

Lej. 239

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA RABIA EN SUEROS DE ANIMALES VACUNADOS Y DESAFIADOS (PRUEBA DE POTENCIA), MEDIANTE LA PRUEBA DE CONTRAINMUNOLECTROFORESIS MODIFICADA.

Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del Título de MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p o r

JOSE ALBERTO RODRIGUEZ MIRANDA



**Asesores: M.V.Z. Aurora Velázquez Echegaray
M.V.Z. Raymundo Iturbe Ramirez
M.V.Z. Angel Retana Reyes**

México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS.....	9
DISCUSION.....	12
CONCLUSIONES.....	17
LITERATURA CITADA.....	18

R E S U M E N

RODRIGUEZ MIRANDA JOSE ALBERTO. Determinación de anticuerpos contra rabia en sueros de animales vacunados y desafiados (Prueba de potencia), mediante la prueba de Contrainmunolectroforesis modificada.

Bajo la dirección de: Aurora Velázquez E., Raymundo Iturbe R. y Angel Retana R.

En este trabajo se evaluó la prueba de Contrainmunolectroforesis modificada (CIE/SN), con la finalidad de determinar anticuerpos contra rabia en sueros de animales vacunados y desafiados (Prueba de potencia). Se inocularon 25 cuyes con un décimo de dosis de vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán. Tres semanas más tarde se obtuvieron muestras de suero y se desafiaron los animales con 100 DLR50% de CVS. Una segunda muestra de suero fue obtenida 7 días después del desafío. Para determinar la presencia de anticuerpos antirrábicos en los 50 sueros, se utilizaron las pruebas de CIE/SN y patrón de Seroneutralización en ratón (SN). Fue imposible determinar anticuerpos neutralizantes del virus rábico con las pruebas empleadas, en los sueros obtenidos a las 3 semanas post-vacunación. Sin embargo, la totalidad de los animales vacunados sobrevivió al desafío con CVS y presentó niveles variados de inmunoglobulinas. El rango de anticuerpos a los 7 días post-desafío fue de 5 a 161 por SN y de 2 a 16 por CIE/SN. El 100% de los animales controles de CVS fallecieron, comprobándose la presencia del antígeno rábico en tejido nervioso mediante la Prueba directa de anticuerpos fluorescentes. Al relacionar las técnicas de SN y CIE/SN por los métodos de Hayslett y Maisel, se obtuvo un coeficiente de correlación de $r = 0.88$, que es estadísticamente significativo. Se determinó la regresión lineal de los títulos obteni-

dos por ambas pruebas, para poder predecir los resultados esperados en SN a partir de los obtenidos por CIE/SN. La ecuación de la recta de regresión fue: $Y = 0.5485 + 1.487X$. Se calcularon también los límites superior e inferior de confiabilidad del 95% a partir de los títulos de anticuerpos obtenidos por CIE/SN para garantizar una predicción más exacta de los resultados esperados en SN.

I N T R O D U C C I O N

La rabia es una encefalitis viral, a la cual son susceptibles todos los animales de sangre caliente incluyendo al hombre (30, 43, 53). Es causada por un virus RNA de la familia de los Rhabdovirus, género Lyssavirus; su forma más común de transmisión es por la mordedura de animales enfermos (2, 20, 30, 31, 43, 50).

Debido a que el desenlace de la enfermedad es fatal, se previene a las personas que trabajan con virus rábico mediante la vacunación, utilizando vacunas preparadas a partir de cerebro de ratón lactante, en embrión de pato o en células diploides humanas, las cuales contienen virus inactivado (2, 8, 19, 21, 30, 31, 34, 45, 50); siendo imprescindible evaluar la respuesta inmune en los individuos vacunados.

De las técnicas serológicas que determinan la presencia de inmunoglobulinas neutralizantes inducidas por la glicoproteína del virus rábico, único antígeno capaz de provocar la formación de este tipo de anticuerpos (2, 11, 12, 18, 45, 56, 60), la Contrainmunolectroforesis (CIE) ha demostrado alta sensibilidad y especificidad para estudiar inmunoglobulinas y antígenos. Tiene como principio el que un antígeno y un antisuero migran el uno hacia el otro en un campo eléctrico, sobre un soporte de agarosa, acelerando así la unión antígeno-anticuerpo, que se manifiesta por la formación de una línea de precipitación (4, 13, 15, 23, 24, 25, 29, 30, 36, 42, 44, 47, 52, 62).

En 1977, Díaz y Varela-Díaz desarrollan una técnica de CIE para determinar anticuerpos contra rabia en sueros de humanos, bovinos, perros, conejos y ratones. Relacionando estos resultados con los obtenidos por la prueba patrón de Seroneutraliza-

ción en ratón, demostraron que los anticuerpos precipitantes - observados son también neutralizantes (16). Como este método - mostró cierta actividad inespecífica con sueros hemolizados o lipémicos (16), en 1980 Díaz y Myers modificaron la prueba para eliminar la inespecificidad. Estos autores estudiaron sueros de humanos inmunizados post-exposición (mordida) con vacunas tipo Fuenzalida; desafortunadamente, no se comprobó la presencia de virus rábico en el tejido nervioso de los animales - que agredieron a estos individuos (17).

Otros procedimientos utilizados para determinar la presencia de anticuerpos antirrábicos, son:

1) Prueba patrón de Seroneutralización en ratón. (SN).- Emplea una serie de diluciones del suero a probar y una dosis -- constante de virus CVS*. Es la técnica de referencia de las -- pruebas serológicas por ser altamente específica y confiable; aunque requiere 15 días como mínimo para proporcionar resultados y de un gran número de animales de laboratorio (33, 45, -- 56).

2) Seroneutralización por reducción de placas.- Esta prueba está correlacionada con la SN, requiriendo 5 a 6 días para la obtención de resultados; utiliza cultivos celulares y personal altamente calificado para su realización (9, 10, 28, 33).

3) Prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes.- Consiste en mezclar el suero, problema con virus rábico, se incuba la reacción (37°C/60') y después se agregan células BHK-21** - tratadas con DEAE-dextrán. Se deja que se formen las monocapas y a las 24 horas de incubación, se examinan las células con un conjugado antirrábico para determinar la presencia de virus -- sin neutralizar (33, 54, 56). Esta técnica es rápida, se pueden procesar varias muestras a la vez y conserva estrecha co-

*Virus patrón de confrontación (Challenge Virus Standard).

