

20
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"

DIFERENCIACION DE CEPAS DE RABIA
MEDIANTE LA UTILIZACION DE
SUEROS INMUNES OBTENIDOS EN
ESPECIES DIVERGENTES

T E S I S

Que para obtener el título de

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta:

Esteban Espejel Madrigal

Directores de tesis:

MC. Alma Virginia Lara Sagahón

Dr. José Alvaro Aguilar Setién

Cuautitlán Izcalli. Edo. de Méx.

1990



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

	Pág.
Resumen	1
1.- Introducción.	3
1.1.- Historia de la rabia .	3
1.2.- Propiedades del virus de la rabia.	4
1.3.- Patogenia, signos clinicos y Dx. de la rabia.	6
1.4.- Control y prevención.	9
1.5.- Variabilidad antigénica del virus.	12
1.6.- Variabilidad de la respuesta inmune contra la rabia.	13
2.- Objetivos.	16
2.1.- Objetivo general.	16
2.2.- Objetivos particulares.	16
3.- Materiales y métodos.	17
3.1.- Animales.	17
3.2.- Cepas del virus de la rabia.	17
3.3.- Líneas celulares.	17
3.4.- Inmunizaciones.	17
3.5.- Determinación del título de anticuerpos neutralizantes.	18
3.6.- Prueba histoquímica.	20
4.- Resultados.	21
5.- Discusión.	37
6.- Conclusiones.	39
7.- Bibliografía.	40

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudiar la respuesta en la formación de anticuerpos neutralizantes contra diferentes cepas del virus de la rabia en aves y compararla con la respuesta en los cobayos.

Se inmunizaron pollos y cobayos con las cepas CVS y ERA del virus de la rabia y con los sueros obtenidos de ambas especies se determinó el título de anticuerpos mediante la prueba de seroneutralización en ratones, utilizando las cepas CVS, ERA y Roxane del virus de la rabia. Asimismo se efectuó una prueba histoquímica para observar las diferencias en las estructuras coloreadas por el suero de cobayo y el de ave.

De esta forma se determinó que la inmunización de los pollos con 2 vacunas de la rabia, una inactivada y una viva, no produjo anticuerpos neutralizantes contra la cepa CVS, en cambio los cobayos inmunizados con las mismas dosis y por las mismas vías que los pollos produjeron altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra esta cepa. Esto sugiere que las aves no responden a los determinantes antigénicos del virus de la rabia de la misma manera que los mamíferos.

Cuando se realizó la neutralización de las cepas ERA y Roxane se obtuvieron altos títulos con los sueros de cobayo, y los sueros de los pollos inmunizados con vacuna inactivada produjeron títulos más altos que los sueros de los pollos inmunizados con vacuna viva.

Por otro lado, también se encontró que contra la cepa Roxane los títulos de anticuerpos neutralizantes de los

pollos fueron mayores que contra la cepa ERA. Debido a que la cepa vacunal inactivada fué la que desencadenó la respuesta hacia la cepa Roxane significa que las cepas CVS y Roxane comparten determinantes antigénicos en la glicoproteína.

Asimismo los cobayos respondieron con títulos altos de anticuerpos independientemente de la cepa vacunal utilizada.

En cuanto a la prueba histoquímica se observó que el cultivo celular tratado con suero de cobayo inmune mostró una definición clara de las inclusiones intracitoplasmáticas, resultado de la replicación viral. En tanto que, el cultivo celular tratado con suero de pollo inmune mostró una coloración más difusa que la de los cobayos, sin embargo esta coloración fué siempre positiva con respecto a los controles no infectados. En ambos casos los sueros provenían de animales inmunizados con la cepa ERA.

pollos fueron mayores que contra la cepa ERA. Debido a que la cepa vacunal inactivada fué la que desencadenó la respuesta hacia la cepa Roxane significa que las cepas CVS y Roxane comparten determinantes antigénicos en la glicoproteína.

Asimismo los cobayos respondieron con títulos altos de anticuerpos independientemente de la cepa vacunal utilizada.

En cuanto a la prueba histoquímica se observó que el cultivo celular tratado con suero de cobayo inmune mostró una definición clara de las inclusiones intracitoplasmáticas, resultado de la replicación viral. En tanto que, el cultivo celular tratado con suero de pollo inmune mostró una coloración más difusa que la de los cobayos, sin embargo esta coloración fué siempre positiva con respecto a los controles no infectados. En ambos casos los sueros provenían de animales inmunizados con la cepa ERA.

1.- INTRODUCCION

1.1.- HISTORIA DE LA RABIA

Es una enfermedad viral capaz de afectar a todos los animales de sangre caliente. La enfermedad ataca principalmente al sistema nervioso y se caracteriza por signos de irritación motora, excitación y parálisis. (George M Baer y col. 1982, OPS, 1986, Rodil C, Tomas, et al, 1981, Mohanty, Sashi B, et at, 1988.)

La rabia, descrita en perros y animales domésticos desde 500 años antes de nuestra era, ha sido una de las enfermedades mortales más temidas por el hombre.

Demócrito hace la primera descripción de la rabia canina 500 años antes de nuestra era.

Aristóteles en el siglo IV A.C., describe la enfermedad que sufren los perros que los vuelve muy irritables y atacan a otros animales o al hombre, en su libro "La historia natural de los animales".

Zinke, en 1804 reconoció la naturaleza infecciosa de la saliva de un perro rabioso.

En 1881, Pasteur, Chamberland, Roux y Thuillier prueban la virulencia constante del virus en el sistema nervioso e ideando la técnica de la inoculación intracraneal mantienen el virus por pases regulares en cerebro de conejo.

Corresponde a Pasteur el mérito de haber efectuado la famosa inoculación con vacuna antirrábica de un niño mordido por un lobo rabioso en 1885. Desde los trabajos de Pasteur

salen las concepciones de "Virus de calle" y de "Virus fijo". El primero se refiere a virus recientemente aislados, sin modificaciones en los laboratorios, con periodo de incubación variable y capacidad de invadir las glándulas salivales. El segundo (fijo), son cepas adaptadas a animales de laboratorio, con periodo de incubación muy corto (4-6 días) y no invaden las glándulas salivales.

En 1903, Reamlinger, mostró la naturaleza viral de este agente por su calidad filtrante y el mismo año Neger, evidencia a las inclusiones celulares características en las células nerviosas de los animales rabiosos. (George M. Baer y col. 1982., Rodil C. Tomas., et al., 1981 ., Mohanty, Sashi B., et al.,1988.).

