

42
2oj.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES
CUAUTITLAN**

VNAM

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE ESPECIES
NO SUSCEPTIBLES A LA RABIA CONTRA LAS
FRACCIONES PROTEICAS DEL VIRUS**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

JORGE RODRIGUEZ MOGUEL

DIRECTORES DE TESIS

**M. C. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON
DR. ALVARO AGUILAR SETIEN**



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.

CONTENIDO

Indice de cuadros

Indice de figuras

Resumen

1.-	Introducción.....	1
1.1.-	Generalidades.....	1
1.2.-	Rabia.....	3
1.2.1.-	Características de la enfermedad...	3
1.2.2.-	Características y propiedades del virus.....	5
1.3.-	Anticuerpos monoclonales y técnicas para la investigación del virus de la rabia.....	7
2.-	Objetivos e hipótesis.....	11
3.-	Material y métodos.....	13
3.1.-	Sueros inmunes.....	13
3.2.-	Virus.....	13
3.3.-	Purificación del virus de la rabia.....	14
3.4.-	Determinación de proteínas virales.....	14
3.5.-	Detección de anticuerpos por DOT ELISA.....	15
3.6.-	Inmunolectrotransferencia.....	16
3.6.1.-	Electroforesis.....	16
3.6.2.-	Inmunotransferencia a papel nitrocelulosa.....	17
3.6.3.-	Detección de las fracciones proteicas por ELISA.....	18
4.-	Resultados.....	19
4.1.-	Determinación de proteínas virales.....	19
4.2.-	Determinación de anticuerpos por DOT ELISA.....	19
4.3.-	Obtención de las fracciones virales por electroforesis.....	20
4.4.-	Transferencia a papel nitrocelulosa.....	21
4.5.-	Detección de las fracciones proteicas del virus.....	21
5.-	Discusión.....	39
6.-	Conclusiones.....	44
7.-	Bibliografía.....	45
8.-	Glosario.....	48

INDICE DE CUADROS

1.- Curva patrón de proteínas.....	23
2.- Prueba DOT ELISA realizada con los sueros inmunes de cuyos.....	25
3.- Prueba DOT ELISA realizada con los sueros inmune de cuyos, pollos y patos.....	27
4.- Resumen de los resultados de las pruebas DOT ELISA.....	29
5.- Movilidad relativa (Rf) del estandar de pesos moleculares.....	30
6.- Pesos moleculares de las bandas de la suspensión viral.....	34

INDICE DE FIGURAS.

1.- Curva patrón de proteínas.....	24
2.- Prueba DOT ELISA aplica a los sueros inmunes de cuyos.	26
3.- Prueba DOT ELISA realizada con los sueros inmunes de cuyo, pollo y pato.....	28
4.- Curva patrón de pesos moleculares.....	31
5.- Electroforesis efectuada por parte del patrón de pesos moleculares.....	32
6.- Electroforesis efectuada por el patrón de pesos moleculares, concentrado viral tratado con acetato de zinc y sulfato de amonio y concentrado viral tratado con acetato de zinc.....	33
7.- transferencia a papel nitrocelulosa del concentrado viral previamente purificado, revelado con negro de de amido.....	35
8.- Deteccion por ELISA de las proteínas virales que reaccionaron con los sueros inmunes de cuyos.....	36
9.- Prueba ELISA efectuada con los sueros inmunes de pollos.....	37
10.-Prueba indirecta realizada con los sueros inmunes de pollos	38

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la respuesta inmune humoral de especies no susceptibles a la rabia como son las aves de las especies *Gallus galli* (gallina doméstica) y *Anas spp* (patos), determinando la presencia de anticuerpos contra el virus de la rabia así como el de identificar hacia que fracciones antigénicas del virus reaccionan los anticuerpos de los sueros de estos, y comparar los resultados con la respuesta de los suyos.

Se inmunizaron pollos, patos y suyos con las cepas ERA, CVS y Pitman Moore del virus de la rabia y con los sueros obtenidos de las especies. Se determinó la presencia de anticuerpos mediante la prueba DOT ELISA, la cepa Roxane purificada por precipitación con acetato de zinc se utilizó como antígeno. Todos los sueros de pollos como de suyos dieron resultados positivos, mientras que los sueros de todos los patos dieron resultados negativos.

Posteriormente se realizó una inmunotrasferencia para identificar hacia que fracciones antigénicas del virus estaban reaccionando los anticuerpos de los sueros que resultaron positivos en la prueba DOT ELISA. De esta manera se determinó que los sueros de suyos independientemente de la cepa utilizada en la inmunización reaccionan con 3 de las 5 fracciones proteicas del virus que son la N, G, y M, por otro lado el resultado que dieron los sueros de

pollos fué una reacción altamente inespecifica incluyendo a un control negativo, por lo que se optó por realizar una prueba indirecta. Con esta, la inespecificidad se eliminó, y se pudo observar una respuesta de los sueros de los pollos hacia una fracción antigénica del virus, correspondiente a la glicoproteína de 67 Kda, esta fracción fue reconocida por los sueros de los pollos inmunizados con la cepa CVS y no con los inmunizados con la cepa Pitman Moore del virus de la rabia.

1

INTRODUCCION**1.1. GENERALIDADES**

La rabia representa aún un gran enigma científico y un problema de salud pública relevante. Entendemos muy poco acerca de su verdadera patogénesis, por ejemplo: ¿dónde se oculta el virus durante el largo periodo de su incubación? y ¿qué mecanismo patofisiológico induce la enfermedad y la muerte?.

La rabia es una infección viral común al hombre y a un gran número de especies animales, en la cual el virus y las lesiones que provoca se desarrolla sobre todo al nivel del sistema nervioso central. Según la Organización Mundial de la Salud, la rabia es, entre las enfermedades infecciosas una de las más preocupantes para la salud del hombre, en razón de su evolución casi siempre fatal una vez de aparecidos los síntomas. Por ello, en la vacunación de los animales ya sean estos, domésticos o salvajes, el objetivo buscado es siempre con prioridad: proteger al hombre de la rabia y evitar la creación de un ciclo secundario entre los animales domésticos (Roman S.B. 1987).

La importancia de la rabia para la salud pública no radica en el número de casos, el cual es relativamente reducido, sino en la

letalidad que alcanza casi al 100% de los enfermos.

En América Latina, durante el período de 1970 - 1983 se registraron en las grandes áreas urbanas 3,662 casos humanos de rabia y 224,684 casos de rabia en perros (Fernández y Arambulo III, 1985).

Los registros de muerte por rabia en humanos son particularmente imprecisos, ya que una vez que se presentan los síntomas de la enfermedad, el paciente, generalmente no acude al servicio médico, donde ya nada o poco puede hacerse por él, sino ofrecerle una muerte hostil en completo aislamiento (Baer G.M., 1988).

Con respecto a la rabia en animales silvestre, incluidos quirópteros, en América Latina, el 89% de los casos se diagnosticó en Canadá y los Estados Unidos (Datos de 1970-1979) de acuerdo con Acha y Szyfres (1988), es probable que esta gran diferencia entre América del norte y el resto del continente no refleje la realidad, debido a la poca atención que se ha prestado a la rabia selvática ya que su vigilancia es deficiente fuera de los Estados Unidos y Canadá.

La rabia en murciélagos es un problema independiente de los ciclos infecciosos de otros mamíferos y solo resulta de interés en América. La especie *D. rotundus* es responsable de apreciables pérdidas en la ganadería latinoamericana, en especial por la rabia bovina en el trópico (Acha y Szyfres 1988).

En México, catorce estados de la República son afectados por

este problema en las regiones tropicales y subtropical. Hasta el año 1975, las pérdidas económicas ocasionadas eran cuantiosas.

Las campañas de vacunación efectuadas en los últimos años, han permitido aminorar este problema pero aún existe grandes riesgos para la población bovina (Román S.B. 1987).

La importancia de la rabia en otras especies ganaderas tales como ovinos, caprinos y porcinos es reducida, y en aves la rabia se adquiere de manera natural sólo en casos muy excepcionales (Acha y Syfres, 1988).

1.2. RABIA

1.2.1. Características de la enfermedad

La rabia es una enfermedad mortal una vez que el animal o el humano presentan las manifestaciones clínicas. Solo se sabe de tres casos de personas sobrevivientes, de los reportados hasta la fecha, lo cual sugiere que una inmunización a tiempo es la única protección que puede ofrecerse a los seres que han sido expuestos al virus de este padecimiento (Debbie J.G., 1988). El ser humano puede ser vacunado después de haber estado expuesto a un animal rabioso o sospechoso de estarlo. Esta vacunación es única dentro del campo de las enfermedades infecciosas y se basa en el prolongado período de incubación del virus de la rabia que es de

varias semanas, lo cual proporciona normalmente el tiempo suficiente para la formación de anticuerpos específicos (Vodopija I., 1988).

El periodo de incubación del virus rábico en los perros es, en promedio de 3 a 8 semanas, pero en el hombre y en otros animales susceptibles hay una gran variabilidad (Shope R.E., 1984).

La vacunación antirrábica preventiva se aplica únicamente a las personas que se encuentra en alto riesgo, cuando sus actividades están directamente relacionadas con la manipulación del virus (Shope R.E., 1984).

La administración de vacunas profilácticas se lleva a cabo principalmente en los animales, como perros, gatos y bovinos.

