

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LAS PRUEBAS DE SERONEU-
TRALIZACION DE RABIA EN DOS SISTEMAS BIOLÓGICOS
DIFERENTES Y PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACION COM-
PARATIVAS IN VITRO

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

David Corzo Castillejos



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



THE UNITED STATES DEPARTMENT OF JUSTICE
OFFICE OF THE ATTORNEY GENERAL
WASHINGTON, D. C. 20530

OFFICE OF THE ATTORNEY GENERAL

DAVID G. GARFIELD, ATTORNEY GENERAL

UNITED STATES

A mis queridos Padres:

Sinar Q. Corzo Balboa

Estela C. de Corzo.

A Mercedes.

A mis hermanas y Familiares.

A mis maestros y amigos.

Con inmensa gratitud a mis Asesores:

Dr. Eliseo Hernández B.

Dr. Ricardo Moreno Chan.

**Con respeto y agradecimiento por
su valiosa ayuda en la elaboración
de esta tesis al**

Dr. Gosse Bijlenga.

A mi H. Jurado:

MVZ. Ma. Luisa Rosas Cortés

MVZ. Manuel Ramírez Valenzuela

MVZ. Carlos Guzmán Clark

MVZ. Horst Richter Plate

MVZ. Ricardo Moreno Chan.

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LAS PRUEBAS DE SERO

NEUTRALIZACION DE RABIA EN DOS SISTEMAS BIOL

GICOS DIFERENTES Y PRUEBAS DE SERONEUTRALIZA

CION COMPARATIVAS IN VITRO

I N D I C E

- I. - INTRODUCCION.
- II. - MATERIAL Y METODOS
- III. - RESULTADOS
- IV. - DISCUSIONES
- V. - CONCLUSIONES
- VI. - BIBLIOGRAFIA

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LAS PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACIÓN DE RABIA EN DOS SISTEMAS BIOLÓGICOS DIFERENTES Y PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACIÓN COMPARATIVAS - IN VITRO

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

La Rabia es una enfermedad infecciosa aguda y, casi sin excepción, mortal, que se manifiesta, en los casos típicos, por un trastorno del conocimiento, aumento de la excitabilidad nerviosa y síntomas paralíticos consecutivos, y que generalmente se transmite a otros animales y al hombre por la mordedura de un animal enfermo (29). Su agente patógeno es un virus neurotrófico clasificado como Rhabdovirus (Koprowski H. 1957) (14).

La enfermedad y su carácter contagioso, así como el peligro de la mordedura de los perros hidrófobos, eran conocidos ya desde Aristóteles: pero hasta 1880 se creía en la posibilidad de su desarrollo espontáneo, y se admitía que podría provocarla los alimentos demasiado calientes, la privación de agua para beber, la falta de satisfacer el instinto de reproducción y las excitaciones nerviosas intensas. Celsus describe una relación entre la hidrofobia en el hombre y la rabia de los animales. La transmisión de la rabia a un perro sano con inoculación de saliva fué reportada por Zinke en 1804 (28).

Pasteur en 1884 fué el primero en modificar la patogenicidad del virus, haciendo una serie de pases intracerebrales en huespedes naturales (22). En 1903 Negri descubre los cuerpos de inclusión intracitoplásmicos, en células nerviosas de humanos y animales infectados con virus rábico (20).

En 1930 Hoyt y Jungeblis fueron los primeros en aislar el virus en ratones blancos, siendo hasta la fecha el método más comúnmente usado para el aislamiento del virus (9).

Las primeras noticias del aislamiento del virus rábico en cultivos celulares son los ensayos realizados en 1913 por Levaditi quien utilizó los ganglios espinales provenientes de animales infectados con el virus rábico (16). Posteriormente, el mismo Levaditi en colaboración con Schöen, logró cultivar el virus rábico — en células provenientes del tumor de Pearce del conejo, observando la formación de los corpúsculos de Negri en el citoplasma celular (17). A estos investigadores siguieron varios otros como: Kanazawa, Schultz Williams, Kliger y Bernkopf, quienes continuaron experimentando con virus rábico en cultivos celulares.

En 1945 Parker y Hollender reportan que el virus rábico se cultivó en tejido cerebral suspendido en solución de Tyrode (21). En 1954 Bequingnon y colaboradores, lograron cultivar el virus — en explante de riñón de raton mediante la técnica de tambor giratorio (2).

Kissling en 1958 cultivó por primera vez el virus de rabia en células no nerviosas (13). En 1960 Kaplan y colaboradores demostraron la presencia del antígeno rábico en células de riñón de "Hamster" (*Cricetus aureus*), mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes (11). Fenje obtuvo una alta concentración del virus en cultivos de diálisis obteniendo después una buena vacuna (5). En 1961 Martos y Atanasiu mostraron las inclusiones intracitoplásmicas producidas por el virus rábico en células de riñón de "Hamster" (*Cricetus aureus*) (19). En la actualidad el virus es cultivado con éste en una línea de células provenientes de riñón de "Hamster" aislada por Mc. Pherson y Stoker conocida como BHK-21 -- C. 13 ("Baby Hamster Kidney Batch 21, Clone 13") en la que se ha comprobado una reproducción rápida del virus (18).

Sedwick y Wiktor en 1967 realizaron la técnica de placas para rabia (27). En 1973 Kaplan y Koprowski publicaron que la técnica de reducción de placas con células BHK-21 13-S suspendidas en agarosa, la cual es usada hoy en día en muchos laboratorios para evaluar los anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia (12). Este método ha demostrado ser más sensible para detectar anticuerpos más rápidamente, estos investigadores afirman que los resultados están en completa correlación con la técnica clásica de inoculación intracerebral en ratones. Una de las ventajas de este nuevo procedimiento es que el resultado final, puede obtenerse en 5 ó 6 días, mientras que para la seroneutralización clásica

ca por inoculación intracerebral al ratón, es necesario esperar de 12 a 14 días.

Unos de los problemas más graves que existen en salud pública y en la ganadería Latina Americana es la rabia parasiante bovina ó "Derriengue"; en México de acuerdo con los datos disponibles de casos de rabia en humanos y animales, puede considerarse que, en mayor o menor grado, la rabia es enzoótica en todo el país, por lo que es considerada una de las enfermedades que causan pérdidas económicas mas importantes, no solo en nuestro país sino que también en todo Latino America. La F.A.O. establece que posiblemente un millón de cabezas de ganado mueren anualmente de rabia transmitida por vampiros en América Latina, entre el norte de Argentina y el norte de México (25). El problema es aún más crítico en salud pública ya que el hombre puede adquirir la enfermedad cuando es mordido por un animal infectado. En el departamento de rabia paralítica (Derriengue) localizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, donde se llevó a cabo este trabajo, estamos interesados en ayudar a la investigación de este problema y pensamos que es de mucha importancia, investigar las diferencias en el título de seroneutralización, con diferentes cepas de virus, como una indicación de posibles diferencias antigénicas entre virus; ya que se ha comprobado que hay diferentes respuestas inmunológicas cuando se inocular ó se vacuna con diferentes cepas de virus rábico. Por otra parte es importante conocer los índices de neutralización

de un antisuero específico contra una determinada cepa, para investigar indirectamente si otras cepas poseen la misma capacidad antigénica, lo que en un momento dado daría una indicación cuando se empleen cepas recién aisladas ó que no se habían adaptado anteriormente a cultivos celulares.

El proyecto de Rabia Paralítica cuenta actualmente con 2 sistemas para determinar los índices de suero neutralización: La prueba clásica en ratones y la prueba de reducción de placas.

Este trabajo tiene como finalidad tratar de determinar la existencia de una correlación entre ambas pruebas, ya que si la prueba de placas proporciona resultados constantes, podría substituir a la prueba clásica en ratones por ser más sensible, más económica y obtenerse resultados en un menor tiempo.

MATERIAL Y METODOSI. - MEDIOS DE CULTIVO.

A). - BHK-21 (Gibco) (Grand Island Biological Company). Ajustándose a un pH de 7.1 utilizando HCL-0.1N, posteriormente se esteriliza por filtración (filtros Millipore 0.22 micras) envasándose en volúmenes de 500 ó 1,000 ml. y conservándose a --4°C. En nuestro laboratorio todas las filtraciones se efectúan bajo presión positiva.

B). - Caldo de Triptosa Fosfatada (TPB) (DIFCO) 295g. en 1,000 ml. de agua bidestilada estéril y deionizada. La esterilización se efectuó en el autoclave a 15 libras de presión (121°C.) durante 15 minutos, conservándose a 4°C.

C). - Solución salina fosfatada,

Solución "A"

NACL	8.0 g.
KCL	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	2.9 g.
KH ₂ PO ₄	0.2 g.
H ₂ O bidestilada	800.0 ml.

Solución "B"

Ca CL ₂	0.1 g.
Mg CL ₂	0.1 g.
H ₂ O bidestilada	200.0 ml.

Estas dos soluciones se esterilizan por separado en el autoclave a 10 libras de presión durante 10 minutos, se dejan enfriar a temperatura ambiente y se mezclan las dos soluciones A y B; refrigerándose a 4°C.

D). - Tripsina 1:300 (Mann Research Laboratories Inc --- New York, New York 1006).

Un gramo de esta tripsina se disuelve en 100 ml. de PBS libre de Ca. y Mg. (C); y se esteriliza por filtración (filtro Millipore 0.22 micras). Se envasa en volúmenes de 5 ml. y se congela a -20°C. Antes de usarse se diluye 1:4

E). - Penicilina y Estreptomina (SQUIBB)

Penicilina G Procaínica	1,000,000 U.I.
Sulfato de Estreptomina	1 g.
H ₂ O bidestilada estéril	50 ml.

En un mililitro de esta solución tenemos 20,000 U. I. de Penicilina y 20 mg. de Estreptomicina. Esta solución es conservada a -20°C .

F). - Micostatina.

Nistatina (SQUIBB)	2,400,000 U. I.
H ₂ O bidestilada estéril	48 ml.

Se agita esta mezcla durante 20 minutos, es envasada en volúmenes de 1 ml. conservándose en congelación a -20°C . (50,000 U/ml.).

G). - Glutamina 3%

L- Glutamina (Mann Research Laboratories)	3 g.
Solución Salina Fisiológica	100 ml.

La esterilización se realiza por filtración (filtro - Millipore, 0.22 micras) se conserva a -20°C .

H). - Na HCO₃ al 4.4%

Na HCO₃ (Lab. Merck) 4.4 g.
 H₂O bidestilada 100.0 ml.

Se esteriliza por filtración por (filtros Millipore, -
 0.22 micras) se conserva en refrigeración a 4°C. -
 en volúmenes de 20 ml.

I). - DEAE Dextran al 0.5 %

DEAE Dextran (Sigma Chemical Company) 0.5 g
 PBS libre de Ca. y Mg. (Sol. A) (C) 100.0 ml.

Se esteriliza por filtración (Millipore 0.22 micras)
 conservándose en congelación a -20°C. y envasán
 dose en volúmenes de 5 ml.

J) - Medio Eagle 2x .

Se utilizan dos sobres de Eagle sin rojo de Fenol -
 (Gibco) por cada litro de H₂O bidestilada y deioni-
 zada; se ajusta el PH a 7.1 con HCL al 1N, se es-
 teriliza por filtración (Millipore 0.22 micras) y se
 envasa en botellas de 500 ml. y conservándose en-
 refrigeración a 4°C.

K). - Solución de Rojo neutro

Rojo neutro (Lab. Merck)	1 g.
H ₂ O bidestilada deionizada	1,000 ml.

La solución es esterilizada en autoclave a 15 libras (121°C.) durante 15 minutos, se envasa en botellas de 250 ml. y se protege de la luz con papel estaño - conservándose a 4°C.

L). - Suero Fetal bovino (Flow Laboratories)

Este suero es adquirido en forma líquida y se mantiene congelada a -20°C.

Antes de usarse es inactivado en baño María a 56°C. durante 30 minutos, se deja a temperatura ambiente y posteriormente se conserva en refrigeración a -4°C.

M). - Medio de crecimiento.

Medio BHK-21 (I-A)	80 %
Suero fetal bovino	10 %
Caldo de triptosa fosfatada	10 %

Antibióticos:

Penicilina	50 U.I./ml.
------------	-------------

Estreptomina	50 mg./ml.
--------------	------------

N). - Medio de mantenimiento.

