidos de América, con la modificación de - que se usó agua bidestilada en lugar de agua destilada y se esterilizaron después de preparados.

1.1 Solución Buffer estandard pH 4,01 Biftalato de Potasio 0,05 M.

Se pesaron 10,10 gramos de biftalato de potasio previamente secado a 110°C por una hora y luego se disolvió con agua libre de CO₂, llevándose a volumen de 1000 ml en un balón volumétrico.

1.2 Solución Buffer estandard pH 5,4 Biftalato de Potasio 0,2M e Hidróxido de Sodio 0.2M.

Se pesaron 2,04 gramos de biftalato de potasio previamente secado a 110°C por una hora, luego se disolvió con agua libre de CO₂ llevándose a volumen de 50 ml en un balón volumétrico. Luego se pipeteó 25 ml de esta solución y se colocaron en un balón volumétrico de 100 ml y se le adicionó 12,05 ml de hidróxido de sodio 0,2M mediante el uso de bureta y luego se llevó a volumen con agua libre de CO₂.

1.3 Solución Buffer estandard pH 6,86

Fosfato Equimolal 0,05M

Se pesaron 3,53 gramos de fosfato de sodio dibásico y 3,39 gramos de fosfato de potasio monobásico cada uno previamente secado a 120°C por dos horas. Luego se disolvieron por separado con agua libre de CO₂, se mezclaron las soluciones y finalmente se colocaron en un balón volumétrico de 1000 ml, llevándose a volumen con agua libre de CO₂.

1.4 Solución Buffer estandard pH 8,0

Fosfato de Potasio monobásico 0,2M

Se pesaron 1,361 gramos de fosfato de potasio monobásico previamente secado a 120°C por una hora y luego se disolvió con agua libre de CO₂ llevándose a volumen de 50 ml en un balón volumétrico. Luego se pipeteó 25 ml de esta solución y se colocaron en un balón volumétrico de 100 ml y se le adicionó 23,05 ml de hidróxido de sodio 0,2M con una bureta, se mezclaron las soluciones y se llevó a volumen con agua libre de CO₂.

1.5 Solución Buffer estandard pH 9,18

Tetraborato de Sodio 0,01M

Se pesaron 3,80 gramos de tetraborato de sodio previamente secado a 120°C por una hora, luego se disolvió con agua libre de CO₂ llevándose a volumen de 1000 ml en un balón volumétrico.

1.6 Solución de Hidróxido de Sodio 1N.

Se pesaron 54 gramos de hidróxido de sodio y se disolvieron en 50 ml de agua libre de CO_2 , luego se enfrió dicha solución y se filtró utilizando papel filtro. Luego se transfirieron 13,60 ml de esta solución mediante el uso de bureta a un frasco volumétrico de 250 ml llevándose a volumen con agua libre de CO_2 .

Para estandarizar el hidróxido de sodio 1N, se pesaron exactamente 0,25 gramos de biftalato de potasio previamente pulverizado y secado a 120°C por dos horas, luego se disolvió en 3,75 ml de agua libre de CO_2 y se le adicionó una gota de fenolftaleína TS y se tituló con la solución de hidróxido de sodio preparada anteriormente hasta la producción de un color rosado permanente, esta titulación se realizó por triplicado. Luego se calculó la normalidad real de la solución de hidróxido de sodio.

1.7 Solución de Hidróxido de Sodio 0,2N

Una alícuota de 50 ml de hidróxido de sodio 1N recientemente preparado, se colocó en un frasco volumétrico de 250 ml mediante el uso de bureta y luego se llevó a volumen con agua libre de CO_2 . Esta solución se valoró para determinarle su normalidad real. Ambas soluciones se envasaron en frascos plásticos bien cerrados.

4. GLOSARIO

- Microscopía Inmunofluorescente :

Técnica serológica que sirve para demostrar la combinación específica de los anticuerpos unidos al indicador de Isotiocianato de Fluoresceína con los antígenos, la cual es visualizada en el microscopio de luz ultra violeta.

- Anticuerpos Fluorescentes :

Son los anticuerpos obtenidos al inocular con virus rábico a un conejo, los cuales son separados por cromatografía de columna, luego las inmunoglobulinas antivíricas quedan marcadas y se separan por diálisis y se unen al Isotiocianato de Fluoresceína.

- Inmunofluorescencia Inespecífica :

Cuando el tejido grisáceo se observa de color verde fluorescente en el microscopio de luz ultra violeta.