Algunas características clínicas sugieren la existencia de diferentes cepas del virus rábico, en las distintas regiones geográficas y en los mamíferos huéspedes. Entre estos fenómenos se encuentran diferentes tiempos de evolución de la enfermedad y de dos formas clínicas diferentes: la rabia furiosa (agitada) y la paralítica (muda) que se presentan en seres humanos y en animales (Debbie J.G 1988).

La ruta más común de transmisión del virus rábico es a través de la piel, por una mordedura producido por un animal infectado. También puede penetrar al cuerpo a través de las membranas mucosas sanas en contacto con un aerosol, o a los ojos mediante el trasplante de una córnea infectada (Shope R.E., 1984).

La evolución de la rabia puede dividirse en tres fases: la prodrómica, la excitativa y la paralítica. El término de la rabia

"furiosa" se refiere a los animales en los cuales la fase excitativa es predominante. En la rabia "muda" o paralítica, la fase excitativa es muy corta o ausente y la enfermedad progresa rápidamente hacia la fase paralítica (Correa Girón P. 1981).

1.2.2 Características y propiedades del virus.

El virus rábico, pertenece a la familia *Rhabdoviridae* definido en el género *Lyssavirus* (Annalisa S. Mauro R. 1990). Al microscópio electrónico, el virus de la rabia tiene forma de bala, de 180 nm de longitud y 80 nm de anchura, esta morfología es característica de la mayoría de los virus de la familia *Rhabdoviridae*.

El virus de la rabia esta constituido por un constante complejo antigénico de diferentes estructuras protéicas. La envoltura integrada por la glicoproteína (proteína G.), proteína M-1 y M-2 y fosfolípidos, de estas la proteína G con un peso molecular de 67 Kda, sobresale de la superficie externa de la envoltura viral formando las proyecciones o espículas del virión, esta es la responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes y de la respuesta inmune celular la cual confiere inmunidad en un desafío contra el virus y es requerida para la presentación de antígenos al sistema inmune. Las proteínas de envoltura, M-1, M-2, tienen peso molecular de 40 000 y 25 000 daltons respectivamente (Annalisa S. Mauro R. 1990).

El núcleo helicoidal de la nucleocápside comprende las moléculas de la ribonucleoproteína (RNP) constituido por el genoma de ácido ribonucleico (ARN) de una sola cadena de sentido negativo, la nucleoproteína (N) con un PM de 55.5 Kdalton, la fosfoproteína con un PM de 37.5 kdalton y la transcriptasa del virión (L) con PM de 185 kdalton de las cuales la proteína N, es inductora de anticuerpos fijadores de complemento y precipitantes (Annalisa S. Mauro R 1990).

Las tres proteínas L, NS y N son importantes para los procesos de replicación y transcripción del virus, L y NS actúan como polimerasas mientras que N debe de estar asociada al ARN para que este funcione como molde.

La replicación del virus de la rabia es similar al de otros virus con ARN de una sola cadena de sentido negativo. El RNA del virion es transcrito a RNA mensajeros (RNAm) monocistrónicos por la transcriptasa del virus, estos RNAm son traducidos, formando las proteínas virales (B. Monique 1987).

In vivo la replicación del virus rábico está casi completamente restringida al tejido nervioso del huésped, y su neurotropismo es la principal característica de esta enfermedad. Sin embargo, *in vitro* presenta una amplia variedad de células huésped, que comprende casi todas las células de mamíferos y aves, tanto las provenientes de cultivos de tejidos primarios como las líneas celulares derivadas de estos (Wiktor T.J 1985).

El suceso inicial dentro del ciclo de multiplicación viral ocurre en el reconocimiento del virión por los receptores

celulares, que se encuentran en la superficie de la membrana plasmática. La unión del virión se lleva a cabo por una atracción electrostática entre las cargas de las proteínas superficiales del virión y las cargas complementarias del receptor celular específico (Wiktor T.J 1985)

Aún se desconoce si el virus rábico utiliza una misma trayectoria, mediada por receptores comunes, para la penetración viral *in vivo* e *in vitro*, o si es reconocido por diferentes receptores en la células huésped. (Wunner W.H., 1984).

1.3. ANTICUERPOS MONOCLONALES Y TECNICAS PARA LA INVESTIGACION DEL VIRUS DE LA RABIA

Con el descubrimiento de los corpúsculos de negri en 1903 se empezó a diagnosticar la rabia post-mortem, para esto se tiñen con el azul de metileno y eosina los corpúsculos localizados dentro del citoplasma neuronal de un animal muerto . Hoy en día varias de estas técnicas de tinción son acompañadas con la introducción de la inmunofluorescencia, a la vez varios métodos de coloración son reemplazados por el examen directo al microscopio de tejidos infectados por el virus de la rabia. Recientemente y con el descubrimiento de los anticuerpos se utiliza un método alternativo para el diagnostico de la rabia (Anjaria J.M., 1985).

La producción de anticuerpos monoclonales contra el virus de la rabia ha permitido determinar la variabilidad antigénica de este virus. utilizando estos reactivos es posible la detección de

diferencias antigénicas entre cepas procedentes de diferentes especies (Shope., 1984).

La utilización de anticuerpos monoclonales para analizar diferentes cepas del virus de la rabia (vacunales y patógenas) ha revelado que puede existir una considerable variabilidad antigénica entre ellas, las diferencias antigénicas han sido demostradas para la glicoproteína como para la nucleocápside de cepas aisladas de diferentes especies animales como la localización geográfica de estas (Bernhard D., Charles E., 1988: Webster W.A. y Col 1985).

Por otro lado sabemos que hay una amplia gama de especies receptoras y se han descrito diferencias a la susceptibilidad de cada especie en las cepas de distintos orígenes. La variabilidad individual de la respuesta inmune hacia diferentes cepas es también un factor importante sobre todo en la vacunación contra esta enfermedad. (Blancou J., 1985).

Los sueros hiperinmunes contra el virus de la rabia obtenidos de diferentes especies que tradicionalmente se trabajan, son incapaces de diferenciar las cepas del virus por lo que ha sido necesario recurrir a los anticuerpos monoclonales para distinguir una cepa de otra o diferenciarlos de otro virus (Aguilar Setién., 1986: Flamand., et al. 1980, Lanfond. M. ET. al 1985).

Ha sido necesario complementar el estudio bioquímico de las proteínas de membranas en este caso del virus rábico con estudios de tipo inmunológico sobre la capacidad de las proteínas, de ser

de tipo inmunológico sobre la capacidad de las proteínas, de ser reconocidas como antígenos, fue hasta 1977, cuando aprovechando la afinidad de las proteínas a la nitrocelulosa se logró contar con un sistema de sostén protéico que permite analizar un estudio antigénico de las proteínas (Towbin,H.,1979).

La necesidad de un estudio profundo de las características antigénicas de las proteínas con la idea de producir un inmunógeno adecuado hacen de esta técnica (inmunotransferencia) el mecanismo idóneo para el estudio del mosaico protéico de las membranas.

Con el desarrollo de técnicas inmunológicas consecutivas de electroforesis, inmunotransferencia y ensayos inmuno-enzimáticos, es posible determinar si un suero inmune es capaz de diferenciar cepas.

La inmunotransferencia combina la resolución de un gel de electroforesis con la especificidad de la detección inmunoquímica. La inmunotransferencia puede ser usada para determinar un número de características importantes de antígenos protéicos, la presencia y cantidad de un antígeno, el peso molecular relativo de la cadena polipeptídica y eficaz en la extracción del antígeno. Esta es particularmente útil cuando se trata de antígenos insolubles, difíciles de determinar o fácilmente degradables, la inmunotransferencia puede ser combinada con la inmunoprecipitación para permitir una detección muy sensible de los antígenos. Esta técnica es particularmente poderosa para ensayar la presencia, cantidad y especificidad de anticuerpos de diferentes muestras de

sueros policlonales, finalmente puede ser usada para purificar anticuerpos específicos a partir de sueros policlonales (Harlon E., 1988).

A partir del primer reporte utilizando esta técnica se han hecho diversas modificaciones, como la aplicación de un campo eléctrico al sistema, para acelerar y hacer más eficaz la transferencia, el uso de diferentes bloqueadores de los sitios libres de nitrocelulosa, etc. Sin embargo todas mantienen en esencia la técnica original en la que la adsorción de proteínas se lleva a cabo por simple contacto entre el gel de poliacrilamida y el papel de nitrocelulosa bajo condiciones estables de pH y temperatura, dando este procedimiento buenos resultados en la identificación de proteínas inmunológicamente importantes (Rowen W.E 1981).

2

OBJETIVOS E HIPOTESIS

2.1.- OBJETIVO GENERAL.

Determinar la producción de anticuerpos contra las diferentes fracciones del virus de la rabia por dos especies no susceptibles de Aves *Gallus galli* (pollo) y *Anas spp* (pato) inmunizados con las cepas CVS, ERA y Pitman Moore y comparar estos resultados con los que se obtengan con sueros de cobayos inmunizados en forma similar.

2.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Purificar la cepa Roxane del virus de la rabia cultivada en células BHK-21.

2.- Obtener por electroforesis las fracciones protéicas de la cepa Roxane del virus de la rabia previamente purificado.

3.- Determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la rabia en los sueros de los patos, pollos y cobayos inmunizados, por medio de la prueba DOT ELISA.