Medio BHK-21 (I-A)	98.0 %
--------------------	--------

Suero fetal bovino	2.0 %
--------------------	-------

Antibióticos:

Penicilina	50 U.I./ml.
------------	-------------

Estreptomina	50 mg./ml.
--------------	------------

II. - LINEAS CELULARES.

A). - BHK-21 - Esta línea se obtuvo de riñón de Hamster lactante; y el I. N. I. P. la adquirió del Instituto Wistar de Filadelfia E. U. A.

B). - 13S. - Esta línea celular es una clona de la línea BHK-21 y fué adquirida por el I. N. I. P. del Instituto Wistar de Filadelfia E. U. A. y la clona 3 fué preparada en nuestro laboratorio.

III. - CEPAS DE VIRUS.

Antibióticos:

Penicilina 50 U.I./ml.

Estreptomina 50 mg./ml.

N). - Medio de mantenimiento.

Medio BHK-21 (I-A) 98.0 %

Suero fetal bovino 2.0 %

Antibióticos:

Penicilina 50 U.I./ml.

Estreptomina 50 mg./ml.

II. - LINEAS CELULARES.

A). - BHK-21 - Esta línea se obtuvo de riñón de Hamster lactante; y el I. N. I. P. la adquirió del Instituto Wistar de Filadelfia E. U. A.

B). - 13S. - Esta línea celular es una clona de la línea -- BHK-21 y fué adquirida por el I. N. I. P. del Instituto Wistar de Filadelfia E. U. A. y la clona 3 fué preparada en nuestro laboratorio.

III. - CEPAS DE VIRUS.

A). - Virus "V-319". - De un vampiro (*Desmodus rotundus*) que fue capturado en el rancho San Ricardo, localizado a tres kilómetros al suroeste de la estación San Vicente, municipio de Acatlán de Pérez Figueroa, Oax. - El vampiro fue capturado en una red, colocada alrededor de un corral donde se encontraban bovinos mordidos por dichos quirópteros. El vampiro murió cuando era trasladado al I.N.I.P. el 14 de febrero de 1969 y se congeló a -30°C . , se efectuó el examen de su cerebro y glándulas salivales, 3 días después por medio de la técnica de inmunofluorescencia, encontrándose estos órganos positivos a rabia por dicha técnica.

Esta cepa fué adaptada a cultivos celulares mediante 5 pases en células de embrión de vampiro, posteriormente se le dió 5 pases en células BHK-21, tomándose de este último pase una placa; la número 476 para purificar el virus, después se dieron 3 pases más en estas mismas células donde se alcanzó un título de 10^9 UFP/ml.*

Esta cepa es utilizada actualmente para elaborar una vacuna antirrábica comercial, producida en el departamento de producción del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (SAG).

* Unidades formadoras de placas.

B).- Virus "CVS" (Adaptado). - Este es el virus standard de confrontación, proveniente del Instituto Wistar de Filadelfia, Pennsylvania, E. U. A. fue adaptado para este estudio a células 13SCL₃ en el Departamento de Rabia Parafítica Bovina (Derriengue) del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Mediante 3 pases seriados en células 13SCL₃ considerándose adaptado a cultivos celulares cuando alcanzó un título de $10^{5.92}$ y formaba placas en suspensiones de agarosa.

C).- Virus Cepa "ERA" (Alto pasaje). - El virus original proveniente de un perro rabioso y adaptado a ratón de nominado SAD 4 (Street Alabama Dufferin), ha sido adaptado a cultivos celulares de riñón de Hamster por Fenje y llamado SAD 4 HK 25. Después de 10 pases en embrión de pollo, el virus fué adaptado a cultivos celulares de riñón de cerdo por Abelseth y encontrado suficientemente atenuado para su uso en varias especies animales (1). Fué entonces que se le denominó Cepa "ERA", y después de 35/45 pases más, se usó para producir una nueva vacuna que lleva el nombre de vacuna Cepa "ERA". El virus fué adaptado a células BHK-21 por Koprowski llegando a obtenerse títulos de $10^{9.0}$ como máximo; la Cepa "ERA" alto pasaje fué obtenida del Instituto Wistar de Filadelfia E. U. A.

IV. - SUEROS.

Los sueros empleados procedían de bovinos adultos hembras (negativas a la Prueba de Reducción de Placas (PRP) y Seroneutralización (SN) antes de la vacunación)-divididos en dos lotes, un lote localizado en el centro experimental de Ajuchitlán, Querétaro y el otro lote en el I.N.I.P. Estos animales fueron vacunados con el virus V-319, siendo sangrados para la obtención del suero a diferentes intervalos después de la vacunación: A las dos, tres, cuatro, seis, ocho semanas, tres y seis meses.

V. - PREPARACION DE MONOESTRATOS.

Se utilizaron botellas de Roux, botellas de leche (Milk Dilution Bottle), cajas de Petri y tubos de Leighton. A partir de una botella de leche con el monoestrato completamente formado; se procedió a quitar todo el medio que estaba en la botella, después se depositó 1 ml. de tripsina al 0.25% que se pone en contacto con las células, se esperan unos minutos para que se desprendan las células, se procede a poner 5 ml. de medio de mantenimiento (I.N.) para neutralizar a la tripsina y así proteger las células estas células son contadas en un hemocitómetro para

saber la cantidad de células por ml. que se tiene, a fin de poder sembrar la cantidad de células adecuada según el recipiente que se utilice.

Las botellas de Roux se siembran poniendo 100 ml. de medio de crecimiento (I.M.) y aproximadamente 13 millones de células. Con las botellas de leche se usan 15 ml. de medio de crecimiento (I.M.), y 3 millones de células aproximadamente. A los tubos de Leighton se les pone con un cubreobjetos, 1 ml. de medio de crecimiento (inciso I M) y aproximadamente 100,000 células. Estos tres tipos de recipiente, cuando ya han sido sembrados con células, se incuban a 37°C. durante 72 horas. Al cabo de este tiempo ya se ha formado un monoestrato satisfactorio. Para la formación de monoestrato en caja de Petri de 50 mm. se colocan los cubreobjetos y se ponen 10 ml. de medio, con aproximadamente 1.5 millones de células. Estas cajas de Petri se incuban a 37°C. en una atmósfera de CO₂ al 5%, y se revisan cada 24 horas para observar el crecimiento de las células, esta observación se realiza con un microscopio invertido.

VI. - ANIMALES DE LABORATORIO.

Se emplearon aproximadamente 500 ratones blancos de 21 días de edad; éstos fueron inoculados por vía intracerebral, administrándole a cada animal 0.03 ml. del inóculo.

Los ratones fueron observados diariamente, considerando como muertes no específicas, aquellas ocurridas antes de los 5 días después de la inoculación.

VII. - SERONEUTRALIZACION.

A). - IN VITRO (Prueba de placa para rabia)

1. - Preparar agarosa al 1% o al 1.25% (Bausch y Lomb) en agua destilada.
2. - Esterilizar por ebullición durante una hora en baño María y mantener la suspensión a 56°C.
3. - Preparar el siguiente medio:
 - 83 ml. de Eagle 2x sin rojo de fenol
 - 2.5 ml. de bicarbonato de sodio al 4.4%
 - 1 ml. de glutamina al 3% (si el medio Eagle no contiene glutamina)
 - 1 ml. penicilina (20,000u. I./ml) más estreptomicina 20 mg/ml.
 - 0.2 ml. de mycostatina (50 mg/ml)

4 ml de suero fetal de bovino.

4. - Agarosa nutritiva:

Mezclar la agarosa y el medio anterior en cantidades iguales y mantenerlo a 46°C . (la concentración de agarosa es ahora de 0.5%)

5. - Distribuir 2 ml. de esta mezcla en cajas de Petri de 35 mm. de plástico Falcón y dejar solidificar la agarosa antes de cambiarlas de lugar (hacer estallar las burbujas del agar con la punta caliente de una pipeta de Pasteur antes de que la agarosa se solidifique).

6. - Tripsinizar suficientes monoestratos de células 13SCL₃ y ajustar la concentración de células a $10 \times 10^6/\text{ml}$.

Suspender las células en un medio contenido:

98% medio de BHK-21 con antibióticos.

2% de suero fetal de bovino.

Conservarlo a 36°C .

Mezclar las células con pipeta para separarlas, ya que tienden a agruparse.

7. - Agregar la suspensión de células a un volumen igual de agarosa nutritiva con agitación continua; manteniendo esta suspensión de células en agarosa a 46°C . en un recipiente pequeño con agua a -

esta temperatura. La temperatura es crítica, ya que si se enfría la mezcla, ésta se solidificará y si es más alta la temperatura, las células morirán.

- 8.- Agregar 1 ml. de esta suspensión a cada caja de Petri. De este modo se usan 2.5 millones de células por caja; distribuyendo uniforme y suavemente la células haciendo estallar las burbujas si es necesario; dejar las cajas de Petri así preparadas sin moverlas por lo menos 10 minutos para permitir que se solidifique la agarosa.
- 9.- Colocarlas en una incubadora de CO_2 y usarlas para infección con un mínimo de 3 horas después de preparadas.
- 10.- Incubar a 36°C . con 5% de CO_2 y 90 a 95% de humedad.
- 11.- Después de permanecer 3 horas en la estufa, se procedió a infectar las cajas con .05 ml. de inóculo. Este inóculo antes de utilizarlo para la infección fué incubado una hora a 36°C . con la correspondiente dilución de suero.
- 12.- Después de 7 días de incubación, las cajas se tiñen con la solución de rojo neutro colocando en cada caja de Petri 2 ml. de la mezcla siguiente:

96.3 ml. Eagle 2X.

2.5 ml. 4.4% de bicarbonato de sodio

1.0 ml. de penicilina mas estreptomina -----
(20,000)

0.2 ml. de micostatina 50 microgramos ml. --
(U.I./ml.).

10 ml. de rojo neutro son mezclados con 90 ml.
de la mezcla de agarosa y medio.

13. - La lectura puede hacerse desde una hora des-
pués de la tinción, aunque regularmente se lle-
va a cabo 24 horas después.

Las placas se aprecian mejor si se observa por
contraste con luz verde.

VIII. - TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.

A). - Material:

- 1). - Laminillas con el monoestrato bien formado.
- 2). - Globulina antirrábica conjugada, basada en la -
técnica del Centro Panamericano de Zoonosis; -
Argentina.
- 3). - Suspensión de cerebro normal al 20%
- 4). - Suspensión de cerebro de ratón infectado al 20%.
- 5). - Portaobjetos
- 6). - Estufa con una temperatura de 36°C.

7).- Microscopio Leitz Wetzlar Germany 717554 a Fil
tros . (Para observación de fluorescencia.)

B).- Procedimiento de la tinción.

Las laminillas son sacadas del recipiente y se obser--
van, eligiendo aquellas que tengan un monoestrato de -
células completo, estas laminillas son secadas a tempe
ratura ambiente, dichas laminillas una vez secadas se-
cortan en tres partes, dos de estas partes son fijadas-
en el portaobjetos con cemento para plástico, que evita
Fluorescencia inespecífica. Después de montadas las-
laminillas en el portaobjetos, se colocan una ó dos go-
tas de una mezcla de globulina antirrábica conjugadas-
con suspensión de cerebro normal en una de las lamini-
llas, mientras que en la otra laminilla ponemos una o-
dos gotas de globulina antirrábica tratadas con cerebro
de ratón infectado al 20%. Los portaobjetos se colocan
en una cámara húmeda y esta cámara es incubada 30 mi-
nutos a 36°C. Posteriormente la incubación, se pro-
cede al lavado, sumergiendo las laminillas en una solu-
ción amortiguadora de fosfatos con un pH. 7.2 durante-
10 minutos; después se enjuagan en agua destilada y se-
secan al medio ambiente o con un secador de aire. Una vez
secas las laminillas pueden ser observadas al microscopio

de inmunofluorescencia Si se pretende guardar las laminillas deben protegerse con un cubreobjeto fijado con alcohol; y conservarse en refrigeración.

IX. - DILUCIONES DEL INOCULO.

A). - Sueros.