**Células renales de hamster lactante (Baby Hamster Kidney).

rrelación con la SN; aunque tiene los mismos inconvenientes -- que la prueba anterior.

4) Prueba de hemoadsorción mixta.- Se emplea para cuantificar anticuerpos en la superficie de cultivos celulares infectados con virus. El principio de la prueba es semejante al de la Prueba indirecta de inmunofluorescencia, excepto que se usan eritrocitos como indicador, en lugar de conjugado antigammaglobulina. Hay una buena relación con la SN, pero presenta dificultades para su realización (18, 30, 33, 50).

La Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes, Fijación de complemento, Ensayo inmunoenzimático (ELISA) y Radioinmunoensayo (RIA), miden niveles de anticuerpos séricos, pero no -- indican si estas inmunoglobulinas tienen la capacidad de neutralizar el virus o no (4, 18, 24, 30, 33, 43, 50, 56).

Como se puede observar, la determinación de niveles de anticuerpos antirrábicos plantea varios problemas, por lo que es necesario contar en el laboratorio con una prueba que muestre una estrecha correlación con los resultados obtenidos por la SN, que se realice en un mínimo de tiempo y a bajo costo.

Al utilizar la prueba de Contrainmunolectroforesis modificada (CIE/SN), se evaluó su sensibilidad y especificidad bajo otras condiciones experimentales y técnicas, por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar, con esta prueba, suros provenientes de cuyes inmunizados con vacuna de virus activo atenuado y posteriormente desafiados con 100 DLR50% de CVS (Prueba de potencia). Se determinó también la relación entre la prueba de SN y la de CIE/SN, con la finalidad de predecir los resultados de la primera, a partir de los títulos obtenidos con la segunda.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

PREPARACION Y OBTENCION DE SUEROS DE CUYE

Se utilizaron 35 cuyes de raza inglesa, clínicamente sanos, con un peso promedio de 350 gramos. Se comprobó la ausencia de anticuerpos contra rabia en el suero de estos animales, empleando la prueba de SN. Los animales se identificaron y se separaron en 3 grupos: A, B y C.

- Grupo A.- 25 cuyes fueron inoculados por vía intramuscular (IM), en la pierna izquierda, con un décimo de dosis de vacuna antirrábica (0.25 ml) cepa V-319/Acatlán* con un título de $10^{4.8}$ DLR50%/ml, diluída previamente, como lo indica el Manual de Requerimientos Mínimos de Calidad que deben llenar los Productos Biológicos para uso Veterinario, en su Prueba de potencia (40). Tres semanas después de la vacunación se obtuvo el suero, que se identificó y conservó a -20°C hasta el momento de utilizarse. Inmediatamente después, los animales fueron inoculados por vía IM, en la pierna derecha, con 0.5 ml de CVS conteniendo 100 DLR50%. Siete días más tarde, se tomó una muestra sanguínea para obtener el suero y determinar niveles de anticuerpos post-desafío.

- Grupo B.- Control de virus: 5 cuyes fueron inoculados por vía IM, con 0.5 ml de CVS conteniendo 100 DLR50%.

- Grupo C.- Control negativo: 5 cuyes fueron inoculados por vía IM, con 0.5 ml de Solución salina fisiológica.

Todos los cuyes fueron observados diariamente durante 30 días después del desafío. Se comprobó la presencia de virus rábico en el tejido nervioso de los animales que murieron, me---

*Proporcionada por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE).

diante la Prueba directa de anticuerpos fluorescentes descrita por Larghi (35).

Se utilizaron los siguientes sueros testigos:

- 1) Positivo a rabia de origen equino.
- 2) Positivo a rabia de origen cobayo.
- 3) Negativo a rabia de origen cobayo.

PRUEBA DE SN

Se realizó de acuerdo a los lineamientos descritos por Kaplan y Koprowski (33). Se utilizaron ratones albinos suizos cepa CFW clínicamente sanos, de 21 días de edad y peso promedio de 14 gramos. Un título de 5 o superior, fue considerado como positivo.

PRUEBA DE CIE/SN

Se siguió la técnica descrita por Díaz y Myers (17) para determinar los niveles de anticuerpos contra rabia. El antígeno utilizado fue un CVS de origen ratón al cual se le dieron dos pases en cerebro de conejo lactante, obteniéndose un título final de 10^8 DLR50%/0.03 ml; esta suspensión se inactivó con betapropiolactona diluida 1/3000.

Cada suero problema fue diluido empleando diluciones dobles seriadas y a cada una de estas diluciones se le adicionó una cantidad constante de antígeno. La mezcla suero-virus se incubó a $37^{\circ}\text{C}/60'$, para favorecer la neutralización del antígeno rábico.

Se utilizaron placas de vidrio de 75 por 50 mm, las cuales se cubrieron con 8 ml de agarosa al 0.9%. Una vez gelificada la agarosa, se hicieron dos hileras de 5 pozos paralelos de 6 y 3 mm de diámetro, con 8 mm de separación entre cada hilera.

Las mezclas antígeno-suero diluído fueron colocadas en los pozos del extremo catódico de las placas (6 mm) y recorridas por electroforesis durante 45'. En seguida se llenaron los pozos correspondientes al ánodo (3 mm) con suero equino hiperinmune antirrábico* conteniendo 200UI/ml y la electroforesis con tinuó por 120'. La lectura de la CIE/SN se realizó con ayuda de un negatoscopio.

Interpretación: Una reacción positiva se manifestó por la ausencia de precipitación, ya que las inmunoglobulinas contra rabia presentes en el suero problema, neutralizaron al antígeno y este no reaccionó con el suero equino indicador. Una reacción negativa se manifestó por la presencia de una fina y clara línea de precipitación entre ambos pozos; es decir, que el suero problema careció de inmunoglobulinas para actuar con el antígeno y este, al verse libre, reaccionó con el suero equino hiperinmune.

Se utilizó una solución amortiguadora de TRIS-Glicina pH -- 8.2 para la cámara de electroforesis, en lugar de una solución Veronal con el mismo pH.

Al concluir el trabajo, los resultados obtenidos por SN y CIE/SN se compararon y correlacionaron, empleando los métodos de Hayslett (26) y Maisel (39).

*Proporcionado por el Centro Panamericano de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina.

