



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**Inoculación de una vacuna génica ADN desnudo contra
la rabia, administrada por diferentes vías en gatos
adultos**

T E S I S :

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CALDERÓN RODRÍGUEZ RAFAEL



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Director: DR. EILIANO TESORO CRUZ
Asesor: Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZALES MORENO

México, D. F.

Enero 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Indice.....	i
Indice de tablas.....	iv
Indice de figuras.....	iv
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. Historia de la rabia.....	2
2.2. Características morfológicas del virus de la rabia.....	3
2.3. Genotipos del virus de la rabia.....	5
2.4. Genoma del virus de la rabia.....	6
2.5. Propiedades del virus de la rabia.....	9
2.6. Patogenia del virus de la rabia.....	9
2.6.1. Daño histopatológico.....	11
2.6.2. Respuesta inmunológica antirrábica.....	12
2.7. Signos clínicos de la rabia en humanos.....	13
2.8. Instrucciones de la Organización Mundial de la Salud para el tratamiento de la rabia post-exposición (en humanos).....	15
2.8.1. Tratamiento local de las heridas con posible exposición a la rabia (medidas recomendadas en todos los casos).....	17
2.8.1.1. Primeros auxilios.....	17
2.8.2. Tratamiento general específico.....	18
2.9. Prevención y control de la rabia.....	19
2.10. La rabia en México y en el mundo.....	20
2.11. Vacunas.....	22
2.11.1. Desarrollo de las primeras vacunas de uso humano para el tratamiento de la rabia.....	23

2.11.2. Cepas rábicas autorizadas actualmente para la producción de vacunas contra la rabia.....	29
2.11.2.1. Potencia y requerimientos para vacunas de uso animal y humano contra la rabia	31
2.11.2.2. Vacunas recombinantes.....	31
2.11.2.3. Vacunas DNA con vectores vacúnales.....	33
2.11.2.4. Vacunas DNA	35
2.11.2.5. Mecanismo de acción de las vacunas DNA.....	38
2.11.2.6. Vacunas orales.....	40
2.11.2.7. Vacunas DNA presente y futuro.....	42
2.11.2.8. Importancia social de las vacunas DNA.....	42
2.11.2.9. Rutas de inoculación para las vacunas contra la rabia existentes en el mercado.....	44
2.11.2.10. Construcción de la vacuna antirrábica (DNA desnudo) empleada en este proyecto.....	45
3. Planteamiento del problema.....	46
4. Objetivos.....	47
5. Hipótesis.....	47
6. Criterios de inclusión.....	47
7. Materiales.....	48
7.1. Equipo.....	48
7.2. Material.....	48
7.3. Material biológico.....	49

8. Metodología.....	50
8.1. Inmunización.....	52
8.2. Detección y evaluación de anticuerpos contra la rabia por ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	53
8.3. Detección de la proteína G de rabia por Western-blot.....	53
8.4. Determinación de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia por Prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (PRRFF).....	54
9. Resultados.....	55
9.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	55
9.2. Western-blot	59
9.3. Prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (PRRFF).....	60
10. Discusión.....	61
11. Conclusión.....	63
12. Anexos.....	65
1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	65
2. Electroforesis en gel de acrilamida del virus de la rabia.....	69
3. Westen-blot.....	75
4. Prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (PRRFF).....	80
13. Referencias.....	84

Índice de tablas.....	iv
Tabla 1 Clasificación del virus de la rabia.....	5
Tabla 2 Tratamiento general recomendado por la OMS.....	18
Tabla 3 Características de los cuatro grupos de gatos utilizados en el proyecto.....	51
Índice de figuras.....	iv
Figura 1 Esquema de la estructura del virus de la rabia.....	4
Figura 2 Representación esquemática de las 5 proteínas que conforman al virus de la rabia, así como el pseudogen.....	8
Figura 3 Producción de proteínas.....	32
Figura 4 Producción de vacunas recombinantes.....	35
Figura 5 Requisitos básicos de un vector de ADN plasmídico.....	38
Figura 6 Esquema del plásmido comercial pCI-neo.....	45

1. Introducción

Desde los descubrimientos de Jenner y Pasteur, las vacunas han sido empleadas para curar y controlar algunas enfermedades que afectan a los seres humanos y animales domésticos.