1.2.- PROPIEDADES DEL VIRUS DE LA RABIA.

El virus de la rabia pertenece a la familia Rhabdoviridae, género Lyssavirus. Los viriones son partículas con envoltura que presentan una forma cilíndrica con una extremidad redondeada y la otra similar a la forma de un proyectil, sus dimensiones son de 175 X 70 nm. (Davis,B.D., et al, 1980.,Luria, S.E., et al 1980).

La envoltura contiene 1500 unidades de una proteína de membrana no glicosilada con peso molecular (PM) de 25.3 Kdalton, designada de proteína M, y 1800 unidades de una glicoproteína con un PM de 67 Kdalton la cual forma las proyecciones o espículas del virión y actúa como hemaglutinina con los globulos rojos de ganso. (Davis, B.D.,

et al, 1978., Luria, S.E., et al 1978.).

La nucleocápside está constituida por una molécula de ARN, una proteína N con PM de 55.5 Kdalton y una ARN polimerasa formada por dos polipeptidos, uno de alto PM (1, "largo", 185 Kdalton.) y otro más pequeño (NS, "Non Structural", 37.5 Kdalton). La molécula de ARN en la cadena sencilla y de polaridad negativa tiene un peso molecular de 3.5 a 4.6 millones de daltons. (Davis, B.D., et al, 1978., Luria, S.E., et al, 1978.).

El virus penetra a las células por un proceso de fusión de membranas. En el citoplasma el ARN (-) participa en 2 procesos:

- 1).- Replicación, en el cual se generan cadenas de ARN positivas y negativas. La síntesis del ARN(-) que formará parte del virión requiere de un molde de ARN (+). Se ha demostrado que la cadena ARN (+), que utiliza en la replicación no es precursora de los ARN.
- 2).- Transcripción, la transcriptasa tiene un sitio promotorúnico en el genoma el cual copia secuencialmente produciéndose finalmente los ARNm monocistrónicos.

Las tres proteínas de la nucleocápside son necesarias en ambos procesos, las proteínas L y NS actúan como polimerasas, mientras que la N debe estar asociada al ARN para que ésta funcione como molde. (Luria, S.E., et al., 1978., Kucera, L.S., et al., 1985.).

Una característica de estos virus es la generación de

viriones incompletos. Estos son más cortos que las partículas normales y contienen una porción del ARN. Los viriones incompletos interfieren en la multiplicación del virus, y se alcanza rápidamente una preponderancia de estas partículas.

Las nucleocápsidas se encuentran en el citoplasma celular formando los cuerpos de inclusiones que se observan mediante las técnicas de inmunofluorescencia y microscopía electrónica. (Luria, S.E., et al 1978., Kucera, L.S., et al 1985.).

1.3.- PATOGENIA, SIGNOS CLINICOS Y DIAGNOSTICO DE LA RABIA.

El virus de la rabia afecta primordialmente perros, gatos y otros carnívoros, pero todos los animales de sangre caliente, incluyendo el hombre son susceptibles. Las aves de corral pueden ser infectadas experimentalmente. (Mohanty, Sashi B., et al., 1988., Baer, George, M., 1975., Correa Girón P., 1982.).

El virus rábico, al ser inoculado por vía subcutánea o intramuscular, como sucede naturalmente por una mordedura, se propaga del lugar de inoculación al sistema nervioso central por el axoplasma de los nervios periféricos.

Una vez que se produce la infección del sistema nervioso central, el virus se difunde en forma centrifuga a las glándulas salivales y otros órganos y tejidos por medio de los nervios periféricos, de la misma manera en que se produce

la progresión centripeta. (Baer, George M., 1982., OPS., 1986., Rodil C, Tomas., et al., 1981., Mohanty, Sashi B., et al., 1988., Correa Girón, P.,1982.).

Los signos clinicos en los bovinos, ovinos y caprinos afectados son inquietud, excitación y agresividad, también presentan salivación excesiva, rechinar de dientes, dolor abdominal, diarrea, prurito en el sitio de la herida, emaciación, parálisis y muerte. Los signos clinicos en caballos recuerdan los de tétanos, pero también se observa en tales animales prurito, agresividad, regurgitación de alimento por las fosas nasales, parálisis progresiva, ataxia y muerte. (Baer, George M., 1982., Rodil C Tomas., et al., 1981., Mohanty, Sshi B., et al., 1988., Correa Girón, P., 1982.).

Los porcinos muestran una etapa irritativa temprana y pueden morder a otros animales o al hombre, mientras que los pollos adultos son resistentes al virus rábico.

En el perro, el periodo de incubación dura de 10 días a dos meses o más.

En la fase prodrómica, los perros manifiestan un cambio de conducta, se esconden en rincones oscuros o muestran una agitación inusitada y dan vueltas intranquilos. La excitabilidad refleja está exaltada, y el animal se sobresalta al menor estímulo.

Se nota anorexia, irritación en la región de la mordedura, estimulación de las vías genitourinarias y un ligero aumento de la temperatura corporal.

Después de 1 a 3 días, se acentúan en forma notoria los síntomas de excitación y agitación. El perro se vuelve peligrosamente agresivo, con tendencia a morder objetos, animales y al hombre, incluso a su propio dueño; muchas veces se muerde a si mismo, infligiéndose graves heridas. La salivación es abundante, ya que el animal no deglute la saliva, debido a la parálisis de los músculos de deglución y hay una alteración en el ladrido por la parálisis parcial de las cuerdas vocales, con un aullido ronco y prolongado.

Los perros rabiosos tienen propensión a abandonar sus casas y recorrer grandes distancias. En la fase terminal de la enfermedad, con frecuencia se pueden observar convulsiones generalizadas; luego incoordinación muscular y parálisis de los músculos del tronco y de las extremidades, parálisis general y muerte. El curso de la enfermedad dura de 1 a 11 días. (Baer, George M., 1982., OPS., 1986., Rodil C, Tomas., et al., 1981., Mohanty, Sashi B., et al., 1986., OMS., 1984., Correa Girón, F., 1982.).

Para hacer el diagnóstico se debe tomar en cuenta la historia clínica, los signos clínicos y la presencia de escasas lesiones a la necropsia, todo esto combinado con las pruebas de laboratorio.

