

00524  
164



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE DNA RESIDUAL DE CELULAS VERO  
PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN LA PREPARACION DE  
VACUNA ANTIRRABICA HUMANA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
MONICA MAYTE ROMERO RAMOS



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

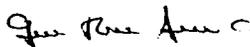
**Jurado asignado:**

Presidente	Profra. Aida Navas Pérez
Vocal	Prof. José Jesús Alvarado Pérez
Secretario	Prof. José Carmen Gudiño Rosales
1er Suplente	Prof. Javier Plasencia de la Parra
2º. Suplente	Profra. Rosa Elena Sarmiento Silva

**Sitio donde se desarrolló el tema :**

- ❖ Laboratorio de Retrovirus y Laboratorio de Ingeniería Genética del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
- ❖ Departamento de Investigación y Desarrollo de Vacunas Virales del Instituto Nacional de Virología, BIRMEX S.A. de C.V.

**Asesor**



M. en C. José Carmen Gudiño Rosales

**Sustentante**



Mónica Mayté Romero Ramos

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por haberme permitido nacer y darme todas las herramientas necesarias para lograr éste y muchos otros objetivos.

A mis padres: **Mami** gracias por el apoyo incondicional que siempre me has dado, por tus desvelos y tu preocupación incansable. **Papi**, mil gracias por todos los momentos que hemos compartido, por apoyarme en todo momento y por consentirme tanto. Ambos son un gran ejemplo para mí.

A mi **hermano**, por todos los pleitos y jugarretas que hemos tenido, por los momentos alegres y los tristes. Sabes que siempre puedes contar conmigo y que creo en ti.

A **Ernesto**, gracias porque sin ti no hubiera sido posible este trabajo (literalmente). Gracias por tus consejos y apoyo y por tu aportación insuperable a este trabajo. Mil gracias.

A mis **abuelitos**: Teresita, Isela, Rubén\* y Toño. Gracias por ser un ejemplo de lucha contra la vida y superación. Cada uno de ustedes es digno de toda mi admiración. Abuelito, se que desde el cielo me acompañará siempre y se quedará toda la vida en mi corazón.

A mis **tíos**: Yola, Javier, Rosa, Héctor, Ángeles, Juan Carlos, Marbella, Paco, Sara, Víctor y Yolanda, gracias por ser parte de mi vida y por los consejos que en algún momento he recibido de ustedes.

A todos mis **primos**: Erika, Brenda, Isela, Javier, Marco, Edgar, Eric, Andy, Cheril, Alan, Fer, Itzel y Paquito, por todos los juegos y aventuras que hemos pasado.

Al **Ing. Briman**: por su amistad y entrega incondicional, por ser una nueva parte de mi familia y una persona con quien siempre se puede confiar. Gracias.

A mis amigas: **Mónica, Danniela, Nadia, Diana y Gaby**, por los inolvidables momentos que pasamos en toda nuestra infancia, por la amistad que hemos conservado hasta ahora después de tantos años y tantas adversidades.

A mis amigos: **Iván, Nelly, Gibrán, Nohemí, Edgar y Poncho**, por todas las cosas que compartimos en la facultad y fuera de ella, por apoyarme en los momentos más difíciles y por contar siempre con ustedes.

A **Fernanda**, por ser una nueva parte de mi vida, por compartir tantos secretos e historias y por escucharme cuando lo he necesitado.

A **José Carmen**, por tu tiempo y dedicación. Gracias por ser un gran profesionalista y persona, por permitirme trabajar y aprender de ti y por todos los lios que tuvimos que resolver y superar juntos. Gracias por aceptar este reto junto conmigo.

A mis **maestros** por ser una parte esencial de mi formación, por enseñarme no solo fundamentos teóricos, sino gran parte de la vida. En especial quiero agradecer al Q.F.B. **Raúl Garza** por ser una persona admirable y un gran apoyo para todos los alumnos.

A mis compañeros de generación **QFB's 96**, por ser parte de una inmemorable época y parte inolvidable de mi vida.

A **Rocío, Ruth, Anita, Leo, Gaby, Benito y todos mis compañeros del laboratorio**, por darme el tiempo y espacio para realizar este trabajo, además de su apoyo y consejos.

A **América, Rosy, Juan Carlos y Liz**, por permitirme conocerlos y compartir su laboratorio, por sus opiniones y apoyo.

A mis compañeros de esterilización, principalmente **Gerardo, Sonia** y la Señora **Chefo**, por su gran apoyo.

A la **UNAM**, por ser una de las Instituciones Educativas más grandes del país, por los esfuerzos que realiza en la formación de sus alumnos y ser parte del engrandecimiento del país.

Al **INDRE** y al **Instituto Nacional de Virología**, por hacer posible la realización de este trabajo.

# ÍNDICE

Página

## ABREVIATURAS

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	ANTECEDENTES .....	3
	1. Definición de rabia.....	3
	2. Antecedentes Históricos .....	3
	3. Características del virus .....	5
	3.1. Organización del Genoma .....	7
	3.2. Variabilidad Genética .....	9
	3.3. Ciclo Infeccioso .....	10
	4. Epizootiología y Epidemiología .....	12
	5. Enfermedad .....	14
	6. Tratamiento .....	16
	7. Diagnóstico .....	17
	8. Vacunas antirrábicas .....	18
	8.1. Vacunación Pre-exposición .....	20
	8.2. Vacunación Post-exposición .....	20
	9. Control de la Rabia .....	20
	10. Producción de Vacuna Antirrábica Humana en Cultivos de Células Vero.....	21
	10.1. Líneas Celulares Continuas .....	21
	10.2. Células Vero .....	22
	10.3. Preparación de la Vacuna Antirrábica .....	24
	11. Principio de la Técnica de Dot-blot .....	27
	12. Principio de la Técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) .....	28
III.	JUSTIFICACIÓN .....	29
IV.	OBJETIVOS .....	29
V.	MATERIAL Y MÉTODO .....	30
VI.	RESULTADOS .....	38
VII.	DISCUSIÓN .....	51
VIII.	CONCLUSIONES .....	55
IX.	BIBLIOGRAFÍA .....	56
X.	APÉNDICE .....	63

## ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>A.C.</b>	Antes de Cristo
<b>AchR</b>	Receptor de acetilcolina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CSPD</b>	Disodio 3-(4-metoxispiro {1,2-dioxietano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo [3.3.1.1] decan}-4-il) fenil fosfato.
<b>D.C.</b>	Después de Cristo
<b>DIG</b>	Digoxigenina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP's</b>	Desoxinucleótidos trifosfatados
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> . Administración de alimentos y fármacos
<b>G</b>	Glicoproteína
<b>Hae III</b>	Endonucleasa de restricción extraída de <i>Haemophilus aegypticus</i>
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>L</b>	RNA transcriptasa
<b>M</b>	Proteína de matriz
<b>mg</b>	Miligramo
<b>µg</b>	Microgramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Nucleoproteína
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NS</b>	Fosfoproteína nominal
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pg</b>	Picogramo
<b>pmol</b>	Picomol
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TEMED</b>	<b>N,N,N',N'</b> -Tetrametiletilendiamina
<b>U</b>	Unidades
<b>UV</b>	Ultravioleta

## I. INTRODUCCIÓN

La rabia es una de las zoonosis más importantes que afectan al mundo y su curso es inexorablemente letal, por lo cual ha sido primordial desarrollar y mejorar vacunas antirábicas para uso humano que cumplan con las exigencias de seguridad, inocuidad y potencia necesarias.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado que se abandone el uso de vacunas realizadas a partir de cultivos de tejidos (animales adultos y lactantes) ya que se ha demostrado que producen una gran cantidad de efectos adversos como son fiebre, dolor de cabeza, insomnio, palpitaciones, diarrea, sensibilización a proteínas (hipersensibilidad) y sobre todo reacciones neurológicas (67).

Entre las vacunas más seguras de uso en humanos se encuentran aquellas que han sido preparadas a partir de diferentes cultivos celulares como son las células Vero. El uso de líneas celulares provee de un mayor control en la producción y una mayor generación viral al poder adaptarlas a microportadores. Sin embargo también existen riesgos como son la presencia de virus y otros agentes transmisibles, proteínas promotoras de crecimiento y el DNA residual que se encuentre en las vacunas (41).

Las líneas celulares continuas tienen una longevidad ilimitada debido a la desregulación de los genes que controlan el crecimiento, por lo tanto se considera que el DNA derivado de ellas tiene el potencial de conferir la capacidad de crecimiento celular no regulado, es decir la actividad tumorigénica a otras células, o codificar para proteínas transformantes.

En 1987 se estableció como límite permisible 100 pg de DNA residual de células Vero por dosis de vacuna (1), sin embargo después de nuevos estudios sobre el límite de pases en los que las células no presentan tumorigenicidad en animales (57) y una evaluación completa, el Comité de Expertos de la OMS concluyó que se pueden considerar aceptables niveles de hasta 10 ng de DNA en una dosis de vacuna purificada (41).

Por otro lado, diversos estudios sugieren que el uso de  $\beta$ -propiolactona altera la estructura y la capacidad del DNA residual para ser utilizado como molde por varias polimerasas, por lo que el uso de este agente ofrece un nivel más de confianza, incluso cuando la cantidad de DNA inoculado por vía parenteral sea importante (45).

## II. ANTECEDENTES

### 1.- DEFINICIÓN DE RABIA

La rabia es una enfermedad viral que afecta a los animales de sangre caliente, presenta un periodo de incubación largo y un curso agudo y mortal. Se le conoce como hidrofobia, *rabies* (inglés), *tollwuto* o *wut* (alemán), *le rage* (francés) y en México se le llama derriengue cuando afecta a los bovinos (18).

Los griegos denominaron a la enfermedad *lyssa* (locura) y los romanos utilizaron la palabra *rabere* (rabiarse), de donde deriva el término actual. En la antigüedad la enfermedad se asociaba a la aparición de Sirius (estrella del perro) en los "días del perro" del verano, pues se suponía que estaban particularmente expuestos a la enfermedad (4).

### 2.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Las civilizaciones que florecieron en los márgenes de los ríos Nilo, Eufrates e Indo, 2000 años A.C. ya conocían la rabia. Existe referencia acerca de esta enfermedad en Asia en el código del pre-Mosaico de Eshnunna, el cual data de antes del código de Hammurabi de la antigua Babilonia en el siglo XXII A.C. en donde se estableció una multa al dueño de un perro que mordiera a una persona y ésta muriera (4,18).

La cultura greco-romana menciona diferentes referencias de esta enfermedad como se muestra en la Iliada (mas de 700 años A.C.) donde Aquiles llama a Héctor "perro rabioso". Demócrito (550 años A.C) fue el primero que describió la rabia en perros y otros animales domésticos (4). Aristóteles (332 A.C) señaló su transmisión a otros animales por la mordedura de perros enfermos (18). Poco después, Cardanus y Marcellus Donatus atribuyeron a la saliva de los animales enfermos la capacidad infectante (5).

Celso (100 años A.C) reconoció la relación entre la rabia en el hombre y en los perros. Plutarco y Celsus (100 años D.C) describieron los dramáticos signos clínicos de esta enfermedad y Celsus acuñó el término hidrofobia **(18)**, además estableció medidas profilácticas (después de la mordedura de un perro) que incluían la incisión inmediata de la herida y la cauterización de la misma con un hierro al rojo **(5)**. En el siglo XV ya era del dominio público la existencia de la rabia canina en España e Inglaterra **(18)**.

Se acepta que en América no existía la rabia canina antes de la llegada de los españoles conquistadores, sin embargo hay referencias indirectas de la rabia en vampiros, como queda consignado en la crónica de la conquista de Darío de Fernández y Oviedo en el años de 1514 y en la historia del descubrimiento y conquista de Yucatán de Juan Francisco Molina Solís de 1527, que relacionan el ataque de vampiros a hombres y animales, con la aparición posterior del padecimiento **(5)**. Existe también referencia de la enfermedad en los anales de la Santa Inquisición en 1709 por el Reverendo Marmolejo **(18, 34)**.

En 1719 aparecen los primeros registros en las Antillas, en Barbados en 1741 y en los estados de Virginia, Carolina del Norte y Nueva Inglaterra en 1753 en los Estados Unidos. Perú presentó una violenta epidemia en 1803 en la cual, sólo en la ciudad de Ica murieron 42 personas **(18)**.

En 1804 Zinke logró la inoculación de la rabia en perros sanos con el empleo de saliva de animales enfermos y estableció en definitiva su propiedad transmisible **(34)**. En 1806 la rabia se introdujo en Argentina por perros de caza traídos de Inglaterra. En 1821 Francois Magedic y Gilbert Breschet infectaron canes con saliva humana, demostrando que en ambos casos estaba implicado el mismo agente **(5)**. En 1879 Galtier experimenta la transmisión de rabia a cerebros de conejos y la infección de conejo a conejo. Las descripciones clínicas formaban la base del diagnóstico hasta la llegada del microscopio óptico **(34)**. En 1881 Pasteur, Chamberlain, Roux Y Thuillier, demuestran la virulencia del sistema

nerviosos de los animales enfermos de rabia, e inoculan intracerebralmente el material sospechoso para así reproducir la enfermedad. El 6 de julio de 1885 se vacuna por primera vez al hombre (al niño Joseph Meister de 9 años de edad), con la vacuna de Pasteur (18).

En 1889 Babes introduce un tratamiento post-exposición contra el virus rábico, a través de la administración simultánea de suero antirrábico y vacuna. En 1903 fue realizada una clara descripción de la interacción viral y neuronal por Negri con la detección de las inclusiones citoplásmicas (cuerpos de Negri) en las neuronas de animales rabiosos; sin embargo fue hasta 1913 que su técnica quedó establecida como diagnóstico (34).

En 1927 Sellar y Fellow simplifican la técnica de diagnóstico, en 1939 se adapta el virus al embrión de pollo y de pato obteniéndose "cepas" avianizadas para inmunizar a los animales y al hombre. En 1968 Sellers aplica el método de tinción directa y la histopatología para el diagnóstico de la rabia. Los métodos de diagnósticos se complementaron cuando Goldwasser y Kissling describieron el método de detección del virus rábico con anticuerpos fluorescentes, quedando establecido como el estándar de oro para el diagnóstico hasta la fecha (18).

### 3.- CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El virus rábico del género *Lyssavirus* pertenece a la familia **Rhabdoviridae** la cual se encuentra en el orden de los **Mononegavirales** (virus envueltos, RNA negativo no segmentado) junto con la familia **Paramixoviridae** (virus Sendai, de la enfermedad de Newcastle, del Sarampión, virus sincicial respiratorio y rubulavirus porcino) y la **Filoviridae** (virus de Marburg y Ebola). Dentro de la familia **Rhabdoviridae** existen patógenos que afectan a plantas y animales vertebrados e invertebrados. Los géneros *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus* afectan a las plantas y los géneros *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* y *Vesiculovirus* afectan a los animales (34,53).

El virus rábico tiene forma de bala con un diámetro de 30 a 75 nm y una longitud de 100-300 nm. Los rhabdovirus animales usualmente son menores de 180 nm, pero los aislados de plantas pueden ser mayores. Existen variaciones en la longitud entre las cepas de virus rábico como el virus CVS (*Challenge Virus Standard*) que es más largo que el PV (*Pasteur Virus*). Las partículas defectuosas son de menor tamaño (20-50% la longitud de las partículas infecciosas estándar) ya que entre el 50% y 80% de su genoma está incompleto (58).