Durante el siglo XX, se desarrollaron nuevas estrategias para la vacunación y gracias a los avances tecnológicos de la biología molecular e ingeniería genética se han buscado nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas recombinantes.¹

Después del perro, el gato es uno de los transmisores más importantes de la rabia al humano (rabia urbana). La vacuna génica contra la rabia utilizada en este proyecto fue diseñada con un plásmido de expresión mamífero, pCI-neo, al cual se le insertó el gen de la glicoproteína G de un aislado mexicano de rabia (**HQ01-IMSS**).²

La vía intramuscular (**IM**), ha sido utilizada de manera frecuente en este tipo de vacunas, mientras la ruta intranasal (**IN**) empieza a ser utilizada en las áreas de vacunación y terapia génicas. Recientemente se ha reportado la vía intradérmica en la punta de la oreja (**ID-PO**) como una vía de inoculación para la vacunación génica en perros.

En este trabajo se plantea la posibilidad de emplear una vacuna contra la rabia diseñada con ADN desnudo en gatos adultos utilizando diferentes vías de

administración, que permita establecer la ruta mas adecuada para la inoculación en esta especie animal.

2. Marco teórico

2.1. Historia de la rabia

La palabra **RABIA** deriva del latín “*rabere*”, que significa ira, enojo, delirio. La rabia es una de las enfermedades más antiguas en la memoria del hombre. Los científicos se aproximaron a la enfermedad solamente como un intento tardío en el siglo XIX, primero por Pierre-Víctor Galtier en 1879, después por Louis Pasteur en 1880.³

La primera descripción de la enfermedad se remonta al siglo XXIII a.C., en el código Eshunna en Babilonia. Desde la antigüedad ya se había establecido la relación entre la rabia humana y la rabia de los animales, especialmente de los perros. En el antiguo Egipto, el Dios Sirius fue hecho a la imagen de un perro furioso.⁴

En la mitología griega, en La Iliada de Homero, él se refiere a la rabia cuando menciona que Sirius, la constelación perro Orión, ejerce una influencia maligna sobre la humanidad. La estrella “perro Sirio” se asociaba con perros rabiosos, en pueblos del Mediterráneo Oriental, Egipto y Roma. Homero hace referencia de que el invencible Héctor era un “perro rabioso”. Mientras que los griegos antiguos tenían a la Diosa Artemisa como sanadora de la rabia y al Dios Artiste, hijo de Apolo, quien era especial para combatir el efecto de la rabia. En la Grecia también era reconocida la cauterización de las heridas causadas por animales rabiosos, tratamiento que se mantuvo hasta el descubrimiento de las vacunas.^{5,6}

2.2. Características morfológicas del virus

El virus rábico presenta un diámetro aproximado entre 75 y 80 nm, y un largo que varía entre 130 y 240 nm. En la parte más externa presenta espículas de aproximadamente 9-12 nm de longitud.

El virus de la rabia está constituido de una doble envoltura fosfolipídica, de un ácido ribonucleico enrollado en espiral, de cadena sencilla y tiene cinco genes que codifican para el mismo número de proteínas.

La replicación del genoma viral tiene lugar en el citoplasma celular.^{3, 7} Una sola molécula de ARN esta presente por virión, constituida de aproximadamente 12,000 nucleótidos. El ARN del genoma es de polaridad negativa, indicando que no es infeccioso por si mismo. Luego de la penetración de la célula, el ARN genómico, debe ser transcrito en moléculas complementarias positivas, capaces de producir las proteínas vírales (**Figura 1**).