La prueba más utilizada es la de inmunofluorescencia directa, que resulta rápida, muy sensible y específica. (OPS., 1986., Correa Girón, F., 1982.).

La inoculación intracerebral de ratones para aislamiento del virus sigue siendo una de las pruebas más útiles para el diagnóstico de la rabia.

Esta prueba rinde mejores resultados si se combina con la de inmunofluorescencia.

En los países en desarrollo continúa empleándose el examen microscópico de los corpúsculos de Negri, que es un procedimiento sencillo, rápido y económico. (Baer, George m., 1982., OPS., 1986., Rodil C, Tomas., et al., 1981., Mohanty, Sashi B., 1988., OMS., 1984., Correa Girón, P., 1982.).

Las pruebas serológicas se usan habitualmente para conocer la capacidad inmunogénica de las vacunas y la respuesta inmune de las personas sometidas a un régimen de pre o post inmunización.

Además de la prueba de seroneutralización en ratones, se han perfeccionado otras pruebas rápidas, entre ellas la prueba modificada de contraelectroforesis y la de inmunoensayo enzimático (ELISA). (OPS., 1986.).

1.4.- CONTROL Y PREVENCIÓN.

El enfoque más racional para prevenir la rabia humana consiste en el control y erradicación de la infección de los animales domésticos, sobre todo los perros.

Las medidas de control aplicables a la rabia canina consisten principalmente en la vacunación masiva de la población canina, la captura de los perros callejeros, los cuales se mantendrán en custodia para ser entregados a sus dueños, previa vacunación cuando los animales sean reclamados, ó en el caso contrario deberán ser sacrificados.

(Correa Girón, P., 1982.).

El método de preferencia para la prevención de la rabia ha sido la vacunación. Desde la época de Pasteur hasta la fecha, la elaboración de vacunas contra la rabia ha sido un proceso de desarrollo tecnológico que ha pasado de las vacunas de primera generación elaboradas en animales hasta las vacunas de tercera generación, en que se aplican los avances de la ingeniería genética.

La vacuna tipo Pasteur (1885), fué elaborada con virus fijo.

Este es un virus que fué adaptado al conejo por vía intracerebral, al grado de que le produce la muerte en aproximadamente 5-6 días, que es el periodo mínimo posible para que el virus rábico fijo produzca la muerte.

Entre las vacunas históricas también se encuentran las siguientes:

La vacuna tipo Fermi (1908) que se inactiva con fenol durante 24 horas a 22 grados centígrados.

La vacuna tipo Semple (1911) inactivada con fenol durante 72 horas a 30 grados centígrados.

La vacuna Umeno, Doi (1916) inactivada también con fenol.

La vacuna Hept (1925) inactivada con éter y fenol.

La vacuna Kelsner (1925) inactivada con cloroformo.

Posteriormente a las vacunas históricas se utilizaron las vacunas de virus vivo modificado, las vacunas en que se empleó son:

Vacuna avianizada Flury Lep (de bajo pasaje). Es elaborada con virus que inicialmente fué adaptado a pollitos por vía

intracerebral, durante 136 pases. Después se le adaptó al embrión de pollo mediante 40 a 50 pases. Se cultiva en huevos embrionados ó en células de riñón de hamster.

Vacuna avianizada Flury Hep (de alto pasaje). Esta vacuna recibió más pases en embrión de pollo hasta completar 178 pases (y en algunos casos 227-230). Se cultiva en huevos embrionados, en células de riñón de perro ó en fibroblastos de embrión de pollo.

La cepa Kelev (con más de 100 pases). Cultivada en huevos embrionados y utilizada en perros y bovinos.

La cepa Kisslin de alto pasaje. Cultivada en una línea de células de hamster.

La cepa Kaw (90-100 pases a 32 grados centígrados). Producida en cultivos celulares de riñón de hamster.

La cepa ERA elaborada en riñón de cerdo.

Entre las vacunas de virus inactivado se encuentran:

Vacuna elaborada en embrión de pato que es hecha con virus fijo, se inactiva con betapropiolactona y se utiliza para la prevención de rabia en humano.

Vacuna Fuenzalida. Es una vacuna elaborada en cerebro de ratón lactante e inactivada con luz ultravioleta.

Existe una vacuna producida en células BHK e inactivada por etilénimina (PV-BHK-EI).

También se produce una vacuna inactivada, reproduciendo el virus en células diploides humanas, que presentan la ventaja de poseer un número de cromosomas normal y por lo tanto está desprovisto de poder cancerígeno. (OPS., 1986., Correa Girón,

E., 1982).

En el presente utilizando metodología de la ingeniería genética se ha elaborado una vacuna recombinante consistente de virus vaccinia que expresa la glicoproteína rábica. esta vacuna ha demostrado ser capaz de inducir la inmunización de ratones y conejos y se está experimentando en animales salvajes. (Wiktor., et al., 1988).

Por otro lado con el empleo de los anticuerpos monoclonales, se ha demostrado que los anticuerpos antiidiotípicos son capaces de inducir una respuesta protectora contra la rabia.

Los anticuerpos antiidiotipos contienen una estructura similar al antígeno de la glicoproteína rábica y su formación se induce al inmunizar con un anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína. estos hechos sugieren que quizá sea posible elaborar una vacuna sin virus. (Reagan., et al., 1983).

1.5.- VARIABILIDAD ANTIGENICA DEL VIRUS.

La producción de anticuerpos monoclonales contra el virus de la rabia permitió determinar la variabilidad antigenica de este virus.

Utilizando estos reactivos Wiktor y Koprowsky (1980) produjeron variantes resistentes a la neutralización a partir de la cepa CVS. Además, estos reactivos altamente específicos y sensibles hicieron posible la detección de diferencias antigénicas entre cepas procedentes de diferentes especies y de diferentes orígenes geográficos, de este modo se sabe que

la mayoría de las cepas Europeas tienen patrones de reacción similares frente a un panel de anticuerpos monoclonales y que la cepa P.M. (Pitman Moore) utilizada para la producción de la vacuna en células diploides humanas protege contra la infección con estas cepas y no contra la de cepas de origen Africano ó Asiático que además tienen un patrón de reacción diferente en el panel de anticuerpos monoclonales. (Shope., 1984).