4.- Identificar las fracciones protéicas del virus de la rabia detectados por los sueros de pollos, patos y cobayos, utilizando la técnica de inmunoelectrotransferencia.

5.- Comparar las fracciones identificadas por los sueros de las especies inmunizadas con las diferentes cepas.

2.3 HIPOTESIS

Las especies de aves *Gallus galli* y *Anas spp* no susceptibles al virus de la rabia presentan una diferencia con los mamíferos (cobayos) en la respuesta inmune humoral hacia las cepas virales rábicas CVS, Pitman Moore y ERA así como a sus diferentes proteínas antigénicas. La respuesta de las aves es más específica contra las diferentes cepas, ya que estas reconocen menos determinantes antigénicos debido a que el virus no se replica en ellas; lo cual, puede demostrarse mediante la prueba de inmuno electro transferencia.

3

MATERIAL Y METODOS

3.1. SUEROS INMUNES

Se utilizaron sueros de pollos (*Gallus galli*), patos (*Anas spp.*) y cuyos adultos.

El programa de inmunización consistió en la aplicación de 3 estímulos a grupos de 5 individuos con dosis de 0.5 ml cada 9 días y, una semana después del último estímulo se procedió al sangrado. Los animales se inmunizaron por las vías subcutánea e intramuscular. Como antígenos se utilizaron virus vacunal cepa Pitman- Moore Inactivada, con adyuvante de gel de hidroxido de aluminio concentración: 1.05 UI/ml; y vacuna antirrábica producida en cerebro de ratón lactante, sin adyuvante, elaborado según el método de Fuenzalida y Palacios, concentración: 1.3 UI/ml.

Como referencia también se usó el suero de un cuyo inmunizado con la cepa ERA producido en un estudio previo (Espejel Madrigal, 1990).

Los cuyos se sangraron por punción intracardíaca y en el caso de las aves la sangre se colectó de la vena braquial (Morilla y Bautista, 1986).

3.2. VIRUS

Las Pruebas de DOT-ELISA e Inmunotransferencia se realizaron empleando como antígeno la cepa Roxane cultivada en la línea

celular BHK-21 en el Laboratorio de Investigación de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE).

3.3. PURIFICACION DEL VIRUS DE LA RABIA.

La purificación de la cepa del virus rábico se hizo a partir de la cosecha del virus cultivado en monoestratos celulares BHK 21 infectado con la cepa Roxana siguiendo la metodología descrita por Wunner (1985).

La cosecha del cultivo celular infectado se mezcló con 0.2 % de Acetato de Zinc 1 M. a pH 5.0 dejándose 1 hr. a 4°C, después se centrifugó a 1000 x g durante 40 min. El sedimento formado se resuspendió en solución de EDTA disódico al 11.7 % pH 7.8 ajustado con Tris- Base, la mezcla se clarificó y se centrifugó a 1000 g durante 40 min se recolectó el sobrenadante y posteriormente se dializó durante 1 día contra solución amortiguadora de fosfatos, se concentró la muestra cubriendo la membrana de diálisis con azúcar glass, por último se alicuotó en viales con 250 µl de muestra y se congeló a -70 °C hasta el momento de ser utilizado.

3.4 DETERMINACION DE PROTEINAS VIRALES.

Para determinar la concentración de proteínas en la muestra purificada ya concentrada se empleó el método de Lowry-Folin (1951), con una solución patrón de albúmina sérica bovina al 1%.

3.5 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR DOT-ELISA.

Para la detección de anticuerpos en los sueros inmunes de las especies en estudio se utilizó la prueba semicuantitativa DOT ELISA.

Se sensibilizaron discos de 0.4 mm de papel de Nitrocelulosa agregando 1 μ l de suspensión viral a cada disco colocado en una microplaca de 96 pozos.

Para la prueba inmunoenzimática (ELISA), los discos sensibilizados se bloquearon durante 1 hr con 75 μ l de solución PBS-leche descremada al 5%, (solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 que consta de 8 g de NaCl, 0.2 gr KCl, 1.15 gr PO_4HNa , 0.2 gr $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 1000 ml de agua desionizada), se realizaron 3 lavados con solución PBS-Tween 80, después se agregaron 50 μ l de suero diluido en una proporción 1:20 en solución PBS-leche descremada al 1% y se incubó durante 1 hr, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS-Tween, se agregaron 50 μ l del conjugado antiespecie peroxidasa (Sigma) correspondiente, los conjugados se diluyeron en solución PBS-leche descremada al 1% en proporción 1:200. Se incubó durante 1 hr, se realizaron nuevamente 3 lavados y por último se reveló con solución de Alfa-Cloro-Naftol (30 mg alfa cloro naftol, 10 ml de metanol, 50 ml de PBS y 50 μ l de agua oxigenada).

Los discos positivos se tñeron de color lila los cuales se compararon con testigos positivos y negativos. Los testigos negativos fueron sueros de animales no inmunizados y los positivos fueron sueros de cuyos que habían dado resultados positivos por la prueba de seroneutralización.

3.6.- IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

3.6.1. Electroforesis.

La obtención de las fracciones protéicas de la cepa del virus de la rabia purificado se realizó por electroforesis de acuerdo al sistema de geles discontinuos de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio, como lo describe Laemeli (1970).

Se empleó una cámara de dimensiones de 10 x 8 cm, la suspensión viral se colocó sobre el gel concentrador en una proporción de 2.5 µg por cada mm del gel.

El gel concentrador se preparó al 4% de poliacrilamida con solución amortiguadora de Tris pH 6.8 (6 g de Tris Base, 560 ml de agua bidestilada), y 0.3% SDS (dodecil sulfato de sodio al 10%).

El gel de separación se preparó al 10% de poliacrilamida en solución amortiguadora de Tris a pH 8.8 (12.11 g de Tris Base, 100 ml de agua bidestilada se ajustó el pH con HCl), y 0.3% de SDS.

El corrimiento se efectuó con una fuente de poder EC-135 (Apparatus Corporation) utilizando una solución Tris-Glicina como amortiguador de corrida pH 8.4 (14.4 gr de glicina, 3 gr de Tris base, 10 ml de SDS al 10 % y 1000 ml de agua bidestilada), primero a 50 volts hasta que el colorante que sirve de referencia llegó al gel separador y luego a 100 volts hasta que el colorante llegó al final del gel de separación.

La preparación de las muestras se realizó mezclando la solución digestora (0.125 M Tris, 2% SDS, 10% Glicerol, 2.5% 2- mercapto

etanol y 1% de azul de bromofenol) en proporción 1:1 con la suspensión viral o con la solución del patrón de pesos moleculares (Sigma). Después de la electroforesis una porción del gel se tiñó con azul de coomassie (0.6 gr de azul de Coomassie, 250 ml de metanol, 50 ml de ácido acético glacial y 200 ml de agua bidestilada) durante 45 min.

3.6.2.- Electrotransferencia en papel de nitrocelulosa

La inmunotransferencia en papel nitrocelulosa se realizó mediante el sistema de transferencia descrita por Bowen y Col (1980).

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

En una cámara para transferir (Genie Electrotroforetic Blotter Schae) se colocaron los componentes del sistema de transferencia en el siguiente orden:

Electrodo (+)	
fibra Scotch	-----
Papel filtro	-----
Nitrocelulosa 0.22 mc	-----
Gel poliacrilamida	-----
Papel filtro	-----
Fibra Scotch	-----
Electrodo (-)	

Una vez integrado el sistema, la cámara se llenó con solución amortiguadora de transferencia pH 7.4 (80 ml de fosfato monobásico de sodio 0.2M , 420 ml de de fosfato dibásico de sodio 0.2M y 4000 ml de agua bidestilada) verificando que cubriera al sistema. la transferencia se llevó a cabo a 6 volts durante 1 hr.

Para verificar la transferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa se cortó una tira y se tiñó con solución de negro de amido durante 5 min, trascurrido el tiempo se lavó con agua destilada a chorro y se trató con solución desteñidora (9 ml metanol, 2 ml ácido acético, 9 ml agua destilada).

3.6.3.- Identificación de las fracciones protéicas virales por inmuno ensayo enzimático (ELISA).

Una vez que se logró una eficiente transferencia se realizó la detección de las proteínas virales en el papel de nitrocelulosa utilizando los sueros inmunes de las especies que resultaron positivas en la prueba DOT-ELISA.

Después de la transferencia se cortaron tiras de nitrocelulosa de 4 mm de ancho, el ensayo inmunoenzimático se realizó colocando cada tira en un tubo de ensayo y siguiendo los mismos pasos descritos para la prueba DOT-ELISA.

4

RESULTADOS**4.1. DETERMINACION DE PROTEINAS VIRALES.**

De una cantidad de 2500 ml de monoestrato celular BHK-21, se concentraron hasta un volumen de 2.25 ml.

En el cuadro y en la figura No. 1 se observan los resultados de la curva patrón de proteínas, así como la concentración de proteínas virales encontradas en una muestra de 0.05 ml de concentrado viral diluido 1:10, la suspensión viral tuvo una concentración de 172.8 µg/ml.