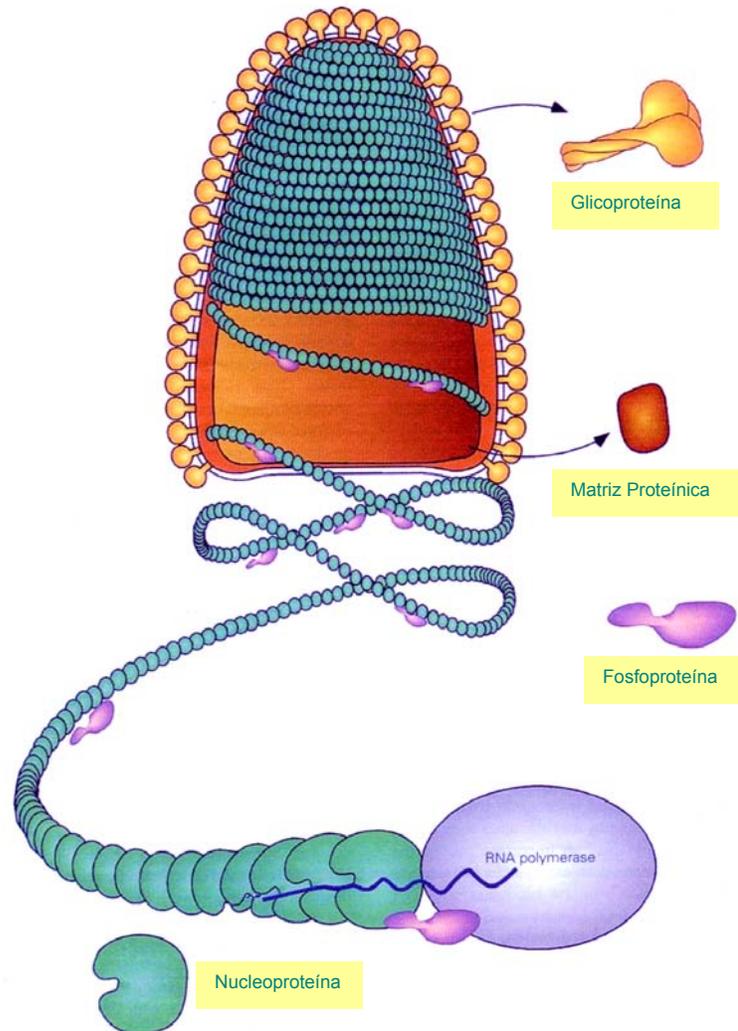


Figura 1. Esquema de la estructura del virus de la rabia.

El virión contiene 67% de proteína, 26% de lípidos, 4% de RNA y 3% de carbohidratos vinculados en forma covalente al lípido y proteína. Se han identificado 5 genes del virus.⁸

El virus de la rabia está compuesto de dos unidades estructurales:

1. Una ribonucleocapside interna (**RNC**), donde el ARN genómico interactúa fuertemente con la nucleoproteína (**N**) y tiene menor contacto con la fosfoproteína (**NS**) y la polimerasa (**L**), 2 proteínas involucradas en la transcripción y en la replicación.

2. Una membrana circundante que comprende la matriz (**M**) y la glicoproteína **G**, el principal antígeno viral.⁷

2.3. Genotipos del virus de la rabia

La rabia es una enfermedad infecto-contagiosa, aguda y mortal; provocada por un virus que pertenece a la familia *Rhabdoviridae* y al género de los *Lyssavirus*, (Tabla 1).⁹

Tabla 1. Clasificación del virus de la rabia.

ORDEN:	FAMILIA:	GENERO:
<i>Mononegavirales</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>

Actualmente, se reconocen siete genotipos.^{10, 11, 12}

Genotipo 1: *Clásico (cepa CVS)*. Es el que con mayor frecuencia se ha aislado del hombre a nivel mundial.

Genotipo 2: *Lagos bat (LB)*, originalmente aislado de murciélagos en Nigeria, sin casos humanos reportados.

Genotipo 3: *Mokola (MOK)*, aislado de roedores en Nigeria, con casos presentados en humanos en África.

Genotipo 4: *Duvenhage (DUV)*, aislado de murciélagos en Zimbabwe, con un caso humano en Sudáfrica.

Genotipo 5: *Lyssavirus europeo (EBL-1)*, aislado de murciélagos, con un caso humano en Rusia.

Genotipo 6: *Lyssavirus europeo 2 (EBL-2)*, aislado de murciélagos, con un caso humano en Finlandia.