- Especificidad Inmunológica :

Los antígenos provocados reaccionan específicamente con anticuerpos específicos para dichos antígenos.

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. BHAGAVAN, N. V. Bioquímica. Traducción de la primera ed. en Inglés por Dr. Wolfgang Meyerson. México, Interamericana, 1974. pp. 4-7.
2. BLOOD, HENDERSON. Medicina Veterinaria. 4a ed. México, Interamericana, 1973. pp 557-561.
3. BURROWS, WILLIAM. Tratado de Microbiología. Traducción de la primera ed. decimanovena ed. por Dr. Alberto Folch y Pl. México, Interamericana, 1969. pp 879-883.
4. CARPENTER, PHILIP. L. Microbiología. Traducción y adaptación de la 4a ed. en Inglés por Dr. José Rafael Blengio, Dr. Roberto Espinoza Zarza, Dr. Alberto Folch Pl, 4a ed. México, Interamericana, 1979. pp - 414-415.
5. CASTILLO, PEDRO PABLO. Diluentes Tamponizados para la Elaboración de la Vacuna Bivalente Antiaftosa en Ratones Lactantes Vol. I Venezuela, Tropical, No. 19. pp 52-61.
6. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Oficina Sanitaria Panamericana sobre Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para la Rabia. Informe técnico - No. 8, Sept., 1975. pp 5-7.
7. COONS, A.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 47, 1941. pp 200-202.

8. DANIELS, F. ALBERTY, R. A. Fisiología. México, Continental, 1965. pp. 233, 235.
9. EL SALVADOR. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL, MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA. Programa de Prevención, Control y Eliminación de la Rabia en El Salvador, San Salvador, Agosto de 1985, pp 4-11.
10. FROBISHER, MARTIN. Sc. D. Microbiología. 3a ed. Barcelona, Salvat, - 1964. pp 170.
11. GLASSTONE, S. Tratado de Química-Física. 3a. ed. Madrid, Aguilar, -- 1961. pp.
12. GOLDWASSER, R. A.; KISSLING, R. E. Fluorescent. Antibody Staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc. Soc. exp. Biol..N. Y. 98, 1958. pp 219-223.
13. JAWETZ, ERNEST, MELNICK, JOSEPH. L, ADELBERG, EDWER, D. A. Microbiología Médica 10a ed. México, Manual Moderno, 1983. pp 171.
14. KAPLAN, COLIN Y OTROS. Que hay de cierto sobre la rabia, versión en español. Bogotá, Colombia, Norma, 1976. pp. 11-15, 25.
15. KAPLAN, M. M. y KOPROWSKI, H. La Rabia, Técnicas de Laboratorio 3a. ed. No. 23, 1976. pp 11-25.
16. LENNETTE, SPAULDING, E. H., TRAUNT, J. P. Manual de Microbiología - Clínica. Traducción de la primera ed. por Carlos Abella. Mallorca, Barcelona, Salvat, 1981. pp 764-767.

17. LUNA RANGEL, RAYMUNDO. Fundamentos de Química Analítica. Vol. I, - México, Limusa, 1976, pp. 211-220.
18. MARON, H. SAMUEL, Y PRUTTON, CARLF, Fundamentos de Físico-Química. Decimoprimerá reimpresión. México, Limusa. 1980. pp. 459-460.
19. MARTIN. CHASE. COX. DENO. GENNARO. HARVEY, KING. LEUALLEN. OSOL. SWINYARD. VAN METER. Remington's Pharmaceutical Sciences. Thirteenth ed. Easton. Pensylvania. Planning Board, 1965. pp 242-245, 468-470.
20. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Rabia, Informe técnico No. 709, Ginebra, 1984, pp 39-41.
21. RODWELL MAYES MARTIN. Bioquímica de Harper. 9a ed. Traducción puesta al día según la 19a ed. por Q.F.B. Ma. del Rosario Carsolio P. México. El Manual Moderno, 1984. pp. 9-13.
22. SBARBATI DE NUDELMAN, NORMA ETHEL. Estabilidad de Medicamentos. Buenos Aires. El Ateneo, 1975. pp 44, 59, 97, 112.
23. THE UNITED STATES PHARMACOPEA XXI, 1985. pp 1430-1432, 1419-1420-1258.
24. VOGEL ARTHUR I. Química Analítica Cualitativa. Versión al castellano por Miguel Catalano, Elsiades Catalano. Buenos Aires. Kapeluz 1953. pp 82.