4.2. DETERMINACION DE ANTICUERPOS POR DOT ELISA.

En el cuadro y en la figura No. 2 se muestran los resultados de las pruebas de DOT ELISA realizadas con los sueros de cuyos inmunizados con las cepas ERA, CVS y Pitman Moore. Se tuvo una respuesta positiva en todos los sueros, sin embargo esta se ve más marcada en los sueros de los animales inmunizados con la cepa ERA en relación con la respuesta que dan Pitman Moore y CVS, por otro

lado el testigo no inmunizado y un disco que tenía albúmina sérica bovina dieron los resultados negativos esperados.

El cuadro y la figura No. 3 muestran los resultados de las pruebas DOT ELISA realizadas con los sueros de las diferentes especies inmunizados con las capas CVS y Pitman Moore. Se observa que todos los sueros de cuyos probados resultaron positivos, los sueros de pollo dieron un resultado positivo muy intenso y todos los sueros de pato dieron resultados negativos. En todos los casos se empleó el suero de un animal no inmunizado como control negativo, en el caso del suero del pollo el control negativo dió un resultado positivo con una muy baja intensidad. En el cuadro No.4 se resumen los resultados de la prueba DOT ELISA obtenidos en los sueros estudiados.

4.3. OBTENCIÓN DE LA FRACCIONES VIRALES POR ELECTROFORESIS.

El cuadro No. 5 muestra los valores de movilidad relativa (Rf) de las proteínas con pesos moleculares conocidos. La curva patrón de pesos moleculares se muestra en la figura No.4, (coeficiente de determinación $r = 0.99$). En la figura No. 5 se pueden observar las 6 diferentes bandas de las proteínas que integran el patrón de pesos moleculares.

El virus se precipitó con acetato de Zn y posteriormente se eliminó el exceso de albúmina por precipitación con sulfato de amonio, la figura No. 6 muestran los corrimientos electroforéticos de la muestra antes y después de la precipitación

con sulfato de amonio, y se puede observar como después de eliminar la albúmina se ven más diferenciadas las bandas de las proteínas virales con pesos moleculares cercanos a la albúmina.

En el cuadro No. 6 se observan los P.M de las bandas del extracto viral obtenidas por tinción con azul de coomasie, tres de ellas coinciden en P.M con proteínas del virus de la rabia que serían la glicoproteína con 67 kda, la proteína M con un peso molecular de 26 kda y la proteína N con un peso molecular de 55.5 Kda.

4.4. TRANSFERENCIA A PAPEL NITROCELULOSA.

Se realizaron ensayos de transferencias de proteínas del gel de acrilamida a papel de nitrocelulosa obteniéndose tanto las bandas de la muestra viral como el del patrón de pesos moleculares, se puede observar una copia idéntica del gel de poliacrilamida en la nitrocelulosa , se empleó la técnica de tinción de negro de amido para proteínas con la cual se observó una buena resolución (Figura No. 7).

4.5. DETECCION DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DEL VIRUS.

Transferidas las fracciones proteicas del virus a nitrocelulosa, se llevó a cabo la detección de estas por ELISA, para esto se hicieron reaccionar con los sueros de cueros y pollos cuya

respuesta fué positiva en la prueba DOT ELISA.

Los resultados de las fracciones detectadas por los diferentes sueros de cuyos inmunizados con las cepas ERA, CVS y Pitman Moore se observan en la figura No.8, así como los P.M. correspondientes a cada banda, los sueros de animales inmunizados con ERA reconocen las bandas de P.M de 120,107,80,67 55 y 26 Kda. mientras que los sueros de animales inmunizados con CVS reconocen las bandas de P.M 107,67,55,39 Y 26 Kda. y los animales inmunizados con Pitman Moore reconocen las bandas de pesos moleculares de 107, 67,55,26 Kda. La figura No. 9 muestra la respuesta de los sueros de los pollos, en esta última se puede observar una respuesta inespecífica que no permite determinar las bandas.

Debido a esta inespecificidad se realizó una prueba indirecta que consistió en incubar las tiras de nitrocelulosa que contenían los antígenos virales, primero con los sueros de los pollos inmunizados con las cepas CVS y Pitman Moore y posteriormente con el suero de unos de los cuyos inmunizados. Se reveló con el conjugado anticuyo-peroxidasa.

En la figura No.10 se observa que la inespecificidad es eliminada con la técnica descrita, a la vez se puede ver que existe una respuesta hacia algunas bandas. El suero de pollo inmunizado con la cepa Pitman Moore no bloqueó las bandas de P.M de 107,67,55 y 26 Kda, mientras que el suero de pollo inmunizado con la cepa CVS bloqueó la detección de la banda de 67 Kda por el suero de cuyo.

CUADRO NO. 1

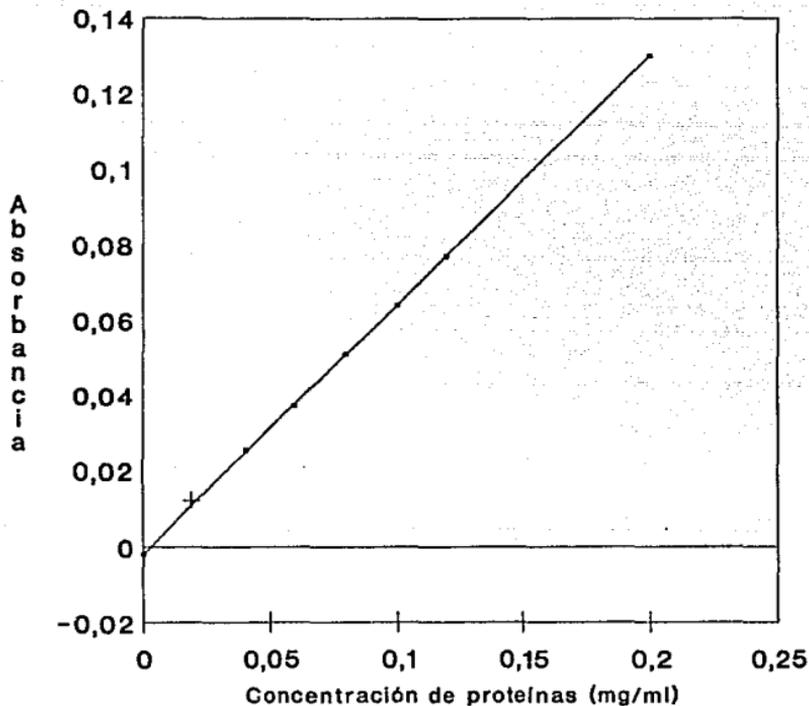
Valores para la curva patrón de proteínas. Absorbancia a una longitud de onda de 765 nm.

Concentración de albúmina (mg)	Absorbancia
0.04	0.024
0.06	0.036
0.08	0.050
0.10	0.064
0.12	0.080
0.20	0.130
Muestra viral	
0.019	0.011
0.021	0.012

FIGURA 1

CURVA PATRON DE PROTEINAS

La curva se elaboró con base en los datos del cuadro no. 1



+ muestra

Los datos experimentales fueron ajustados con un análisis de regresión lineal ($b=0.88$ mg/ml, $a=-0.0017$ mg/ml, $r=0.999$)

CUADRO NO. 2

Resultados de la prueba DOT-ELISA aplicada a los sueros de los cuyos inmunizados con la vacuna indicada. La intensidad de la respuesta se indica con el número de +. El antígeno fue la suspensión viral purificada y concentrada de la cepa Roxane.

Pozo*	Vacuna	Intensidad
A 1-2	ERA	+++
B 1-2	ERA	+++
C 1-2	CVS	++
D 1-2	CVS	++
E 1-2	CVS	+
F 1-2	CVS	+
G 1-2	CONTROL (-)	-
A 4-5	ERA	+++
B 4-5	CVS	++
C 4-5	PITMAN MOORE	+++
D 4-5	CVS	++
E 4-5	ERA	++
F 4-5	CVS	+++
G 4-5	CVS	++
H 4-5	ALBUMINA	-

*Localización en la placa de 96 pozos mostrada en la figura No. 2.

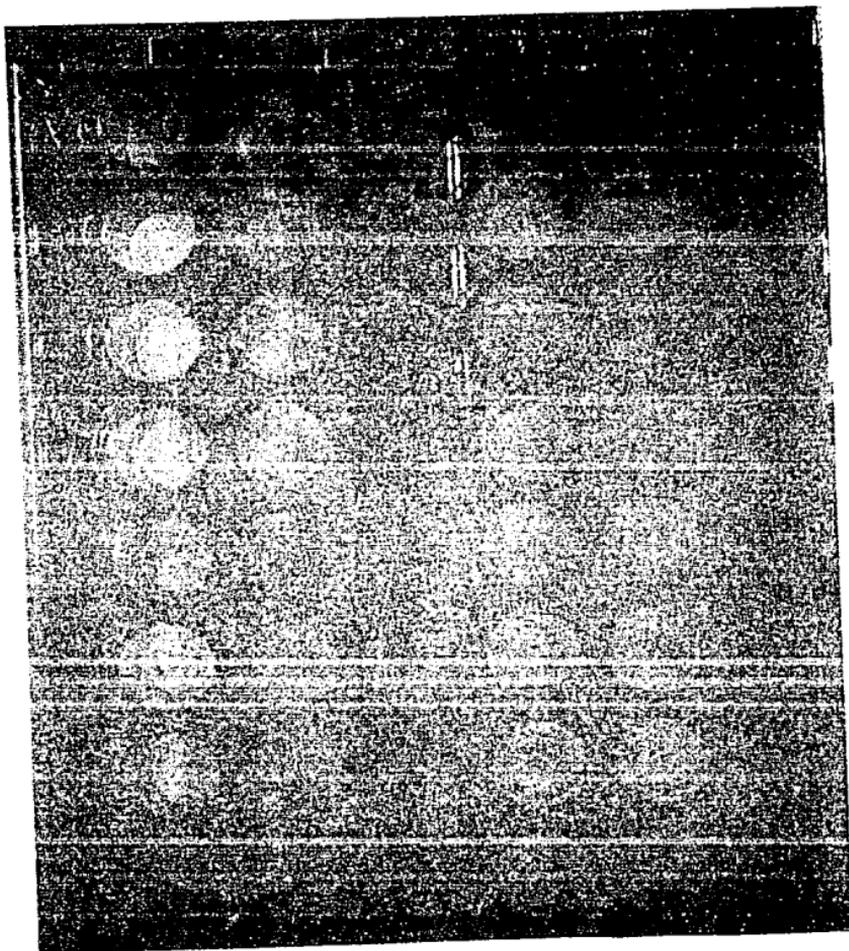


FIGURA NO 2

Resultados de la prueba DOT-ELISA hecha con los sueros de los cuyos inmunizados con las cepas ERA, CVS y Pitman Moore.