Genotipo 7: *Lyssavirus australiano (ABV)*, aislado de un megaquiróptero (zorros voladores), sin casos humanos.

2.4. Genoma del virus de la rabia

El genoma de los *Lyssavirus* tienen aproximadamente 120 Kb.¹³ Cada una de las cinco proteínas que constituye el virus rábico es codificada por un gen. La secuenciación de los 11932 nucleótidos del genoma de la cepa virus Pasteur (PV) del virus de la rabia ha permitido estudiar los elementos reguladores de la transcripción y de la replicación. La secuencia completa de aminoácidos fue deducida de la secuencia de los genes que codifican respectivamente las 5 proteínas: **N**, **NS**, **M**, **G** y **L** (**Figura 2**). Por otro lado, el análisis de las secuencias principales de los diferentes *Lyssavirus* ha permitido su estudio comparativo y evolutivo.^{7 13, 14, 15}

Una peculiaridad del genoma del virus de la rabia es la existencia de un pseudogen que comprenden 423 nucleótidos y se encuentra entre los genes **G** y **L**. Esta región no codificante hipervariable fue denominada pseudogen Ψ (**Figura 2**).^{13, 14}

Como se mencionó anteriormente el genoma rábico codifica para 5 proteínas: La nucleoproteína **N** (450 aminoácidos), esta estrechamente asociada al ARN viral y se expresa abundantemente en el huésped, después de una infección por virus rábico. La proteína **N** es una de las más conservadas y se utiliza para el diagnóstico de *Lyssaviruses*^{16, 17, 18}

La fosfoproteína **NS** o **M1** (297 aminoácidos), se acumula en el citoplasma de las células infectadas. Inicialmente se había propuesto que esta proteína formaba parte de la envoltura, por esta razón, le fue atribuida la denominación **M1**, por primera proteína de membrana no glicosilada. Posteriormente se demostró que no forma parte de la membrana sino de la nucleocápside. La proteína **M1** rábica y **NS** del virus de la estomatitis vesicular (**VSV**) son denominaciones de la misma proteína y solamente la denominación **NS** debe ser empleada para todos los *Rhabdovirus*.^{19, 20}

La proteína **L** (2142 aminoácidos); denominada **L** por "*large*", traducido a "grande" en español, responsable de la transcripción y de la replicación del ARN viral. Es la más conservada de todas las proteínas de los virus ARN

monocatenarios de polaridad negativa. Esta estabilidad aparentemente resulta de la necesidad de conservar funciones enzimáticas vitales para el virus.^{19, 20}

Estas tres proteínas (**N**, **NS**, y **L**) asociadas al ARN viral, constituyen la nucleocápside.

La proteína **M** (202 aminoácidos), se localiza sobre la cara interna de la envoltura lipídica y es la menor de las 5 proteínas del virus rábico a diferencia del virus de la estomatitis vesicular (**VSV**), la proteína **M** del virus de la rabia no está fosforilada.

La glicoproteína **G** (504 aminoácidos) está insertada en la membrana lipídica del virus; ella es responsable de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T, y es la única proteína externa del virión, representa aproximadamente un tercio de la masa proteínica viral.^{14, 21, 22, 23}



Figura 2. Representación esquemática de las 5 proteínas que conforman al virus de la rabia, así como el pseudogen.^{3, 23}

2.5. Propiedades del virus de la rabia

Los *Rhabdovirus* son virus frágiles, inactivados por el calor, los rayos ultravioleta, la desecación, los solventes orgánicos y la tripsina son bastante estables en un rango de pH entre 5 y 10.

Los *Rhabdovirus* se conservan varios días a 4°C y durante mucho tiempo a –70°C y liofilizados.⁷

2.6. Patogenia del virus de la rabia

La rabia es transmitida al hombre por contacto, generalmente por mordeduras o lameduras de animales con capacidad de transmitir el virus, en áreas de la piel sin continuidad; debido a heridas o a través de mucosas intactas como la conjuntiva ocular. También se han reportado casos de personas que adquirieron la infección por la inhalación de partículas virales a manera de aerosol y en trasplantes de corneas en humanos.²⁴