Los anticuerpos monoclonales contra el virus de la rabia también han diferenciado entre cepas de mamíferos terrestres y mamíferos voladores. (Ruprecht., et al., 1988).

1.6.- VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA LA RABIA.

Los sueros hiperinmunes contra el virus de la rabia obtenidos en los mamíferos que tradicionalmente se utilizan (conejos, cricetos, caballos, etc.) son incapaces de diferenciar las distintas cepas del virus. Por lo que ha sido necesario recurrir a los anticuerpos monoclonales para distinguir una cepa de otra o diferenciarlo de otros lissavirus como son el Mokola, Lagos-bat y Duvnaghue. (Aguilar betián., et al., 1986., Flamand, A., et al., 1980., Lafond, M., et al., 1985).

Sin embargo, es sabido que no todas las especies responden de la misma manera hacia un estímulo antigénico determinado. la respuesta inmune de cada especie depende en última instancia de la información genética que posee. (Mc Connell, I., et al., 1981., Iizard, I., 1984.).

En el caso del virus de la rabia es bien sabido que una

determinada vacuna puede ser eficaz para proteger a ciertas especies pero puede revelarse ineficaz en la protección de otras (Dietzchold, B., et al., 1987., Ruprecht, Ch., et al., 1986), tal es el caso de la vacuna elaborada con la cepa SAD/B19 que se ha revelado muy eficaz para la protección del zorro rojo contra la rabia por vía oral pero que no es capaz de proteger al zorrillo o a los mapaches al ser aplicada por la misma vía. (Soria, B., et al., 1987).

Ayudando esto último, Brochier y colaboradores (1987) al infectar aves con el virus rábico, no obtiene la formación de anticuerpos neutralizantes contra rabia, lo que hace suponer que las aves están mal dotadas genéticamente para responder contra el virus rábico o al menos contra ciertos determinantes antigénicos de dicho virus.

Otra prueba de la diferente respuesta por especie fue reportada por Webster y colaboradores, quienes encontraron que cuando la cepa CVS fue sustituida como virus de desafío por la cepa ERA en la prueba de reducción de focos fluorescentes, algunos sueros humanos presentaban títulos considerablemente superiores.

Esta característica también fue observada en los niveles de anticuerpos séricos de zorrillos que habían sido vacunados o desafiados con diferentes cepas de virus de la rabia de campo o de laboratorio. (Webster, W., et al., 1986).

A diferencia de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales en la que la respuesta heterogénea de un individuo, generalmente de la especie murina, es seccionada

hasta encontrar la clona productora del anticuerpo capaz de diferenciar a las cepas del virus rábico, se propone en el presente trabajo demostrar que la información genética de especies diferentes (mamíferos y aves) responde en forma distinta a los diferentes antígenos que contiene el virus de la rabia.

2.- OBJETIVOS.

2.1.- OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la cinética de formación de anticuerpos neutralizantes contra diferentes cepas del virus de la rabia en aves y compararla con la respuesta de los cobayos.

2.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Inmunizar aves y cobayos con las cepas del virus de la rabia CVS y ERA.

2.- Efectuar pruebas paralelas de seroneutralización utilizando diferentes cepas de virus rábico y los sueros obtenidos de ambas especies.

3.- Se compararán los resultados obtenidos con los sueros de aves y cobayos en las pruebas de seroneutralización.

4.- Se compararán los resultados obtenidos mediante pruebas histoquímicas efectuadas en células infectadas, utilizando sueros de cobayos y aves.

3.- MATERIALES Y METODOS.

3.1.- ANIMALES.

Se utilizaron 8 cobayos de raza Hardley, machos y 8 pollos de raza Rhode Island, machos.

Ratones de 21 días de la cepa NIH que fueron empleados en las pruebas de seroneutralización.

3.2.- CEPAS DEL VIRUS DE LA RABIA.

La cepa ERA con un título de $10^{5.5}$ LD 50 en ratón, proporcionada por "Laboratorios Sannycon de México" SA de CV.

La cepa CVS con 0.9 U.I., fué donada por la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaria de Salud.

La cepa Roxane fué adquirida de forma comercial.

3.3.- LINEAS CELULARES.

Se utilizaron células BHK-21 que fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Nunc) hasta obtener monoestratos confluentes en medio BHK-21 suplementado con penicilina, estreptomycin, 6% de medio triptosa fosfato (TBP) y 10% de suero fetal bovino. Estos cultivos fueron posteriormente inoculados con virus de rabia cepa ERA.

3.4.- INMUNIZACIONES.

Se formaron 2 grupos de cobayos de 4 individuos cada uno y 2 de aves del mismo número de animales y se distribuyeron de la siguiente manera:

Grupo No. 1.- 4 cobayos adultos inmunizados con cepa CVS.

Grupo No. 2.- 4 cobayos adultos inmunizados con cepa ERA.

Grupo No. 3.- 4 pollos adultos inmunizados con cepa CVS.

Grupo No. 4.- 4 pollos adultos inmunizados con cepa ERA.

El calendario de inmunización de estos animales fué el siguiente:

Día No. 1.- Toma de muestras de suero sanguíneo.

Día No. 2.- Inmunización de los animales con 0.5 ml. de vacuna y 0.5 ml. de adyuvante completo de Freund por la vía subcutánea.

Día No. 12.- Inmunización por las vías intramuscular (IM), subcutánea (SC) e intraperitoneal (IP) con 0.5 ml. de vacuna sin adyuvante.

Día No. 19.- Inmunización por vía IM, SC e IP con 0.5 ml. de vacuna sin adyuvante.

Toma de suero sanguíneo.

Día No. 26.- Inmunización por vía IM, SC e IP con 0.5 ml. de vacuna sin adyuvante.

Día No. 35.- Toma de suero sanguíneo.

3.5.- DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

Material y Procedimiento:

a) Cepas: La actividad neutralizante de los sueros de los animales inmunizados se probó contra las cepas CVS, ERA y Roxane.

Antes de realizar la prueba de seroneutralización, las cepas se ajustaron para obtener 50 LD 50.

b) Diluciones del suero: El desarrollo de la técnica de

seroneutralización se hizo de acuerdo a lo publicado por Morilla y Bautista (1986). Los sueros problema debidamente identificados se inactivaron durante 30 minutos a 56 grados centígrados para evitar la acción de factores inespecíficos. Se hicieron diluciones decrecientes del suero en diluyente (BAPS) de la siguiente manera:

Diluyente	0.6	0.8	0.8	0.8
Suero	0.4	0.2	0.2	0.2
Dilución inicial		1:2.5	1:12.5	1:65.5
	1:312.5			
Virus	0.8	0.8	0.8	0.8
Dilución Final	1:5	1:25	1:125	1:625

La dilución del virus debe tener de 50-300 DL 50%.