El virión puede estar dividido en dos partes estructurales, un cilindro central y denso formado por la ribonucleoproteína (RNP) o nucleocápside con forma helicoidal (es extremadamente compacta) y una capa delgada (8 nm ancho) cubierta con proyecciones espiculares que tienen 10 nm de largo, 3 nm de diámetro y un espacio entre una y otra de 5 nm (58).

El virus contiene múltiples copias de las siguiente 5 proteínas:

Nucleoproteína (N), fosfoproteína (NS), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) y transcriptasa (L). Las proteínas N, NS y L están unidas no covalentemente al RNA del virión y la unión de éstas forma el complejo ribonucleocápside la cual forma la estructura helicoidal dentro del virión. El complejo de la nucleocápside está cubierto de lipoproteína consistente de proteína M y las proyecciones superficiales de proteína G que se extienden hacia el exterior del virus. Las proteínas M y G forman la envoltura (Figura 1 y 2).

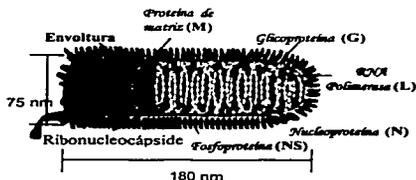


Fig. 1 Virus rábico corte longitudinal

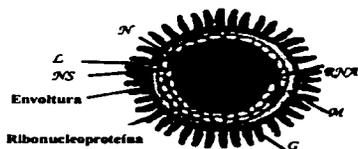


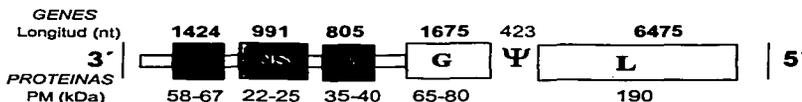
Fig. 2 Virus rábico corte transversal

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.1. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

El genoma del virus es de una sola cadena de RNA no segmentado, antisentido y de aproximadamente 12 kb. Contiene 5 genes monocistrónicos que codifican para 5 proteínas (N, NS, M, G y L) (65).

Dentro del genoma existen regiones intergénicas que varían tanto en longitud como en composición. Una de ellas de 423 nucleótidos de largo se considera que es un pseudogen de alguna sexta proteína que existía dentro del genoma, tiene un codón de inicio (ATG nucleótido 4994) y 17 codones más, aunque no se ha identificado ningún polipéptido sintetizado a partir de esta secuencia (35).



**Fig.3** Organización de los genes del virus rábico incluyendo las proteínas que codifican y sus pesos moleculares.

**Nucleoproteína (N).** Es un polipéptido fosforilado de 450 aminoácidos (aa) con un peso molecular de 58-67 kDa. Es el mayor componente de la ribonucleoproteína viral pues cada virión contiene 1750 moléculas. La asociación de la proteína N con la RNP puede disminuir la degradación del RNA por ribonucleasas, puede restringir la configuración del RNA y puede tener funciones regulatorias durante la transcripción (formación de RNAm para la síntesis de proteínas virales) y de la replicación (multiplicación de RNA viral). Esta proteína es el principal blanco antigénico de las células T-cooperadoras (34,58).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Fosfoproteína Nominal (**NS, M1 o P**). Es una proteína altamente hidrofílica de 297 a 303 aa con un peso molecular de 22-25 kDa, es parte de la RNP viral y hay 950 moléculas de ésta por virión. Una protein-quinasa celular fosforila la proteína NS, lo cual sugiere un importante papel en la estructura o función de la proteína. La fosforilación le provee una carga negativa que se incrementa por el contenido de aspartato y glutamato. En contraste con la diversidad en los vesiculovirus, las secuencias de la fosfoproteínas de virus rábico presentan una homología del 92 al 98% (**34,58**).

Proteína de Matriz (**M o M2**). Contiene 202 aminoácidos y tiene unido covalentemente ácido palmítico, su peso molecular es de 35-40 kDa y hay 1650 moléculas de esta proteína en cada virión. Su función primaria es mantener una interacción entre el dominio citoplasmático de la proteína G y la RNP durante el ensamblaje y salida del virus (**34,58**).

Glicoproteína (**G**). La proteína madura contiene 504 aminoácidos con un peso molecular de 67 kDa. Tiene dos segmentos hidrofílicos típicos de su naturaleza transmembranal. Cada virión contiene entre 1200 y 1800 moléculas de proteína G en forma de aproximadamente 400 a 600 espículas triméricas estrechamente unidas a la superficie del virus. Existen 3 dominios: externo, transmembranal y citoplasmático con 438, 22 y 44 aminoácidos respectivamente. El ectodominio tiene dos sitios antigénicos mayores, el sitio II que es discontinuo (aa 34-42 y aa 198-200 asociados con puentes disulfuro) y el sitio III el cual es continuo (aa 330-338), en este dominio se encuentra la arginina en la posición 333 que es indispensable para la virulencia. Esta proteína es el mayor antígeno responsable de inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus y además induce a las células T cooperadoras (Tc), por lo que se considera que tiene dos partes inmunogénicas (las cuales inducen tanto anticuerpos como a las Tc) que son: una fracción que contiene el amino terminal (está incluido el sitio II) y la fracción que tiene el carboxilo terminal (contiene el sitio III) (**21, 34, 47, 58, 65**).

RNA transcriptasa (**L**). Contiene 2127 a 2142 amino ácidos con un peso molecular de 190 kDa, es la proteína más larga y ocupa más de la mitad (54%) del genoma del virus, hay 20-150 moléculas por virión. Su función incluye: síntesis de RNA, metilación, protección del extremo 5' del RNA con un GTP ("*capping*") y poliadenilación de RNA virales. Debido a que su vida media es de solo unos minutos en la célula infectada, ha sido poco estudiada. La homología en las secuencias de los rhabdovirus y otros miembros de los Mononegavirales sugieren una evolución de un antecesor común (**34,58**).

### 3.2. VARIABILIDAD GENÉTICA

Las clasificación de los virus relacionados a rabia se basa en el reconocimiento de sitios antigénicos de la glicoproteína (G) por pruebas de neutralización, lo cual ha permitido definir diferentes serotipos y es la base para diferenciar cepas.

Todas las cepas de virus rábico han sido aisladas de mamíferos e incluyen: **Serotipo 1** representado por el virus (RABV) o CVS. En este grupo se encuentran el virus de la calle aislado de animales sin modificación en el laboratorio y virus fijo adaptado a animales de laboratorio mediante pases sucesivos intracerebrales. Este es el serotipo con mayor extensión en el mundo y únicamente se encuentran libres de él Australia, Inglaterra, Irlanda, Nueva Zelanda, Japón, Escandinavia y Hawaii.

El **serotipo 2** está representado por el virus Lagos Bat (LB) que fue aislado de murciélagos frugívoros y gatos en algunos países de África. En el **serotipo 3** se encuentra el virus Mokola (MOK) que fue aislado de humanos, perros, gatos, musarañas y roedores de algunos países africanos. El virus Duvenhage (DUV) pertenece al **serotipo 4** y fue aislado de humanos y murciélagos insectívoros en Sudáfrica y Zimbawe. Los **serotipos 5 y 6** están formados por virus de murciélago Europeo tipo 1 y 2 (EBL-1 y EBL-2) respectivamente.

Se piensa que el lyssavirus de murciélago Australiano (ABL) podría formar el **serotipo 7**, sin embargo aún no se ha decidido su clasificación final. Los virus Obodshiang y Kotonkan fueron aislados de mosquitos en África y aún se está estudiando su taxonomía final (**17,27,34**). Al menos 6 de estos virus se han encontrado en murciélagos lo cual puede indicar que probablemente el virus rábico sea en realidad un virus de murciélago que ha cruzado a otras especies (**48**).

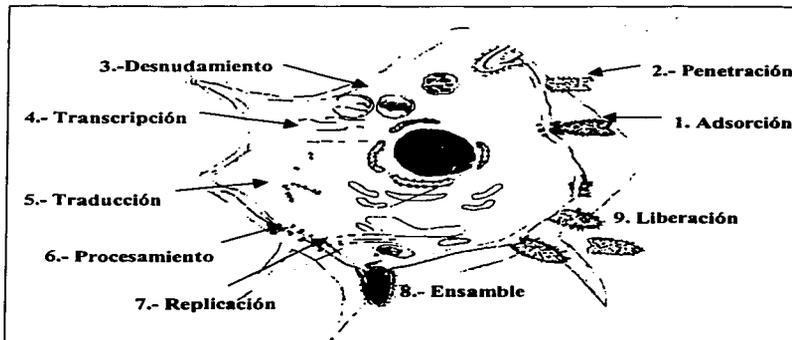
### 3.3. CICLO INFECCIOSO

En la figura 4 se esquematiza el ciclo viral a nivel celular. La fusión de la envoltura del virus a la membrana de la célula hospedera desencadena el proceso de **infección**. Inicia con la interacción del ectodominio de la proteína G con los receptores en la superficie de la célula como el de la acetilcolina (AChR) en células musculares, aunque se han propuesto otros receptores como lipoproteínas (**48**), moléculas de adhesión en el caso de las células nerviosas y varios factores de crecimiento, fosfolípidos, glicolípidos, carbohidratos y gangliósidos están involucrados (**34, 27, 47**).

Después de la **adsorción** el virus penetra a la célula hospedera y entra al citoplasma por pinocitosis. Los viriones se agregan en endosomas (vesículas citoplasmáticas). El pH ácido (5.7 - 6.1) dentro de las vesículas endocíticas de la célula, activa la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal provocando el **desnudamiento** viral y como consecuencia la liberación de la RNP dentro del citoplasma (**58, 27**).

Los lyssavirus tienen RNA de cadena sencilla y **negativa** que no puede ser usado directamente para la síntesis de las proteínas virales, para ello primero debe ser producido un **RNA+** que es sintetizado por la polimerasa viral (L), la cual reconoce al RNA viral encapsidado por la proteína N en su extremo 3' y realiza la **transcripción** primero de un RNA líder que no es modificado (no sufre poliadenilación ni "**capping**") y 5 RNA's poliadenilados y con "**capping**" que codifican para las proteínas N, NS, M, G y L (**58**).

Después de la transcripción, los mensajeros rábicos son procesados por la maquinaria de **traducción** celular, muchos de ellos son expresados en los ribosomas libres en el citoplasma. La proteína G es transportada a la membrana citoplásmica de la célula después de su glicosilación (65). La **replicación** o síntesis del RNA genómico viral, comienza solo hasta que se ha llevado a cabo la transcripción de los mRNAs y así la proteína N acumulada regula el cambio de transcripción a replicación en la cual el RNA de cadena positiva actúa como un molde para la síntesis de la cadena complementaria negativa. Antes de que el virus brote se inhiben la transcripción y replicación simultáneamente. Durante el proceso de **ensamblaje**, el complejo N-NS-L encapsula el RNA genómico negativo para formar la RNP y la proteína M forma una cápsula o matriz alrededor de ésta. Posteriormente el complejo RNP-M migra hacia el área de la membrana plasmática que contiene los insertos de glicoproteína a la cual se une y finalmente el virus completo **brota** de la membrana plasmática (58, 65).



**Fig. 4** Ciclo infeccioso a nivel celular comenzando con la adsorción del virus a la célula hasta el ensamble y liberación del virus al espacio intracelular.

#### 4.- EPIZOOTIOLÓGIA Y EPIDEMIOLOGÍA

La rabia afecta a todos los mamíferos, algunas especies son llamadas "reservorios" debido a que mantienen el virus en la naturaleza.

Epidemiológicamente la rabia puede dividirse en dos grandes grupos, la Rabia Urbana y la Rabia Silvestre (Fig. 5). En la denominada **rabia urbana (A)**, el ciclo lo integran fundamentalmente el perro (en algunas ocasiones el gato) como especie reservorio y el hombre como especie que cierra el ciclo. En la **rabia silvestre (B)** intervienen varias especies animales, según el nicho ecológico y geográfico de que se trate.

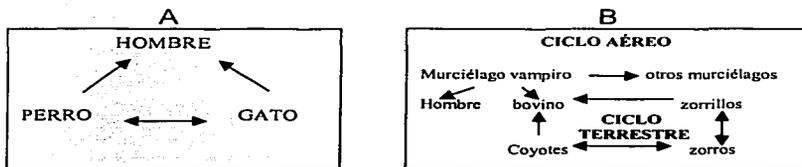


Fig. 5 Ciclos de Rabia Urbana (A) y Rabia Silvestre (B) que muestran las especies involucradas en la permanencia de la rabia en la naturaleza.

En los países en vías de desarrollo de Asia, África y partes de América latina incluyendo México, la rabia urbana sigue siendo la mayor causa (90%) de exposición y de casos en humanos. En Asia los perros, gatos, monos, mangostas y zorros árticos, representan los principales reservorios, mientras que en África las mangostas importadas de las islas Caribeñas son un reservorio importante además de los perros, chacaes y zorros. En América Latina los murciélagos hematófagos son de gran interés ya que atacan al ganado y han ocurrido algunos incidentes de mordeduras a humanos.

En los países desarrollados en donde la rabia urbana ha sido controlada, la rabia silvestre es la que presenta mayor importancia. En Europa existen dos tipos de reservorios y ambos son silvestres, el primero es el zorro y el segundo los murciélagos; sin embargo el perro sigue siendo un reservorio importante en el este de Europa. En EUA los reservorios de importancia son el mapache, zorrillo, murciélago insectívoro, zorro y coyote **(43, 47,48,61)**.

La OMS registra que cada 10 a 15 minutos alguien muere de rabia en el mundo y cada hora mil personas reciben tratamiento antirrábico. A nivel mundial se estima que mueren anualmente entre 40 mil a 70 mil personas que fueron agredidas por perro **(37)**.

La epidemiología de la rabia ha sido revolucionada por el descubrimiento de anticuerpos monoclonales en 1978 **(53)**. El conjunto de estos anticuerpos dirigidos contra los epítopes específicos de aislados de diferentes especies animales y de diferentes lugares geográficos, son utilizados para identificar las cepas de virus. Actualmente es posible identificar un aislado de humanos o animales y determinar cuál fue la fuente de infección. La secuenciación del genoma viral con la transcriptasa reversa sobre el RNA para producir cDNA que es amplificado por la DNA polimerasa termoestable (RT-PCR), ha permitido conocer y analizar la variabilidad de cepas **(47)**, además de que la combinación del método de RT-PCR con la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real ha permitido identificar rápidamente el genotipo de una muestra evitando cualquier contaminación de otros productos de PCR **(11)**.

En México se ha desarrollado un estudio para conocer la epizootiología molecular de la rabia y la dinámica de la enfermedad entre los reservorios. Se encontró que existen dos filogrupos, uno asociado a murciélagos (principalmente vampiros) y el otro asociado a reservorios terrestres (zorrillos, zorros, perros, coyotes). Este estudio permitió determinar con una alta precisión los principales reservorios que están presentes en México lo cual contribuye al conocimiento de los lugares y especies en las cuales es necesario una mayor prevención y control **(60)**.