Se considera que la vía de transporte más frecuente es a través de mordeduras de la piel, principalmente los dedos y regiones de la cara que tienen potencialmente más sensibilidad a la infección e innervación: una vez que se infecta el tejido subyacente, el virus se replica en el sitio de la herida. Llegando a terminales nerviosas más cercanas, de esta forma comienza el viaje del virus a través de los nervios periféricos; infectan los ganglios espinales más próximos donde es probable que se replique nuevamente, e invada a la médula espinal, por la cual asciende rápidamente al cerebro por medio de un proceso llamado

septineurítis, donde se vuelven a replicar en los tejidos de la sustancia gris, distribuyéndose y localizándose de manera irregular, principalmente en el hipocampo (astas de Ammon), mesencéfalo, tálamo y médula. El daño a las neuronas motoras causa lesiones progresivas que producen la parálisis flácida. Tras su replicación, este viaja a través de los axones, nervios y células de Schwann de todos los nervios del cuerpo llegando a la mayoría de los órganos y tejidos periféricos como son la piel, el músculo y ciertos órganos de predilección como glándulas salivales.^{24, 25}

Se ha comprobado que en las glándulas salivales hay un incremento en los títulos víricos, más que en cerebro y también se han hallado títulos altos en los pulmones; esto indica que el agente puede multiplicarse fuera del SNC. Se ha aislado y detectado virus en diferentes órganos y tejidos, tales como las glándulas suprarrenales, glándula interescapular (en los murciélagos), riñones, vejiga, ovarios, testículos, glándulas sebáceas, células germinativas de los bulbos pilosos, córnea, papilas de la lengua y pared intestinal.⁹

Es conveniente tener en cuenta que la distribución del virus no es uniforme y la frecuencia de la infección de diferentes órganos es variable; además que el virus de la rabia no puede infectar a las personas que tienen contacto con las heces, la sangre, la orina o la piel intacta del individuo infectado.⁹

2.6.1. Daño Histopatológico

El virus de la rabia se replica por brote de las membranas celulares del huésped y la nucleocápside viral se desarrolla del citoplasma. Las partículas virales se pueden formar en la superficie celular pero lo más común es que broten de las membranas intracitoplasmáticas, las partículas libres infectan células nuevas por fusión de su envoltura con la membrana celular del huésped permitiendo la entrada directa del material genético del virus.²⁵

La lesión en el cerebro se presenta como una destrucción de las neuronas, los cambios histopatológicos consisten en degradación y necrosis neuronal, con desmielinización de la sustancia blanca e infiltración de las células mononucleares como linfocitos, polimorfonucleares y eritrocitos y hay una hiperemia perivascular. Un hallazgo frecuente de lesión histopatológica por rabia lo constituyen los llamados cuerpos de Negri, que son inclusiones intracitoplásmicas en células nerviosas de aproximadamente 2 a 10 μm de diámetro, de forma redonda u oval, acidófilos y que se observan con mayor abundancia en hipocampo (Astras de Ammon), en los ganglios basales, Puente de Varolio y médula. Dichos corpúsculos corresponden a conglomerados de gran cantidad de proteínas del virus rábico. Estos cambios histológicos también se relacionan con la duración de la enfermedad ya que cuando la muerte se aproxima estos cambios suelen ser mínimos.^{25, 26}

2.6.2. Respuesta inmune antirrábica

Durante el periodo de incubación el virus de la rabia es segregado. El sistema inmune desencadena la respuesta de anticuerpos.

Después de los síntomas neurológicos, los anticuerpos aparecen en el suero y posteriormente en las células estromales de la médula ósea, específicamente, por el factor que actúa como ligando sobre un receptor proteínico Stem Cell Factor (CSF).

Los anticuerpos en el CSF reflejan la producción local activa en el sistema nervioso central, así como también la transferencia pasiva y la ausencia después de la vacunación. La determinación de anticuerpos se usa solo para el diagnóstico en la fase tardía de la enfermedad. La vacunación previa de un paciente con rabia podría confundir el estado pero en la enfermedad los títulos aumentan sin ser vacunados.²⁷

Los estudios inmunopatológicos en ratones muestran que los anticuerpos neutralizantes son un componente esencial en la respuesta protectora. Sin embargo, en ratones “knockout” donde la respuesta de interferón mediado por células T es menor que en los ratones control a pesar de la presencia de anticuerpos y es evidente que la inmunidad celular juega un papel menor en la protección.²⁷

Actualmente se reconoce a la proteína G de la glicoproteína de las espículas del virus rábico como responsable de la reacción de fijación del complemento, pero sobre todo de la inducción de anticuerpos neutralizantes protectores del organismo frente a una inoculación de prueba.