- c) Se puso un control negativo.
- d) El juego de diluciones se mantuvo a 4 grados centígrados.
- e) Inmediatamente después de haber adicionado el virus de las diluciones de los sueros se incubaron en baño maria con agitador a 37 grados centígrados durante 90 minutos.
- f) Posteriormente las diluciones se colocaron en un recipiente con hielo y se procedió a inocular lotes de 6 a 10 ratones por dilución con 0.03 ml. por vía intracerebral.
- g) Una vez inoculados los ratones se anotó en las hojas el número de ratones vivos y muertos durante 21 días, descartándose a los ratones que murieron durante los primeros tres días después de la inoculación.
- h) El título de anticuerpos se determinó por el método de Reed y Muench.

3.6.- PRUEBA HISTOQUIMICA.

Se prepararon diluciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 del suero de pollo o cobayo, a los monoestratos confluentes de células BHK-21 previamente infectadas con virus de la rabia cepa ERA y cultivadas en placas de 96 pozos, se les adicionaron 100 microlitros de la dilución correspondiente del suero de pollo o cobayo inmunizados y se incubaron durante 2 horas, transcurrido el tiempo de incubación se lavaron los pozos tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se agregaron 100 microlitros de conjugado antiespecie-peroxidasa (Sigma) y se incubó nuevamente durante 1 hora, después de lo cual se lavaron tres veces con (PBS) y se agregó el reactivo revelador (7.5 mg. de diaminobencidina, 15 microlitros de H₂O y 15 ml. de PBS). se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La solución reveladora se descartó, se lavaron los pozos con PBS y se observaron al microscopio óptico, como controles negativos se utilizaron monoestratos confluentes de células BHK-21 no infectadas.

Se observaron las diferencias en las estructuras coloreadas por el suero de cobayo y por el suero de ave.

4.- RESULTADOS.

Titulos de anticuerpos neutralizantes.

Los titulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos de los sueros de los animales sangrados el día 19 del calendario de inmunización se muestran en los cuadros Nos. 1,2,3 y 4, asimismo, estos resultados se encuentran concentrados en el cuadro No. 5 en donde se puede observar que los sueros de los pollos no produjeron anticuerpos neutralizantes, independientemente de la cepa utilizada para inmunizar, en cambio los sueros de los cobayos presentan altos titulos (1:625, 1:264) también sin importar si se inmunizó con la cepa ERA o con la cepa CVS.

Todos los animales se sangraron en blanco el día 35 del calendario de inmunización, los sueros de los 2 animales inmunizados con la misma cepa se combinaron resultando una mezcla de suero de pollo y una mezcla de suero de cuyo por cada cepa de virus de rabia empleada para inmunizar.

Con estos sueros se probó la capacidad de neutralización de las cepas CVS, ERA y Roxane. Los resultados de la neutralización de estas cepas se muestran en los cuadros 6,7 y 8 respectivamente. La figura No. 1 y el cuadro No. 9 muestran el concentrado de estos resultados.

Prueba histoquímica.

Las figuras 2 y 3 corresponden a las células BHK-21 no infectadas y tratadas con suero de cobayo (Figura 2) y con suero de pollo (Figura 3). En ninguno de los casos se

observan estructuras similares a inclusiones virales o de cualquier otro tipo.

Las figuras 4 y 5 corresponden a células BHK-21 infectadas con la cepa ERA del virus de la rabia. La figura 4 tratada con suero de cobayo inmune nos muestra una definición clara de las inclusiones intracitoplasmáticas, resultado de la replicación viral. En tanto que, la figura 5, tratada con suero de pollo inmune nos muestra una coloración más difusa que en el caso anterior; sin embargo esta coloración fué siempre positiva con respecto a los controles no infectados. En ambos casos los sueros provenían de animales inmunizados con la cepa ERA. La coloración positiva se observó también en ambos casos hasta la dilución 1:40.

El daño que el virus provocó en las células infectadas hace aparecer a éstas en un monoestrato con células aisladas en contraste con las células no infectadas (Figuras 2 y 3) en las que se observa mayor uniformidad.

CUADRO # 1.

NEUTRALIZACION DE LA CEPA CUS POR EL SUERO DE POLLOS INMUNIZADOS CON
CEPA CUS Y SANGRADOS EL DIA 19 DEL CALENDARIO DE INMUNIZACION.

POLLO # 1.		
DILUCION	ANIMALES INOCULADOS	ANIMALES + MUERTOS O PARALITICOS
1:5	5	5
1:25	5	5
1:125	5	5
1:625	5	5
TITULO DE ANTICUERPOS: 8		
POLLO # 2.		
DILUCION	ANIMALES INOCULADOS	ANIMALES + MUERTOS O PARALITICOS
1:5	5	5
1:25	5	5
1:125	5	5
1:625	5	5
TITULO DE ANTICUERPOS: 8		

• VERIFICADOS EL DIA 15 POSTINOCULACION DEL VIRUS.

CUADRO # 2

NEUTRALIZACION DE LA CEPA CUS POR EL SUERO DE POLLDS INMUNIZADOS CON
CEPA ERA Y SANGRADOS EL DIA 19 DEL CALENDARIO DE INMUNIZACION.

POLLO # 1.		
DILUCION DE SUERO	RATONES INOCULADOS	RATONES * MUERTOS O PARALITICOS
1:5	5	5
1:25	5	5
1:125	5	5
1:625	5	5
TITULO DE ANTICUERPOS: 0		
POLLO # 2.		
DILUCION DE SUERO	RATONES INOCULADOS	RATONES * MUERTOS O PARALITICOS
1:5	5	5
1:25	5	5
1:125	5	5
1:625	5	5
TITULO DE ANTICUERPOS: 0		

* VERIFICADOS EL DIA 15 POSTINOCULACION DEL VIRUS.

CUADRO # 3

NEUTRALIZACION DE LA CEPA CUS POR EL SUERO DE CUYOS INMUNIZADOS CON CEPA ENA Y SANGRADOS EL DIA 19 DEL CALENDARIO DE INMUNIZACION.