## 5.- ENFERMEDAD

Experimentalmente el virus puede ser transmitido por cualquier vía de inoculación: intradérmica, subcutánea, intramuscular, por escarificación, en el cojinete plantar, instilación en el saco conjuntival, intraocular, intralingual, instilación nasal, endovenosa, aerosoles y oral. La susceptibilidad varía según la vía y en algunos casos según la cepa utilizada. La dosis de exposición y el sitio juegan un papel importante en la transmisión de la enfermedad; la presencia de ropa (especialmente gruesa) y de pelo o lana en los animales, podría ocasionar que aunque los dientes llegaran a lacerar la piel, la saliva (y por lo tanto el virus) quedara en su mayor parte impregnada en la ropa o en la lana (17).

La transmisión de la rabia usualmente comienza cuando la saliva de un hospedero infectado tiene contacto con un animal no infectado. La exposición puede ser *leve* en la cual ocurren lameduras en la piel erosionada o mordeduras superficiales (que involucra epidermis, dermis o tejido celular subcutáneo) en tronco y miembros inferiores. La exposición *grave* consiste en lamedura en mucosas (ya sea ocular, nasal, oral o genital), mordedura superficial en cabeza, cuello, manos o genitales, mordedura profunda en cualquier parte en la cual se perfora el tejido muscular y paquetes neurovasculares o mordeduras múltiples. La transmisión de la rabia también puede ser aérea en cavernas con guano (heces) y orina de murciélago, por accidentes en laboratorio (22, 48), de humano a humano por ejemplo en trasplante de córnea contaminada con rabia (17, 65). La enfermedad en humanos puede dividirse en 5 etapas clínicas: periodo de incubación, prodromo, fase neurológica aguda, coma y muerte (47).

*Periodo de incubación:* Después de la inoculación de saliva infecciosa por mordida, el virus puede quedarse en el sitio de inoculación por horas o semanas, puede estar en la periferia, puede permanecer secuestrado dentro de neuronas o puede persistir en los macrófagos a partir de los cuales posteriormente se reactiva y produce la enfermedad.

Se han desarrollado estudios que sugieren (al menos *in vitro*) que la RNP semipurificada inhibe el estallido respiratorio en fagocitos mononucleares lo cual muestra que tiene un efecto modular de la respuesta inmune y esto podría representar una ventaja a favor del virus (39).

La dispersión del virus probablemente es facilitada por el movimiento a través de las conjunciones de célula a célula, la distribución via fluido cerebroespinal puede contribuir también al esparcimiento del virus dentro del Sistema Nervioso Central (SNC), sin embargo no se conoce con certeza si se replica o no en el sitio de inoculación, pero una vez que entra al sistema periférico nervioso se mueve centripedamente dentro de los axones al SNC con una velocidad aproximada de 3 milímetros por hora (27). No hay síntomas y generalmente dura de 1 a 3 meses. El tiempo más corto ha sido de 4 días y el más largo han sido de hasta 7 años (48). Los periodos de incubación tienden a ser más cortos después de exposiciones graves. Al final de esta etapa el virus penetra los nervios periféricos y sube en forma centripeta a la médula espinal y el cerebro a partir del cual se distribuye hacia una gran variedad de órganos (riñón, páncreas, corazón, folículos pilosos, retina y córnea) hasta llegar a las glándulas salivares.

*Periodo prodrómico:* Su duración es de 2 a 10 días. Los síntomas iniciales pueden ser no específicos como son: respiratorios, gastrointestinales o nerviosos (dolor de cabeza, fatiga, vértigo, irritabilidad, nerviosismo, fiebre, malestar, dolor de garganta), en algunos individuos afectados se puede presentar parestesias (hormigueo, ardor, frío) en el lugar de la mordedura y en ocasiones prurito. Se ha reportado también aprehensión, ansiedad, agitación, irritabilidad, nerviosismo, insomnio o depresión (4). Los anticuerpos neutralizantes suelen aparecer a los ocho o nueve días después de los primeros síntomas, mientras que los anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo se elevan a partir de los diez u once días (47). La inmunidad celular se presenta mediante las células CD8+ y CD4+ virus-específicas (4, 47).

*Periodo neurológico agudo:* empieza cuando aparecen los síntomas específicos: rigidez nuchal, parestesias, convulsiones tanto focales como generalizadas, hiperventilación, hipersalivación, hiperactividad, alucinaciones, desorientación, comportamiento extraño, parálisis y en raras ocasiones aumento de la libido. Durante esta etapa la coherencia mental del paciente se deteriora gradualmente durante un periodo de 2 a 12 días. La rabia puede presentarse de forma furiosa o parálitica (muda) (4, 22). El virus de la rabia produce una inflamación escasa en el sistema nervioso central a diferencia de la que producen otros virus (como las encefalitis equinas). En la rabia se infectan una gran cantidad de neuronas sin una franca citopatología (63).

Durante el periodo de transición entre las fases nerviosas y el *coma*, aparecen periodos de respiración rápida e irregular, luego una parálisis generalizada y coma típico de otras encefalitis. Aunque la encefalitis es ampliamente extendida, la destrucción neuronal no lo es (63). La *muerte* probablemente resulta de la infiltración a los centros que controlan el sistema cardio-respiratorio. Si no hay cuidado médico intensivo, la persona muere dentro de siete días, principalmente debido a problemas respiratorios. En los pacientes bajo cuidado intensivo (generalmente sobreviven varios meses), se afectan casi todos los órganos. Hasta la fecha solo existen 7 casos de sobrevivientes humanos que mostraron signos de la enfermedad, al menos cuatro de ellos se recuperaron con secuelas y uno con severas perturbaciones neurológicas. Casi en todos los casos existió vacunación (47,48).

## **6.- TRATAMIENTO**

Ningún antiviral, esteroide o interferón ha sido efectivo como tratamiento para la enfermedad de la rabia, ya que ésta es fatal. Las únicas medidas que se pueden tomar son la aplicación de sedantes y las atenciones necesarias para prolongar la vida pero no se puede evitar la muerte (47).

## 7.- DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de rabia requiere la diferenciación entre una gran variedad de enfermedades que causan síntomas neurológicos similares como son el Síndrome de Guillain-Barré, poliomielitis y otras encefalitis virales (63).

Debido a que el diagnóstico de laboratorio normalmente no es posible durante la primera semana de la enfermedad a menos que se sospeche de rabia, el diagnóstico se basa en los síntomas clínicos. El diagnóstico definitivo se establece mediante el aislamiento del virus rábico, la detección de su ácido nucleico o de su nucleoproteína. También se pueden determinar anticuerpos antirrábicos, principalmente en el fluido cerebroespinal. A partir del día en que aparecen los síntomas de la enfermedad se puede efectuar el diagnóstico por medio de la identificación del virus con anticuerpos fluorescentes en biopsias del cuero cabelludo con pelo. La presencia de cuerpos de Negri es únicamente de interés histológico ya que esta prueba no está avalada como parte del diagnóstico cotidiano debido a que su presencia o ausencia no implica ni descarta necesariamente la infección por virus rábico (36,47,63).

El diagnóstico *postmortem* puede realizarse a partir de especímenes de tálamo, médula, hipocampo y cerebelo con la prueba de Inmunofluorescencia directa (IFD) a partir de tejidos frescos o fijados en formol al 10% (63,19.). El tálamo es el sitio en donde se aloja en mayor concentración el virus, por lo que el estudio de esta región evita obtener falsos negativos lo cual puede suceder con el hipocampo y cerebelo (10). La prueba inmunohistoquímica con avidina-biotina, la cual ha demostrado tener una correlación de 98% con la IFD (32) es de gran utilidad también. Ambas técnicas son sensibles y específicas en la detección del virus.

El uso de anticuerpos (particularmente de aquellos que reconocen los epítopes de la proteína N) es útil debido a que proporciona buenos resultados aún cuando los tejidos han sido fijados con formol o en parafina (34). La identificación del antígeno viral en biopsias de piel de la cara o cuero cabelludo de la porción occipital del cuello, al igual que impresiones de córnea por medio de IFD, es un método rápido de diagnóstico de la rabia en humanos antes de que mueran.

La reacción en cadena de la polimerasa acoplada con la transcripción reversa (RT-PCR) ha sido utilizada para amplificar secuencias del genoma de los lyssavirus directamente de cerebro, saliva y otros tejidos infectados (25, 34) e incluso se ha utilizado para detectar al virus en tejidos descompuestos y en pequeñas muestras de animales vivos (46, 51).

## **8.- VACUNAS ANTIRRÁBICAS**

Durante mas de 70 años después de el trabajo original de Pasteur, únicamente se contó con vacunas realizadas a partir de tejido nervioso. Fermi y Semple introdujeron algunas modificaciones a la vacuna original utilizando fenol para inactivar parcial o totalmente al virus. Las reacciones adversas de este tipo de vacunas se observó desde los tiempos de Pasteur, ya que además de las complicaciones neurológicas atribuidas a la presencia de mielina, el virus fijo puede ser patogénico en humanos ya que en algunos casos ocurrió parálisis después de la aplicación de vacuna la cual no estaba totalmente inactivada (47,48).

Desde 1885 a la fecha se han desarrollado diferentes vacunas utilizando distintos sustratos, cepas, formas de inactivación, purificación y aplicación. En la tabla 1 se mencionan algunas de las principales características de diferentes vacunas.

Nombre	Cepa	Sustrato	Observaciones	Ref.
<b>Vacunas obtenidas en tejido nervioso</b>				
Pasteur 1885	Pasteur	Cordón espinal de conejo	Virus vivo residual. Ya no es utilizada en ningún país debido a su alto riesgo. Inactivada por secado.	47
Fermi 1908	Virus fijo	Cerebro de oveja, cabra o conejo	No se utiliza en ningún país debido a que en muchas ocasiones contenía virus vivo residual y tejido nervioso que causaba enfermedades neurológicas. Virus vivo fenolizado.	47
Semple 1911	PV	Cerebro de animales	Contiene tejido nervioso. Aún se utiliza en países subdesarrollados de Asia y África. Inactivada con fenol.	48 54
Fuenzalida 1956	51,91 CVS	Cerebro de ratón lactante	Contiene mielina lo cual puede ocasionar trastornos neurológicos. Es utilizada en Sudamérica. Inactivada con luz ultravioleta.	53 54
<b>Vacunas obtenidas en embriones de aves</b>				
DEV 1956	PM	Embrión de pollo	Ya no se utiliza en ningún país debido a que en algunas ocasiones producía alergias y su inmunogenicidad era muy baja. Inactivada con BPL.	48 4
PDEV 1983	PM	Embrión de pollo	Se utiliza en todo el mundo y es una vacuna purificada por ultracentrifugación. Inactivada con BPL.	48
<b>Vacuna obtenidas en cultivos de células</b>				
HDCV 1976	PM- L503 3M ERA	MRC-5	Es el estándar mundial de vacuna rábica. Se utiliza en todo el mundo pero es muy costosa. Inactivada con BPL.	13 53
RVA 1988	CVS	C. fetales de resus	Se utiliza en Estados Unidos de América (EUA) y tiene el inconveniente de que produce algunas reacciones alérgicas. Inactivada con BPL.	48 7
PHKCV	Beijing	C. riñón de hamster	Es utilizada en la República China. Inactivada con formol.	9 48
PCECV 1980's	Flury LEP-C25	C. embrión de pollo	Es utilizada en todo el mundo, principalmente en Alemania y EUA. La vacuna es purificada por ultracentrifugación. Inactivada con BPL.	6 48
PVRV 1984	PM	C. Vero	Es utilizada en todo el mundo, principalmente en Francia. La vacuna es purificada por ultracentrifugación. Inactivada con BPL.	38
CPRV	PM	C. Vero	Es una variación de la PVRV, purificada por columnas. Produce menos reacciones de hipersensibilidad que la HDCV. Inactivada con BPL.	24
DKCV	PM	C. riñón de perro	Purificación por filtración en columnas con Sefarosa 6B. Inactivada con BPL.	8 48
<b>OTRAS VACUNAS</b>				
MLV 1960	ERA, SAD y otras	Células BHK	Vacuna de virus vivo modificado utilizado en la inmunización oral de varias especies animales como son: lobo, zorro, mapache.	48
VRG 1996	ERA	Virus vaccinia	Es una vacuna recombinante, se utiliza el genoma de la glicoproteína insertado en el virus de vaccinia. Es administrada a animales salvajes.	29 52 47
Vacuna Genica	CVS	Plásmido pCIneo	Actualmente se está probando la vacuna; sin embargo se requiere de algún adyuvante para emplear menores dosis de DNA vacunal. El empleo en humanos es controversial.	3 31 44

**Tabla 1** Vacunas Antirrábicas de uso humano y animal, obtenidas a partir de diversos sustratos y cepas virales. Abreviaciones: DEV, vacuna de embrión de pato; PDEV, vacuna purificada de embrión de pato; HDCV, vacuna de cultivo de células humanas diploides; RVA, vacuna de rabia adsorbida; PHKCV, vacuna rábica de células primarias de riñón de hamster; PCECV, vacuna purificada de cultivo de células de embrión de pollo ; PVRV, vacuna Vero rábica purificada; CPRV, vacuna Vero rábica purificada por cromatografía; DKCV vacuna de células de riñón de perro; MLV virus vivo modificado; VRG Proteína G de virus rábico; PV virus fijo Pasteur; PM, Pitman Moore; CVS, cepa de virus reto; ERA, Erclyn-Rokitnicki-Abelseth; Flury LEP Flury pase corto en huevo; SAD, Street Alabama -Dufferin; C., células; MRC-5, células diploides humanas; BHK, células de riñón de hamster bebé; BPL,  $\beta$ -propiolactona.

### **8.1. VACUNACIÓN PRE-EXPOSICIÓN**

La OMS recomienda un régimen de 3 dosis en los días 0, 7 y 21 ó 28 vía intramuscular. También se puede utilizar la vía intradérmica, aplicando 0.1 mL en los mismos días excepto en el caso de que la persona haya recibido tratamiento contra la malaria (cloroquina) (64). Se han desarrollado diferentes estudios que sugieren nuevos esquemas de inmunización para disminuir costos. Al personal que se encuentre en riesgo continuo se le debe realizar una determinación del título de anticuerpos cada 6 meses (2).

### **8.2. VACUNACIÓN POST-EXPOSICIÓN**

Las recomendaciones generales para el tratamiento cuando se sospecha de exposición al virus de la rabia son:

- A) Limpieza: Lavar y aplicar un desinfectante en el sitio de la herida.
- B) Inmunización pasiva: Aplicar inmunoglobulina anti-rábica (RIG) de acuerdo a las especificaciones emitidas por la OMS. Debido a su baja disponibilidad por su alto costo, se está estudiando la posibilidad de sustituirla por anticuerpos monoclonales.
- C) Inmunización activa: Aplicación de vacuna antirrábica humana, utilizando cualquier de los regímenes sugeridos por la OMS (2, 20, 26, 64 ).

## **9.- CONTROL DE LA RABIA**

El control de la rabia urbana se lleva a cabo por la vacunación masiva de perros y gatos con distintos tipos de vacuna existentes en el mercado (inactivada y recombinante) (15). En los países desarrollados se aplica la vacunación oral en animales silvestres; sin embargo se ha observado que estas vacunas no inmunizan a los mapaches, lo cual ha llevado a realizar estudios sobre nuevas vacunas (40).

Actualmente, el control de la rabia en murciélagos hematófagos se lleva a cabo reduciendo la población de éstos por envenenamiento con anticoagulante (warfarina) o por el tratamiento sistémico del ganado con Difenadiona suspendida en Carbapol (18); sin embargo se están llevando a cabo estudios para evitar exterminar a todos los murciélagos hematófagos, desarrollando vacunas que en un futuro puedan controlar la enfermedad en los murciélagos de varias especies (55).