CUADRO NO. 3

Resultados de la prueba DOT-ELISA realizada con los sueros inmunes de cuyos, pollos y patos.

Especie	Pozo	Vacuna	Intensidad
CUYO	A 1-2	CVS	+
	B 1-2	CVS	+
	C 1-2	CVS	+
	D 1-2	CVS	+
	E 1-2	PITMAN MOORE	++
	F 1-2	PITMAN MOORE	+++
	G 1-2	PITMAN MOORE	++
	H 1-2	PITMAN MOORE	++
	A 10-11	CONTROL (+)	++
	G 10-11	CONTROL (-)	-
POLLO	A 4-5	CVS	+++
	B 4-5	CVS	+++
	C 4-5	CVS	+++
	D 4-5	CVS	+++
	E 4-5	PITMAN MOORE	+++
	F 4-5	PITMAN MOORE	+++
	G 4-5	PITMAN MOORE	+++
	H 4-5	PITMAN MOORE	+++
	F 7-8	PITMAN MOORE	+++
	G 7-8	PITMAN MOORE	+++
	H 10-11	CONTROL (-)	++
	PATO	A 7-8	CVS
B 7-8		CVS	-
C 7-8		PITMAN MOORE	-
D 7-8		PITMAN MOORE	-
E 7-8		PITMAN MOORE	-
F 10-11		CONTROL (-)	-

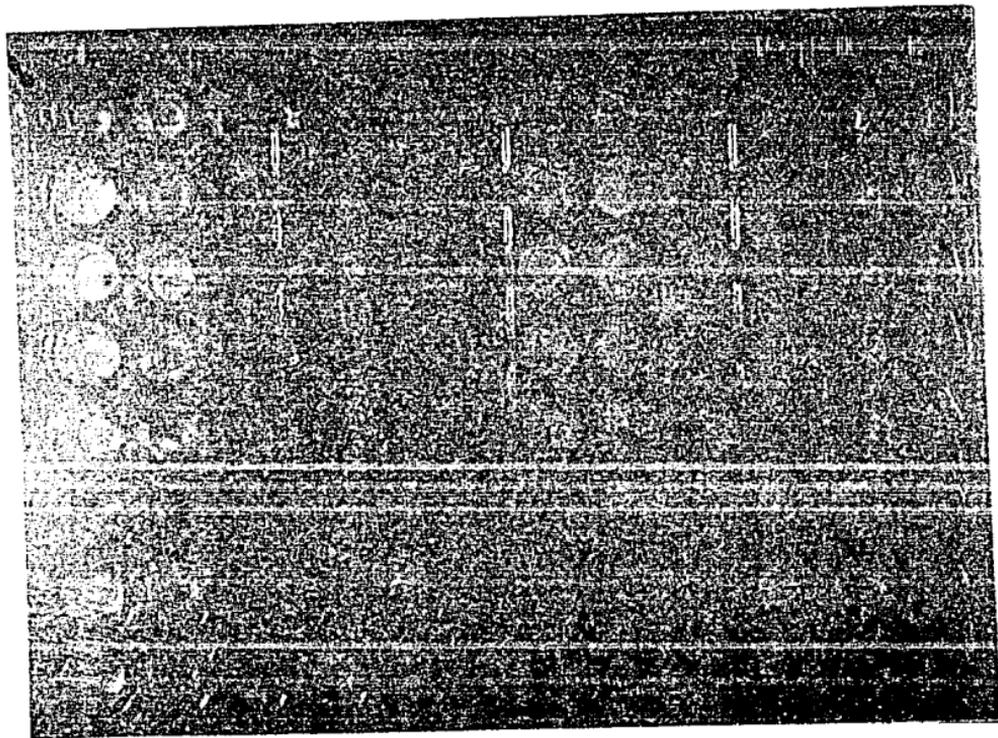


FIGURA NO. 3

Prueba DOT-ELISA realizada con los sueros de cuyo (carriles 1 y 2), de pollo (carriles 4 y 5) y pato (carriles 7 y 8). El antígeno utilizado fue la suspensión de la cepa Roxane.

CUADRO NO. 4

Resumen de los resultados de los cuadros Nos. 2 y 3.

Especie	Cepa	No. de sueros probados	No. de sueros positivos
Cuyo	ERA	4	4
Cuyo	CVS	12	12
Cuyo	Pitman More	5	5
Gallina dom.	CVS	4	4
Gallina dom.	Pitman Moore	4	4
Pato	CVS	4	0
Pato	Pitman Moore	4	0

cuadro no.5

Movilidades relativas (MR) obtenidas por electroforesis de las proteínas patrón para la elaboración de la curva estándar de pesos moleculares.

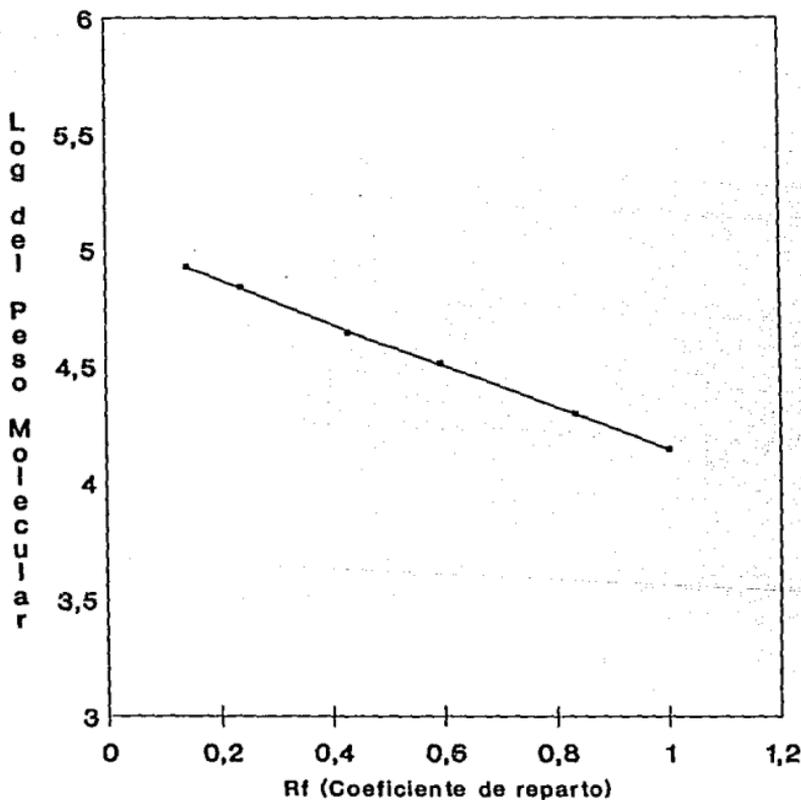
Proteína	P.M.	Log P.M.	MR
Fosforilasa	94 000	4.9731	0.1428
Albumina	67 000	4.8260	0.2380
Ovalbumina	43 000	4.6334	0.4285
Anhidrasa Carbónica	30 000	4.4771	0.5952
Inhibidor Tripsina	20 100	4.3031	0.8333
Lactoalbumina	14 400	4.1583	1.0000

FIGURA 4

CURVA PATRON DE PESOS MOLECULARES

31

La curva se elaboró con base en los datos del cuadro no. 5



Los datos experimentales fueron ajustados con un análisis de regresión lineal ($b=-0.92$ cm/kDal, $a=6.06$ cm, $r=0.99$)