R E S U L T A D O S

Como puede observarse en el Cuadro No. 2, ningún animal presentó anticuerpos contra rabia al inicio del experimento.

En la Prueba de potencia, los 25 cuyes vacunados sobrevivieron al desafío con CVS (100 DLR/50%/0.5 ml), no presentando -- signos de rabia durante el periodo de observación (Grupo A). - La virulencia y patogenicidad del virus de desafío empleado en esta prueba, fue comprobada en los animales controles que no - fueron vacunados previamente (Grupo B); estos animales presentaron los signos clínicos característicos de la enfermedad y - murieron, comprobándose además la presencia del antígeno rábico en su tejido nervioso, por medio de la Prueba directa de anticuerpos fluorescentes (Cuadro No. 1).

Los Cuadros No. 2 y 3 muestran que en los 25 sueros del Grupo A obtenidos a los 21 días de la vacunación, no fue posible detectar la presencia de anticuerpos contra rabia con ninguna de las dos pruebas empleadas (SN y CIE/SN). Sin embargo, el total de los animales vacunados sobrevivió al desafío con el virus patógeno.

En las 25 muestra séricas del Grupo A obtenidas a los 7 --- días post-desafío (día 28), se encontraron títulos variados de inmunoglobulinas antirrábicas con ambas técnicas. Los títulos obtenidos por SN se encontraron en el rango de 5 a 161 ----- (\bar{x} = 51.58), mientras que los títulos en CIE/SN fluctuaron entre 2 y 16 (\bar{x} = 5.28).

El cuadro No. 4 muestra los resultados obtenidos por SN y - CIE/SN en los sueros testigos.

Para facilitar el análisis estadístico, los títulos obtenidos por ambas técnicas fueron expresados en logaritmo base 10 (\log_{10}). A los valores de las escalas para ambas pruebas así obtenidos (Diagrama de dispersión), se adiciona el número de diluciones usadas para cada uno de los sueros problema (Gráfica No. 1, corresponde a los Cuadros 2 y 3).

Se calculó el coeficiente de correlación (r) para establecer si había una relación significativa entre los títulos obtenidos por SN y CIE/SN. Se obtuvo un valor de $r = 0.88$, que es estadísticamente significativo.

Siendo el objetivo de este estudio el determinar el nivel de anticuerpos contra rabia empleando la prueba de CIE/SN, para poder predecir los títulos en SN, fue necesario determinar la línea de regresión (recta de cuadrados mínimos) de los \log_{10} de los títulos obtenidos por ambos métodos. La ecuación de la regresión lineal de estos valores fue:

$$Y = 0.5485 + 1.487X$$

La pendiente $b = 1.487$ debe ser interpretada como el incremento en el \log_{10} del título de SN por unidad, sobre el \log_{10} del título de CIE/SN (Gráfica No. 2).

Para obtener un valor estimativo del título de SN en base a los resultados obtenidos por CIE/SN, debe ser usada la siguiente conversión:

$$\log_{10} \text{ título de SN} = 0.5485 + 1.487 \log_{10} \text{ título de CIE/SN}$$

Además de la línea recta, se trazaron dos curvas de confiabilidad de 95% que representan los límites superior e inferior de la distribución del valor Y correspondiente a cada valor X (Gráfica No. 2). Estas curvas indican los valores máxi-

mos y mínimos esperados para SN, los cuales corresponden a los títulos obtenidos en CIE/SN.

Ejemplo: un suero con un título en CIE/SN, debe tener un título de 27.6 en SN. Los límites superior e inferior de confiabilidad del 95% muestran además que el título de SN no será mayor de 60.6 ni menor de 12.5.

CUADRO No. 1
RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE POTENCIA

GRUPO A ANIMALES VACUNADOS CON CEPA V-319/ACATLAN Y DESAFIADOS POSTERIORMENTE CON CVS					
Animales vacunados	Animales desafiados	DLR50% utilizadas/vía de inoculación/cantidad inoculada	Días de observación post-desafío	No. de muertos/vivos	Sobrevivientes (%)
25	25	100/IM/0.5 ml	30	0/25	100

GRUPO B CONTROL POSITIVO: ANIMALES INOCULADOS CON VIRUS RABICO DE DESAFIO (CVS)					
Animales inoculados	DLR50% utilizadas/vía de inoculación/cantidad inoculada	Días post-inoculación en que aparecieron los primeros signos nerviosos	No. de muertos/positivos a la Prueba directa de inmunofluorescencia	Positivos (%)	
5	100/IM/0.5 ml	24-30	5/5	100	

GRUPO C CONTROL NEGATIVO: ANIMALES INOCULADOS CON SSF					
Animales inoculados	Vía de inoculación/cantidad inoculada	Días de observación post-inoculación	No. de muertos/vivos	Sobrevivientes (%)	
5	IM/0.5 ml	30	0/5	100	

CUADRO No. 2

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SN

No. de suero	Título pre-vacunación (Día 0)	Título post-vacunación (Día 21)	Título post-desafío (Día 28)
1	-	-	33 = 1.51
2	-	-	25 = 1.39
3	-	-	19 = 1.27
4	-	-	19 = 1.27
5	-	-	5 = 0.69
6	-	-	33 = 1.51
7	-	-	25 = 1.39
8	-	-	95.5 = 1.98
9	-	-	33 = 1.51
10	-	-	6.5 = 0.81
11	-	-	42 = 1.62
12	-	-	48 = 1.68
13	-	-	37.5 = 1.57
14	-	-	48 = 1.68
15	-	-	48 = 1.68
16	-	-	42 = 1.62
17	-	-	42 = 1.62
18	-	-	75 = 1.87
19	-	-	60 = 1.77
20	-	-	125 = 2.09
21	-	-	161 = 2.20
22	-	-	75 = 1.87
23	-	-	75 = 1.87
24	-	-	75 = 1.87
25	-	-	42 = 1.62

Los resultados se expresan también en \log_{10}

CUADRO No. 3
 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE CIE/SN

No. de suero	Título post-vacunación (Día 21)	Título post-desafío (Día 28)
1	-	4 = 0.60
2	-	4 = 0.60
3	-	4 = 0.60
4	-	4 = 0.60
5	-	2 = 0.30
6	-	4 = 0.60
7	-	4 = 0.60
8	-	8 = 0.90
9	-	4 = 0.60
10	-	2 = 0.30
11	-	4 = 0.60
12	-	4 = 0.60
13	-	4 = 0.60
14	-	4 = 0.60
15	-	4 = 0.60
16	-	4 = 0.60
17	-	4 = 0.60
18	-	8 = 0.90
19	-	4 = 0.60
20	-	8 = 0.90
21	-	16 = 1.20
22	-	8 = 0.90
23	-	8 = 0.90
24	-	8 = 0.90
25	-	4 = 0.60