En México se ha implementado un programa estratégico para el control y erradicación de perros y gatos callejeros que abarca la educación y cultura de la población por varios medios, vacunación antirrábica gratuita, ovariosterectomía y castración, implementación de normas que legislen la posesión de animales, donación y recolección de animales no deseados para su sacrificio, entre otros (14).

## **10.- PRODUCCIÓN DE VACUNA ANTIRRÁBICA HUMANA EN CULTIVOS DE CÉLULAS VERO**

### **10.1. LÍNEAS CELULAR CONTINUAS (1, 41)**

Las líneas celulares continuas tienen una longevidad potencialmente infinita y se han obtenido por alguno de los siguientes métodos:

- a) Subcultivo en serie de un cultivo de células primarias de un tumor humano o animal (HeLa, Namalva).
- b) Transformación de una célula normal con un virus oncogénico (linfocito B transformado con virus Epstein Barr).
- c) Subcultivo en serie de una población de células normales que genera una nueva población de células de longevidad infinita (Vero, BKH-21, CHO).
- d) Fusión de una célula de mieloma y un linfocito B (producción de anticuerpos).

**Ventajas del uso de líneas celulares continuas.**

- a) Se encuentran bien caracterizadas y normalizadas. Se pueden conservar en un Banco Celular.
- b) Son menos exigentes que las células diploides.
- c) Crecen bien en medios y sueros ordinarios, incluso hay algunas que no requieren suero.
- d) Pueden crecer en biorreactores sobre microportadores.

**Desventajas del uso de líneas celulares continuas.**

- a) Muchas líneas expresan virus endógenos y son tumorigénicas.
- b) Existe el riesgo TEÓRICO de tumorigenicidad asociada al DNA residual que puede codificar proteínas transformantes.
- c) Pueden acarrear proteínas promotoras de crecimiento.
- d) Pueden estar contaminadas de virus y otros agentes transmisibles como el SV40, retrovirus tipo A.

**10.2. CÉLULAS VERO**

La línea celular Vero fue establecida en 1962 partiendo de un cultivo primario de células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Después de varios pases, la línea fue incluida en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC *American Type Culture Collection*) y en 1979 fue establecido el banco primario celular comenzando de una ampula de células en pase 124 , éste fue utilizado para realizar el banco de células de trabajo, el cual fue analizado de acuerdo a los requerimientos de líneas celulares utilizado para la producción de vacunas virales inactivadas con **(38)**:

- a) Pruebas de identidad.
- b) Pruebas de esterilidad.
- c) Pruebas de detección de agentes víricos con cultivos celulares.
- d) Pruebas de detección de agentes víricos con animales y huevos.
- e) Pruebas de detección de retrovirus y otros virus o ácido nucléico vírico endógenos.
- f) Pruebas de detección de virus particulares.
- g) Pruebas de tumorigenicidad.
- h) Pruebas en células que contiene un sistema de expresión de ADN recombinante.

El riesgo potencial de tumorigenicidad asociado con el uso de las células Vero fue estudiado en ratones atímicos sin pelo y hamsters Sirios. La prueba fue negativa en hamsters, mientras que los ratones mostraron evidencias de formación de nódulos en el sitio de inoculación, sin embargo no se observó metástasis como ocurre en las células HeLa o Hep 2 que son tumorigénicas (57).

La inoculación de animales con células Vero, no tiene efecto tumorigénico hasta el pase 169, de acuerdo a esto se utilizaron cultivos celulares en pase 137 para el banco de trabajo y el pase 142 como máximo pase para la producción de vacunas (38). La OMS comprobó que entre los pases 134-150 las células Vero no son tumorigénicas (41).

### 10.3. PREPARACIÓN DE LA VACUNA ANTIRRÁBICA.

Se realiza la **descongelación** de la semilla celular de trabajo y se hacen **pases** consecutivos hasta tener la cantidad de células necesarias para sembrarlas en un biorreactor con microacarreadores. Se descongela la semilla viral y se realiza la **infección** de las células Vero. Se obtienen 5 a 6 **cosechas** cada 48 horas, en las cuales hay DNA celular libre. Se eligen las que tienen mejores títulos virales para someterlas a un proceso de **clarificación** para eliminar restos celulares por medio de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  (no se elimina el DNA) y posteriormente se realiza una **concentración** (10-25 veces) por ultrafiltración tangencial a través de una membrana que permite el paso de moléculas de 100,000 Daltones. En este paso el virus junto con partículas mayores al límite de la membrana (incluyendo el DNA celular) se quedan en la superficie y posteriormente se recuperan en un volumen menor llamado **concentrado** el cual se **inactiva** por medio de la  $\beta$ -propiolactona, después se **purifica** (de proteínas y DNA residual) mediante una ultracentrifugación en flujo continuo de sacarosa, por último se **formula** con una (o varias) sustancia (s) que le provea de al menos 2 años de estabilidad y se **liofiliza** (Figura 6).

Los análisis de control de calidad se realizan a lo largo del proceso y en el producto terminado (figura 7), éstos involucran pruebas **físicoquímicas** como humedad, hermeticidad, pH, tiempo de disolución y pruebas **biológicas** como son las pruebas de esterilidad (agentes adventicios en animales y células, prueba de micoplasma y tuberculosis y determinación general de otras bacterias, hongos o virus), pruebas de identidad celular (cariotipo, isoenzimas, tumorigenicidad), pruebas de inocuidad, potencia y estabilidad (**16, 33, 42**).

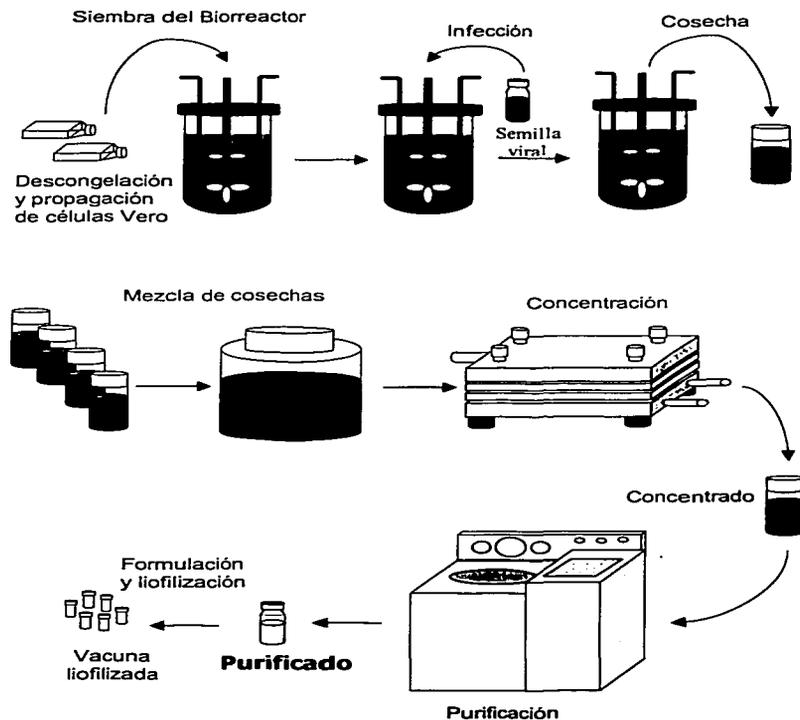
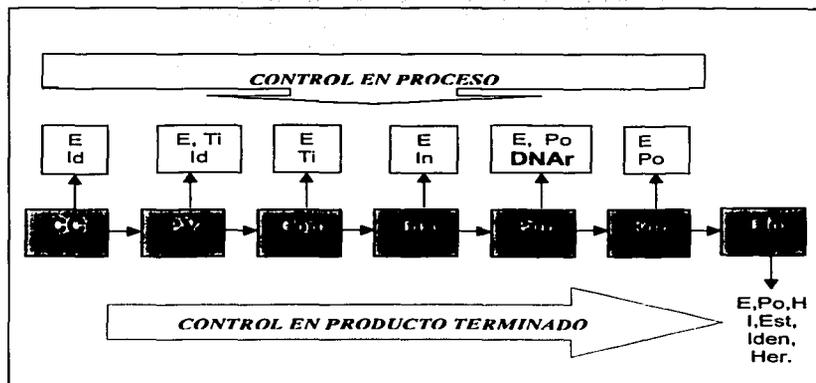


Fig. 6 Esquema de la producción de Vacuna Antirrábica para uso humano en un biorreactor de 2 Litros, utilizando células Vero unidas a microportadores como sustrato.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 7** Control de Calidad en la producción de vacuna antirrábica humana  
 CC- Cultivo Celular; PV- Producción viral; Con- Concentración; Ina- Inactivación; Pur-Purificación;  
 For- Formulación; Lio- Liofilización; E- Esterilidad, Id- Identidad TI-Titulación; In- Prueba de  
 Inactivación; Po- Prueba de Potencia; DNAr- DNA residual de células Vero; H-Humedad, I-Inocuidad;  
 Est-Estabilidad; Her- Hermeticidad, Iden identidad

La norma para la utilización de células animales como sustratos *in vitro* en la producción de sustancias biológicas (41) indica que dichos productos no pueden tener una cantidad mayor de 10 ng de DNA residual de la línea celular utilizada, por dosis de vacuna que se aplique inyectada. Por esta razón existe la necesidad de cuantificar la cantidad de DNA celular en la vacuna a granel (producto purificado no terminado). Para ello existen varios métodos de cuantificación desde muy sencillos y económicos hasta algunos muy sofisticados y costosos. El proceso de purificación debe ser validado por métodos apropiados, es preciso demostrar la uniformidad entre 3-4 lotes consecutivos (41) y estandarizar el método de detección de la cantidad de DNA residual (50). En la tabla 2 se mencionan algunos métodos y su principal utilidad.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

<i>Método</i>	<i>Descripción</i>	<i>Ref</i>
Espectrofotométrico	Se utiliza cuando la muestra está pura y la cantidad de DNA es $\geq 250$ ng/mL. La absorbancia de la muestra se determina a 260nm.	56
Fluorometría	Se utiliza un fluorocromo (como bromuro de etidio) que se intercala en la muestra. Se estima la cantidad de DNA de la muestra comparando la fluorescencia emitida por ésta con una serie de estándares. Se utiliza para muestras impuras o $< 250$ ng/mL. Se pueden detectar teóricamente de 1 a 5 ng.	56
Hibridación No radiactiva	Se utiliza una sonda marcada con un dNTP que tiene unida una molécula como digoxigenina, ésta se hibrida con el DNA complementario que está fijo en una membrana de nylon. La cantidad de DNA se detecta por quimioluminiscencia o color. Por medio de este método se pueden detectar genes unicopia partiendo de 1 $\mu$ g de DNA.	62
Hibridación radiactiva	Se utiliza una sonda marcada con un radioisótopo que se hibrida con el DNA complementario que se encuentra fijo en una membrana de nylon. Se pueden detectar genes unicopia partiendo de picogramos de DNA.	62
Inmunoenzimático	Se utiliza una proteína con afinidad por el DNA de cadena sencilla. Esta proteína está conjugada con una molécula de biotina y posteriormente se utiliza un anticuerpo anti-DNA conjugado con ureasa el cual al reaccionar con urea propicia un cambio de pH que es detectado por un sensor. Este método se usa para detectar hasta 2 pg de DNA.	28
PCR	Es un método sencillo y rápido capaz de sintetizar millones de copias idénticas de una secuencia definida de DNA partiendo de una simple copia.	62

Tabla 2. Métodos para cuantificar DNA

## 11.- PRINCIPIO DE LA TÉCNICA DE DOT-BLOT

El sistema no-radioactivo incorpora un nucleótido modificado con digoxigenina (hapteno esteroideal) durante la síntesis de DNA o RNA el cual puede usarse para la hibridación y posterior detección con color o luminiscencia.

Existen diversas técnicas para marcar DNA, como marcaje al azar, que está basada en la hibridación de oligonucleótidos de 6 a 12 bases de largo y con secuencia al azar a un molde de DNA. La enzima Klenow sintetiza DNA a partir del extremo 3'OH de los oligonucleótidos, utilizando una mezcla de desoxirribonucleótidos que contienen desoxiuridin-trifosfato modificado con digoxigenina (DIG-dUTP). Esto resulta en la incorporación de DIG en la cadena de DNA sintetizada. Este DNA puede ser detectado con anticuerpos anti-digoxigenina, que

tengan acoplada una enzima como fosfatasa alcalina, la cual cataliza la degradación de un sustrato que genera una señal que puede ser detectada por un método colorimétrico o quimioluminiscente.

## **12.- PRINCIPIO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

En abril de 1983 Kary Mullis desarrolló la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por lo cual recibió el premio Nóbel de química en 1993. La PCR es una metodología que se puede utilizar para la detección de teóricamente una sola molécula de DNA de la secuencia buscada. Por medio de esta técnica se aumenta artificialmente el número de copias del DNA, lo cual nos permite su detección en geles de agarosa o poliacrilamida.

Para realizar la reacción se requieren dos oligonucleótidos (iniciadores) específicos que se hibridan a las cadenas de DNA opuestas en una molécula blanco, flanqueando una región que se va a amplificar. Posteriormente se realiza la síntesis de DNA, utilizando la enzima termoestable DNA polimerasa (Taq). La reacción se lleva a cabo mediante ciclos sucesivos que comprenden tres temperaturas. **Desnaturalización** a 94°C en la cual las dos hebras del DNA molde se separan en cadenas sencillas. **Alineamiento** de los iniciadores, se logra a una temperatura entre 37-60°C, en ella los oligonucleótidos se acoplan con su región complementaria en las cadenas de DNA, flanqueando el fragmento que se va a amplificar. **Extensión** o síntesis de DNA, se lleva a cabo a 72°C, en esta temperatura se incorporan los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) a partir del extremo 3' de los oligonucleótidos durante la síntesis de DNA con la Taq-polimerasa. El resultado de esta reacción es la acumulación exponencial de moléculas del DNA problema, considerando que cada producto sintetizado sirve como molde, el número de copias de DNA se duplica cada ciclo de reacción, por lo que en 20 ciclos se obtendrían aproximadamente un millón de copias ( $2^{20}$ ) del DNA blanco (12,66).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las Normas Internacionales para producción de biológicos a partir de cultivos de líneas celulares continuas establecen un límite máximo permisible de DNA residual celular (10 ng/dosis), en vacunas utilizadas por vía intramuscular con el fin de evitar los riesgos que dicho DNA pueda representar como son la tumorigenicidad o la presencia de genomas virales **(41)**.

Para poder desarrollar una vacuna antirrábica humana que pueda competir en el mercado internacional, es necesario cumplir con todos los controles de calidad establecidos por la OMS y la FDA (*Food and Drug Administration*), lo cual implica entre otros, determinar la cantidad de DNA residual por dosis de vacuna.

Es imprescindible estandarizar un método adecuado de cuantificación del DNA residual ya que esta técnica será la base de la validación del método de purificación de la vacuna **(41)**. Para ello, también es necesario estandarizar el método de extracción que garantice la posterior detección de dicho DNA **(50)**.

### IV. OBJETIVOS

- Estandarizar un método de extracción de DNA a partir de monocapas de células Vero y de muestras de vacuna antirrábica humana a granel.
- Estandarizar el método de Dot-Blot utilizando digoxigenina para marcar el DNA y realizar la cuantificación de las muestras mencionadas en el punto anterior.
- Estandarizar la técnica de PCR para determinar la cantidad de DNA residual en las muestras mencionadas en el primer punto.