CUYO # 1.		
DILUCION DE SUERO	RATONES INOCULADOS	RATONES # MUERTOS O PARALITICOS
1:5	5	0
1:25	5	0
1:125	5	0
1:625	5	3
TITULO DE ANTICUERPOS: 1:625		
CUYO # 2.		
DILUCION DE SUERO	RATONES INOCULADOS	RATONES # MUERTOS O PARALITICOS
1:5	5	0
1:25	5	0
1:125	5	2
1:625	5	4
TITULO DE ANTICUERPOS: 1:214		

* VERIFICADOS EL DIA 15 POSTINOCULACION DEL VIRUS.

CUADRO # 4

NEUTRALIZACIÓN DE LA CEPA CUS POR EL SUERO DE CUYOS INMUNIZADOS CON
CEPA CUS Y SANGRADOS EL DÍA 19 DEL CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN.

Cuyo # 1.		
DILUCION DE SUERO	RATONES INOCULADOS	RATONES * MUERTOS O PARALITICOS
1:5	5	0
1:25	5	0
1:125	5	0
1:625	5	3
TITULO DE ANTICUERPOS: 1:625		
Cuyo # 2.		
DILUCION DE SUERO	RATONES INOCULADOS	RATONES * MUERTOS O PARALITICOS
1:5	5	0
1:25	5	0
1:125	5	2
1:625	5	4
TITULO DE ANTICUERPOS: 1:214		

* VERIFICADOS EL DIA 15 POSTINOCULACION DEL VIRUS.

CUADRO # 5

CONCENTRADO DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION DE LA CEPA CUS EFECTUADA CON LOS SUECOS OBTENIDOS EL DIA 19 DEL MILEN-DARIO DE INMUNIZACION.

ESPECIE INOCULADA	VACUNA	TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES	
		REPETICION	
POLLO	ERA	1	1
		0	0
		0	0
CUYO	ERA	1:625	1:254
	CUS	1:625	1:625

CUADRO # 6

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION DE LA CEPA CVS POR SUEROS OBTENIDOS EL DIA 35 DEL CALENDARIO DE INMUNIZACION.

ESPECIE INMUNIZADA	VACUNA	DILUCION	RATONES INOC.	RATONES M O P	TITULO
POLLO	ERA	1:5	5	5	0
		1:25	5	5	
		1:125	5	3	
		1:625	5	5	
	CVS	1:5	5	3	0
		1:25	5	4	
		1:125	5	5	
		1:625	5	5	
CUVO	ERA	1:5	5	0	>1:437
		1:25	5	0	
		1:125	5	2	
		1:625	5	2	
	CVS	1:5	5	0	>1:625
		1:25	5	0	
		1:125	5	0	
		1:625	5	1	

INOC.: INOCULADOS, M: MUERTOS, P: FAREALITICOS.

CUADRO # 7

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION DE LA CEPA ERA POR SUEROS OBTENIDOS EL DIA 35 DEL CALENDARIO DE INMUNIZACION.

ESPECIE INMUNIZADA	VACUNA	DILUCION	RATONES INOC.	RATONES M O P	TITULO
POLLO	ERA	1:5	5	3	1:7.5
		1:25	5	5	
		1:125	5	5	
		1:625	5	5	
	CUS	1:5	5	0	1:21
		1:25	5	3	
		1:125	5	5	
		1:625	5	5	
CUYO	ERA	1:5	5	0	>1:625
		1:25	5	0	
		1:125	5	0	
		1:625	5	0	
	CUS	1:5	5	0	>1:625
		1:25	5	0	
		1:125	5	0	
		1:625	5	0	

INOC.: INOCULADOS, M: MUERTOS, P: PARALITICOS.

CUADRO # 8

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION DE LA CEPA ROXANE POR
SUEROS OBTENIDOS EL DIA 35 DEL CALENDARIO DE INMUNIZACION

ESPECIE INMUNIZADA	VACUNA	DILUCION	RATONES INOC.	RATONES M O P	TITULO
POLLO	ERA	1:5	7	1	1:45
		1:25	6	2	
		1:125	6	5	
		1:625	6	5	
	CUS	1:5	5	0	1:501
		1:25	5	0	
		1:125	5	0	
		1:625	5	5	
CUVO	ERA	1:5	6	0	>1:625
		1:25	7	0	
		1:125	6	1	
		1:625	6	2	
	CUS	1:5	6	0	>1:625
		1:25	6	0	
		1:125	6	1	
		1:625	6	0	

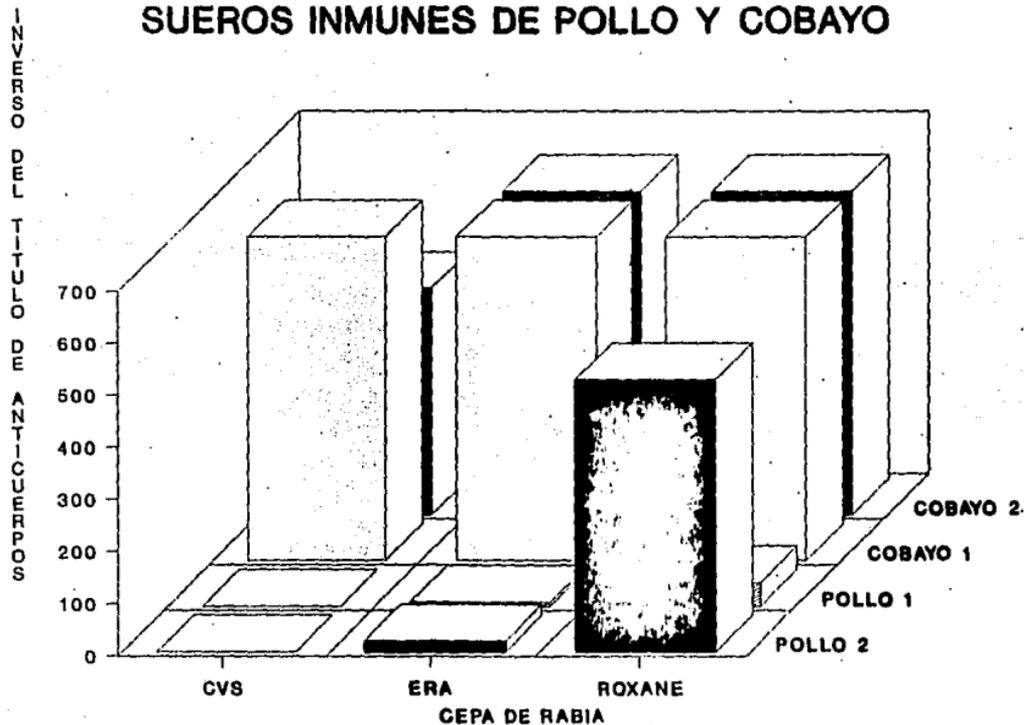
INOC.: INOCULADOS, M: MUERTOS, P: PARALITICOS.