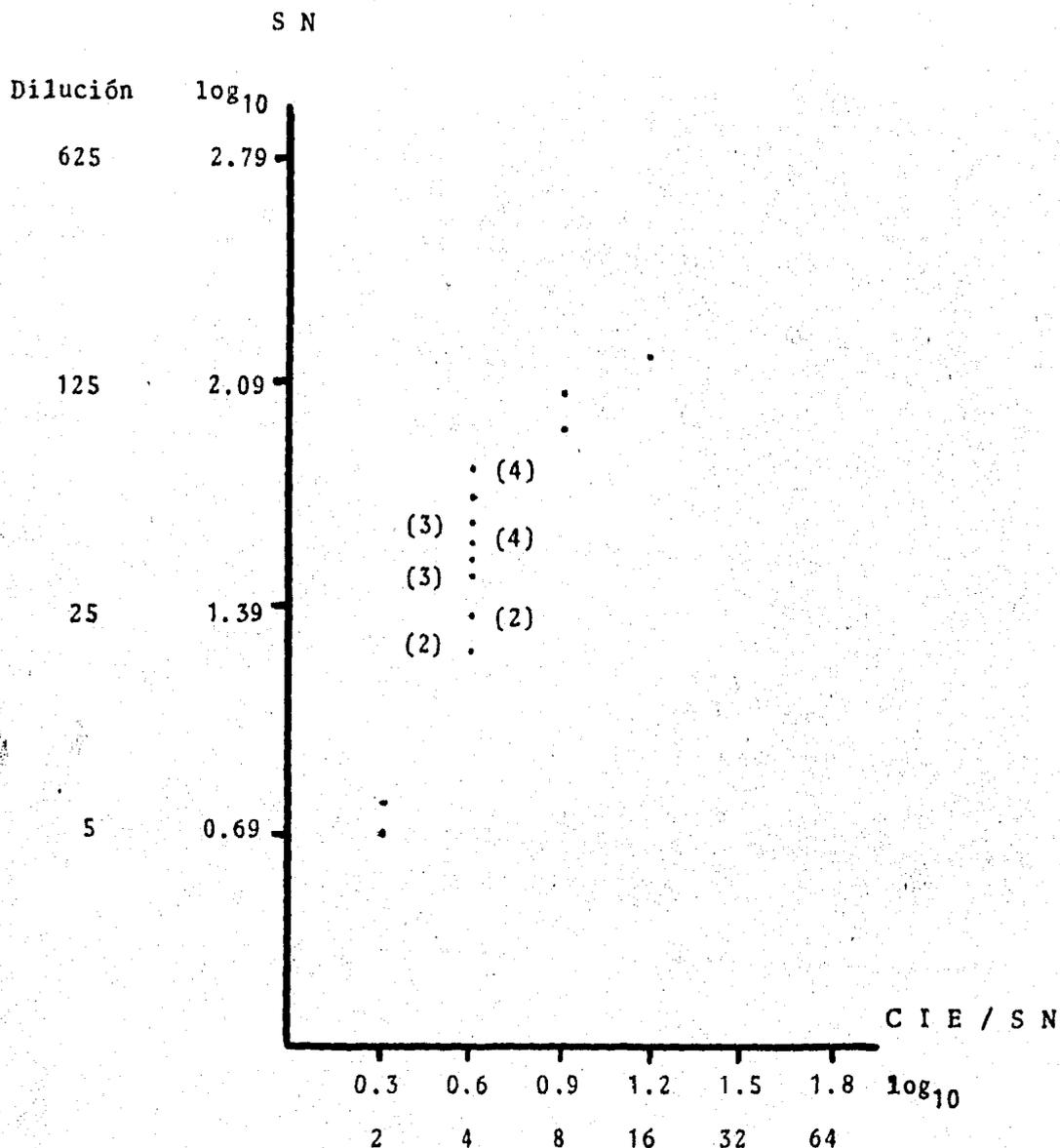
Los resultados se expresan también en \log_{10}

CUADRO No. 4
RESULTADOS DE LOS SUEROS TESTIGOS POR SN Y CIE/SN

Suero	Título en SN	Título en CIE/SN
1) Positivo a rabia origen equino	4500	128
2) Positivo a rabia origen cobayo	625	32
3) Negativo a rabia origen cobayo	--	--