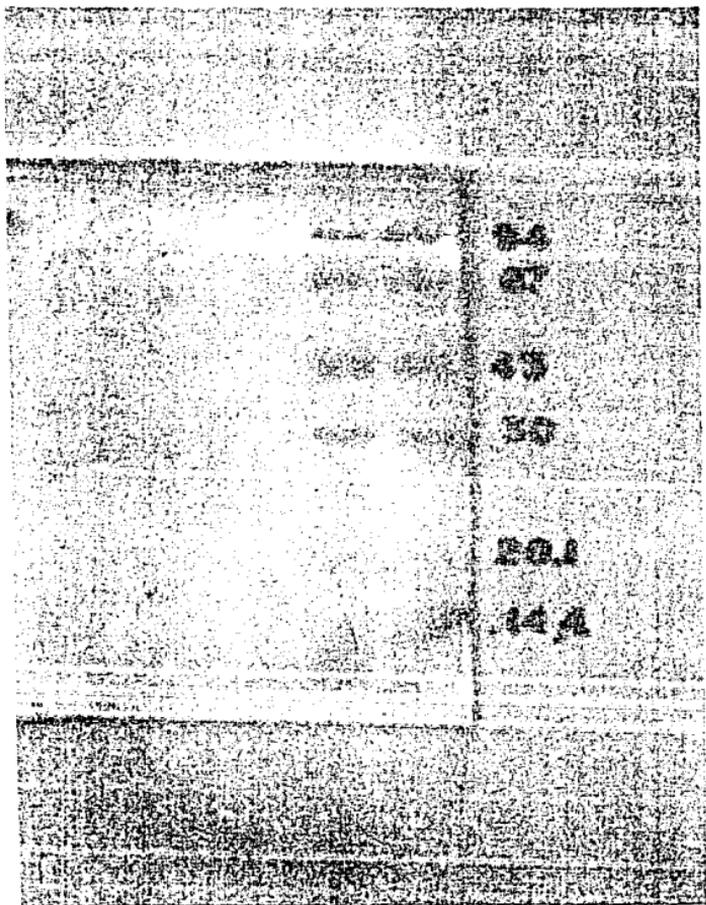


FIGURA NO. 5

Corrimiento electroforético efectuado con el patrón de pesos moleculares, se observan las seis bandas de las proteínas de referencia y se indican sus pesos moleculares.

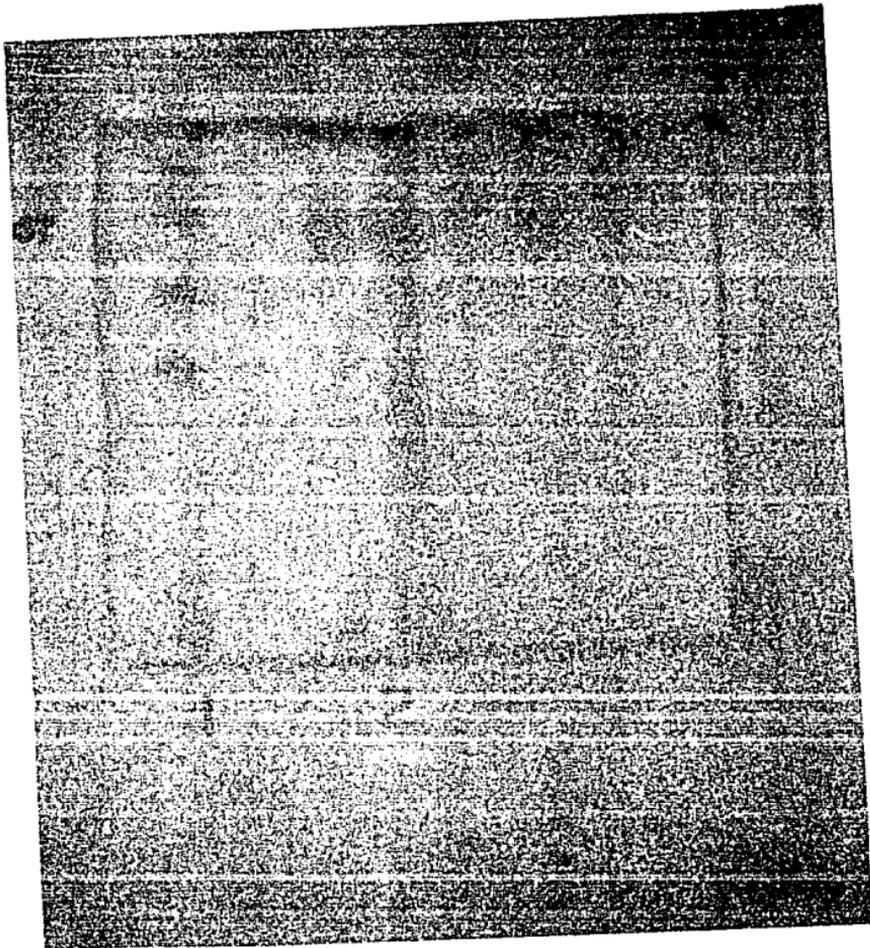


FIGURA NO. 6

Electroforesis efectuada con la cepa Roxane del virus de la rabia:

1. Patrón de pesos moleculares
2. Concentrado viral por precipitación con acetato de zinc y sulfato de amonio.
3. Concentrado viral por precipitación con acetato de cinc.

CUADRO NO. 6

Pesos moleculares de las bandas de la suspensión viral encontradas por interpolación de los valores de movilidad relativa en la curva estándar.

MR	P.M.
0.0476	103462
0.2449	68098
0.2547	66698*
0.3530	54148*
0.6190	30820
0.6904	26491*
0.9118	16571

* Valores que coinciden con los pesos moleculares de proteínas del virus de la rabia.

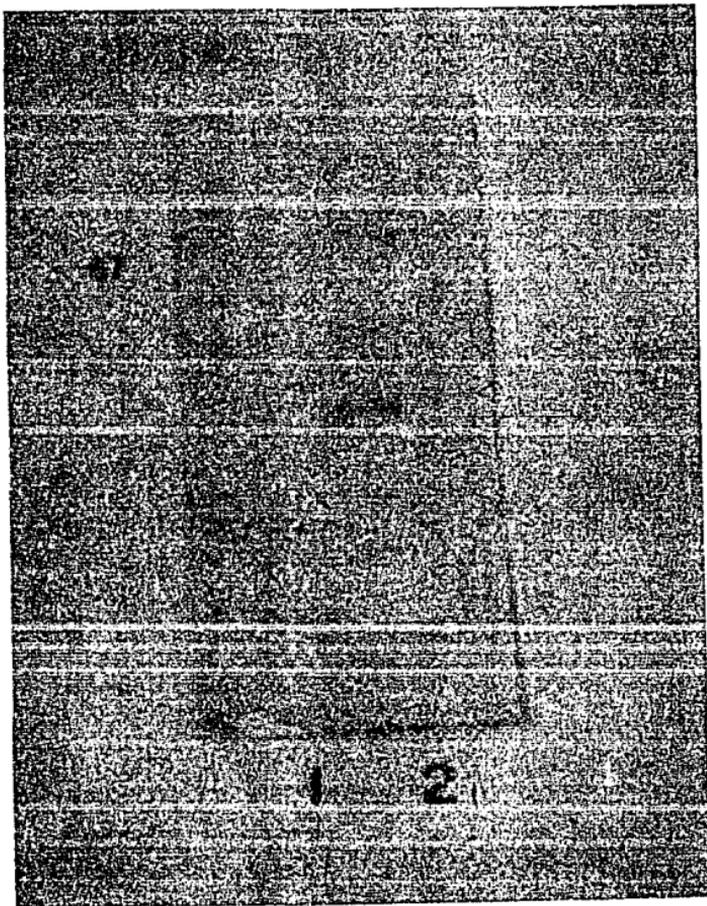


FIGURA NO. 7

Electrotransferencia a papel de nitrocelulosa de las proteínas de la suspensión viral (1) y del patrón de pesos moleculares (2), revelada por tinción con negro de amido.

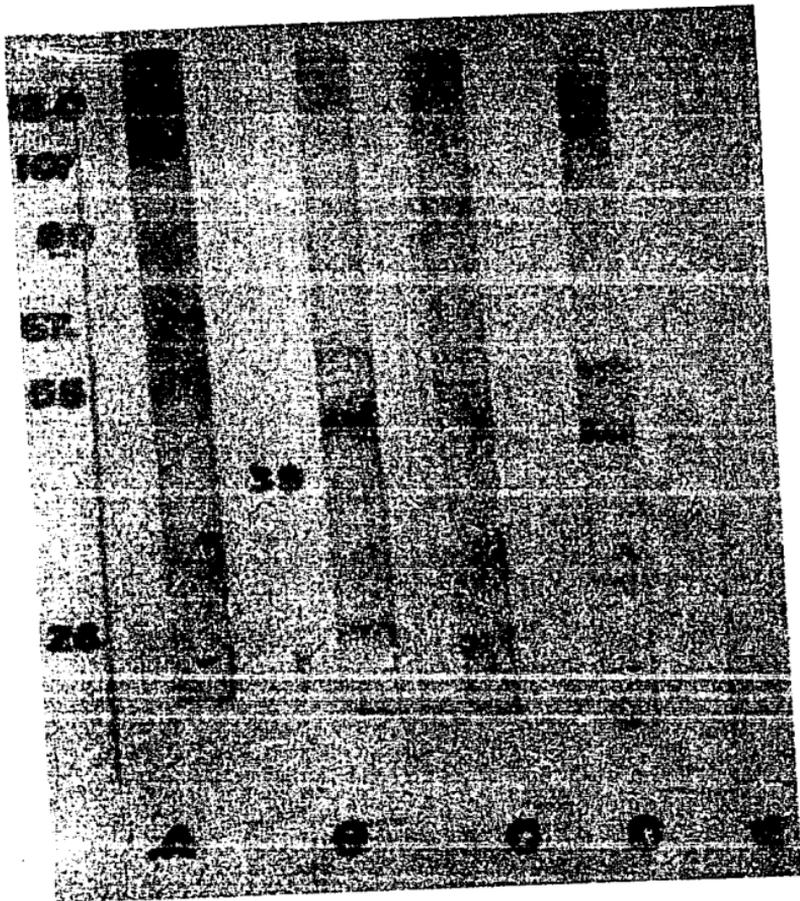


FIGURA NO. 8

Proteínas de la suspensión viral que reaccionaron con los sueros inmunes de los cuyos en la prueba de inmuno electrotransferencia.