CUADRO N 9

CONCENTRADO DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACIÓN EFECTUADA CON LOS SUEROS OBTENIDOS EL DÍA 35 DEL CALENDARIO DE INHUNIZACION.

ESPECIE INOCULADA	VACUNA	CEPA NEUTRALIZADA	TITULO
POLLO	CUS	ERA CUS ROXANE	1:21 0 1:501
	ERA	ERA CUS ROXANE	1:7.5 0 1:45
CUYO	CUS	ERA CUS ROXANE	>1:625 >1:625 >1:625
	ERA	ERA CUS ROXANE	>1:625 >1:437 >1:625

FIGURA 1
SERONEUTRALIZACION DE CEPAS DE RABIA CON
SUEROS INMUNES DE POLLO Y COBAYO



1 INMUNIZADO CON VACUNA VIVA
 2 INMUNIZADO CON VACUNA INACTIVADA

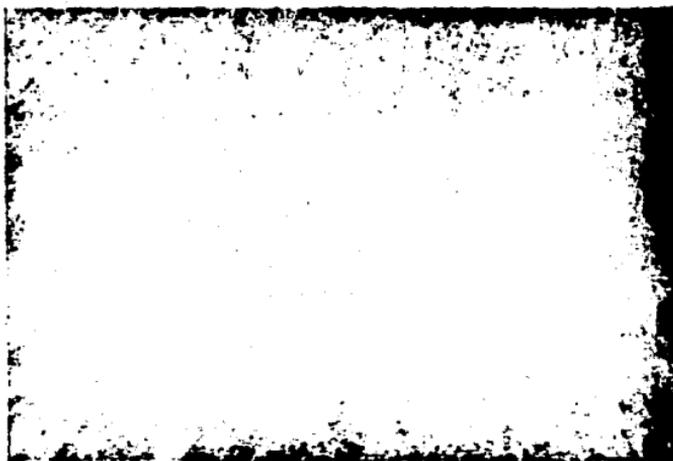


FIGURA 2
Células BHK-21 no infectadas y tratadas con suero de cobayo.



FIGURA 3
Células BHK-21 no infectadas y tratadas con suero
de pollo.



FIGURA 4

Células BHK-21 infectadas con la cepa ERA del virus de la rabie tratadas con suero de cobayo inmune, nos muestra una definición clara de las inclusiones intracitoplasmáticas, resultado de la replicación viral.

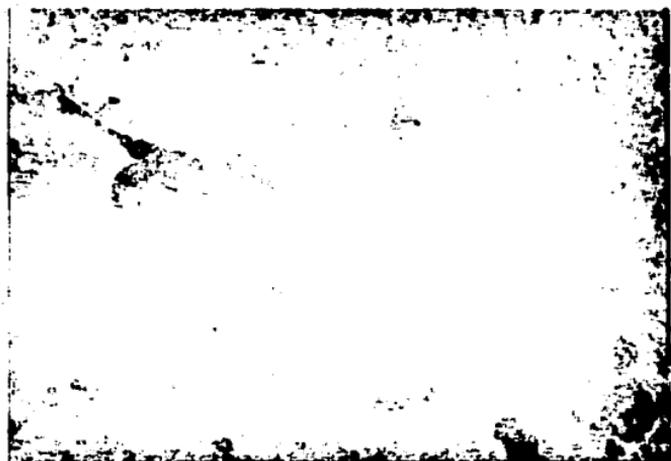


FIGURA 5

Células BHK-21 infectadas con la cepa ERA del virus de la rabia tratadas con suero de pollo inmune, nos muestra una coloración más difusa que en el caso anterior.

5.- DISCUSION.

Existen pocos reportes acerca de la respuesta inmune de aves contra el virus de la rabia. Cough y Jorgenson (1976), encontraron bajos titulos de anticuerpos no neutralizantes en algunas aves silvestres depredadoras que probablemente fueron inoculadas por via oral. Blancou y Zamudio (1975) inocularon experimentalmente aguilas rateras (*Buteo buteo*) con virus rábico por las vias intramuscular y oral y solo encontraron una nula o ligera respuesta de anticuerpos neutralizantes. Brochier y col. (1987) inocularon experimentalmente por via oral diversas especies de aves depredadoras silvestres con la vacuna recombinante vaccinia-proteina G y no observaron alguna respuesta de anticuerpos neutralizantes hacia el virus de la rabia. En el presente trabajo la inmunización de pollos con dos vacunas del virus de la rabia, una inactivada y otra viva no produjo anticuerpos neutralizantes contra la cepa CVS ; en cambio los cobayos inmunizados con las mismas dosis que los pollos produjeron altos titulos de anticuerpos neutralizantes. Esto y el resultado de las investigaciones antes descritas sugieren que las aves no responden a los determinantes antigénicos del virus de la rabia de la misma manera que los mamíferos.

Al realizar la neutralización de las cepas ERA y Roxane se obtuvieron altos titulos con los sueros de cobayo, y los sueros de los pollos inmunizados con vacuna inactivada (CVS) produjeron titulos más altos que los sueros de los pollos inmunizados con la cepa ERA.

Ya que las aves no son susceptibles a la rabia, el virus no se replica en estos animales, esto probablemente sea la causa de que se produzca una respuesta mayor en pollos con la vacuna inactivada que con la vacuna viva.

Por otro lado también se encontró que contra la cepa Roxane los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron mayores que contra la cepa ERA. Debido a que la cepa vacunal inactivada fue la que desencadenó la respuesta hacia la cepa vacunal Roxane significa que la cepas CVS y Roxane comparten determinantes antigénicos en la glicoproteína pero la conformación debe ser diferente quizás por cambios de aminoácidos en sitios diferentes al epitopo de tal manera que los anticuerpos reconocen mejor la conformación de Roxane que la de la homóloga CVS.