GRAFICA No. 1

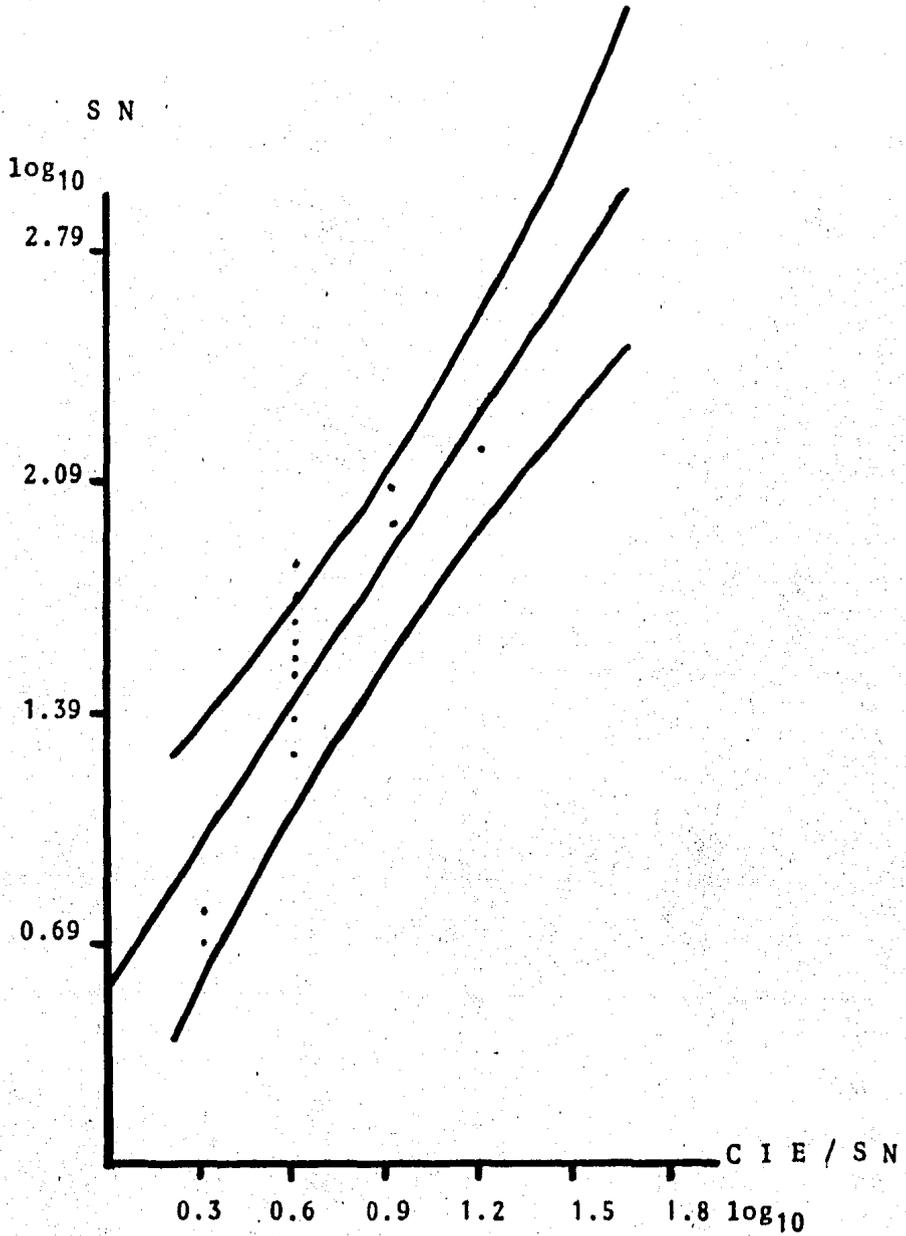
Diagrama de dispersión de los \log_{10} de los títulos de anticuerpos neutralizantes del virus rábico, obtenidos por SN y CIE/SN en los 25 sueros problema.



NOTA: Cada punto representa el título de un suero, con ambas técnicas. El número en paréntesis, indica la cantidad de sueros que presentaron el mismo título.

GRAFICA No. 2

Correlación entre los títulos de anticuerpos seroneutralizantes en 25 muestras de cuyes positivas a las pruebas de SN y -- CIE/SN. Se representan la regresión lineal y las curvas de confiabilidad del 95% de los límites superior e inferior de Y.



D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos con las dos técnicas evaluadas --- (SN y CIE/SN), muestran que no fue posible determinar la presencia de inmunoglobulinas séricas en los animales vacunados con un décimo de dosis de vacuna antirrábica cepa V-319/Acaatlán (Grupo A) y que fueron sangrados a los 21 días post-inoculación (Caudros 2 y 3 respectivamente).

Esta ausencia de anticuerpos nos hizo pensar que los animales no resistirían el posterior desafío con 100 DLR50% de CVS (Cuadro No. 1); sin embargo, el total de los cuyes sobrevivió sin mostrar signo clínico alguno de la enfermedad. El nivel de inmunoglobulinas post-desafío encontrado en estos animales fue de 5 a 161 para SN y de 2 a 16 para CIE/SN (Cuadros No. 2 y 3).

La patogenicidad de la cepa de desafío empleada se comprobó en los animales del Grupo B, donde se observó una mortalidad del 100%, determinándose la presencia del antígeno rábico mediante la Prueba directa de anticuerpos fluorescentes. Los resultados encontrados en este trabajo difieren de los obtenidos por Díaz y Myers (17), ya que estos autores no comprobaron la presencia de virus rábico en el tejido nervioso de los individuos en estudio.

Como se puede observar, los resultados indican que no hay una correlación directa entre el nivel de anticuerpos séricos y el grado de protección obtenido. Los resultados también hacen suponer que existen otros mecanismos que participan en la inmunidad hacia el virus rábico y que el suero no representa la totalidad de los mismos. Así, debemos mencionar que no se observaron diferencias clínicas post-desafío entre aquellos animales que mostraron niveles de anticuerpos de 5 y los de 161 por la prueba patrón de SN.

Son varias las causas que pueden explicar la sobrevivencia del total de los animales vacunados al desafío y la ausencia de inmunoglobulinas post-vacunación:

1) Relación respuesta inmune-dosis de vacuna.- Está demostrado que las vacunas a virus activo elaboradas en cultivos celulares, confieren una buena respuesta inmune (1, 6, 27, 32, 38, 45). Estas vacunas inducen la producción de altos títulos de anticuerpos, que se pueden detectar fácilmente a partir del día 21 y en ocasiones antes (10, 27, 38, 46); esto dependerá de la dosis, la cepa utilizada, la vía de inoculación, la presencia o no de adyuvante y la especie en la que se aplica el producto. Así, la ausencia de anticuerpos en los animales vacunados pudo obedecer a que fueron inoculados con un décimo de la dosis normal (2.5 ml) de un producto comercial. Lo anterior coincide con las investigaciones realizadas por López (37), -- quien utilizando dosis menores de vacuna cepa V-319/Acatlán en ratones, encontró una gran diferencia entre el nivel de anticuerpos inducidos por la vacunación y el porcentaje de protección conferido por la misma. Asimismo, López y Hernández (38) mencionan que a pesar de los buenos resultados obtenidos en -- Pruebas de potencia en cuyes, cuando se utilizan vacunas preparadas en cultivos celulares, estos son irregulares.

2) Relación nivel de inmunoglobulinas-grado de protección.- La literatura consultada informa de casos de rabia humana en los que individuos que poseían niveles altos de anticuerpos -- (41, 51), fallecieron al igual que sujetos que no presentaron anticuerpos detectables con las pruebas patrón durante el curso de la enfermedad (7). Existe también información acerca de dos casos de individuos que lograron niveles excepcionales de inmunoglobulinas antirrábicas por infección natural (32, 48); desafortunadamente, en estos sujetos no fue posible comprobar la presencia del antígeno rábico y se sospechó de rabia porque

niveles tan altos de anticuerpos en suero y líquido cefalorraquídeo, no se pueden obtener normalmente por vacunación.