Los anticuerpos neutralizantes bloquean la fijación del virus a los receptores de las células blanco, uniéndose a las proteínas virales de la superficie, facilitando la fagocitosis y la lisis de las partículas virales.²⁸

2.7. Signos clínicos de la rabia en humanos

La enfermedad comienza a partir del momento en que el virus rábico es inoculado por mordida a hospederos susceptibles (como es el caso del hombre) y los mecanismos de defensa inespecíficos no son capaces de interceptar y anular al virus; es aquí donde los signos comienzan con hormigueo, dolor e irritación. El periodo prodrómico que puede durar de 2 hasta 10 días, presenta diversos síntomas y signos no específicos, como son: malestar general, náuseas, dolor de garganta, tos, vómito, diarrea, sensación de angustia, ligera elevación de la temperatura corporal, retención urinaria, hiper-irritabilidad, libido excesivo, decaimiento o agitación, anorexia, insomnio, alucinaciones y alteraciones sensoriales imprecisas, a menudo relacionadas con el lugar de la mordedura. El paciente puede estar perturbado por una ansiedad mal definida, la cual no responde a los tranquilizantes.²⁹

Seguido del periodo Prodrómico, se inician uno de los dos modelos clínicos clásicos:

- Tipo furioso o encefálico que se caracteriza por su hiper-excitabilidad, hiperactividad, miedo con periodos de alteración cortos, hidrofobia, aerofobia, espasmos en músculos del cuello y abdomen, seguido de la flexión del cuello o raramente la extensión de éste. En la fase de excitación, hay hiperestesia y una extrema sensibilidad a la luz y al sonido, dilatación y contracción de las pupilas.²⁹
- Tipo mudo o paralítico que se caracteriza por una parálisis del tipo ascendente, observándose debilidad en el paciente. La excitación es menos evidente en la rabia paralítica, y los espasmos fóbicos aparecen solo en el 50% de esos pacientes. Durante las etapas tempranas de la rabia paralítica entre los signos más notables se incluyen el mioedema en los sitios de percusión generalmente en la región del pecho, músculo deltoides y muslo así como piloerección.²⁹

En ambos casos a medida que la enfermedad progresa hay espasmos en los músculos de deglución y la bebida es rechazada violentamente por contracciones musculares. Esta disfunción de la deglución se observa en la mayoría de los enfermos, muchos de los cuales experimentan contracciones espasmódicas laringofaríngeas. También pueden observarse sofocación y espasmos de los músculos respiratorios y convulsiones generalizadas. La fase de excitación puede ser predominante hasta la muerte o sustituida por una fase

de parálisis generalizada. En otros casos la fase de excitación es muy corta, y en casi todo el curso predomina la sintomatología paralítica. Las complicaciones neurológicas reportadas incluyen el aumento de la presión intracraneana, que puede ocurrir durante una fase de coma; donde existe un compromiso hipotalámico con producción y secreción inadecuada de hormona antidiurética produciendo temporalmente un cuadro de diabetes insípida, disfunciones autónomas con hipertensión, hipotensión, arritmias cardíacas e hipotermia también puede observarse. Al término de la enfermedad se observa una parálisis progresiva con sudoración, convulsiones, opistótonos, sialorrea y muerte por asfixia o paro respiratorio.²⁹

2.8. Instrucciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el tratamiento contra la rabia post-exposición (en humanos).