- A - suero de cuyo inmunizado con ERA
- B - suero de cuyo inmunizado con CVS
- C - suero de cuyo inmunizado con CVS
- D - suero de cuyo inmunizado con Pitman Moore
- E - suero de cuyo control negativo

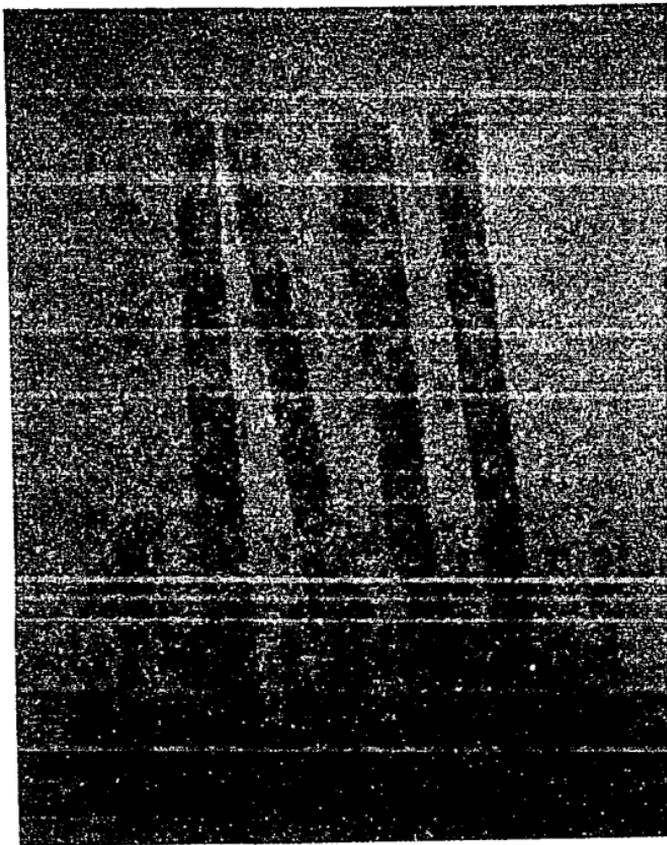


FIGURA NO. 9

Resultados de la prueba ELISA hecha con los sueros de los pollos inmunizados con las cepas CVS y Pitman Moore y las proteínas de la cepa Roxane transferidas a la nitrocelulosa.

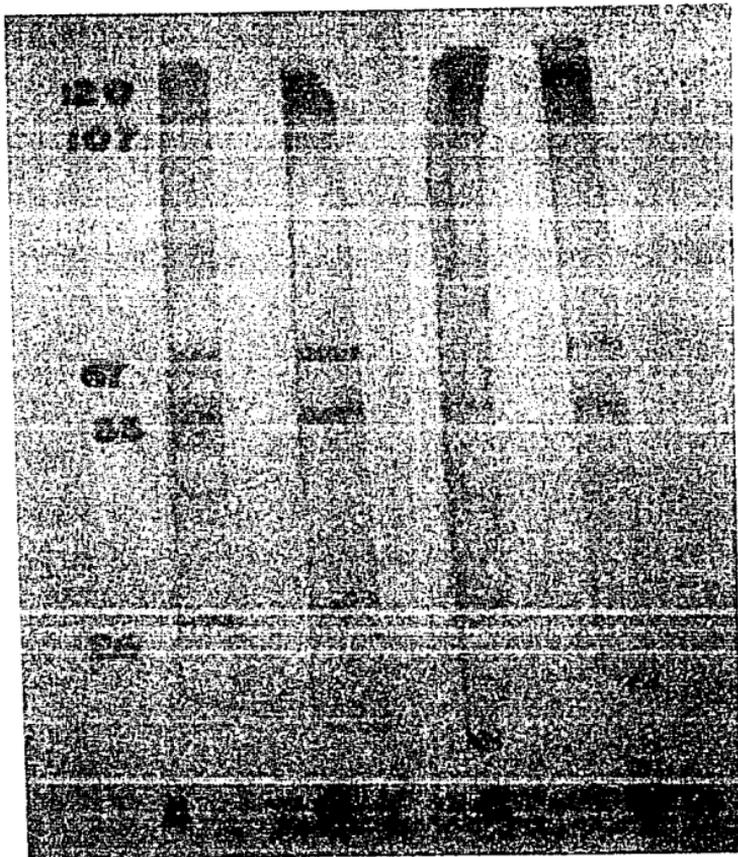


FIGURA NO. 10

Proteínas de la suspensión viral que reaccionaron con los sueros inmunes de los pollos. Para esta prueba se utilizó el método indirecto descrito anteriormente.

- A - Cuyo inmunizado con CVS
- B - Pollo inmunizado con Pitman Moore
- C - Pollo inmunizado con CVS
- D - Cuyo inmunizado con Pitman Moore

5

DISCUSION

La existencia de varias cepas del virus de la rabia ha causado gran interes debido ha que ha dado un nuevo enfoque a los estudios epidemiológicos e inmuno-patológicos de esta antigua enfermedad. La variabilidad antigénica de las cepas del virus de la rabia fue puesta en evidencia mediante el empleo de los anti cuerpos monoclonales (AM). Estos reactivos altamente especificos y sensibles se han usado ampliamente en el estudio del virus de la rabia. Dietzchold y col (1987) utilizaron los AM para investigar el mecanismo de la neutralización del virus de la rabia, Lafon y col (1987) estudiaron la actividad antiviral de los AM dirigidos contra la nucleocápside y la proteína NS del virus de la rabia, Llodmell y Ewalt (1987) estudiaron la inhibición de la diseminación del virus in vitro con AM antiglicoproteína. Los ejemplos citados son solo algunos de los problemas que han podido ser atacados gracias a la disponibilidad de los AM.

Con el fin de encontrar un suero policlonal que pudiera tener las propiedades de especificidad y sensibilidad de un AM se estudió la respuesta inmune contra el virus de la rabia de especies no susceptibles y no involucradas en la epidemiología de esta enfermedad, en este trabajo se inmunizaron pollos, patos y cuyos, estos últimos utilizados como referencia.

En un trabajo precedente se estudió comparativamente la producción de anticuerpos contra el virus de la rabia en cuyos y pollos clasificados en dos grupos uno de ellos fue inmunizado con una vacuna inactivada (tipo Fuenzalida, cepa CVS) y el otro con una cepa viva atenuada (ERA) . La presencia de anticuerpos anti-rabia se puso en evidencia por pruebas de seroneutralización y se estudió la capacidad de los sueros para neutralizar a tres cepas del virus la cepa ERA, la cepa CVS y la cepa Roxane. Se encontró que el suero de los pollos inmunizados con las cepas CVS y ERA fueron capaces de neutralizar a la cepa Roxane, sin embargo, el título de anticuerpos promedio fue mucho mas bajo para los inmunizados con la cepa ERA que los inmunizados con CVS, por otro lado los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron mucho mas bajos para los pollos que para los cuyos, los cuales reaccionaron indistintamente contra todas las cepas (Espejel, 1990).

En el presente trabajo , se emplearon la cepas Pitman Moore (atenuada) y la cepa cepa CVS (vacuna inactivada tipo Fuenzalida) para inmunizar a pollos, patos y cuyos. Se utilizó la prueba DOT-ELISA en vez de la seroneutralización para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la rabia, pues ofrece las ventajas de la rapidez, sencillez y ahorro de reactivos. La cepa Roxane purificada por precipitación con acetato de zinc se utilizó como antígeno para la prueba, con la purificación se trató de eliminar a los antígenos provenientes del cultivo celular donde se replicó el virus , que pudieran interferir con los resultados.

Con la prueba Dot ELISA los sueros de todos los pollos así

como los de todos los cuyos dieron resultados positivos, mientras que los sueros de patos dieron todos resultados negativos. Se observó que la coloración con los sueros de los pollos fue muy intensa y hasta en el control negativo se observó una ligera reacción positiva indicando cierta inespecificidad en la técnica.

Posteriormente se realizó una inmunotransferencia para identificar hacia que fracción antigénica del virus estaban dirigidos los anticuerpos de los sueros que resultaron positivos en la prueba DOT-ELISA. Los sueros de los cuyos independientemente de la cepa utilizada en la inmunización reaccionaron con las cinco fracciones proteicas del virus como se puede observar en la figura 8.