3) Réplica viral.- Se sabe que varios virus, entre ellos el rábico, al replicarse pueden salir al espacio extracelular y así infectar a otra célula o pasar de una célula a otra sin exponerse al Aparato inmunocompetente (AIC), por lo que no habrá estimulación del mismo y por ende, producción de anticuerpos y/o linfocitos sensibilizados (23, 32, 43).

4) Interferón.- La capacidad interferogénica de diferentes tipos de vacunas contra rabia, ha sido estudiada (3, 5, 32, -- 46, 61) y se ha encontrado que la protección contra el virus rábico se relaciona directamente con el nivel de interferón inducido por las mismas. Así, Baer y Yager (5) encontraron que las vacunas preparadas en célula BHK inducen la producción de 1.5 unidades de interferón a las 24 horas post-vacunación, en ratones. Wiktor y colaboradores (61), señalan que una dosis de vacuna elaborada en células diploides humanas indujo niveles de 20-300 unidades de interferón, 8 horas después de ser aplicada en monos Rhesus.

5) Relación células inmunocompetentes-grado de protección.- Está demostrado que parásitos intracelulares como los virus, estimulan principalmente una inmunidad de tipo celular (14, -- 22, 50, 57, 59); desafortunadamente, existen pocos estudios efectuados con rabia, que evalúan clara y concretamente la respuesta celular hacia el antígeno rábico. Así, Ramanna y Pal -- (49) encontraron que la máxima inhibición de la migración de los macrófagos (90%), se detectó al sexto día post-sensibilización y que disminuyó notablemente el día 14 (45%) en conejos inoculados con virus rábico atenuado. Por otra parte, Tsiang y Lagrange (58) trabajando con pruebas de hipersensibilidad retardada en cojinete plantar de ratones, encontraron que los máximos niveles de hipersensibilidad se obtuvieron a las 24 ho--

ras post-desafío con CVS y a los 4 días post-desafío con virus de calle. En nuestro estudio no se analiza la respuesta celular en forma aislada, pero los dos trabajos arriba mencionados muestra la importancia de la participación de la inmunidad mediada por células, en la protección hacia el virus de la rabia.

Como puede apreciarse, la presencia de inmunoglobulinas en todos los sueros animales obtenidos después del desafío (día - 28) con las técnicas de SN y CIE/SN, contrasta con la ausencia de ellas a los 21 días post-vacunación. Probablemente, el incremento de anticuerpos fue provocado por el virus de desafío (CVS), que funcionó como un segundo estímulo antigénico dirigido al AIC. Resultados similares reportaron Sureau y colaboradores en sus trabajos con la vacuna antirrábica cepa ERA en bovinos (55) ya que observaron una notable elevación de anticuerpos en los animales vacunados, a partir del séptimo día del desafío. Ellos concluyen que la exposición al virus patógeno, actúa como un refuerzo que aumenta la inmunidad contra la rabia.

En relación a la prueba de CIE/SN, encontramos que su sensibilidad y especificidad en la determinación de anticuerpos contra rabia, es similar con respecto a la prueba patrón de SN, ya que los títulos detectados por ambas técnicas presentaron estrecha correlación como ya había sido demostrado previamente por otros autores, en diferentes condiciones (16, 17). De igual manera, estudios realizados con antígenos diferentes al virus rábico, confirman el valor diagnóstico de la CIE como prueba de rutina (15, 25, 29, 36, 42, 47, 52).

Estadísticamente, al correlacionar los títulos de anticuerpos obtenidos por SN y CIE/SN utilizando las técnicas descritas por Hayslett (26) y Maisel (39), observamos un mejor coeficiente de correlación ($r = 0.88$) en comparación al obtenido por Díaz y Myers ($r = 0.59$) al trabajar con sueros humanos ----

(17). Esto posiblemente tenga relación con el origen de los --
sueros utilizados, la uniformidad de los animales empleados, --
tipo y dosis de vacuna, número de estímulos antigénicos y méto
do estadístico empleado.

Finalmente, el cálculo de los límites superior e inferior de
confiabilidad del 95% a partir de los títulos de anticuerpos -
obtenidos por la prueba de CIE/SN, garantiza una predicción --
más exacta de los resultados esperados en SN (Gráfica No. 2) -
(26, 39).

CONCLUSIONES

1) Los resultados obtenidos en este trabajo en el total de los sueros de los animales sobrevivientes al desafío, indican que la CIE/SN es apropiada para la determinación de inmunoglobulinas contra rabia, ya que muestra una estrecha correlación con la prueba patrón de SN.

2) Empleando un décimo de la dosis (0.25 ml) de vacuna anti-rábica cepa V-319/Acatlán en cuyes, en este estudio, fue imposible determinar la presencia de anticuerpos séricos a los 21 días post-vacunación con la prueba evaluada y la prueba patrón de SN.

3) En este trabajo, esta cantidad de vacuna fue capaz de -- proteger al 100% de los animales vacunados, que fueron desafiados con 100 DLR50% de CVS posteriormente.

4) Son varios los mecanismos que juegan un papel importante en la protección hacia virus rábico y el suero no representa - la totalidad de los mismos.

L I T E R A T U R A C I T A D A

- 1) Abelseth, M.K.: Further studies on the use of ERA rabies vaccine in domestic animals. Can. Vet. J., 8: 221-227 ---- (1967).
- 2) Andrewes, C., Pereira, H.G. and Wildy, P.: Viruses of Vertebrates. 4th ed. Baillière Tindall, London, England, ---- 1978.
- 3) Atanasiu, P.: Interferón y vacunación antirrábica. Sal. Púb. Méx., 24: 123-129 (1982).
- 4) Bach, J.F. and Schwartz, R.S.: Immunology. 2nd ed. John Wiley & Sons, N.Y., USA, 1982.
- 5) Baer, G.M. and Yager, P.A.: A mouse model for post-exposure rabies prophylaxis: The comparative efficacy of two vaccines and of antiserum administration. J. Gen. Virol., 36: 51-58 (1977).
- 6) Batalla, C.D., Arellano, S.C. y Sureau, P.: Evaluación serológica de las vacunas antirrábicas para bovinos que existen actualmente en México. Téc. Pec. Méx., 18: 22-26 ---- (1971).
- 7) Center for Disease Control.: Two suspected cases of human rabies. Morbid. Mortal. Weekly Rep., 28: 292-298 (1979).
- 8) Clark, H.F., Wiktor, T.J. y Koprowski, H.: Vacunación Humana contra la Rabia, Historia Natural de la Rabia. Editada por: Baer, G.M., 339-364, La Prensa Médica Mexicana, México, D.F., 1982.
- 9) Corzo, C.D., Hernández, B.E. y Bijlenga, G.: Comparación de la sensibilidad de las pruebas de seroneutralización con diferentes cepas de virus de la rabia. I. Adaptación del virus CVS a cultivos celulares. Téc. Pec. Méx., 32: 66-68 (1977).
- 10) Corzo, C.D. y Hernández, B.E.: Comparación de la sensibilidad de las pruebas de seroneutralización con diferentes cepas de virus de la rabia. II. Comparación de la prueba de reducción de placas utilizando tres cepas de virus rábico