Los sueros en diluciones dobles y cuádruples fueron mezclados con cantidades equivalentes de una dilución constante de virus y la mezcla ya incubada por una hora a 36°C. fué depositada en las cajas de Petri en cantidad de .05 ml/caja paralela a la prueba en cajas de Petri, otra prueba de seroneutralización se efectuó en ratones blancos de 21 días de edad utilizando las mismas diluciones de suero y virus e inoculando .03-ml. por ratón por vía intracerebral. (5 ratones por cada dilución)

B). - Los virus utilizados se mencionan en el inciso (III) estas cepas víricas se utilizaron con diluciones finales diferentes:

V-319	Dilución final	1:600
CVS	Adaptado dilución final	1:80
ERA	Dilución final	1:800

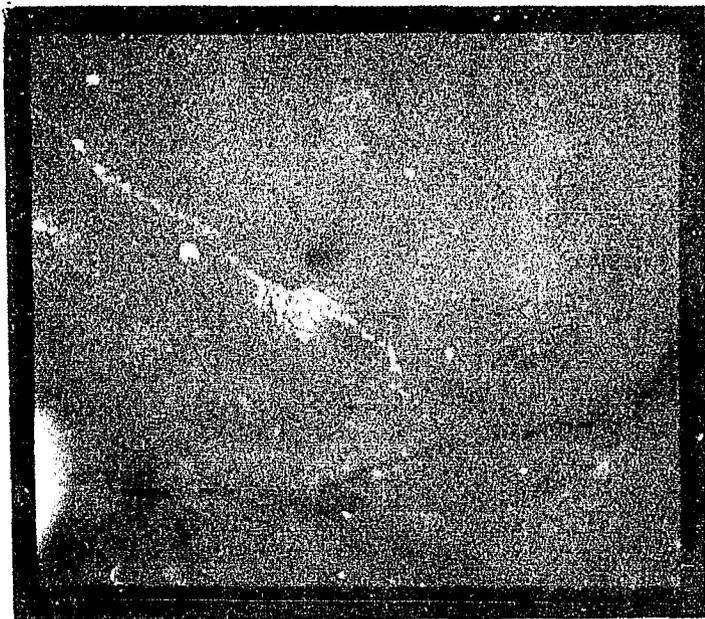
R E S U L T A D O SADAPTACION DEL VIRUS "CVS" A CULTIVOS CELULARES

La adaptación del virus "CVS" a células 13SCL₃, mencionado en Material y Métodos (Capítulo anterior), se realizó con la técnica siguiente:

4 cubreobjetos estériles se colocaron en cajas de Petri de 50 mm. y células 13SCL₃ pase 25 se sembraron en cada una de ellas. Una vez crecidas las células (monoestrato) se infectaron con virus CVS en diluciones 10^0 - 10^2 y en presencia -- de DEAE Dextran (100 mg/ml.)

Después de una hora de incubación a 37°C. y 5% de CO₂ con las diferentes diluciones del virus se procedió a poner a las células medio de mantenimiento. Los cubreobjetos se tiñeron a las 30, 48 y 72 por la técnica de anticuerpos fluorescentes. A las 48 horas de infectadas las células, cosechamos el sobrenadante de las 2 diluciones o sea de las cajas 10^{-1} y 10^{-2} . La caja de la dilución 10^{-1} se mantuvo en congelación a -20°C. durante 24 horas después de los cuales se descongeló y se procedió a envasar, etiquetar, y congelar nuevamente a -70°C. Este primer pase de (CVS) se identificó como - CVS 1. Con el CVS 1 infectamos botellas de leche y tubos de Leighton con células 13SCL₃ pase 27, tiñéndose los cubreobjetos de los tubos de Leighton 30 horas después de la infec --

ción. El resultado fué positivo a la técnica de inmunofluorescencia (lámina 1), obteniendo así el segundo pase del virus a cultivos celulares. Este virus (CVS 2) fué titulado en prueba de placa con células 13SCL₃ (pase 30). Las diluciones fueron de 10^{-0} a 10^{-4} , utilizando 4 cajas por cada dilución, los resultados fueron favorables ya que encontramos placas en diluciones 10^{-0} a 10^{-3} esto significa que el virus se estaba adaptando a las células. Posteriormente infectamos botellas de leche con células 13SCL₃ (pase 25) que fueron infectadas con el virus CVS (2); de esta botella infectada obtuvimos 3 muestras, la primera a las 48 horas después de la infección cosechando el medio y añadiendo nuevo medio de mantenimiento al mismo monoestrato la segunda cosecha fué a las 96 horas y la tercera cosecha a las 120 horas. En este último pase se realizaron algunas modificaciones en la técnica ya que, ha esta muestra se le neutralizó el pH. (aproximadamente a las 72 horas, se cosechó ese medio a las 96 horas y se puso nuevo medio de mantenimiento, después se neutralizó el pH. a las 110 horas, a las 120 horas, se procedió a congelar la botella a -20°C durante 24 horas, posteriormente se descongeló y centrifugó a 2,000 R.P.M. durante 5 minutos, el sobrenadante lo envasamos en tubos de plástico de 2 ml., poniendo en cada tubo 1.5 ml. identificándolo como CVS 3, y rápidamente se procedió a congelar a -70°C . conservándose a esta temperatura.



Lamina 1. - Preparación coloreada con anticuerpos fluorescentes, mostrando puntos antigénicos de diferentes tamaños dentro del Citoplasma. El núcleo siempre está libre de inclusiones.

Este virus se tituló en la prueba de reducción de placa y se obtuvo un resultado favorable, ya que se encontró que el virus tiene un título de $10^{5.92}$.

Una vez adaptado este virus, se utilizó para el estudio comparativo con otros virus ya conocidos, cabe mencionarse -- que la adaptación de esta cepa de virus a cultivos celulares, se realizó exclusivamente para este estudio.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACION

Los resultados de este trabajo se ilustran en los cuadros del No. 1 al No. 8 y en las gráficas No. 1 a la No. 16, correspondiendo 2 gráficas por cada uno de los cuadros.

Las gráficas se trazaron empleando los resultados obtenidos en las pruebas de seroneutralización (cuadros 1 al 8), tomando en consideración que en cada gráfica se usó un virus como base y el otro al azar del mismo suero y muestras con los dos virus. Para trazar la posición del virus como base, se tomó en cuenta la abscisa y la ordenada a fin de ajustar los datos a una línea y para trazar la posición del virus al azar se tomó en consideración el sitio trazado del virus base y la coordenada vertical (abscisa). Para trazar la otra gráfica se invierten los datos, tomando el virus que se usó anteriormente como base, al azar y el virus que se usó anteriormente al azar, ahora como base; de igual manera se efectuó la comparación de las dos pruebas biológicas diferentes (seroneutralización IN VIVO E IN VITRO).

En este trabajo los anticuerpos producidos por la inoculación se dividieron en dos grupos: Los anticuerpos tempranos señalados en las gráficas, corresponden a la respuesta obtenida a 2 y 3 semanas después de la inoculación, y los anticuerpos tardíos corresponden al período posterior. En las gráficas que muestran el estudio comparativo entre los dos sistemas biológicos (IN VIVO E IN VITRO) se consideraron anticuerpos tempranos hasta 4 semanas después de la inoculación y tardíos de 6 semanas en adelante.

LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION.

(CUADRO No. 1)

<u>V-319</u>	<u>CVS (ADAP.)</u>
* 987-28. 4.148 \pm .156	3.034 \pm .121
989-28. 4.239 \pm .139	3.120 \pm .129
992-28. 3.658 \pm .147	2.544 \pm .129
995-28. 3.999 \pm .233	3.254 \pm .188
987-38. 4.540 \pm .148	2.721 \pm .150
989-38. 4.228 \pm .117	3.291 \pm .164
992-38. 4.528 \pm .188	2.557 \pm .162
995-38. 4.062 \pm .176	2.844 \pm .186
915-38. 2.473 \pm .135	2.344 \pm .135
949-38. 3.742 \pm .219	2.533 \pm .188
951-38. 2.383 \pm .196	2.034 \pm .141
962-38. 1.340 \pm .156	2.087 \pm .188
971-38. 3.115 \pm .274	2.685 \pm .156

NOTA: 987= No. de Arete. 2S dos semanas. 4.148= logaritmo de la dilución - 14060 \pm .153= desviación estandar, el (dos veces el error estandar) límite de confianza al 95%. La columna de la derecha corresponde al logaritmo de la Dilución \pm el error estandar, del mismo suero y la misma muestra de la columna izquierda, pero con diferente virus. De esta misma manera están anotados los datos en todos los cuadros.

LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION

(CUADRO No. 2)

<u>V-319</u>	<u>ERA</u>
987-2S. 4.148 ± .156	2.823 ± .162
989-2S. 4.239 ± .137	3.145 ± .156
992-2S. 3.658 ± .147	2.516 ± .145
995-2S. 3.999 ± .233	2.848 ± .125
987-3S. 4.540 ± .148	3.082 ± .137
989-3S. 4.228 ± .117	2.860 ± .188
992-3S. 4.528 ± .188	2.651 ± .184
995-3S. 4.062 ± .176	2.829 ± .147
915-3S. 2.473 ± .135	2.240 ± .109
949-3S. 3.742 ± .219	2.527 ± .098
951-3S. 2.383 ± .196	1.650 ± .111
971-3S. 3.115 ± .274	2.482 ± .147

LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION

(CUADRO No. 3)

<u>CVS (ADAP.)</u>	<u>ERA</u>
987-28. 3.034 \pm .121	2.823 \pm .162
989-28. 3.120 \pm .129	3.145 \pm .156
992-28. 2.544 \pm .156	2.516 \pm .145
995-28. 3.254 \pm .188	2.848 \pm .125
987-38. 2.721 \pm .150	2.860 \pm .188
989-38. 3.291 \pm .164	2.651 \pm .184
992-38. 2.557 \pm .162	2.829 \pm .149
995-38. 2.844 \pm .186	2.829 \pm .149
915-38. 2.344 \pm .135	2.240 \pm .109
949-38. 2.533 \pm .188	2.527 \pm .098
951-38. 2.034 \pm .141	1.650 \pm .111
971-38. 2.482 \pm .147	2.482 \pm .147

LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION.

(CUADRO No. 4)

<u>v-319</u>	<u>CVS (ADAP.)</u>
987-4S. 3.720 ± .156	2.920 ± .188
989-4S. 4.176 ± .172	2.364 ± .174
992-4S. 4.228 ± .227	3.006 ± .166
995-4S. 4.548 ± .192	3.456 ± .166
987-6S. 3.558 ± .194	2.650 ± .139
989-6S. 4.276 ± .207	3.876 ± .147
992-6S. 4.249 ± .225	2.745 ± .168
995-6S. 4.268 ± .162	3.524 ± .184
987-8S. 2.162 ± .111	1.653 ± .111
989-8S. 4.224 ± .152	3.770 ± .217
992-8S. 3.899 ± .145	2.473 ± .135
995-8S. 4.224 ± .201	2.287 ± .117
915-6S. 2.147 ± .186	2.724 ± .180
949-6S. 2.744 ± .235	2.713 ± .197
951-6S. 1.889 ± .196	3.190 ± .194
962-6S. 2.093 ± .172	2.281 ± .131
971-6S. 2.785 ± .209	2.657 ± .137
915-3M. 2.103 ± .229	2.582 ± .147
949-3M. 3.062 ± .180	2.248 ± .352
951-3M. 2.183 ± .190	1.869 ± .176
962-3M. 1.872 ± .172	1.300 ± .123
971-3M. 3.753 ± .150	2.458 ± .156
915-6M. 2.030 ± .174	1.383 ± .137
949-6M. 2.438 ± .166	3.030 ± .172
951-6M. 2.143 ± .196	1.560 ± .147
962-6M. 1.602 ± .168	1.544 ± .125
971-6M. 2.700 ± .160	2.395 ± .147

LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION

(CUADRO NO. 5)

<u>V-319</u>	<u>ERA</u>
987-4S. 3.720 ± .156	2.790 ± .135
989-4S. 4.176 ± .172	3.892 ± .182
992-4S. 4.228 ± .227	2.644 ± .121
995-4S. 4.548 ± .192	2.371 ± .150
987-6S. 3.558 ± .194	2.491 ± .019
989-6S. 4.276 ± .207	3.768 ± .119
992-6S. 4.249 ± .225	2.273 ± .115
995-6S. 4.268 ± .162	3.011 ± .074
987-8S. 2.162 ± .111	1.653 ± .111
989-8S. 4.224 ± .152	3.770 ± .217
992-8S. 3.899 ± .145	2.473 ± .135
995-8S. 4.224 ± .201	2.287 ± .117
915-6S. 2.147 ± .186	1.950 ± .111
949-6S. 2.744 ± .235	2.105 ± .188
962-6S. 2.093 ± .172	1.701 ± .094
971-6S. 2.785 ± .209	1.427 ± .141
915-3M. 2.103 ± .229	1.760 ± .139
949-3M. 3.062 ± .180	2.480 ± .147
962-6M. 1.602 ± .168	1.500 ± .145
971-6M. 2.700 ± .160	2.620 ± .143

LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION

(CUADRO No. 6)

<u>CVS (Acap.)</u>	<u>ERA</u>
987-4S. 2.920 ± .188	2.790 ± .135
989-4S. 2.364 ± .174	3.892 ± .182
992-4S. 3.006 ± .166	2.644 ± .121
995-4S. 3.456 ± .166	2.371 ± .150
987-6S. 2.650 ± .139	2.491 ± .019
989-6S. 3.876 ± .147	3.768 ± .119
992-6S. 2.745 ± .168	2.273 ± .115
995-6S. 3.524 ± .184	3.011 ± .074
987-8S. 2.146 ± .188	1.653 ± .111
989-8S. 3.922 ± .158	3.770 ± .217
992-8S. 2.434 ± .170	2.473 ± .135
995-8S. 2.771 ± .176	2.287 ± .117
915-6S. 2.724 ± .180	1.950 ± .111
949-6S. 2.713 ± .197	2.105 ± .188
962-6S. 2.281 ± .131	1.701 ± .094
971-6S. 2.657 ± .137	1.427 ± .141
915-3M. 2.582 ± .147	1.760 ± .139
949-3M. 2.248 ± .352	2.480 ± .147
962-5M. 1.544 ± .125	1.500 ± .145
971-6M. 2.395 ± .147	2.620 ± .143

LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION

(CUADRO No.7)

<u>* P. R. P.</u>	<u>** P. C. R.</u>
907-3S. 2.974 \pm .090	2.419 \pm .170
918-3S. 3.483 \pm .117	1.747 \pm .140
921-3S. 2.250 \pm .103	1.747 \pm .243
947-3S. 2.230 \pm .103	1.747 - .139
951-3S. 2.150 \pm .117	1.857 \pm .158
962-3S. 2.272 \pm .105	1.977 \pm .247
971-3S. 3.006 \pm .101	3.184 \pm .123
974-3S. 2.063 \pm .121	1.857 \pm .123
983-3S. 1.519 \pm .064	2.583 \pm .185
986-3S. 2.908 \pm .074	2.316 \pm .273
906-3S. 3.160 \pm .074	2.534 \pm .135
943-3S. 2.778 \pm .101	2.534 \pm .135
946-3S. 2.899 \pm .092	2.446 \pm .171
949-3S. 2.755 \pm .033	2.345 \pm .260
955-3S. 2.793 \pm .123	2.181 \pm .159
915-3S. 2.739 \pm .099	2.534 \pm .135
924-3S. 2.922 \pm .117	2.619 \pm .175
925-3S. 2.960 \pm .082	1.567 \pm .180
930-3S. 2.755 \pm .082	2.534 \pm .175
987-4S. 3.334 \pm .109	3.233 \pm .135
989-4S. 3.198 \pm .099	3.379 \pm .175
992-4S. 3.094 \pm .119	3.212 \pm .132
995-4S. 3.384 \pm .101	2.279 \pm .177
996-4S. 3.454 \pm .027	2.460 \pm .123

* Prueba de reduccion de placas

** Prueba clásica en ratones.

LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION

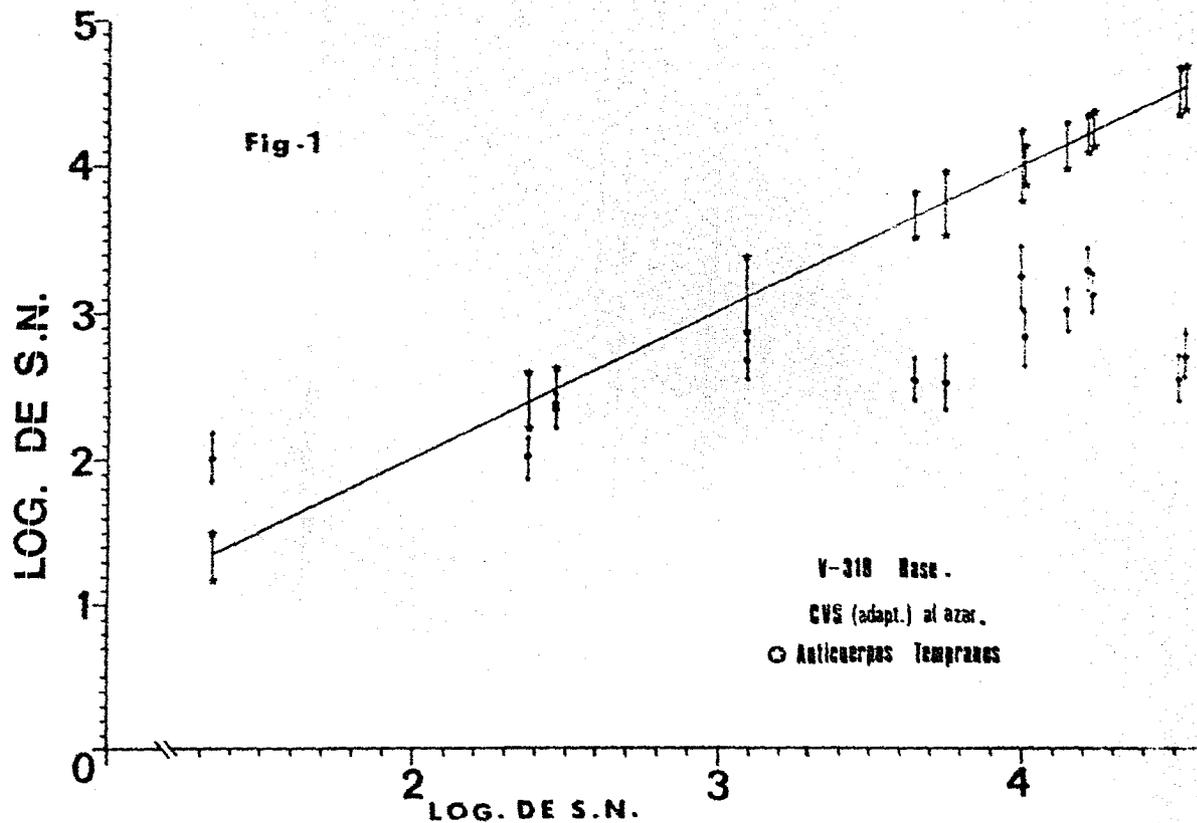
(CUADRO No. 8)

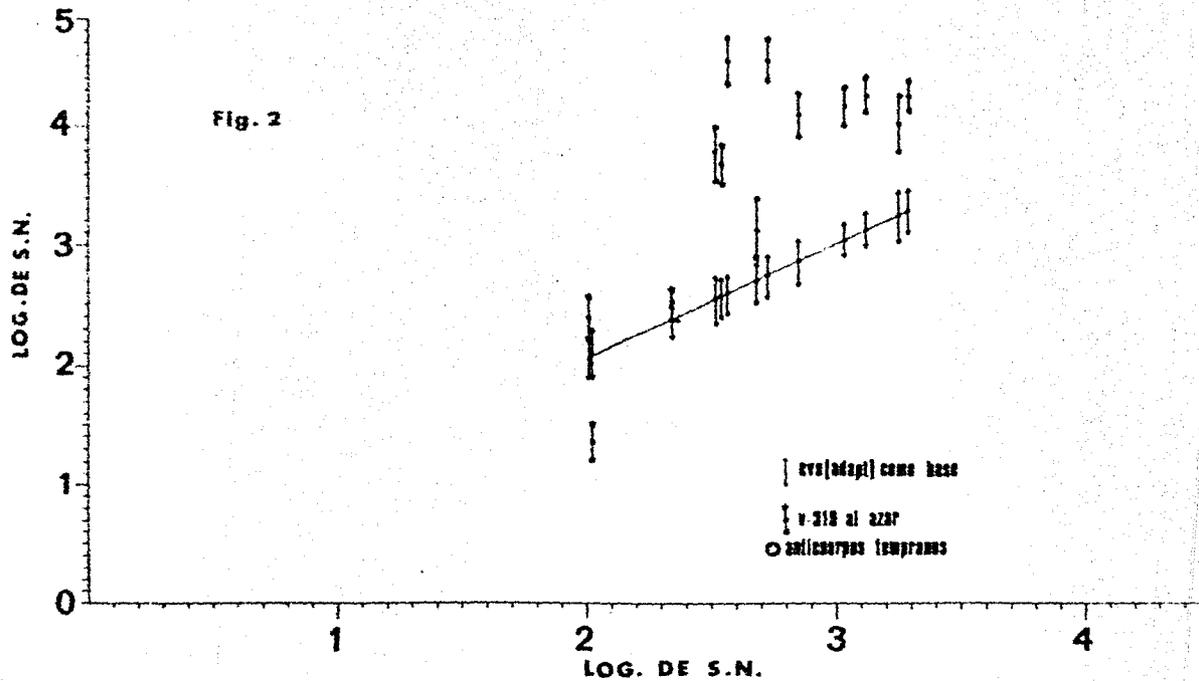
<u>P. R. P.</u>		<u>P. C. R.</u>	
930-6S.	3.895 ± .129	3.164 ± .123	
907-6S.	2.956 ± .101	1.797 ± .151	
925-6S.	3.139 ± .064	3.215 ± .132	
924-6S.	2.720 ± .107	2.609 ± .123	
915-6S.	2.720 ± .096	1.747 ± .101	
911-6S.	3.019 ± .107	1.936 ± .384	
955-6S.	2.577 ± .099	1.791 ± .160	
949-6S.	2.492 ± .107	2.166 ± .125	
943-6S.	2.492 ± .107	2.370 ± .167	
922-6S.	3.069 ± .086	2.346 ± .117	
906-6S.	2.860 ± .119	2.184 ± .125	
918-6S.	2.900 ± .121	2.358 ± .117	
951-6S.	1.924 ± .099	1.048 ± .171	
962-6S.	2.110 ± .121	2.379 ± .171	
971-6S.	2.733 ± .101	2.184 ± .127	
943-3M.	2.191 ± .111	2.527 ± .135	
949-3M.	2.874 ± .103	2.446 ± .171	
995-3M.	2.471 ± .107	2.527 ± .135	
911-3M.	2.191 ± .111	1.774 ± .165	
915-3M.	2.133 ± .107	2.493 ± .130	
924-3M.	2.153 ± .080	2.233 ± .137	
925-3M.	2.793 ± .121	1.980 ± .123	
907-3M.	2.380 ± .092	2.202 ± .131	