## V. MATERIAL Y METODO

### MATERIAL BIOLÓGICO:

- **DNA de células Vero** (extraído a partir de una monocapa confluyente de células en una botella de 175 cm<sup>2</sup>).
- **Virus Purificado** (muestra obtenida como producto de la purificación del virus rábico por ultracentrifugación en flujo continuo, ver figura 6 y 7).

### REACTIVOS.

- |   |   |
|---|---|
| • Acido Maléico                                 | • Hidróxido de sodio  |
| • Acrilamida                                    | • Marcador de peso molecular<br>ΦX174 digerido con <i>Hae</i> III |
| • Bicarbona de sodio                            | • Medio 199 1X  |
| • Bisacrilamida                                 | • Persulfato de Amonio  |
| • Bromuro de etidio                             | • Sacarosa  |
| • Citrato de sodio                              | • Solución fijadora y reveladora<br>para fotografía               |
| • Cloruro de sodio                              | • Taq Polimerasa (5 U/μL)   |
| • dNTP's  | • TEMED   |
| • DNAzol  | • Tripsina  |
| • Etanol absoluto                               | • Tris-HCL  |
| • Estuche de marcaje de DNA con<br>digoxigenina | • Tween 20  |
| • Estuche de detección de DNA<br>marcado        | • Verseno   |
| • Gentamicina                                   | • Suero Fetal Bovino  |

## EQUIPO

- Balanza analítica (OHAUS).
- Balanza granataria (OHAUS).
- BIO-DOT (GIBCO-BRL).
- Cámara de electroforesis vertical (Pharmacia).
- Cámara de Neubauer.
- Centrífuga (HERMLE).
- Coss-Linker (HOEFER). Instrumento para fijar DNA a la membrana de Nylon.
- Analizador de imágenes Eagle-Eye (STRATAGENE) que puede detectar las bandas de DNA que se encuentran en un gel teñido con bromuro de etidio y permite analizar concentraciones por densitometría.
- Gene Quant (PHARMACIA). Instrumento para cuantificar material genético (DNA, RNA ) cuya base es la espectrofotometría.
- Incubadora 37°C.
- Microscopio invertido (OLYMPUS).
- Termobloque (THERMOLYNE).

## PROCEDIMIENTO

### ***Extracción de DNA a partir de una monocapa confluyente de Células Vero en una botella NUNC de 175 cm<sup>2</sup>.***

- 1) Descartar el medio de las células.
- 2) Añadir 5 mL de una solución de Tripsina-Verseno (0.05% - 0.05%) y enjuagar la monocapa y la botella. Descartar.
- 3) Añadir 1 mL de la misma solución de Tripsina-Verseno e incubar aproximadamente 10 minutos a 37°C hasta que las células estén listas para desprenderse (se observan opalescentes a contra luz y comienza a desprenderse la monocapa y las células se observan redondeadas en el microscopio invertido a 40X).

- 4) Bajar las células golpeando ligeramente la botella.
- 5) Añadir 5 mL de Medio (M-199 1X,  $\text{NaHCO}_3$  0.17%, Suero Fetal Bovino 5%, Gentamicina 0.0077%) para detener la acción de la Tripsina-Verseno. Resuspender las células varias veces, evitando que queden células conglomeradas y se forme espuma.
- 6) Medir el volumen de la suspensión celular y hacer una cuenta en cámara de Neubauer.
- 7) Utilizar el volumen necesario de la suspensión celular para tener  $1-3 \times 10^7$  células en un tubo de centrifuga de 15 mL.
- 8) Centrifugar a 3000 rpm 10 min.
- 9) Eliminar todo el medio por decantación
- 10) Añadir 1mL de DNAzol.
- 11) Homogenizar la suspensión celular con una pipeta de 1 mL, utilizando una punta con un corte a 3 mm del extremo.
- 12) Incubar a temperatura ambiente 5 minutos y posteriormente añadir 500  $\mu\text{L}$  de Etanol Absoluto (grado biología molecular).
- 13) Invertir 10 veces y esperar unos segundos a que el DNA se precipite.
- 14) Con una punta para medir volumen de 1 a 200  $\mu\text{L}$ , recuperar la hebra formada de DNA y sumergirla en un tubo eppendorf que contenga 1 mL de Etanol al 95% (2 veces).
- 15) Dejar secar el DNA en un tubo limpio a temperatura ambiente aproximadamente 15 minutos.
- 16) Disolver el DNA con 300  $\mu\text{L}$  de agua inyectable. Si no se disuelve el DNA, se debe incubar a  $56^\circ\text{C}$  una hora.
- 17) Cuantificar el DNA por espectrofotometría en el Gene Quant.
- 18) Hacer una dilución para tener una muestra de 1 mL con una concentración de 2 ng/  $\mu\text{L}$  de DNA de células Vero.
- 19) Hacer alícuotas de esta dilución, en 6 tubos de 0.5 mL con 150  $\mu\text{L}$  cada uno.
- 20) Guardar a  $-20^\circ\text{C}$ .

**Extracción de DNA a partir de una curva estándar y de la muestra (purificado).**

- 1) Colocar en una gradilla 5 tubos eppendorf de 1.5 mL y marcarlos como 0, 1, 5, 10 y 50 (respectivamente) para realizar la curva de DNA. Añadir a cada tubo la respectiva cantidad partiendo de la solución de 2 ng/mL de DNA de células *Vero*. Posteriormente añadir a cada tubo 300  $\mu$ L de Sacarosa al 35%.
- 2) Por otro lado, colocar 300  $\mu$ L de la muestra problema en un tubo de 1.5 mL.
- 3) Agregar 200  $\mu$ L de DNAzol (thiocianato de guanidinio GIBCO) a cada tubo.
- 4) Homogenizar por inversión de 3-6 veces. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Añadir 100  $\mu$ L de etanol absoluto grado biología molecular.
- 6) Homogenizar por inversión de 3-6 veces. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos.
- 7) Centrifugar a 12,000 rpm 15 min a 4°C, siempre acomodando la abertura del tubo hacia el centro, para así saber en qué lugar queda el botón, ya que éste no se observa frecuentemente.
- 8) Decantar el tubo y sin voltearlo, escurrirlo sobre un papel filtro. Dejarlo en esta posición 5 minutos.
- 9) Limpiar el tubo por dentro con un papel filtro Whatman SIN TOCAR el fondo, ya que es ahí donde se encuentra el DNA.
- 10) Limpiar nuevamente el interior con un papel filtro húmedo y posteriormente con uno seco.
- 11) Dejar 5 minutos boca arriba el tubo a temperatura ambiente.
- 12) Añadir 500  $\mu$ L de etanol al 95%. Invertir el tubo 3-6 veces.
- 13) Centrifugar a 12,000 rpm 15 min a 4°C. Decantar el etanol y dejar boca abajo el tubo sobre un papel filtro de 15-20 minutos.
- 14) Disolver el DNA en 25  $\mu$ L de agua inyectable.

**Nota:** Se utiliza sacarosa con una concentración de 34 - 35% en la curva de DNA con el fin de simular las condiciones en las que se encuentra la muestra, ya que después de la purificación por gradiente continuo el virus y el DNA celular (si es que existe) se encuentran en una solución de sacarosa con la concentración mencionada.

Los pasos 12 y 13 se realizan con la finalidad de limpiar cualquier residuo de DNAzol que queden en las paredes, ya que al añadir el etanol dichos residuos se precipitan e inhiben la reacción de PCR.

**Técnica de Dot-Blot**

- 1) Realizar una extracción de 500  $\mu\text{L}$  de purificado (producto a granel de la vacuna) y en paralelo sembrar 10 ng de DNA de células Vero en 500  $\mu\text{L}$  de sacarosa al 35% para obtener una curva patrón (ver página y 32). Extraer el DNA y resuspender en 10  $\mu\text{L}$  de agua inyectable.
- 2) Calentar a ebullición en baño de agua los 10  $\mu\text{L}$  en los que se diluye el DNA durante 10 minutos y al terminar colocar rápidamente en hielo otros 10 minutos.
- 3) Añadir a cada tubo los siguientes elementos del estuche de Marcaje de DNA con digoxigenina: 2  $\mu\text{L}$  del tubo 5 (hexanucleótidos), 2  $\mu\text{L}$  del tubo 6 (dNTP's), 1  $\mu\text{L}$  del tubo 7 (enzima Klenow) y 5  $\mu\text{L}$  de agua inyectable.
- 4) Centrifugar a 11,000 rpm 10 segundos, para asegurar que los 20  $\mu\text{L}$  se encuentren en el fondo del tubo.
- 5) Incubar a 37°C durante 22 horas.
- 6) Detener la reacción calentando el tubo a 65°C durante 10 minutos y posteriormente introducirlo en hielo 10 minutos.
- 7) Centrifugar a 11,000 rpm 10 segundos.
- 8) En una microplaca de 96 pozos sobre hielo, realizar diluciones 1:2 de cada tubo como se indica a continuación:
- 9) A1-A12: colocar 5  $\mu\text{L}$  de agua inyectable en cada pozo.
  - Añadir al primer pozo (A1), 5  $\mu\text{L}$  del tubo con 10 ng de DNA marcado con DIG (control de marcaje).
  - Homogenizar y pasar 5  $\mu\text{L}$  al siguiente pozo y así sucesivamente hasta el pozo 12 sin olvidar descartar los últimos 5  $\mu\text{L}$  de éste, ya que de lo contrario tendría 10  $\mu\text{L}$  en lugar de 5 como todos los demás.
  - Agregar a cada pozo 45  $\mu\text{L}$  de agua inyectable.
- 10) Repetir los pasos anteriores en la fila B1-B12, utilizando el DNA extraído a partir de sacarosa al 35% con 10 ng de DNA de células Vero (curva patrón).
- 11) En los pozo C1-C12 utilizar el DNA extraído a partir de 500  $\mu\text{L}$  del purificado (producto a granel de la vacuna).

- 12) En la fila D1-D12 colocar testigos negativos (DNA de células Vero sin marcar, sacarosa y agua) para comprobar que las reacciones posteriores sean adecuadas y no haya inespecificidad.
- 13) Transferir el volumen de cada pozo (50  $\mu$ L) a un aparato para Dot-Blot (BIO-DOT) previamente armado con una membrana de nylon de 8x12 cm cargada positivamente y un papel filtro Whatman entre la primera y la segunda placa del mismo. La membrana debe haber sido humedecida con una solución SSC 2x.
- 14) Conectar el vacío durante 10 minutos.
- 15) Lavar cada pozo de la microplaca con 50  $\mu$ L de agua inyectable y transferir nuevamente al pozo correspondiente del BIO-DOT. Conectar el vacío 10 minutos.
- 16) Desarmar el BIO-DOT y pasar la membrana a un papel filtro seco.
- 17) Fijar el DNA a la membrana exponiéndola (con las muestras hacia arriba) a luz UV con intensidad de 250 joules dos veces utilizando el Cross-Linker, pasar la membrana a un recipiente y añadir 10 mL de Amortiguador "A".
- 18) Agitar a temperatura ambiente durante 1 minuto y descartar la solución.
- 19) Añadir 15 mL de Amortiguador "B" y mantener en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Descartar.
- 20) Agregar 15 mL del Anticuerpo antidigoxigenina diluido 1:10,000 en amortiguador B (1.5  $\mu$ L de anticuerpo en 15 mL de amortiguador B), mantener en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Descartar.
- 21) Realizar dos lavados de 15 minutos cada uno en agitación a temperatura ambiente con la Solución de Lavado. Descartar.
- 22) Añadir 20 mL de la Solución de Detección, agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Descartar.
- 23) Añadir 1 mL del sustrato CSPD (dioxietano) 0.25 mM y con la micropipeta de 1000  $\mu$ L esparcirlo por toda la membrana durante 5 minutos (recuperar el sustrato y guardarlo a 4°C en un eppendorf ámbar para utilizarlo una vez más).

- 24) Dejar escurrir la membrana y colocarla sobre un papel filtro seco para eliminar el exceso de CSPD. Introducir la membrana entre un par de acetatos e incubar a 37°C 15 minutos en oscuridad.
- 25) Meter la membrana en un cassette para rayos X y en el cuarto oscuro colocar una placa para rayos X. Dejar en la oscuridad de 10-15 minutos.
- 26) Revelar la placa (en el cuarto oscuro) sumergiéndola 2 minutos en solución reveladora, 30 segundos en agua, 2 minutos en solución fijadora y 30 segundo en agua. Dejar secar a temperatura ambiente.
- 27) Capturar la imagen de la placa en el analizador de imágenes EAGLE-EYE y utilizar la herramienta de densitometría para obtener los datos de cada muestra.

#### ***Técnica de PCR***

Para cada reacción de 50  $\mu$ L se necesitan las siguientes concentraciones finales:

- a) Deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) 0.2 mM de cada uno.
- b) Tris-HCl 10 mM pH 8.5, KCl 50 mM (Buffer para PCR).
- c)  $MgCl_2$  2.5 mM.
- d) Iniciadores de globina 20 pmoles de cada uno.
- e) Taq Polimerasa 5 unidades.

Los oligonucleótidos están basados en la secuencia del gen de  $\beta$ -globina humano, pero presentan gran homología con el mismo gen en varios primates, incluyendo el mono Verde Africano. Los iniciadores utilizados acotan una región de 242 pares de bases y tienen la siguiente secuencia:

**GLO1 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'**

**GLO2 5'-GAA GAG CCA CGG ACA GGT AC-3'**

Por cada experimento se debe utilizar:

- ❖ Una curva patrón de 0, 1, 5, 10 y 50 ng de DNA de células Vero añadidos a sacarosa al 35% antes de la extracción.
- ❖ Un testigo positivo empleando 5  $\mu$ L DNA de células Vero [2 ng/ $\mu$ L].
- ❖ Un testigo negativo añadiendo 25  $\mu$ L de agua en lugar de la muestra.

El programa que se utiliza en el termociclador es el siguiente:

- a) Un ciclo único de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos.
- b) Cuarenta y tres ciclos de amplificación consistentes en: desnaturalización a 94°C durante 15 segundos y de alineamiento/extensión a 60°C durante 20 segundos.
- c) Una extensión final de 2 minutos a 60 °C.
- d) Indefinidamente a 4°C.

Para observar los productos de PCR, se hacen migrar en un gel de poliacrilamida al 6%, de la siguiente manera:

- a) Armar la cámara vertical HOEFER.
- b) Vaciar la solución de poliacrilamida al 6% y dejar polimerizar.
- c) Colocar en el primer pozo 1.5  $\mu$ L de marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 digerido con *Hae III* diluido a una concentración de 0.1  $\mu$ g/  $\mu$ L.
- d) Colocar en los siguientes pozos 20  $\mu$ L de cada producto de PCR mezclado con 3  $\mu$ L de buffer de carga.
- e) Utilizar regulador TBE 1X y 100 Volts durante 50 minutos para permitir la migración de los productos de PCR.
- f) Sacar el gel de la cámara y teñirlo en una solución de bromuro de etidio 0.5 mg/mL durante 30 minutos.
- g) Lavar el gel.
- h) Observar el gel bajo iluminación ultravioleta en el analizador de imágenes Eagle Eye.
- i) Comparar la banda de la muestra con las de la curva patrón.