- adaptado a cultivos celulares. Téc. Pec. Méx., 32: 69-75 - (1977).
- 11) Cox, J.H., Dietzschold, B. and Schneider, L.G.: Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. Infect. and Immun., 16: 754-759 (1977).
 - 12) Cox, J.H.: The structural proteins of rabies virus. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 5: 21-25 (1982).
 - 13) Crowle, A.J.: Immunodiffusion. 2nd ed. Acad. Press, N.Y., USA, 1973.
 - 14) Cunningham, A.J.: Understanding Immunology. Acad. Press, - N.Y., USA, 1978.
 - 15) Dea, S., Roy, S. and Begin, M.E.: Counterimmunoelectrophoresis for detection of neonatal calf diarrhea coronavirus: Methodology and comparison with electron microscopy. J. -- Clin. Microbiol., 10: 240-244 (1979).
 - 16) Díaz, A.M. and Varela-Díaz, V.M.: The counterimmunoelectrophoresis test for detection of antibodies to rabies virus. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 128: 331-337 (1977).
 - 17) Díaz, A.M. and Myers, D.M.: Determination of serum neutralization antibodies to rabies virus by a modified counterimmunoelectrophoresis test. J. Clin. Microbiol., 12: ---- 175-179 (1980).
 - 18) Díaz, A.M. and Myers, D.M.: Comparison between a modified counterimmunoelectrophoresis test and the indirect fluorescent-antibody test for detection of antibodies to rabies virus in human sera. J. Clin. Microbiol., 14: 446-448 ---- (1981).
 - 19) Fábrega, F.P. y Sepúlveda, C.A.: Tratamiento antirrábico con vacuna de tipo Fuenzalida-Palacios. Bol. Of. Sanit. -- Panam., 90: 211-216 (1981).
 - 20) Fenner, F., McAuslan, B.R., Sambrook, J., Mims, C.A. and White, D.O.: The Biology of Animal Viruses. 2nd ed. Acad. Press, N.Y., USA, 1974.
 - 21) Fenner, F. and White, D.O.: Medical Virology. 2nd ed. ---- Acad. Press, N.Y., USA, 1976.

- 22) Fougereau, M. and Dausset, J.: 4th International Congress of Immunology. Progress in Immunology IV. Acad. Press, London, England, 1980.
- 23) Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. y Wells, J. V.: Manual de Inmunología Clínica. 2da ed. El Manual Moderno, México, D.F., 1980.
- 24) Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H.: Methods in Immunology. 3rd ed. W.A. Benjamin, INC., Massachusetts, USA, 1977.
- 25) Hatch, M.H.: Modified counterelectrophoresis method for subtyping hepatitis B antigen. J. Clin. Microbiol., 2: 231-234 (1975).
- 26) Hayslett, H.T.: Estadística Simplificada. 7a ed. Compañía General de Ediciones, México, D.F., 1980.
- 27) Hernández, B.E., Morales, R.J., Arellano, S.C., Campos, V. J., López, B.B. y Pérez, R.H.: Evaluación de una vacuna comercial antirrábica inactivada para bovinos, producida en cultivo de tejidos. Téc. Pec. Méx., 28: 57-62 (1975).
- 28) Hernández, B.E. y Corzo, C.D.: Comparación de la sensibilidad de las pruebas de seroneutralización con diferentes virus de la rabia. III. Comparación de la prueba de seroneutralización en ratones con la prueba de reducción de placas. Téc. Pec. Méx., 32: 76-80 (1977).
- 29) Hierholzer, J.C. and Barme, M.: Counterimmunoelectrophoresis with adenovirus type-specific anti-hemagglutinin sera as a rapid diagnostic method. J. Immunol., 112: 987-995
- 30) Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A.: Manual de Microbiología Médica. 7a ed. El Manual Moderno, México, D.F., 1977.
- 31) Kahrs, R.F.: Viral Diseases of Cattle. The Iowa University Press, Iowa, USA, 1981.
- 32) Kaplan, C.: Que Hay de Cierto sobre la Rabia. Edamex, México, D.F., 1981.
- 33) Kaplan, M.M. y Koprowski, H.: La Rabia. Técnicas de Laboratorio. 3a ed. OMS, Ginebra, Suiza, 1976.

- 34) Kumate, J.: Vacunas y Vacunación. Rabia. 6a ed. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F., 1976.
- 35) Larghi, O.P.: Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota técnica No. 8 - de la OSP., 2: 5-24 (1975).
- 36) Lindsey, H.S., Thompson, W.H. and Obijeski, J.F.: Diagnosis of California La Crosse virus infection by counterimmunoelectrophoresis. J. Clin. Microbiol., 7: 603-608 (1978).
- 37) López, B.B.: Inmunogenicidad comparativa de las cepas de rabia: Era (bajo pasaje), Era (alto pasaje), V319 y Mazatán 558 adaptados a cultivos celulares en ratones blancos adultos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., --- 1974.
- 38) López, B.B. y Hernández, B.E.: Proposición de un método experimental para probar la potencia para vacunas antirrábicas de virus vivo modificado producidas en cultivos celulares. Téc. Pec. Méx., 32: 58-65 (1977).
- 39) Maisel, L.: Probabilidad y Estadística. Fondo Educativo -- Interamericano, México, D.F., 1973.
- 40) Manual de Requerimientos Mínimos de Calidad que deben llenar los Productos Biológicos para uso Veterinario. ----- S.A.R.H., D.G.S.A., México, D.F., 1977.
- 41) Maton, P.N., Pollard, J.D. and Newsom, D.J.: Human rabies encephalomyelitis. Brit. Med. J., 1: 1038-1040 (1976).
- 42) Minor, T.E., Helstrom, P.B., Nelson, D.B. and D'Alessio, D.J.: Counterimmunoelectrophoresis test for immunoglobulin M antibodies to group B Coxsackievirus. J. Clin. Microbiol., 9: 503-506 (1979).
- 43) Mohanty, S.B. and Dutta, S.K.: Veterinary Virology. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1981.
- 44) Mota, A.R.: Empleo de la contraelectroforesis para diferenciar entre animales infectados y vacunados, que son reactores positivos a brucelosis por las pruebas de rutina. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1983.