La baja respuesta de los pollos hacia la cepa ERA se demostró también por medio de la prueba histoquímica, sin embargo se recomienda en próximos estudios utilizar técnicas como la inmunotransferencia para detectar cual de las proteínas virales reconoce el suero de pollo inmune.

Los cobayos respondieron con títulos altos independientemente de la cepa utilizada como vacuna, estos animales se utilizaron como controles ya que las dosis y las vías de inmunización fueron las mismas que para los pollos, estos resultados corroboran una vez más que la capacidad de respuesta a un antígeno está determinada genéticamente.

6.- CONCLUSIONES.

1.- La respuesta de los pollos hacia el virus de la rabia es diferente a la de los cobayos.

2.- Los pollos responden mejor a la vacuna inactivada.

3.- Los sueros de pollo fueron capaces de neutralizar la cepa Roxane pero no la cepa CVS.

4.- El suero de pollo podría utilizarse para diferenciar cepas del virus de la rabia, como son la CVS, ERA y Roxane, mediante la prueba de seroneutralización.

7.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- AGUILAR SETIEN, A., PASTORET, P., OROS CORDOBA, D. y KRETSCHMER, R. Anticuerpos monoclonales en rabia. En: Avances en el uso de vacunas 1885-1985. Ed. Garza R.J. y Franco D.G.G. Gerencia General de Biológicos y Reactivos, Secretaria de Salud. México, 1986.
- 2.- ATANASIU, P., ARIATA, M., PERRIN, P., MANGANASO y SUREAU, P. Propriétés physicochimiques et antigéniques du virus rabique. C.R. Acad. Sc. Paris, t.293 (6 juillet 1981).
- 3.- BAER, GEORGE M. The Natural History of Rabies. Academia Press. USA. 1975.
- 4.- BAER, GEORGE M. La Rabia. La Prensa Médica Mexicana. México. 1986.
- 5.- BROCHIER. B., BLANCOU, J., THOMAS, I., LANGUET, B., ARTOIS, M., KIENY, M., LECOCCQ, J., COSTY, F., DEMESTRE, P., PASTORET, P. Use of recombinant vaccina-rabies glycoprotein virus for oral vaccination of wildlife against rabies: innocuity to several non-target bait consuming species. Annales de Médecine Veterinaire. 1987.
- 6.- CORREA GIRON P. Ciencia Veterinaria. Vol. 3. UNAM. México. 1981.
- 7.- CORREA GIRON P. Enfermedades Virales de los Animales Domésticos Monogástricos. Tercera Edición. México. 1982.

- 8.- DAVIS, B.D., Mc. CARTHY, M.C. Tratado de Microbiología. Salvat Editores. Segunda Edición. España. 1978.
- 9.- DIETZSCHOLD, B., COX, J., SCHNEIDER, T., WIKTOR, T., KOPROWSKI, H. Isolation and purification of polymeric form of the glycoprotein of rabies virus. J. Gen. Virol. 40. 1978.
- 10.- DIETZSCHOLD, B., TOLLIS, M., RUPRECHT, CH., CELIS, E., KOPROWSKI, H. Antigenic variation in rabies and rabies viruses: Cross protection independent of glycoprotein-mediated virus-neutralizing antibody. The journal of infectious diseases. Vol. 156, No. 5. November 1987.
- 11.- FENNER, F. and WHITE, D. Virologia Medica. La Prensa Médica Mexicana. Segunda Edición. 1984.
- 12.- FLAMAND, A., WIKTOR, T., KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus. I. The nucleocapside protein. J. Gen. Virol. 66, 2125-2133. 1985.
- 13.- KUCERA, L., MYRVIK, Q. Fundamental of Medical Virology. Lea and Febiger. Segunda Edición. USA. 1985.
- 14.- LAFON, M., WIKTOR, T. Antigenic Sites on the ERA Virus Nucleoprotein and Non-Structural Protein. J. Gen. Virol. 66, 2125-2133. 1985.
- 15.- LURIA, S., DARNELL, J., BALTIMORE, D., CAMPBELL, A. Animal virus multiplication: The RNA viruses. In: General Virology. Tercera Edición. USA. 1978.

- 16.- Mc CONNELL, I., MUNRO, A., WALDMAN, H. The immune system. Blackuell Scientific Publications. 1981.
- 17.- MOHANTY, S., DUTTA, S. Virologia Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. México. 1988.
- 18.- MORILLA, G., BAUTISTA, G. Manual de inmunología. Editorial Diana. México. 1986.
- 19.- OLSEN, R., KRAKOWKA, S. Inmunología e Inmunopatología de animales domésticos. Editorial El Manual Moderno. México. 1983.
- 20.- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Comité de expertos de la OMS sobre la rabia. Séptimo informe. Ginebra. 1984.
- 21.- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Segunda Edición. 1986.
- 22.- REAGAN, K., WUNNER, W., WIKTOR, T., KOPROWSKY, H. Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoprotein. J. Virol. 48, 660. 1983.
- 23.- RODIL, C., QUIROZ, V., PALACIOS, G., CASTAÑEDA, G., MARIN, A. Enfermedades Infecto-Contagiosas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay. 1981.
- 24.- RUPRECHT, CH., GLICKMAN, L., SPENCER, P., WIKTOR, T. Differentiation using monoclonal antibodies and discriminant analysis. American Journal Immunology. Vol. 6. No. 2. 1986.

25.- SORIA BALTAZAR,R., BLANCOU and ARTOIS,M. Results del administration par voie orale au mouton de deux vaccins contenant un virus de la rage modifié (SAD/B19) ou un recombinant du virus de la vaccine et de la rage. Annales de Medecine Veterinaire 131: 481-486. 1987.

26.- TIZARD,I. Immunologia Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. 1985.

27.- WEBSTER,W., CASEY,G., CHARLTON,K. Use of alternate rabies virus strains as Challenge Virus in the RFFIT. Comp. Immunol. microbiol. Infect. Dis. 1986.

28.- WIKTOR,T., KIENY,M., LATHE,R. New Generation of Rabies Vaccine. Vaccina-Rabies Glycoprotein Recombinant Virus. En Kurstak,e., Marusyk,F. Murphy y M.V.H. van Regenmortel, Virology Research. Plenum Publishing Corporation. Vol. 1. 1988.