## VI. RESULTADOS

### *DOT-BLOT*

#### 6.1.- CONTROL DE MARCAJE DE DNA Y NIVEL DE DETECCIÓN.

Reportes en la literatura (62) indican que los métodos de hibridación con sondas marcadas no tienen la suficiente sensibilidad para la detección y cuantificación de cantidades de DNA dentro del rango esperado para los objetivos del presente trabajo. Por ello se eligió la estrategia de marcaje directo a partir del DNA extraído de las muestras problema.

Para probar la factibilidad de esta propuesta se realizó una curva de DNA de células Vero marcado con DIG, con el fin de determinar la menor cantidad detectable por este método. Se marcó 1 ng de DNA y se realizaron diluciones logarítmicas que se colocaron en una membrana en concentraciones de 1 a  $1 \times 10^5$  pg y de 5 a  $5 \times 10^4$  pg.

La figura 8 muestra la detección del DNA marcado en un ensayo de Dot-Blot. Se puede observar que este método permite la detección de hasta 1 pg de DNA (A6), sin embargo la señal más nítida se observa a partir de 5 pg (B5).

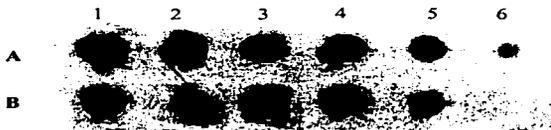


Fig. 8. Detección de diferentes cantidades de DNA marcadas con DIG, fijadas a membrana y detectada por quimioluminiscencia. Fila A: diluciones logarítmicas de 1  $\times 10^5$  a 1 pg; Fila B: diluciones logarítmicas de 5  $\times 10^4$  a 5 pg; B6: control negativo (agua).

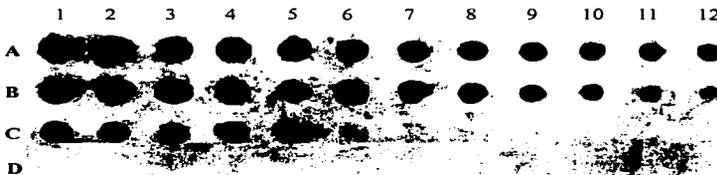
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6.2.- DETECCIÓN DE DNA A PARTIR DE MUESTRAS PROBLEMA.

Se llevaron a cabo 3 ensayos de Dot-Blot (A-C) marcando directamente el DNA obtenido de las muestras problema y de la curva patrón. El marcaje se realizó durante 22 horas siguiendo las indicaciones del fabricante.

En cada uno de los experimentos se incluyó una curva de diluciones seriadas 1:2, partiendo del DNA extraído de 500  $\mu$ L de una solución de sacarosa con 10 ng de DNA de células Vero. De la misma forma se hicieron diluciones seriadas 1:2 del DNA marcado, extraído de las muestras problema, partiendo de 500  $\mu$ L de purificado (producto a granel). En cada membrana se incluyeron controles positivos (DNA control del marcaje) y negativos (agua, solución de sacarosa al 35% y DNA de células Vero sin marcar).

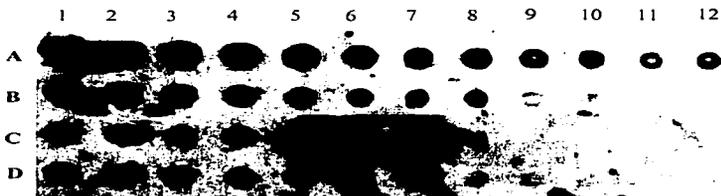
En la figura 9 y 10 se presentan dos ejemplos de los resultados de Dot-Blot que incluyen: el DNA de control de marcaje; el de la curva patrón y el de la muestra problema, además de los controles negativos señalados arriba.



**Figura 9.** Cuantificación de DNA extraído de purificado (producto a granel).

Línea A1- A12: Curva de DNA de Células Vero (10 ng – 2 pg); B1-12: Curva de DNA extraídos a partir de Sacarosa + 10 ng de DNA de células vero; C1-C12: DNA extraído de 500  $\mu$ L de purificado (muestra problema); Fila D controles negativos: D1-D6: Sacarosa, D8-D9: agua, D11-D12: DNA de células Vero sin marcar.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



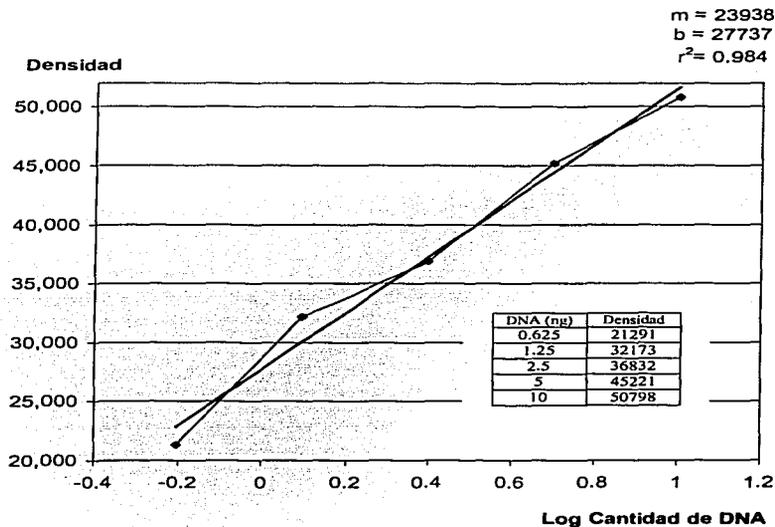
**Figura 10.** Cuantificación de DNA extraído de purificado (producto a granel).  
 Línea A1- A12: Curva de DNA de Células Vero (10 ng – 2 pg); B1-12: Curva de DNA extraídos a partir de Sacarosa + 10 ng de DNA de células vero; C1-C12 y D1-D12: DNA extraído de 2 muestras de 500 µL de purificado (muestras problema).

La placa obtenida de cada ensayo se analizó en el procesador de imágenes Eagle-Eye para obtener valores de densitometría tanto de las curvas patrón como de las muestras problema procesadas en cada ensayo.

Para poder realizar el análisis de la cantidad de DNA en las muestras del producto purificado, se construyó una curva estándar con los 5 primeros valores de densitometría que se obtuvieron de las extracciones de DNA de la curva patrón (B1-B5), ya que estos 5 puntos corresponden a la fase lineal de la gráfica. Después de una regresión lineal a los datos de la curva estándar, se realizó la interpolación de los valores de densitometría de las muestras problema en la ecuación de la recta correspondiente de cada experimento. Las figuras 11-13 muestran los resultados de este análisis.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### Curva estándar del experimento A



**Figura 11.** Curva estándar del experimento DOT A mostrando los parámetros de la regresión lineal ( $m$  y  $b$ ) y su coeficiente de correlación ( $r^2$ )

## Curva estándar del experimento B

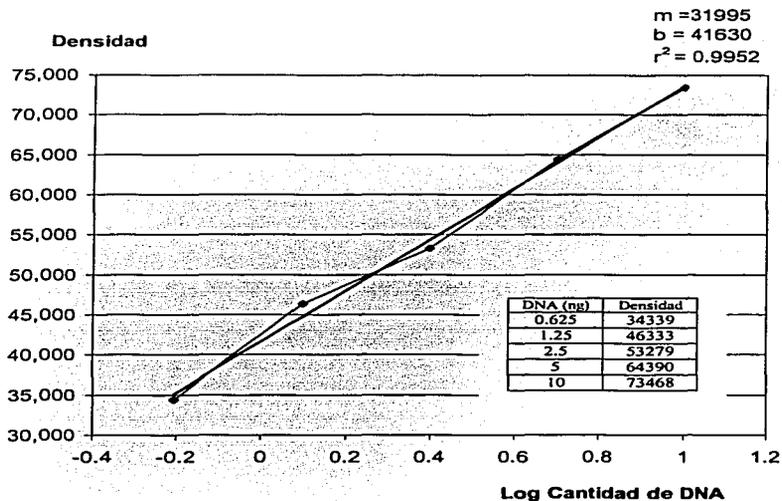


Figura 12. Curva estándar del experimento DOT B mostrando los parámetros de la regresión lineal ( $m$  y  $b$ ) y su coeficiente de correlación ( $r^2$ ).

## Curva estándar del experimento C

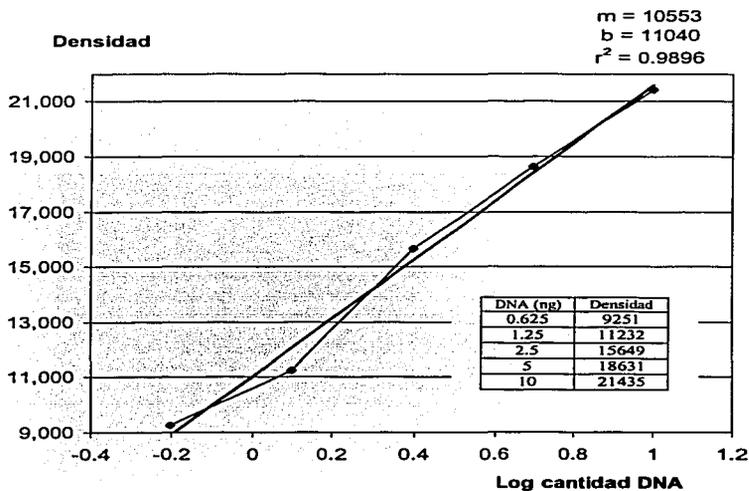


Figura 13. Curva estándar del experimento DOT C mostrando los parámetros de la regresión lineal ( $m$  y  $b$ ) y su coeficiente de correlación ( $r^2$ ).

En la tabla 3 se presentan los resultados del análisis de la cantidad de DNA de los 3 primeros puntos de cada muestra problema. Para cada muestra la primera columna corresponde a los valores de densidad obtenidos con el analizador de imágenes, mientras que la segunda contiene la cantidad de DNA calculada a partir de la interpolación de los valores de densidad de cada punto en la ecuación de la recta correspondiente, cuyos parámetros de regresión lineal ( $m$  y  $b$ ) se indican para cada experimento. Esta estimación de DNA ya incluye el factor de dilución utilizado para la preparación del dot-blot.

Muestra	1		2		3		4	
	m=23938 b=27737 $r^2=0.984$		m=23938 b=27737 $r^2=0.984$		m=31995 b=41630 $r^2=0.9952$		m=10553 b=11040 $r^2=0.9896$	
Dilución	Densidad	DNA (ng)	Densidad	DNA (ng)	Densidad	DNA (ng)	Densidad	DNA (ng)
-	27228	0.94264	27935	1.00881	43903	1.14223	12761	1.45567
1:2	16792	0.69250	28398	2.10930	32510	0.90448	9062	1.29888
1:4	7503	0.56794	9718	0.70245	24118	0.91420	5609	1.22288

Tabla 3 Determinación de la cantidad de DNA residual de células Vero en 4 muestras problema (purificado), interpoladas en la ecuación de la recta correspondiente.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) encontrando un valor de razón de varianza (RV) de 1.468, menor que el tabulado (4.07) a una  $p=0.05$  por lo asumimos que no existe diferencia significativa en los valores estimados de DNA entre las muestras. Así, se promediaron los valores de DNA calculados para todas las muestras obteniendo una estimación de DNA residual de células Vero de  $1.08 \pm 0.42$  ng en 500  $\mu$ L de producto purificado, con un coeficiente de variación de 38.6% y un rango de valores de 0.57 a 2.1 ng / 500  $\mu$ L.

Por otro lado, se promediaron los valores obtenidos en las muestras problemas sin diluir (correspondientes al primer punto en los dot-blots), ya que así se evita al máximo las variaciones inducidas por errores experimentales durante la manipulación en el proceso. De esta forma el promedio de DNA residual de células Vero fue  $1.14 \pm 0.23$  ng / 500  $\mu$ L, con un coeficiente de variación de 20% y un rango de valores de 0.94 a 1.45 ng / 500  $\mu$ L.

### PCR

#### 6.3.- ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE DNA.

Se realizaron diferentes métodos de extracción de DNA (tabla 4) con la finalidad de elegir el más adecuado para lograr nuestro objetivo. Se eligió el indicado en el último renglón de la tabla, debido a que con éste se lograron los mejores resultados.

METODO	CONDICIONES	OBSERVACIONES
Isotiocianato de guanidina 5M / SDS 1%	Con y sin lavados con citrato de sodio 0.1M en etanol al 10%	Presencia de inhibidores Bajo rendimiento
Fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico	Precipitación con etanol con y sin lavados con citrato de sodio 0.1M en etanol al 10%	Bajo rendimiento
Columnas QUIAGEN	Instrucciones del fabricante	Alto costo
DNAzol	Diferentes volúmenes de DNAzol	Presencia de inhibidores
	Lavados con citrato de sodio 0.1M en etanol al 10%	Bajo rendimiento
	Limpieza del tubo con papel filtro	Con la limpieza del tubo se elimina el exceso del DNAzol evitando así la inhibición

Tabla 4. Métodos utilizados para extraer DNA residual de células Vero.

#### 6.4.- ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN.

Se estandarizaron las condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, realizando variaciones en el programa del termociclador utilizando un programa con tres temperaturas (desnaturalización, alineamiento y extensión) y otro programa con dos temperaturas (desnaturalización y alineamiento/extensión). También se probaron diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  y cantidades de primers y Taq Polimerasa. En la figura 14 se presentan los resultados de la estandarización de la concentración de iniciadores.

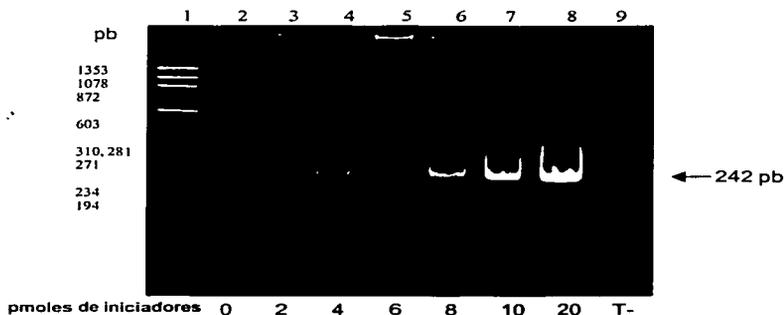
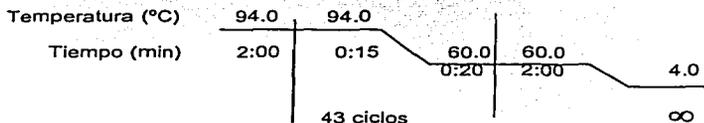


Fig. 14 Efecto de la concentración de iniciadores en la amplificación del producto de PCR del gen de  $\beta$ -globina (242 pb). Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 / *Hae* III ; carriles 2-8, producto de PCR utilizando cantidades crecientes (0-20 pmoles) de primers; carril 9 testigo negativo (agua en lugar de DNA de células Vero).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

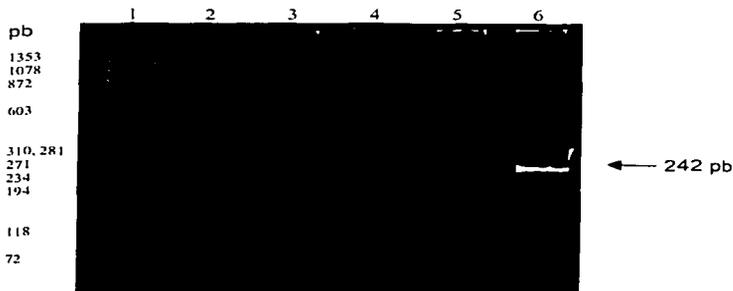
Una vez que se ajustaron las condiciones para una adecuada reacción de amplificación se trabajó bajo los siguientes parámetros:  $MgCl_2$  2.5 mM, dNTP's 0.2 mM de cada uno, Tris-HCl 10 mM pH 8.5, KCl 50 mM, 20 pmoles de cada uno de los iniciadores de globina y 5 unidades de Taq Polimerasa.