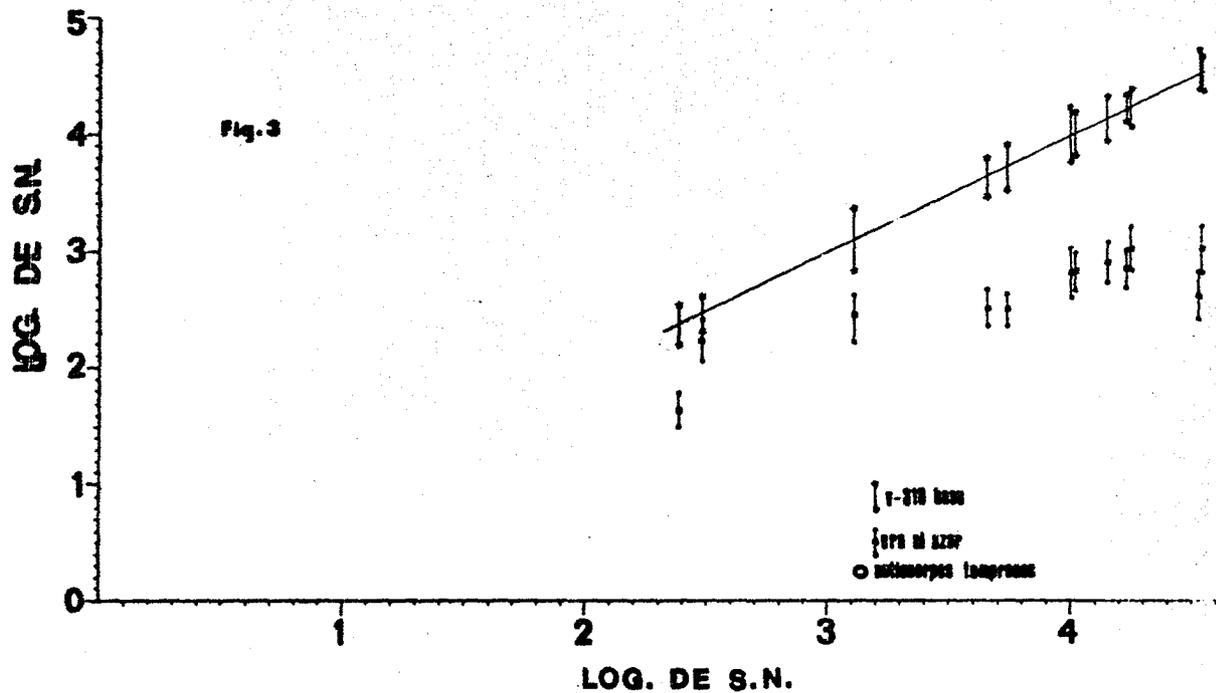
LOGARITMOS DE SERONEUTRALIZACION

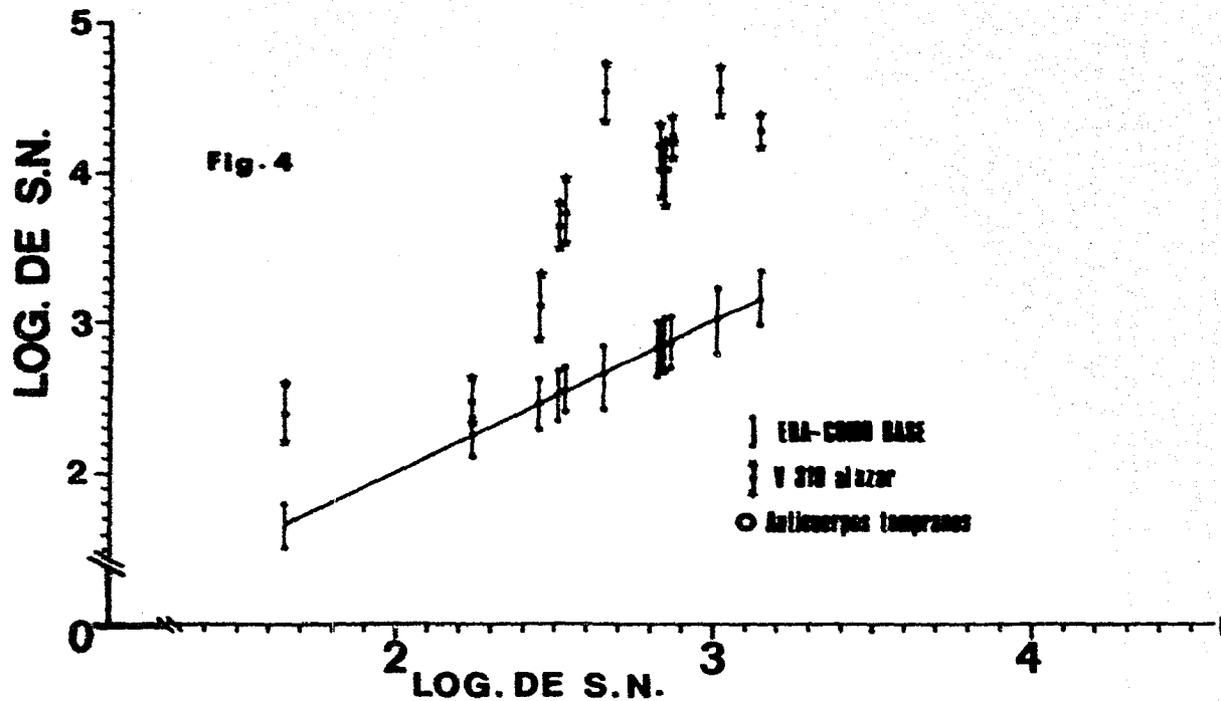
CONTINUACIÓN

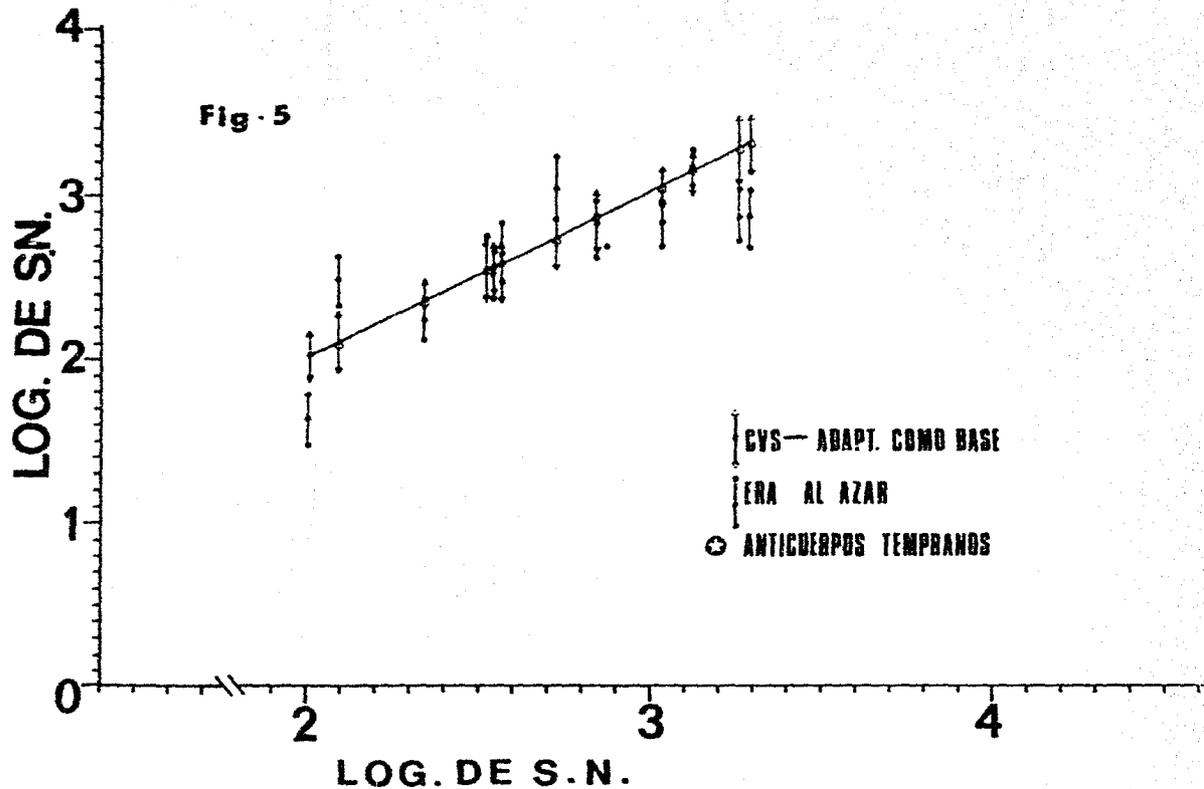
<u>P. R. P.</u>		<u>P. C. R.</u>
947-3M.	2.145 ± .113	1.857 ± .123
918-3M.	2.516 ± .094	2.379 ± .168
971-3M.	2.748 ± .098	2.212 ± .132
983-3M.	1.613 ± .141	1.857 ± .123
986-3M.	2.295 ± .092	1.048 ± .171
906-6M.	2.237 ± .103	2.512 ± .125
955-6M.	1.857 ± .084	1.631 ± .270
915-6M.	2.256 ± .090	1.786 ± .128
925-6M.	2.915 ± .090	2.533 ± .135
930-6M.	3.490 ± .070	3.220 ± .135
905-6M.	2.212 ± .051	2.533 ± .135
962-6M.	2.678 ± .039	1.981 ± .173
971-6M.	2.377 ± .070	2.200 ± .132
983-6M.	2.847 ± .085	2.001 ± .151
989-6M.	2.236 ± .087	1.048 ± .171