Con los sueros de los pollos una vez mas se obtuvo una reacción altamente inespecífica ya que no se pudieron distinguir las bandas hacia las cuales estaba reaccionando el suero. Con el control negativo, en el que se utilizó el suero de un pollo que no estaba inmunizado, también se tñó completamente la tira de nitrocelulosa (figura No. 9). Se pensó que la inespecificidad del suero de pollo podía deberse a una cierta afinidad del suero de pollo hacia la sustancia bloqueadora (solución de leche descremada), sin embargo al cambiar a una solución bloqueadora de PBS-TWEEN80 se obtuvo la misma inespecificidad, por lo que se optó por realizar una prueba indirecta en la que se elaboró un sistema de capas en el orden suero de pollo-suero de cuyo-conjugado anticuyo-peroxidasa en donde las bandas que se revelan están dadas por la reacción del suero de cuyo, las bandas bloqueadas por los

anticuerpos en el suero de pollo no se revelan. Los resultados de esta prueba indicaron que los sueros de los pollos inmunizados con la cepa CVS reaccionaron con la banda correspondiente en peso molecular a la glicoproteína del virus de la rabia mientras que los sueros de los pollos vacunados con la cepa atenuada no reaccionaron con ninguna de las fracciones del virus.

La poca o nula respuesta de los pollos y los patos puede deberse a que al no ser susceptibles a la infección, no tienen receptores para el virus que retarden su dispersión y estimulen la secreción de los factores que atraen a los macrofagos. Es importante notar que los pollos inmunizados con la vacuna inactivada por lo menos respondieron hacia la glicoproteína, mientras que con la vacuna atenuada ERA no se obtuvo respuesta en ninguna de las dos especies, esto se puede explicar por el hecho de que la respuesta hacia una vacuna viva dependen de la replicación del agente en el animal inmunizado lo cual no va a ocurrir en las especies no susceptibles. Es poco probable que el repertorio de anticuerpos de especies como las aves estudiadas no contenga las clonas para responder hacia los antígenos del virus de la rabia, por lo que antes que concluir que no tienen la información genética para montar esta respuesta se sugiere tratar de obtener anticuerpos contra el virus variando otros factores que se sabe también influyen en la respuesta inmune como son: aumentar la concentración de antígeno, probar diferentes adyuvantes y comparar las diferentes vías de inmunización (Allen, P.M., 1987; Rosenthal, A.S. 1978).

En el presente estudio solo se evaluó la capacidad de reco-

nocer los antígenos de la cepa roxane, en la continuación de este trabajo se determinará si los sueros de pollo que reaccionaron con la glicoproteína de la cepa Roxane reaccionan con la glicoproteína de otras cepas del virus.

6

CONCLUSIONES

- 1.- La purificación por precipitación con acetato de zinc y sulfato de amonio permitió una mejor separación e identificación de las proteínas virales en la electroforesis.
2. En las condiciones utilizadas los patos no responden a la inmunización con el virus de la rabia independientemente de la cepa utilizada.
3. Todos los sueros de cuyo reconocen a la glicoproteína (G) de 67 Kda, a la Nucleoproteína (N) de 55.5 Kda y a la proteína de la membrana (M) de 26 Kda, independientemente de la cepa utilizada para la inmunización. Los sueros de las cuyos inmunizados con las vacunas ERA y Pitman Moore además reconocen a la polimerasa (proteína L) de 185 Kda.
4. Los sueros de pollo dan una reacción altamente inespecífica en la prueba DOT ELISA e inmunoelectrotransferencia.
5. Los pollos inmunizados con la cepa CVS produjeron anticuerpos contra la glicoproteína de la cepa Roxane del virus de la rabia.

7

BIBLIOGRAFIA

- ACHA, P., SZYFRES B. "Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales". OPS, 2a, EUA, p. 989. 1988.
- 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. Mexico 1986.
- ALLEN, P. M. Antigen processing at the molecular level. Immunol. Today 8: 270-273. 1987.
- ANNALISA S., MAURO R., BRACCI L. HPLC immunoaffinity purification of rabies virus glycoprotein using immobilized anti-peptide antibodies. J. of immunological Methods, 127, 131-138. 1990.
- ANJARIA J.M., JHALA C. I. Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies. Int. J. Zoon 12, 267-275. 1985.
- BAER. GEORGE M. La rabia. La prensa Médica Mexicana. México 1986.
- BERNHARD D., CHARLES E. R. Antigenic Diversity of the Glycoprotein and Nucleocapsid Proteins on Rabies and Rabies-Related Viruses: Implications for Epidemiology and Control of Rabies. Rev. Of Infec. Diseases. Vol 10. Supplement 4; S785-S799. 1988.
- BLANCOU J. . La rage du renard. Ann Med Vet, 129. 293-307. 1985
- BOWEN, B., STEINBERG J., LAEMELI U.K. and WENTRAUB H. "THE DETECTION OF dna binding proteins by protein blotting. Nucl Acids Research, Vol 9 No1 1-21. 1980
- CORREA GIRON P. Ciencia veterinaria. Vol. 3. UNAM. México 1981.
- DEBBIE J, G. La rabia: Un viejo enemigo al que podemos derrotar. Organización Mundial de la salud (O.M.S.). Foro Mundial de la Salud. Vol. 9, 550-555. 1988.

- DIETZCHOLD, B., TOLLIS, M., RUPRECHT, CH., CELIS E., KOPROWSKI, H.,. Antigenic vararation in Rabies an Rabies-Related Viruses. Cross-Protection Independent of Glycoprotein-Mediated virus-Neutralizing Antibody. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 156. No. 5. November 1987.
- FERNANDES, M. V., ARAMBULO P. V. Rabies is an international Problem . III. En KOPROWSKI H. y S. A. Plotkin (eds.), World s Debt to Pasteur, The Wistar Symposium Series. Vol. 3 liss Inc New York. 1985.
- FLAMAND. A., WIKTOR, T., KOPROWSKY, H., Use of hibridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus . I. The nucleocapside protein J. Virol 48: 105-109. 1980
- HARLOW E., LINE D. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.
- LAEMELI V.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nalure (London). 227, 680-685. 1870.
- LAFON M., WIKTOR T.J. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoproteins and non structural protein. J. Gen Virol 66 2125-2133. 1985.
- LODMELL, L.D., EWALT C. L. Immune sera and antiglycoprotein monoclonal antibodies inhibit in vitro Cell-to-Cell Spread of Pathogenic Rabies Viruses. J. Virology 61 3314-3318. 1987.
- LOWRY D.H., RUSEHRIOUSH N.J., FAIR AL. Protein measurement with the folin phenol Reagent. J. Biol. Chemistry, 193; 265-273. 1951
- MONIQUE L, B., MIREILLE L. Antiviral activity of Mono clonal Antibodies Specific For the Internal Proteins N and NS of rabies Virus. J. gen Virol 68, 3113-3123. 1987.
- MOHANTY. S., DUTTA.S. Virologia Veterinaria. Nueva editorial Interamericana. México. 1988.
- MORILLA,G., BAUTISTA,G. Manual de inmunologia. Editorial Diana. México. 1986.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes en el hombre y en los animales. Segunda Edición 1986.
- ROMAN S. B., BLANCOU J. Evaluación de la inmunidad conferida en bovinos por una vacuna antirrábica producida en cultivo celular a partir de virus inactivados. Vet. Mex. 18; 207- 213. 1987.

- ROSENTHAL, A. S. Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response *Immunol. Rev.* 40:135-152. 1978.
- SHOPE R.E. Rabies Enigma: Human and Animal Disease Control. In: *Applied Virology*. New York, Academic Press. 231-231. 1984.
- SUREAU P., WIKTOR T.J. Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: Detection by monoclonal antibodies *Am J. epidemiol* 117, 605-609. 1983.
- SMITH J.S., SUMNER J.W., ROUMILLET L.P., BAER G.M., WINKLER W.G. Antigenic characteristics of isolates associated with a new epizootic of racoon rabies in the United States *J. Infect dis* 149, 769-774. 1984.
- TOWBIN, H., STAEBELINT., and GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat Acad. Sci USA*, 76, 4350-4353. 1979.
- VODOPIJA I. Current Issues in Human Rabies Immunization. *Rev. inf. Dis*; 10, supplement 4; Nov-Dec: S758-S763. 1988.
- WEBSTER, W., CASEY, G. y CHARLTON, K. Use of Alternate Rabies Virus Strains as Challenge virus in the RFFIT. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1986.
- WIKTOR T.J. Monoclonal Antibodies in Rabies Virus Research Veterinary Viral Diseases. Their significance in South-East Asia and the Western Pacific. Ed. Della-Porta. Academic Press Australia; 374-381. 1985.
- WEBSTER W.A., CASEY G., CHARLTON K.M., WIKTOR T.J. Antigenic variants of rabies virus in isolates from eastern, central and southern Canada. *Can j. Comp Med.* 49, 186-188. 1985.
- WUNNER W.H., REAGANK.J. and KOPROWSKI H. Characterization of saturable Binding Sites for Rabies Virus. *J. Virol.* ;50 (3): 691-697. 1984. 07 3
- WUNNER W.H. Growth, Purification and titration of Rhabdoviruses. In: *Virology: a practical approach*. Ed. by MAHY B.W.J. IRL PRESS. OXFORD-Washington D.C., 79-92. 1985.

GLOSARIO

Anticuerpos monoclonales	AM
Dodecil sulfato de sodio	SDS
Fosfoproteína	NS
Glicoproteína	G
Kilodaltons	Kda
Organización Mundial de la salud	OMS
Peso molecular	P.M
Movilidad relativa	M.R.
Solución amortiguadora de fosfato	PBS.
Productora Nacional de Biologicos Veterinarios	PRONABIVE