El perfil de temperaturas utilizadas para el termociclador se esquematiza abajo.

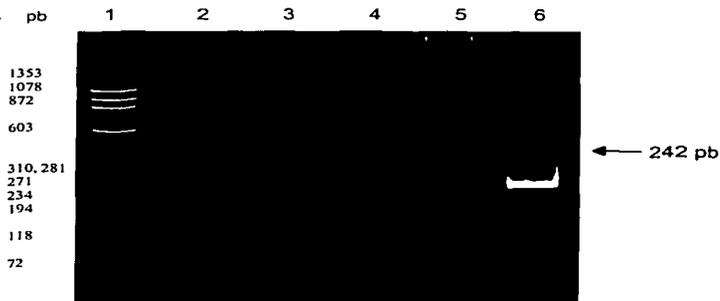


Antes de procesar las muestras problema para la cuantificación de DNA residual en ellas, se trabajó en la amplificación de DNA partiendo de cantidades conocidas de DNA de células Vero como estándares de cuantificación. Después de varias pruebas se logró amplificar de forma repetitiva el DNA extraído a partir de muestras con 0, 1, 5, 10 y 50 ng de DNA sembrados en sacarosa al 35% simulando las condiciones en las cuales se encuentra la muestra problema.

En las figuras 15 y 16 se muestran dos ejemplos de la amplificación de estándares de cuantificación. En los resultados que se presentan en la figura 15 se observa una gradación en la intensidad de las bandas, que se corresponden con la cantidad de DNA que se sembró en los diferentes estándares de cuantificación. En algunos de los ensayos se observaron intensidades de bandas contradictorias para 2 cantidades diferentes de DNA de inicio, como se puede observar en la figura 16 donde la señal del carril 5 (10 ng de DNA) fue menor a la del carril 4 (5 ng).



**Fig. 15** Efecto de la concentración de DNA en la amplificación del producto de PCR del gen de  $\beta$ -globina (242 pb) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio. Amplificación a partir de la extracción de diferentes cantidades de DNA de células Vero. Carril 1 marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 / *Hae* III ; carriles 2-6 productos de PCR obtenidos a partir de 0, 1, 5, 10 y 50 ng de DNA de la curva patrón.



**Figura 16** Efecto de la concentración de DNA en la amplificación del producto de PCR del gen de  $\beta$ -globina (242 pb) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio. Amplificación a partir de la extracción de diferentes cantidades de DNA de células Vero. Carril 1 marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 / *Hae* III ; carriles 2-6 productos de PCR obtenidos a partir de 0, 1, 5, 10 y 50 ng de DNA de la curva patrón.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Después de lograr resultados repetitivos en la extracción y amplificación de DNA a partir de los estándares de cuantificación, se procedió a realizar los ensayos de PCR con DNA extraído de las muestras problema. En la figura 17 se presentan los resultados de la amplificación de un fragmento de 242 pb del gen de  $\beta$ -globina en los estándares y en el DNA obtenido de 300  $\mu$ L de purificado (muestra problema). Se puede observar que la intensidad de banda en la muestra problema es comparable a la que se obtuvo en el carril correspondiente a 1 ng de DNA de la curva patrón. En ninguno de los ensayos que se realizaron se obtuvo una intensidad de señal mayor a ésta. Por el contrario, en varias ocasiones no se encontró producto de la amplificación.

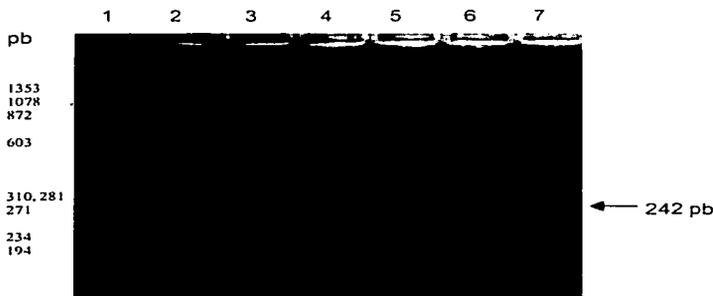
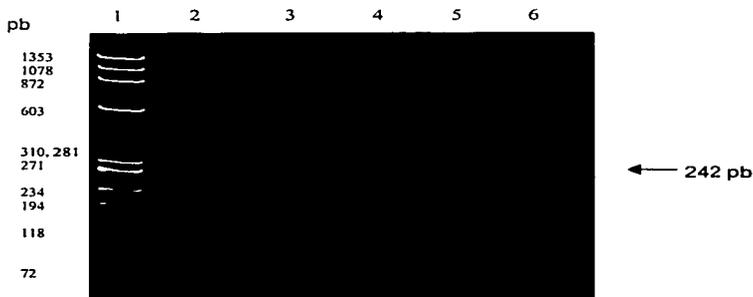


Fig. 17 Electroforesis en gel agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio. Amplificación del gen de  $\beta$ -globina (242 pb) a partir de la extracción de diferentes cantidades de DNA de células vero y del purificado. Carril 1 marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 / *Hae* III; carriles 2-6, extractos con 0, 1, 5, 10 y 50 ng de DNA molde respectivamente; carril 7 muestra problema (purificado).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con el fin de descartar la presencia de inhibidores en las muestras problema, que afecten el rendimiento en la amplificación (y por ende la no amplificación en varias pruebas, o la baja intensidad de las bandas obtenidas), se realizaron extracciones de DNA (por duplicado) de 300  $\mu$ L de 2 muestras. Uno de los tubos de cada muestra se procesó directamente para la extracción, mientras que al los duplicados se les añadieron 5 y 10 ng de DNA de células Vero respectivamente, antes de la extracción de DNA y posteriormente se realizó el ensayo de PCR. En la figura 18 se presentan los productos de amplificación de dichas extracciones. Se puede observar que ambas muestras presentaron amplificación, sin embargo en las réplicas a las cuales se les añadió DNA externo la intensidad de la señal resultó mucho mayor, lo cual indica que no tenemos inhibidores que afecten el proceso de la PCR y por lo tanto, las muestras problema realmente contienen muy poco DNA residual.



**Fig. 18** Electroforesis en gel de acrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio. Amplificación del gen de  $\beta$ -globina (242 pb) a partir de extractos de purificado. Carril 1 marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 / *Hae* III ; carriles 2 y 3, extracción a partir de 300  $\mu$ l de purificado; carriles 4 y 5, extracción de 5 y 10 ng de DNA en 300  $\mu$ l de purificado; carril 6 testigo negativo (agua).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## VII. DISCUSIÓN

La rabieta es una de las zoonosis más importantes que afectan al mundo. Debido a su curso inexorablemente letal ha sido imprescindible desarrollar vacunas de calidad óptima que se sujeten a normas de clase mundial para prevenir dicha enfermedad.

El uso de líneas celulares como sustrato en la producción de vacuna antirrábica humana ha marcado un avance importante en el desarrollo de dichas vacunas, debido a su mayor eficiencia de producción y menores efectos adversos. Sin embargo, también existen riesgos como son la presencia de virus y otros agentes transmisibles, proteínas promotoras de crecimiento y el DNA residual que se encuentre en las vacunas, por lo que el Comité de Expertos de la OMS determinó como niveles máximos aceptables hasta 10 ng de DNA en una dosis de vacuna purificada.

Con el fin de cumplir con el control de Calidad de la vacuna antirrábica humana en lo que respecta a la cantidad de DNA residual de células Vero, se desarrolló el presente trabajo en el que encontramos que el método de Dot-blot tiene una sensibilidad de detección de hasta 1 pg cuando se marca directamente la muestra. Esto representa una gran ventaja puesto que las cantidades detectables son mucho menores que las perseguidas por este trabajo.

Las muestras extraídas de producto a granel de vacuna, se compararon contra la curva patrón realizada a partir de la extracción de 10 ng en sacarosa para asegurarnos de simular la pérdida del material genético que ocurre durante la extracción, por lo que es imprescindible utilizar una curva patrón para cada ensayo con el fin de interpolar en ella los valores que se obtengan de las muestras problemáticas. No es válido elaborar una sola curva patrón y los ensayos subsecuentes interpolarlos en dichos valores, ya que por las condiciones de marcaje, detección y revelado de las placas, cada Dot tiene variaciones y presenta diferentes intensidades dependiendo de las soluciones de detección (principalmente del CSPD, del tiempo de exposición antes de revelar y de la calidad de las soluciones de revelado).

Se decidió realizar la extracción de 500  $\mu$ L de purificado debido a que dicha cantidad excede lo que en realidad se podría utilizar para una dosis de vacuna antirrábica humana, por lo que al utilizar este volumen podemos asegurar que la cantidad de DNA encontrado no será mayor que el que se puede encontrar por una dosis de vacuna.

Después de analizar los datos obtenidos de las 4 muestras de purificado en diferentes Dots, observamos que la variación no es considerable entre el valor promedio de los valores sin dilución de cada muestra ( $1.1373 \pm 0.23$  ng) y el promedio de los 12 datos correspondientes a los tres primeros puntos de cada muestra ( $1.0801 \pm 0.42$  ng). Estos datos nos dan la certeza de que al realizar el cálculo por cualquiera de los dos métodos, el valor encontrado es mucho menor que la norma implementada por la OMS (máximo 10 ng/dosis).

Aunque no se toman en cuenta en los cálculos todos los datos reportados para cada Dot-blot, visualmente nos proporcionan una gran información, ya que de no contar con un analizador de imágenes, al observar la disminución de la intensidad de los puntos en las diferentes diluciones de la curva patrón y de la muestra, nos lleva a realizar una estimación de la cantidad de DNA que habría en esta última sin tener un dato exacto, pero por lo menos podemos estimar si se exceden lo 10 ng o no. Con todo lo anterior, podemos concluir que la técnica de DOT-BLOT es una herramienta útil y relativamente sencilla para determinar pequeñas cantidades de DNA (1pg).

La reacción en cadena de la polimerasa es un método muy fino que permite detectar hasta una sola molécula de DNA; sin embargo es un proceso que requiere de muchas precauciones para evitar contaminaciones y necesita amplificar muestras de DNA que se encuentren puras y libres de inhibidores.

Se probaron varios métodos de extracción y purificación de DNA y se eligió la técnica con DNAzol y la limpieza del tubo con papel filtro antes de los lavados, debido a que la Taq polimerasa es sensible a las pequeñas cantidades del DNAzol

que se quedan en las paredes (aún cuando no son visibles) lo cual propicia su inhibición evitando que se lleve a cabo la reacción de amplificación. Este método nos permitió extraer DNA con la pureza y rendimiento adecuados para posteriormente realizar la PCR. El método de extracción es un factor clave en el éxito de la prueba, ya que si no se cuenta con un método estandarizado se puede llegar a reportar cantidades falsas.

Es necesario manejar los gels con mucho cuidado debido a que cuando no se introducen adecuadamente los productos en el gel, puede ocurrir lo mostrado en la figura 16 en la cual la banda de DNA amplificado correspondiente a la extracción de 5 ng, es más gruesa que la obtenida de la extracción de 10 ng. Esto puede deberse a que la detección en poliacrilamida es tan fina que cuando se pierde una pequeña cantidad del producto es muy notorio. Además es importante realizar todo el procedimiento con gran cuidado principalmente la extracción, debido a que la pérdida de material genético por muy pequeña que sea, marca una diferencia notable después de la reacción de PCR.

En la estandarización de los parámetros con los cuales se llevaría a cabo la reacción, se tomó en cuenta la posible inhibición de la Taq Polimerasa y la probable contaminación por DNA humano que nos lleven a tener falsos positivos, por lo que fue necesario extremar todas las precauciones utilizando un área única de preparación del coctel de PCR en donde se encontraba material desechable, nuevo y estéril, micropipetas y marcadores exclusivos para esta técnica. Además se utilizaron cantidades elevadas de iniciadores y de Taq Polimerasa (mayor que las reportadas en la bibliografía) con el fin de asegurar el éxito de la reacción aún bajo la influencia de pequeñas concentraciones de inhibidores.

Se realizó la estandarización de la extracción y amplificación por triplicado de los estándares de marcaje dentro de los cuales se pudiera comparar el resultado de amplificación correspondiente a la muestra problema.

Para asegurar que en los resultados obtenidos para la amplificación de la muestra problema no había interferencia por inhibición de la reacción de PCR, se realizó un ensayo en el que se extrajo y amplificó el DNA de dos muestras problema y de sus duplicado en los cuales se sembró previamente 5 ó 10 ng de DNA. De esta forma se pudo comprobar que el resultado de comparar la banda de la muestra problema con las de los estándares de amplificación, es confiable y no existe el problema de inhibición de la reacción. El resultado de la extracción y amplificación del DNA de 300  $\mu$ L de purificado que al compararlo con las banda obtenidas para la curva patrón, nos da una cantidad aproximada de 1 ng la cual es comparable a la obtenida por el método de Dot-blot y es mucho menor que el valor sugerido por la OMS (máximo 10 ng/dosis).

La técnica de PCR es muy útil para detectar pequeñas cantidades de DNA siempre y cuando la muestra que se emplee se haya purificado extensivamente y traiga consigo posibles inhibidores.

La cuantificación realizada por ambos métodos arrojan resultados similares, por lo que podemos concluir que ambas técnicas pueden ser utilizadas para una cuantificación rápida del DNA del granel purificado y cumplir con una parte del Control de Calidad de esta etapa.

Se puede utilizar cualquiera de los métodos o preferiblemente ambos, dependiendo de las condiciones y material con que cuente el laboratorio que emplee dichas técnicas y del tiempo que se tenga para realizar la determinación. El hecho de realizar ambos procedimientos, contribuiría a reportar un resultado más certero.

Como ya se mencionó, es importante validar el método de extracción de DNA y posteriormente el de cuantificación, ya que se pueden utilizar como parte del proceso de validación del método de Purificación.

## VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Se estandarizó la técnica de Dot-blot para cuantificar el DNA extraído de muestras de purificado (producto a granel de vacuna antirrábica), utilizando una técnica de marcaje directo de DNA con Digoxigenina.
- ❖ La cantidad de DNA estimado en las muestras fue de  $1.1373 \pm 0.23$  ng/500  $\mu$ L (un solo dato de cada dot) y de  $1.0801 \pm 0.42$  ng/500  $\mu$ L (3 datos de cada dot). Este valor es mucho menor que el establecido por la OMS el cual no puede sobrepasar los 10 ng /dosis.
- ❖ Se obtuvo por triplicado una curva patrón de 0,1,5,10 y 50 ng de DNA extraídos a partir de sacarosa y amplificados por PCR. Es muy importante siempre incluir testigos positivos y negativos de extracción y de reacción para tener todos los elementos necesarios para evaluar una muestra.
- ❖ La cantidad de DNA estimado por PCR para 300  $\mu$ L de purificado fue de 1 ng, los cual es menor que el límite establecido por la OMS.
- ❖ Ambos métodos dieron resultados comparables y son adecuados para la cuantificación de DNA residual de células Vero en producto a granel de vacuna antirrábica humana.
- ❖ Este trabajo sirve como base para la futura validación de los métodos de cuantificación y por consiguiente del método de purificación que se emplee para eliminar el DNA residual de células Vero del producto a granel de vacuna antirrábica humana.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aceptabilidad de los sustratos celulares para la producción de sustancias biológicas. Organización Mundial de la Salud, Ginebra 1987. Serie de Informes Técnicos 747.
- 2) Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), *Human Rabies Prevention*, January 8 1999, Vol. 48, No. RR-1.
- 3) Alvarado Islas A., Morales Alonso R., De Paz Villafán O., Ramos Ramírez L., Aguilar Setién A. *Fracción crotálica AL27 como adyuvante para incrementar la expresión de una vacuna génica contra la rabia*, XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, Oaxaca, México, 3-8 de noviembre de 2002, p. 23.
- 4) Baer George M., *Vacunas Antirrábicas en Vacunas*, Ciencia y Salud. capítulo 17, Secretaría de Salud, México, 1992, p. 243-253.
- 5) Baer, G., William, J., Bellini and Daniel B., Fishbein *Fields Virology*, Second Edition, Raven Press, New York. Cap. 19, 1990, p. 883-919.
- 6) Barth R., Franke, *Purified chick-embryo cell vaccine for humans* in *Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 27, p. 290-296.
- 7) Barth R., Franke V., Steenis G., *Fetal rhesus monkey lung diploid cell vaccine for humans* in *Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 28, p. 297-300.
- 8) Barth R., Franke V., Steenis G., *Dog Kidney cell vaccine for humans* in *Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 29, p. 301-305.
- 9) Barth R., Franke V., Lin F. T., *Primary hamster kidney cell vaccine for humans* in *Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 30, p. 306-309.

- 10) Bingham John, Merwe Maria van der, *Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test*, Journal of Virological Methods, 2002, 101:85-94.
- 11) Black Elizabeth M. Lowings Paul J. Smith Jemma, Heaton Paul R, & McElhinney Lorraine M. *A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology*. Journal of Virological Methods, Volume 105, Issue 1, August 2002, p. 25-35.
- 12) Boehringer-Mannheim, PCR applications Manual, 1995, p. 2-4
- 13) Branche R. *Vaccine for humans prepared in human diploid cells in Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 25, p. 280-284.
- 14) Celada Cano José Pedro, *Programa estratégico de control y erradicación de perros y gatos callejeros para evitar la zoonosis de la rabia al humano en México*, XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, Oaxaca, México, 3-8 de noviembre de 2002, p. 37.
- 15) Compendium of Animal Rabies Prevention and Control, National Association of State Public Health Veterinarians, Inc., July 14<sup>th</sup> 2000, Vol 49, No.RR-8.
- 16) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 7<sup>a</sup> edición, Editada por Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud, México 2000, p.1813.
- 17) Flores Alés Andrés J. *La rabia de los carnívoros domésticos: aspectos prácticos a considerar*. Animalia, 1991, año IV, no 25, p. 26-32.
- 18) Flores-Crespo Raúl, *La Rabia en las Diferentes Especies, sus Transmisores y sus Control*, 1<sup>a</sup> edición, 1998, Editado por INIFAP y SAGAR, p. 3-16
- 19) H.Bourhy, P.Sureau, versión española Montaña Hirose, J. A. *Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de la rabia*, Instituto Pasteur, 1990, p. 119-121.
- 20) Hanlon C.A., Niezgodá M., Morrill P.A., Rupprecht C.E., *The incurable wound revisited\_ progress in human rabies prevention?*, Vaccine, 2001, 19: 2273-2279.

- 21) Jallet C., Jacob Y., Bahloul C., Drings A., Desmexieres E., Tordo N., Perrin P., *Chimeric Lyssavirus Glycoproteins with Increased Immunological Potential*, Journal of Virology, 1999, 73:225-233.
- 22) Johnson Herald N., Emmons Richard W., *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*, 2<sup>o</sup> edition 1992, revised and expanded by Edwin H Lennette, Marcel Dekker, Inc. p. 669-685
- 23) Johnson Nicholas, Healy Derek and Fookas Anthony R., *Post-vaccination antibody response to non-conformational rabies-glycoprotein epitopes*. XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, Oaxaca, México, 3-8 de noviembre de 2002, p. 22
- 24) Jones Robert L., Froeschle James E., Atmar Robert L., Matthews J. Stephen, Sanders R., Pardalos J., Moeller L., Dhin J.E., Famula M., Briggs D.J., Lang J., *Immunogenicity, safety and lot consistency in adults of a chromatographically purified Vero-cell rabies vaccine: a randomized, double-blind trial with human diploid cell rabies vaccine*, Vaccine, 2001, 19: 4635-4643.
- 25) Juárez Islas Víctor Manuel, *Aplicación de la Técnica: Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a la transcripción reversa (RT-PCR) para el estudio de la rabia en México*, Tesis para obtener el título de Biólogo, 1999, UNAM, ENEP Iztacala.
- 26) Kamoltham thavachai, Khawplod Pakamatz, Wilde Henry, 2002 *Rabies intradermal post-exposure vaccination of humans using reconstituted and stored vaccine*, 2002, Vaccine 20:3272-3276.
- 27) King A.A., Turner G.S., *Rabies: A Review*, J. Comp. Path., 1993, Vol 108:1-39.
- 28) Kung Viola T., Panfili Peter R., Sheldon Edward L., King Robert S, Nagainis Peter A., *Picogram Quantitation of Total DNA using DNA-binding Proteins in a Silicong Sensor-Based System*, Analytical Biochemistry, 1990,187:220-227.
- 29) Lees C. Y., Briggs D. J., Wu X., Davis R. D., Moore S.M., Gordon D., Xiang Z., Ertl H., Tang D., Fu Z., *Induction of protective immunity by topic application of a recombinant adenovirus expressing rabies virus glycoprotein*, Veterinary Microbiology, 2002, 85: 295-303.

- 30) Lodmell Donald L., Ewalt Larry C., *Post-exposure DNA vaccination protects mice against rabies virus*, *Vaccine*, 2001, 19: 2468-2473.
- 31) Lodmell Donald L., Parnell Michael J., Bailey John R., Ewalt Larry C., Hanlon Cathleen A., *Rabies DNA vaccination of non-human primates: post-exposure studies using gene gun methodology that accelerates induction of neutralizing antibody and enhances neutralizing antibody titers*, *Vaccine*, 2002, 20:2221-2228.
- 32) M. Niezgodá, V. Anegundí, P. Colarusso, et all. *Advances in the development of a rapid immunohistochemical test in rabies diagnosis*. XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, Oaxaca, México, 3-8 de noviembre de 2002, p. 27
- 33) Manual for the production of Rabies Vaccine in Vero Cell Cultures, World Health Organization, BLG/RA/84.Rev.1.
- 34) Mattos Carlos A., Mattos de Cecilia C. Rupprecht Charles E., *Rhabdovirus in Fields Virology*, 4<sup>th</sup> edition, 2001, chapter 39, Lippincott Williams &Wilkins,
- 35) Meléndez Félix Alejandra, *Estudio Molecular de la Región Variable de la proteína N del virus de la Rabia en México*, Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químico-biológicas, 2001, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- 36) Meslin F. X., Kaplan M. M., *An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research* in *Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 2, p. 9-27.
- 37) Meslin Francois Xavier, *Situación de la rabia en el Mundo, sin considerar a las Américas*, XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, Oaxaca, México, 3-8 de noviembre de 2002, p. 10.
- 38) Montagnon B., Fanget B., *Purified Vero cell vaccine for humans* in *Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 26, p. 285-295.

- 39) Morales Martínez ME., Rosillo Rico G., Campos León Y., Rojas Salas M., Ramírez Ramos L., Schmid Kretschmer R., Setién Aguilar JA., *La ribonucleoproteína del virus de la rabia: ¿un inmunomodulador que favorece la infección?*, XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, Oaxaca, México, 3-8 de noviembre de 2002, p.22
- 40) Morimoto K., McGettigan J.P., Foley H.D., Hooper C.C., Dietzschold B., Schnell M., *Genetic engineering of live rabies vaccines*, *Vaccine*, 2001, 19:3543-3551.
- 41) Normas para la utilización de células animales como sustratos *in vitro* en la producción de sustancias biológicas. Anexo 1, Organización Mundial de la Salud, 1998, Serie de Informes Técnicos, No 878, Normas para Sustancias Biológicas No 50.
- 42) Normas para la vacuna antirrábica de uso médico, Anexo 2, Organización Mundial de la Salud, 1981, Serie de Informes Técnicos 658. Normas para sustancias biológicas No 22.
- 43) Pastoret Paul-Pierre, *Rabies mini review*, *Virus Research*, 2002, 82:61-64
- 44) Perrin P., Jacob Y., Setién Aguilar A., Loza-Rubio E., Jallet C., Cliquet F., Tordo N., Desmézières E., Aubert M, *Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus*, *Vaccine*, 2000, 18: 479-486.
- 45) Perrin P., Morgeaus S., *Inactivation of DNA by beta-propiolactone*, *Biologicals*, 1995, 23:207-211.
- 46) Picar E, M.J. Barra, E.Tissot, C.Combeau et all, *Development of a hemi-nested RT-PCR for rabies diagnostic and typing-Comparison with reference methods*. XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, Oaxaca, México, 3-8 de noviembre de 2002, p. 24
- 47) Plotkin Stanley A., Charles e. Rupprecht, Koprowski Hilary , *Rabies Vaccine*, InWB Saunders comp., Eds Vaccines, 1999, Chapter 31, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, p743-766.
- 48) Plotkin Stanley A., *Rabies*, *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 30:4-12.

- 49) Robertson James S., Heath Alan B., *A Collaborative Study to Examine the Sensitivity and Reproducibility of Assays for the Detection of DNA in Biologicals Derived from Continuous Cell Lines*, Biologicals, 1992, 20:73-81.
- 50) Robertson James S., Heath Alan B., *A Collaborative Study on DNA Quantitation in Biological Products*, Biologicals, 1995, 23,199-205.
- 51) Rojas AEab., Loza-Rubio Ea., Banda RVMa., Hernández Bea. *Correlation between rabies virus ARN quality and its detection, using PCR in positive decomposed brains*. XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, Oaxaca, México, 3-8 de noviembre de 2002, p. 24
- 52) Rupprecht C., Hanlon C., Koprowski H., *Genetically engineered vaccines in Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 34, p. 341-345.
- 53) Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T, "Rabies Re-examined", *Lancet Infectious Diseases*, June 2002, Vol. 2(6):337-353.  
[http://infection.thelancet.com/journal/vol2/iss6/full/aid.2.6.review\\_and\\_opinion.21289.1](http://infection.thelancet.com/journal/vol2/iss6/full/aid.2.6.review_and_opinion.21289.1).
- 54) Selligman B., Lepine P., Fuenzalida E., Hoskins J.M., Koprowski H., *Laboratory Techniques in rabies*, Health World Organization, Geneva 1973, 3<sup>th</sup> edition, p. 192-261.
- 55) Setién Aguilar A., Brochier B., Tordo No., De Paz O., Desmettre P., Péharpré D., Pastoret P., *Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (Desmodus rotundus)*, *Vaccine*, 1998, vol 16, No. 11/12, 1122-1126.
- 56) Sambrook, Fritsch, Maniatis, *Molecular Cloning*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Hargor Laboratory Press, 1989, Vol.3, p. E5.
- 57) Swason Stephen K., Mento Steven J., Weeks-Levy Carolyn, Brock Bonnie D., Kowal Kieron J., Wallace Rosalyn E., Ritchey Mary B., Cano Francis R., *Characterization of Vero cells*, *Journal of Biological Standarization*, 1988, 16:311-320.
- 58) Tordo N., *Characteristics and molecular biology of the rabies virus in Laboratory Techniques in Rabies*, Health World Organization, Geneva 1996, 4<sup>th</sup> edition, chapter 3, p. 28-45.

- 59) Ubol Sukathida, Hiriote Wanwarang, Anuntagool Narisar, Utaisincharoen Pongsak, *A radical form of nitric oxide supresses RNA synthesis of rabies virus*, Virus Research, 2001, 81:125-132.
- 60) Velasco Villa A., Gómez Sierra Mauricio, Hernández Rodríguez Gustavo, Juárez Islas V., Meléndez Félix Alejandra, Vargaspino Fernando, Velásquez Monroy Oscar y Fliesser Ana, *Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in México*, Journal of Clinical Microbiology, 2002, vol. 40, No 3, p. 951-958
- 61) Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas, Boletín vol XXXII-Año 2000, OMS, OPS, Editado por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro.
- 62) Walker Matthew R., Rapley Ralph, *Route Maps in Gene Technology*, Blackwell Science, 1997, Blackweell Science, capítulo 48 y 55, p. 12-130, 144-148.
- 63) Whitfield Silvia G., Makonnen Fekadu, Shaddock John H., Niezgodá Michael, Warner Cynthia K., Messenger Sharon L., *A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens*, Journal of Virological Methods, 2001, 95:145-151.
- 64) WHO Recommendations on Rabies Post-Exposure Treatment and the Correct Technique of Intadermal immunization against Rabies, World Health Organization, 1997, WHO/EMC/ZOO/96.6.  
<http://www.who.int/emc.documents/rabies/docs/whoemczoo966.pdf>
- 65) [www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies)
- 66) [www.biology.ucsd.edu/others/dsmith/classes/pcr.html](http://www.biology.ucsd.edu/others/dsmith/classes/pcr.html)
- 67) [www.who.int/vaccines-diseases/safety/infobank/rabies.shtml](http://www.who.int/vaccines-diseases/safety/infobank/rabies.shtml)

## X. APÉNDICE

### Amortiguador "A"

Acido maléico 11.61 g  
 NaCl 18.775 g  
 Ajustar pH 7.5 con NaOH.  
 Aforar a 1000 mL

### Amortiguador "B"

Hacer una dilución 1:10 del reactivo  
 de bloqueo en amortiguador "A"

### Buffer TBE 10 X

Tris-Borato 108 g  
 Acido Bórico 55 g  
 EDTA 2mM pH 8.0 40 mL

### Cloruro de Sodio 3 M

Cloruro de sodio 87.75 g  
 Aforar a 500 mL

### Solución de Detección

Tris-HCl 1M pH 9.5 2 mL  
 NaCl 3M 0.666 mL

### Solución de Lavado

Tween 20 150 µL  
 Amortiguador "A" 50 mL

### Solución de Poliacrilamida 6%

Acrilamida -bisacrilamida 2 mL  
 TBE 10 X 1 mL  
 TEMED 10 µL  
 Persulfato de amonio 10% 100 µL  
 Agua 7 mL

### Solución SSC 20X

NaCl 175.5 g  
 Citrato de Sodio  
 Ajustar pH 7.5, aforar a 1000 mL.  
 Esterilizar por autoclave

### Solución SSC 2 X

50 mL de SSC 20X  
 450 mL de agua

### Stock de Acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida: 146 g  
 Bisacrilamida: 4 g  
 Agua: 500 mL

### TRIS-HCl 1 M pH 9.5

Tris-HCl 78.8 g  
 Ajustar el pH a 9.5 con NaOH  
 Aforar a 500 mL