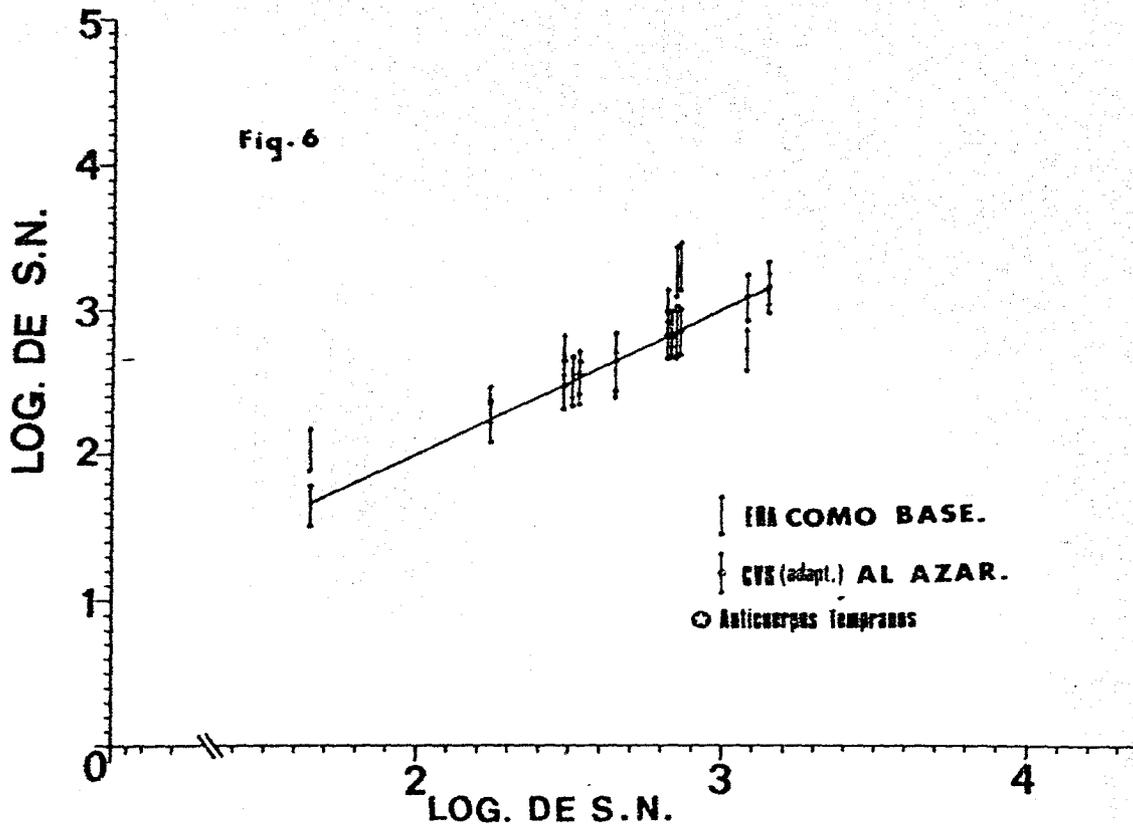


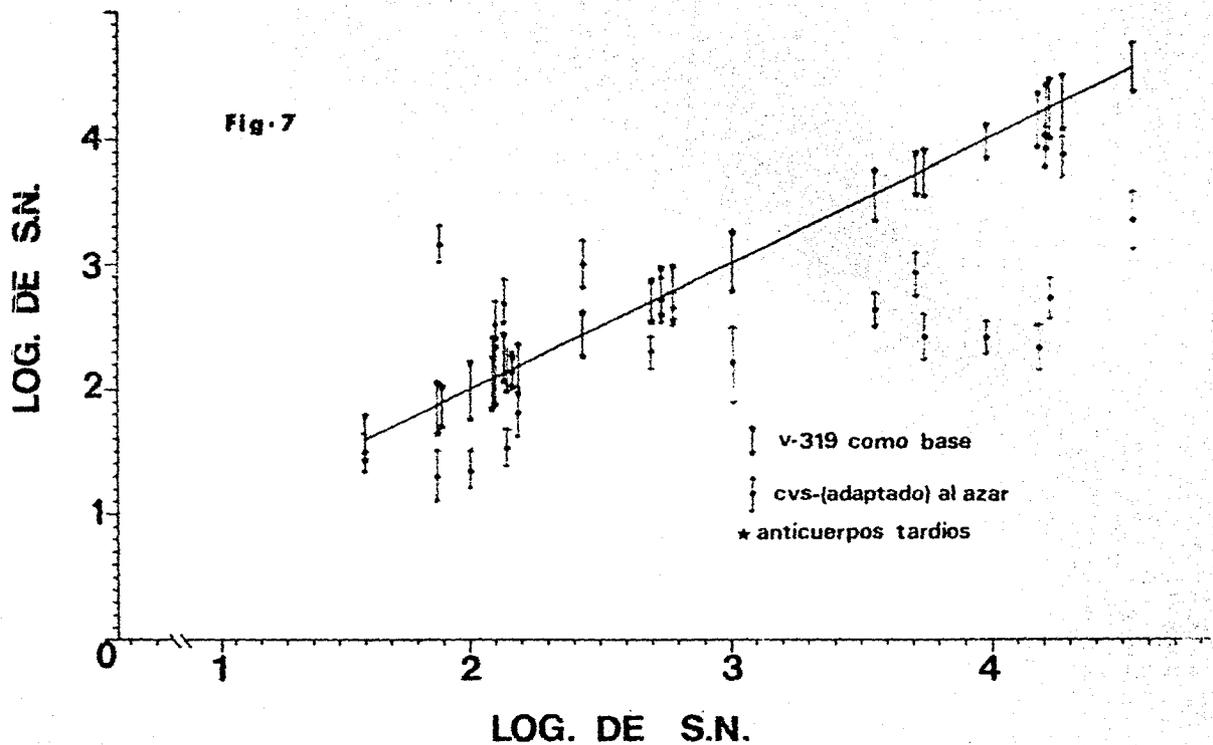


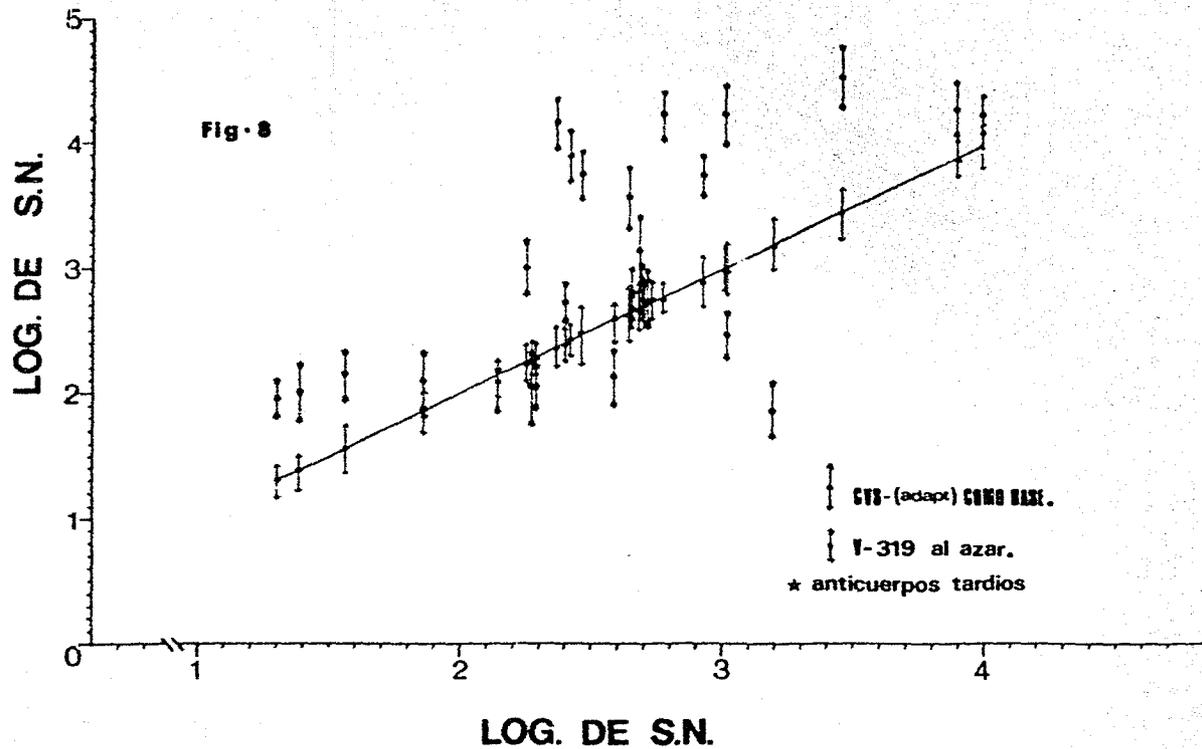


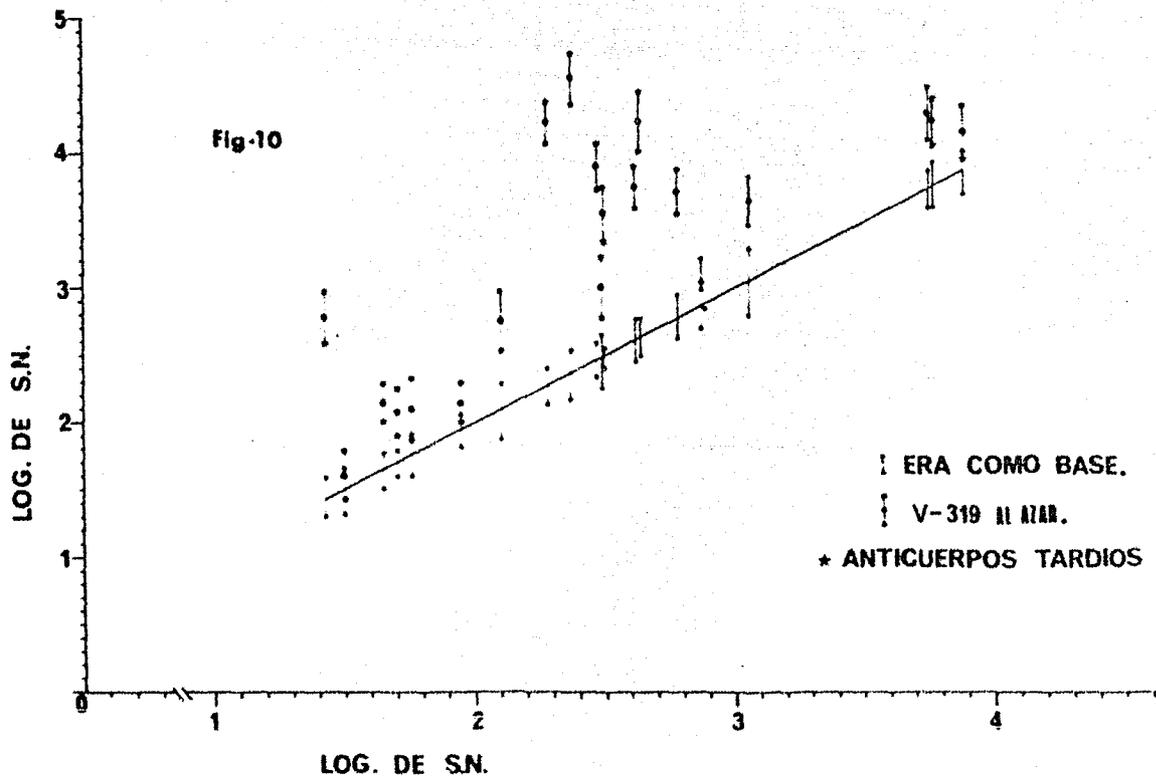


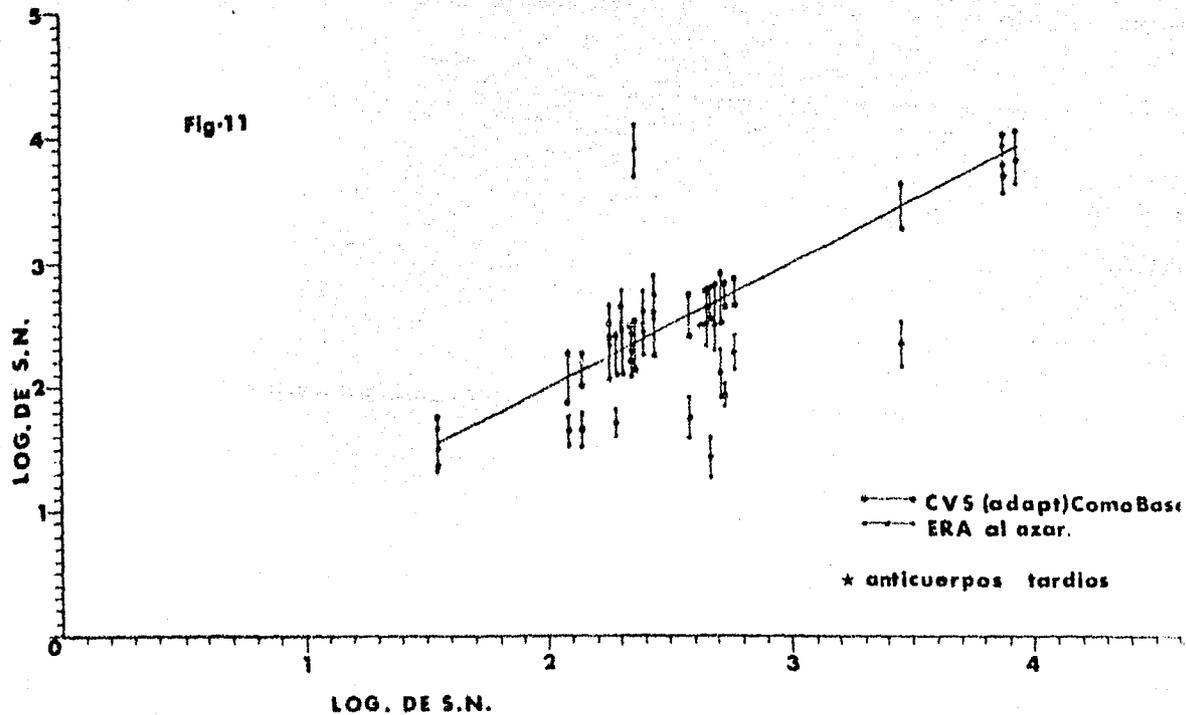












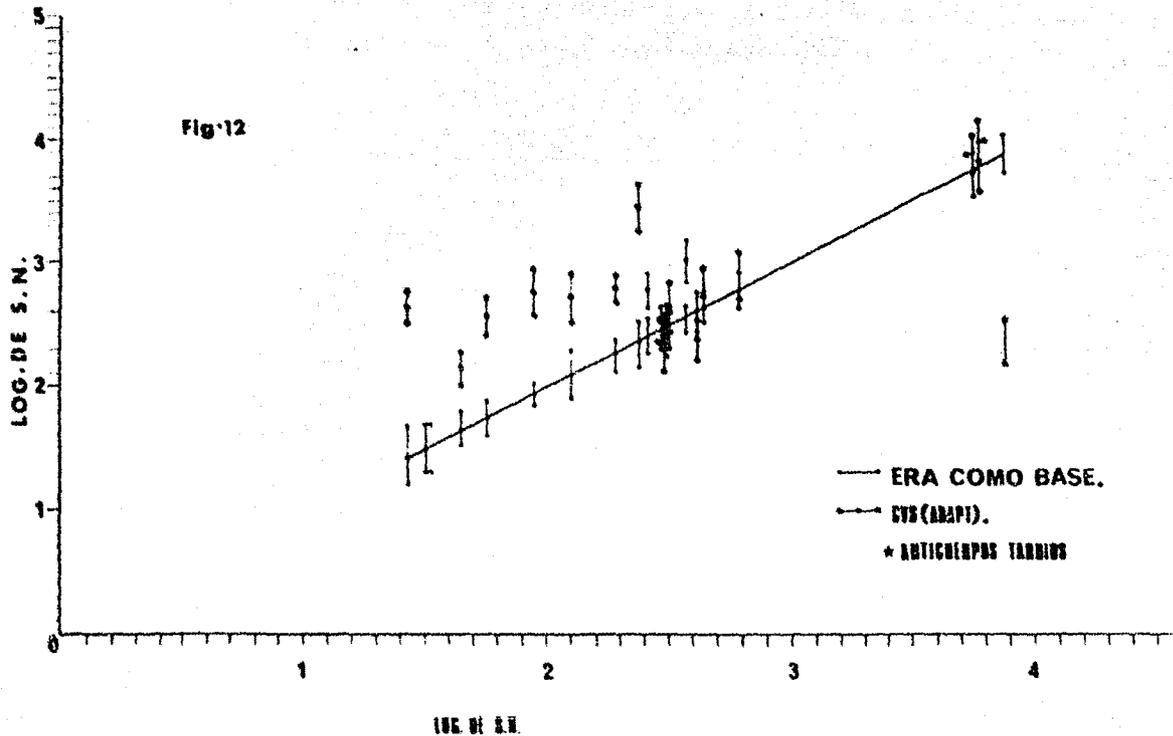


Fig. 13

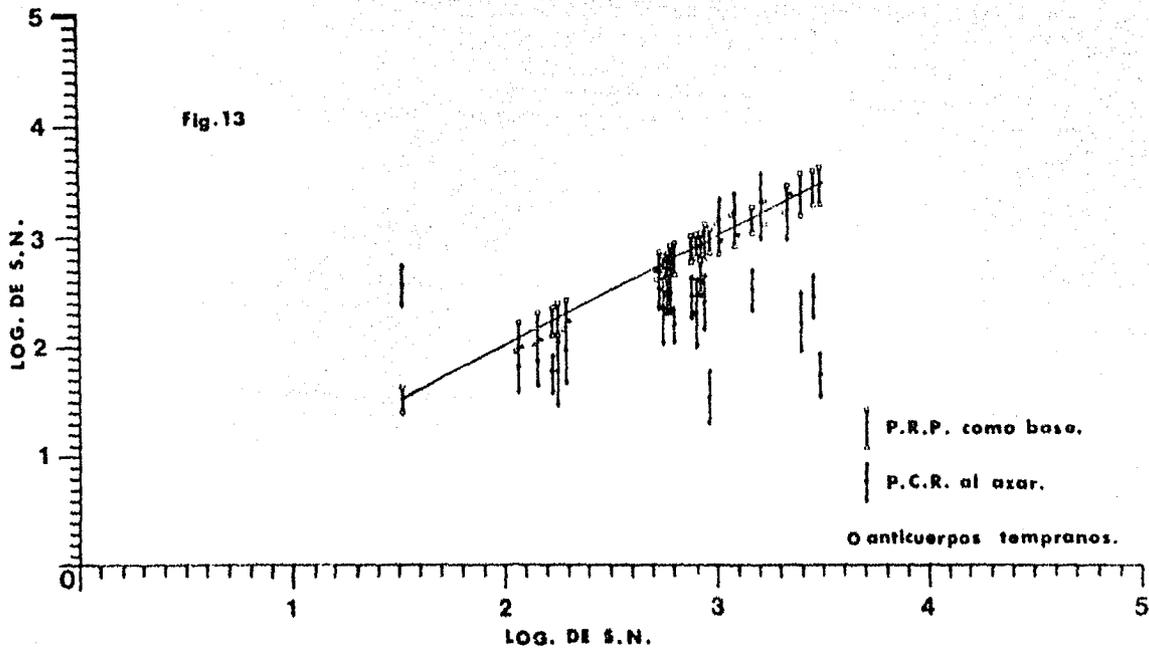


Fig. 14

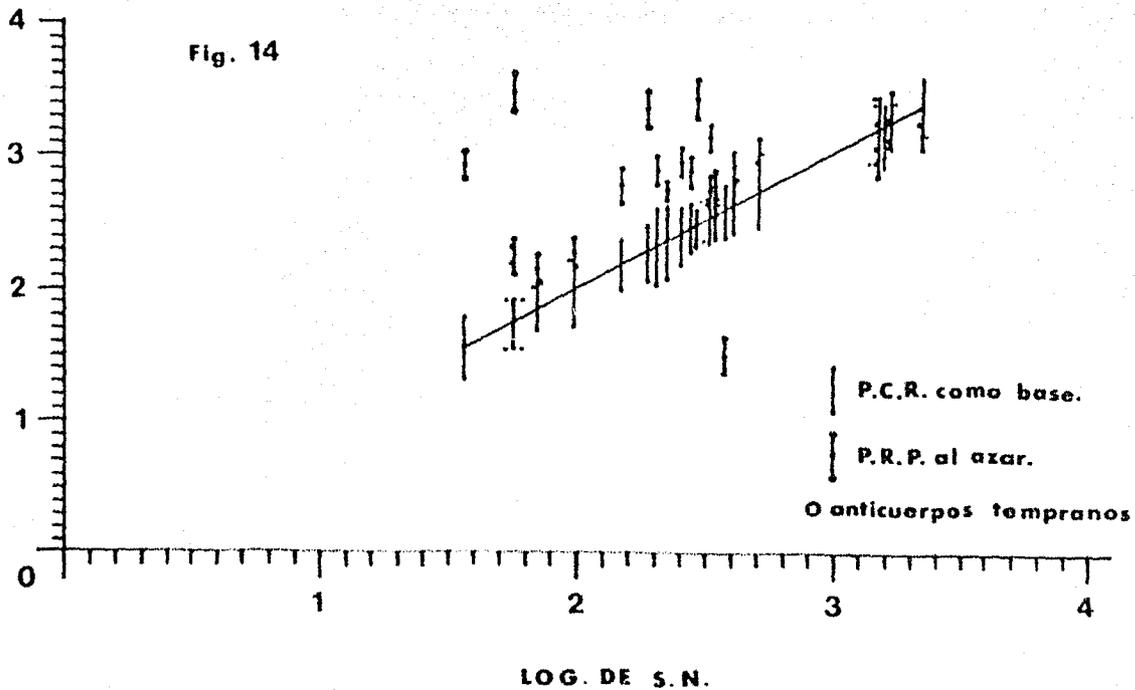


Fig. 15

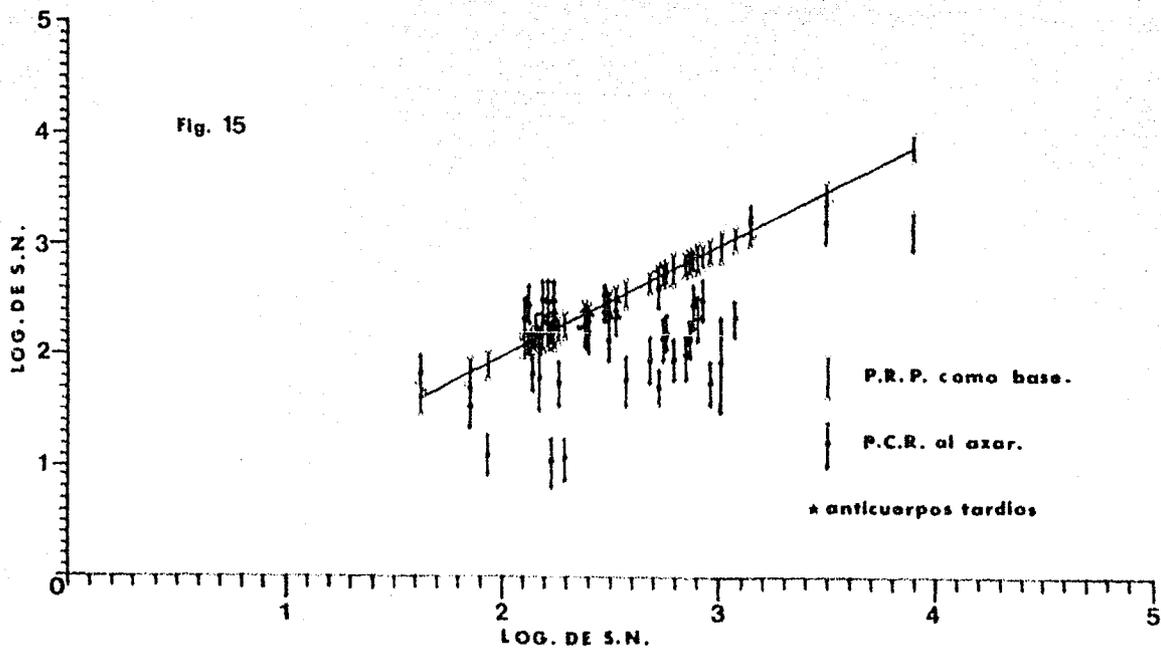
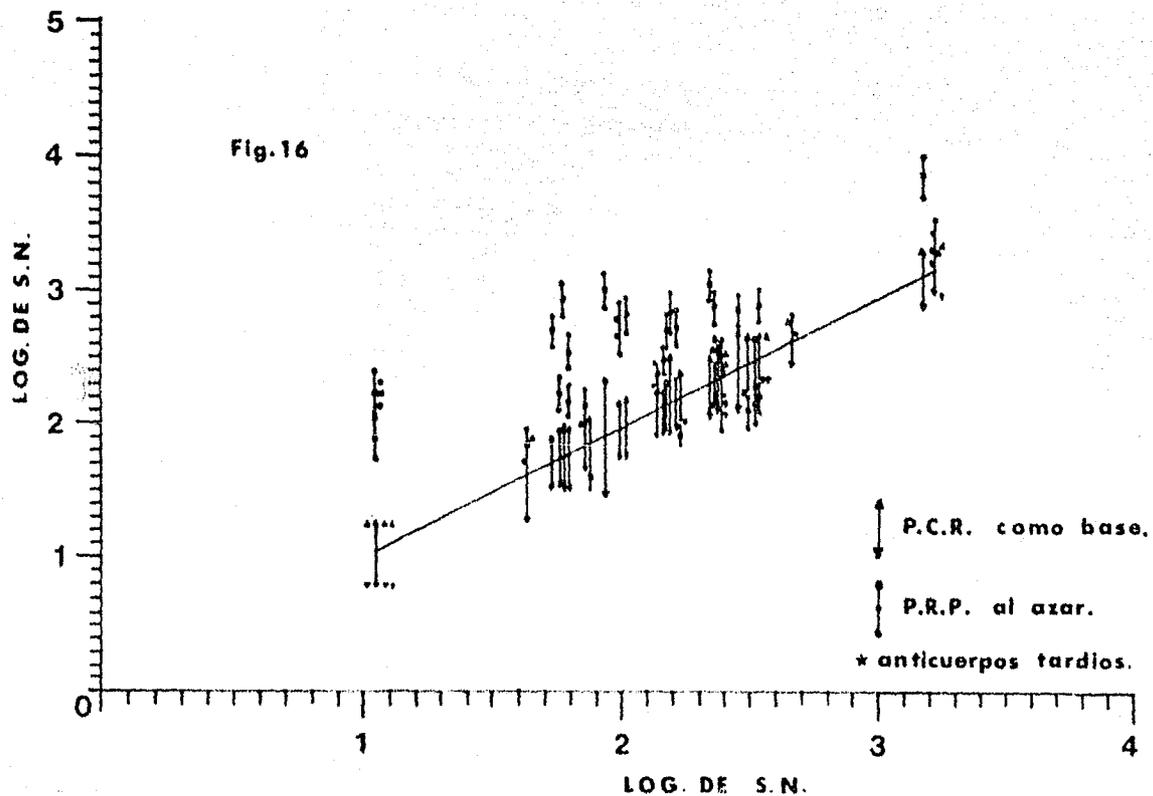


Fig. 16



CUADRO No. 9

<u>VIRUS BASE</u>	<u>VIRUS AL AZAR</u>	<u>NO. DE DATOS POSITIVO.</u>	<u>NO. DE DATOS SIN DIFERENCIA</u>	<u>NO. DE DATOS NEGATIVOS.</u>
* V-319	CVS(adaptado)	1/13	3/13	9/13
& CVS(adaptado)	V-319	9/13	3/13	1/13
& V-319	ERA	0/12	1/12	11/12
& ERA	V-319	11/12	1/12	0/12
& CVS(adaptado)	ERA	1/12	8/12	3/12
& ERA	CVS(adaptado)	3/12	8/12	1/12
" V-319	CVS(adaptado)	3/27	12/27	12/27
" CVS(adaptado)	V-319	12/27	12/27	3/27
" V-319	ERA	0/20	5/20	15/20
" ERA	V-319	15/20	5/20	0/20
" CVS(adaptado)	ERA	1/20	10/20	9/20
" ERA	CVS(adaptado)	9/20	10/20	2/20
& P. R. P. (V-319)	P. C. R. (CVS)	1/24	9/24	14/24
& P. C. R. (CVS)	P. R. P. (V-319)	14/24	9/24	1/24
" P. R. P. (V-319)	P. C. R. (CVS)	0/38	14/38	24/38
" P. C. R. (CVS)	P. R. P. (V-319)	24/38	14/38	0/38

& ANTICUERPOS TEMPRANOS" ANTICUERPOS TARDIOS

* NOTA: Los animales fueron inmunizados con el virus V-319, siendo este el virus homólogo, este es más sensible que un virus heterólogo como lo es el --- CVS adaptado a cultivos de tejidos.

El numerador es el total de muestras que caen en esta categoría y el denominador el número de muestras examinadas.