- 45) Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos de la OMS en Rabia. 6to inf. Serie de Informes Técnicos No. 523. OMS, Ginebra, Suiza, 1973.
- 46) Plotkin, S.A.: Rabies vaccine prepared in human cell cultures: Progress and perspectives. Rev. Infect. Dis., 2: 433-447 (1980).
- 47) Poli, G., Pozza, O., Ponti, W., Balsari, A. and Vacirca, C.: Application of counterimmunoelectrophoresis for a rapid serodiagnosis of enzootic bovine leukosis. Brit. Vet. J., 136: 251-255 (1980).
- 48) Porras, C., Barboza, J.J., Fuenzalida, E., López, A.H., Díaz, A.M.O. and Furst, J.: Recovery from rabies in man. Ann. Inter. Med., 85: 44-48 (1976).
- 49) Ramanna, B.C. and Pal, S.R.: Cellular immunity in rabies virus infection: Leukocyte-migration inhibition in-vitro. Indian. J. Med. Res., 71: 6-11 (1980).
- 50) Roberts, A.W. and Carter, G.R.: Essentials of Veterinary Virology. Michigan State University Press, Michigan, USA, 1981.
- 51) Rubin, R.H., Sullivan, L., Summers, R., Gregg, M.B. and Sikes, R.K.: A case of human rabies in Kansas: Epidemiologic, clinical and laboratory considerations. J. Infect. Dis., 122: 318-322 (1970).
- 52) Russi-Cahill, J.C., Mogdasy, M.C., Somma-Moreira, R.E. and Peluffo, M.H. de.: Counterimmunoelectrophoresis with influenza antigens. I. Use of avian plague virus to detect type-specific antibodies to influenza A in human sera. J. Infect. Dis., 131: 64-66 (1975).
- 53) Smith, H.A., Jones, T.C. and Hunt, R.D.: Veterinary Pathology. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1972.
- 54) Smith, J.S., Yager, P.A. and Baer, G.M.: A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull. Wld. Hlth. Org., 48: 535-541 (1973).
- 55) Sureau, P., Arellano, C. y Batalla, D.: Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa ERA en bovinos. II.

- 45) Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos de la OMS en Rabia. 6to inf. Serie de Informes Técnicos No. 523. OMS, Ginebra, Suiza, 1973.
- 46) Plotkin, S.A.: Rabies vaccine prepared in human cell cultures: Progress and perspectives. Rev. Infect. Dis., 2: 433-447 (1980).
- 47) Poli, G., Pozza, O., Ponti, W., Balsari, A. and Vacirca, C.: Application of counterimmunoelectrophoresis for a rapid serodiagnosis of enzootic bovine leukosis. Brit. Vet. J., 136: 251-255 (1980).
- 48) Porras, C., Barboza, J.J., Fuenzalida, E., López, A.H., Díaz, A.M.O. and Furst, J.: Recovery from rabies in man. Ann. Inter. Med., 85: 44-48 (1976).
- 49) Ramanna, B.C. and Pal, S.R.: Cellular immunity in rabies virus infection: Leukocyte-migration inhibition in-vitro. Indian. J. Med. Res., 71: 6-11 (1980).
- 50) Roberts, A.W. and Carter, G.R.: Essentials of Veterinary Virology. Michigan State University Press, Michigan, USA, 1981.
- 51) Rubin, R.H., Sullivan, L., Summers, R., Gregg, M.B. and Sikes, R.K.: A case of human rabies in Kansas: Epidemiologic, clinical and laboratory considerations. J. Infect. Dis., 122: 318-322 (1970).
- 52) Russi-Cahill, J.C., Mogdasy, M.C., Somma-Moreira, R.E. and Peluffo, M.H. de.: Counterimmunoelectrophoresis with influenza antigens. I. Use of avian plague virus to detect type-specific antibodies to influenza A in human sera. J. Infect. Dis., 131: 64-66 (1975).
- 53) Smith, H.A., Jones, T.C. and Hunt, R.D.: Veterinary Pathology. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1972.
- 54) Smith, J.S., Yager, P.A. and Baer, G.M.: A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull. Wld. Hlth. Org., 48: 535-541 (1973).
- 55) Sureau, P., Arellano, C. y Batalla, D.: Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa ERA en bovinos. II.

- Duración de inmunidad. Téc. Pec. Méx., 18: 16-21 (1971).
- 56) Thomas, J.B.: Las Pruebas de Neutralización de Suero, de Anticuerpos Fluorescentes Indirecta y de Inhibición Rápida del Foco Fluorescente, Historia Natural de la Rabia. Editada por: Baer, G.M., 177-194, La Prensa Médica Mexicana, México, D.F., 1982.
- 57) Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria. 2a ed. Editorial Interamericana, México, D.F., 1984.
- 58) Tsiang, H. and Lagrange, P.H.: In vivo detection of specific cell-mediated immunity in street rabies virus infection in mice. J. Gen. Virol., 47: 183-191 (1980).
- 59) Weissman, I.L., Hood, L.E. and Wood, W.B.: Essential Concepts in Immunology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, California, USA, 1978.
- 60) Wiktor, T.J., Gyorgy, E., Schlunberger, H.D., Sokol, F. and Koprowski, H.: Antigenic properties of rabies virus components. J. Immunol., 110: 269-276 (1973).
- 61) Wiktor, T.J., Koprowski, H., Mitchell, J.R. and Merigan, T.C.: Role of interferon in prophylaxis of rabies after exposure. J. Infect. Dis., 133: 260-265 (1976).
- 62) Williams, C.A. and Chase, M.W.: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. III. Reactions of Antibodies with Soluble Antigens. Acad. Press, N.Y., USA, 1971.