D I S C U S I O N

Se ha dicho que la prueba de seroneutralización en ratones y la prueba de reducción de placas, muestran una correlación completa (12). También se considera que la prueba de reducción de placas es cien veces más sensible que la prueba en ratones para detectar anticuerpos tempranos y diez veces más sensible que la prueba en ratones para detección de anticuerpos tardíos. Las Figuras 13 y 14 corresponden a la comparación de las dos pruebas, utilizando sueros de menos de cuatro semanas después de la vacunación y consideradas como anticuerpos -- tempranos. Podrá notarse en estas dos gráficas que si bien existe una tendencia a la distribución lineal de los datos no ajustados a una línea de predicción, (los datos pareados, marcados "al azar" en las gráficas) la correlación dista mucho de ser "completa". Cabe hacer notar que cuando se usan los datos de la prueba de reducción de placas como base (valor lineal ajustado), la distribución de los datos de la prueba en ratones es sumamente desordenada (Figura 13) lo que no sucede en el mismo grado cuando se invierte la forma de distribución de los datos (Figura 14) esta observación aunada a los márgenes más amplios de los límites de confianza para la prueba en ratones, nos indican que la prueba de seroneutralización fué menor confiable en esta serie de pruebas que la prueba de reducción de placas.

La prueba de reducción de placas resultó ser diez veces más sensible que la prueba en ratones en esta prueba efectuada con anticuerpos tempranos.

La baja confiabilidad de la prueba en ratones observada en la prueba efectuada con anticuerpos tempranos es también evidente en la prueba efectuada con anticuerpos tardíos (Figuras 15 y 16). Si bien en este caso ningún título de seroneutralización en ratones arrojó un dato superior a la prueba de reducción de placas, como ocurrió con anticuerpos tempranos, el porcentaje de datos que no son significativamente diferente (37%) y aquellos en los que aún habiendo diferencias significativas, estas son muy pequeñas (es decir existen diferencias significativas pero no altamente significativas), es mayor. La prueba de reducción de placas también en este caso es más sensible que la prueba en ratones. La prueba de reducción de placas es cinco veces más sensible que la prueba en ratones usando sueros de más de cuatro semanas después de la vacunación.

En los experimentos aquí reportados, la prueba de reducción de placas resultó más sensible que la prueba en ratones. Además la prueba de reducción de placas es más sensible en el caso de anticuerpos tempranos que en el caso de anticuerpos tardíos, lo cual coincide con lo reportado por el comité de expertos en rabia de la Organización Mundial de la Salud (12). Sin embargo, la diferencia en sensibilidad observada por nosotros es menor a la reportada. Esta discrepancia en los resultados podría deberse a las cepas de virus utilizadas en cada serie de experimentos. Las posibles diferencias antigénicas entre cepas también fueron examinadas por nosotros y los resultados se discuten a continuación:

Si bien la serie de pruebas efectuadas en este trabajo no son suficientes para llegar a conclusiones definitivas sobre diferencias antigénicas entre cepas de virus rábico adaptadas a cultivos celulares, si es posible hacer algunas comparaciones, limitadas por el número de muestras y tipo de sueros empleados.

El cuadro No. 9 resume los hallazgos de toda la serie de pruebas, indicando el número de sueros que caen en cada categoría. Los datos anotados como positivos son aquellos en que el título reducción de placas fué superior a la muestra correspondiente usada como base ajustada a una línea recta. El dato anotado como negativo es aquel que arroja un título inferior al ajustado y los datos anotados como sin diferencia son aquellos valores cuyos límites de confianza se tocan o se superponen en la gráfica. Por ejemplo en la figura No. 1, el primer par de datos, de izquierda a derecha, es un dato positivo. Los siguientes tres pares de datos se consideran sin diferencia porque se tocan o se superponen los títulos de reducción de placas y el resto de los datos están anotados como negativos en el cuadro No. 9. El cuadro 9 entonces es el vaciado de los datos de las Figuras 1 a 16 correspondiendo cada línea a una figura diferente.

La comparación del virus V-319 (homólogo) con el CVS con anticuerpos tempranos (Fig. 1 y 2) arroja un dato de mayor sensibilidad de la prueba de reducción de placas con el virus homólogo que con el heterólogo. Se puede observar una cosa semejante cuando comparamos el virus V-319 con la cepa ERA (Fig. 3 y 4) también con ---

anticuerpos tempranos. Es decir en los dos casos en que se compara el virus homólogo con un virus heterólogo, el primero es más completamente enutralizado por su antisuero. Cuando se compara los virus heterólogos entre sí, también con anticuerpos tempranos (Fig. 5 y 6) - notamos que la mayor parte de los datos (8 de 12) cae dentro de la categoría "sin diferencia", lo que nos indica que los sueros empleados son igualmente ineficientes para neutralizar a ambos.

En el caso de la comparación de V-319 contra CVS con anticuerpos tardíos (Fig. 7 y 8), los resultados son menos claros. Continúa existiendo la tendencia a observar títulos más altos con el virus homólogo, pero el número de datos sin diferencias significativas es muy alto (12 a 27). Cuando se compara V-319 con ERA con anticuerpos tardíos (Fig. 9 y 10) nuevamente obtenemos títulos más altos con el virus homólogo.

Por último cuando se comparan los virus heterólogos entre sí, obtenemos nuevamente un alto número de datos sin diferencias significativas (10 de 20). Además, las diferencias observadas entre los títulos de seroneutralización obtenidos con los sueros que si tuvieron diferencias estadísticamente significativas son muy pequeñas, con una a dos excepciones.

La prueba de reducción de placas es más sensible que la prueba de seroneutralización en ratones tanto para conducir pruebas de vacunas como para estudiar posibles diferencias antigénicas entre virus. --

Las pruebas comparativas de seroneutralización cruzada que se han hecho en el pasado utilizando ratones, no han revelado diferencias entre cepas de virus de rabia de diferentes orígenes. Según los resultados de este trabajo, cabe suponer que estas diferencias puedan detectarse debido a la mayor sensibilidad y confiabilidad que proporciona la prueba de reducción de placas.

Cabe suponer que las diferencias de sensibilidad observadas entre la prueba de reducción de placas y la seroneutralización en ratones pueda ser debida en parte a que la prueba en ratones se efectúa con un virus heterólogo (CVS) en tanto que la prueba de reducción de placas efectuada en este estudio se efectuó con el virus homólogo (V-319). Es quizá pertinente recomendar que cuando se efectúen pruebas de vacunas, se emplee la cepa homóloga para la prueba de reducción de placas, siempre y cuando esto sea posible.

C O N C L U S I O N E S

1. - La prueba de reducción de placas es diez veces más sensible que la prueba de seroneutralización en ratones en la detección de anticuerpos tempranos y cinco veces más sensible en la detección de anticuerpos tardíos.
2. - La prueba de reducción de placas es lo suficientemente sensible y confiable como para permitir detectar diferencias en los títulos de seroneutralización contra virus homólogos y heterólogos.
3. - Es posible que la diferencia en sensibilidad observada entre la prueba In Vivo y la prueba In Vitro sea debida más a diferencias entre cepas que a diferencias intrínsecas de la sensibilidad de las dos pruebas.
4. - Es recomendable usar cepas de virus homólogos en la evaluación de anticuerpos circulantes de animales vacunados.

B I B L I O G R A F I A

- 1 ABELSETH, M.K. Attenuated Rabies Vaccine for domestic - animals produced in tissue culture. Vet. - J., 5:279, 1964.
- 2 BEQUIGNON, R.: "Culture du virus rabique in Vitro" C.R. Acad. Sci. (Paris). 239:1162 1954.
- 3 CAMARGO, F. The Derriengus problem in México. Proc. 59 the Ann. meeting U.S. Liv. - Sani-Ass., P. 313-318, 1955.
- 4 CARNEIRO, V. BLACK, J. & KOPROWSKI, H. Rabies in cattle. Immuni- zation of cattle in Brasil against exposu re to street virus of vampire bat origin. Amer-Vet. Med. Ass; 127:366-369, 1955
- 5 FENJE, P. Propagation of rabies virus in cultures - of hamster kidney cells. Can. H. Micro blol. 6: 479, 1960
- 6 FERNANDEZ, M. V. ; and POMERAT, C. M. ; "Cytopathogenic effects of - rabies virus on nervous tissue". A. Zelleforsch, 53:431,

- 7 GOLDWASSER, RA. A. and R. E. KISSLING: "Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens"
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98:219,223,
1958.
- 8 HORSFALL, F. L. and TAMMIVA, I.: Rabies virus.
Viral and Rickettsial infections of man -
814-837, 1965
- 9 HOYT, A. and JUNGBLUT, C. W.: Experimental rabies in white mice -
and attempted chemotherapy.
J. Infect. Dis., 47:418, 1930.
- 10 KANAZAWA, K.: "Sur la culture in Vitro du virus de la -
rage".
Jap. J. Exp. Med., 14:519, 1936
Jap. J. Exp. Med., 135:259, 1937
- 11 KAPLAN, M., M., : "Demonstration of rabies virus in tissue
culture".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98:223 --
1960.
- 12 KAPLAN, M., & KOPROWSKI, H. Laboratory techniques in rabies, 3ed ed.
Geneve World Health Organization. ---
No. 523:10 1973.

- 13 KISSLING, R. E. : Growth of rabies virus in non nervous -
tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98:223, -
1958.
- 14 KOPROWSKI, H. Experimental studies on rabies virus.
Canad. J. Publ. HLth: 17:10 80, 1957
- 15 KLIGER, I. J. and BERNKOPFF, H. "Studies on the cultivation and antigenic characters of rabies virus.
- 16 LEVADITI, C. : "Virus rabique et culture des cellules in Vitro". C.R. Soc. Biol. (Paris), ----
75:505, 1913.
- 17 LEVADITI, C, and SCHÖEN R: Virus rabique et cellules neoplasiques -
C.R. Acad. Sci., (Paris), 202:702, 704
1936
- 18 MAC. PHERSON and STOKER M. : Polyoma transformation of hamster cells and investigation of genetic factors affecting cell competence.
Virology, 16:147-151, 1962

- 19 MARTOS, L. and ATANASIU, P.: Presence d'inclusions spécifique dans les cellules de rein de hamster en culture des tissus infectés par le virus de la rage fixe.
Ann. Inst. Pasteur (Paris), 101: 448, -
1961.
- 20 NEGRI, A.: Beitrag zum studium des aetiologie der tollwuth. Z. Hyg. Infektionskr, 43:507-
1903.
- 21 PARKER, R. C. and HOLLENDER, A. J.: Propagation of rabies virus in tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 60: 94, --
1945.
- 22 PASTEUR, L.: Lettre sur la rage.
Ann Inst Pasteur (Paris), 1:1 , 1887.
- 23 PIZZI, IVA.: Sampling variation of the fifty per cent and-point, determined by the Reed -- Muench (Behrens) method. Human -- biology: Vol. 22 No. 3: 152-189, --
1950.

- 24 RAMIREZ, V. M. Rabia paralítica bovina.
Ciencias veterinarias 2 (5) : 543-554 -
1957
- 25 RAMOS M. Primer seminario internacional sobre-
rabia para las Americas.
Buenos Aires Argentina Cap. VIII -
1967
- 26 REDD, L. J. and MUENCH, H.: A simple method of estimating fifty --
percent end-points. Am. Jour. Hyg. -
27:493-497, 1938
- 27 SEDWICK, W. D.; WIKTOR, T. S. A. Reproducible plaquing sy stem --
for rabies and Lymphocitic-Choriome-
ningitis viruses (LCM) and other RNA
viruses In BHK-21, 13S agarose sus-
pensions. Atanasiu en el capítulo V -
del primer seminario internacional so-
bre rabia para las Américas.
- 28 ZINKE, G. G.; Neue ansichten der hundswulth, In ner-
ursachen und forlgen, nebst einer si-
cheran behandlungsart der von tollen -
tieren gobissen menschen für arzte--
und nichtarzte bestimmt. C. E. Gabler
Publisher, Hohna, 16:212. 1804.

- 29 HUTYRA F. & MAREK J. and MANNINGER R. - Patología y
Terapéuticas especiales de los animales
domésticos.
Tomo primero. Editorial Labor, -
S. A. Pag : 401 - 402. 1950

**ESTA TESIS FUE IMPRESA EN
VEGA IMPRESORES S. de R. L.
OFICINAS EN AV. UNIVERSIDAD No.
1855 TEL. 548-73-48 TALLERES
EN SUR 107 No. 1609 COL.
AERONAUTICA MILITAR TEL. 552-66-97
SERVICIO A DOMICILIO**