Las recomendaciones hasta el momento son las establecidas por el comité de expertos en rabia de la OMS. Los métodos propuestos pueden ser modificados en determinadas condiciones, tales como el tratamiento en niños de corta edad o en los casos en que no se conocen con certeza las circunstancias de la exposición, sobre todo si ocurre en zonas de rabia enzoótica, aun cuando el animal parezca sano en el momento de la mordedura. En esos casos el tratamiento inmediato esta justificado, pero de acuerdo con una pauta modificada, por ejemplo, el tratamiento local de la herida, seguido de la administración de una dosis única de suero (preferiblemente de inmunoglobulina humana antirrábica) y un esquema inicial de vacunación; si a los 5 días de la

exposición el animal continua sano, no será necesario continuar con la vacunación. En las zonas exentas de rabia donde sean frecuentes las mordeduras de animales, también estaría indicada una modificación del tratamiento que se recomienda a continuación. En zonas epizooticas de rabia, cuando por experiencia de campo, confirmada mediante el análisis de laboratorio, se establezca que la especie animal causante de la mordedura no esta infectada, las autoridades sanitarias podrán abstenerse de recomendar tratamiento antirrábico específico.³⁰

El volumen de vacuna por dosis y el número total de dosis que debe aplicarse varían según las condiciones de cada caso. Las vacunas se deben administrar conforme a las pautas y dosis recomendadas por los fabricantes.³⁰

A juicio del Comité, el tratamiento mixto con suero y vacuna es el más eficaz de todos los tratamientos conocidos para la profilaxis de la rabia en el humano después de la exposición, aunque la experiencia ha mostrado que en casos de exposición leve es suficiente la vacuna sola. La administración del suero se hará en una sola dosis de 40 UI por Kg. de peso, si se trata de suero heterólogo, o de 20 UI por Kg. de peso, si se emplea inmunoglobulina humana antirrábica. Al mismo tiempo se aplicará la primera dosis de vacuna, pero inyectado en un sitio distinto del cuerpo. Antes de inyectar el suero heterólogo se investigará la sensibilidad del sujeto. El médico debe estar preparado para cualquier reacción de choque anafiláctico.³⁰

El tratamiento debe iniciarse lo antes posible después de la exposición, pero en ningún caso se debe rehusar instaurarlo en una persona expuesta, cualquiera que sea el tiempo que haya transcurrido.

En las zonas donde no se disponga de suero antirrábico habrá que administrar el tratamiento completo.³⁰

2.8.1. Tratamiento local de las heridas con posible exposición a la rabia (Recomendaciones en todos los casos).

2.8.1.1. Primeros auxilios

Como el procedimiento mas eficaz de protección contra la rabia es la eliminación del virus en el sitio de infección, es indispensable la limpieza inmediata de la herida por métodos físicos y químicos. Hay que lavar de inmediato a chorro de agua con jabón, detergente o solo con agua (método que es recomendado en todas las mordeduras, aunque no haya posibilidad de contacto con el virus rábico). A continuación se aplica alcohol etílico (400-700 mL/L), tintura de yodo o soluciones yodadas o de compuestos de cuaternario de amonio (1 mL/L).³⁰

2.8.2. Tratamiento general específico

Tabla No.2 Tratamiento general recomendado por la OMS.

Naturaleza del contacto	Estado del animal (Sin tener en cuenta si esta vacunado o no)		Tratamiento recomendado
	En el momento de la exposición	Durante el periodo de observación de 10 días ^A	
Contacto sin lesión Contacto indirecto Ningún contacto	Sano		Ninguno
	Sospechoso de rabia ^B	Sano	Ninguno
		Rabioso	Ninguno
Lameduras de la piel arañazos o lesiones	Sano	Sano	Ninguno
		Rabioso ^C	Iniciar vacunación ^C
Mordedura leve (en las partes cubiertas de los brazos, del tronco y de las piernas)	Sospechoso de rabia ^B	Sano	Iniciar la vacunación; interrumpir el tratamiento si el animal continúa sano durante 5 días ^{A,D}
		Rabioso	Iniciar la vacunación si el diagnóstico es positivo administrar un ciclo completo de vacunación
Mordedura de la mucosa; mordedura grave (múltiples o en la cara cabeza, dedos o cuello)	Rabioso; animal silvestre ^E o animal que no puede someterse a observación		Administrar un ciclo completo de vacunación
	Animal silvestre ^E o doméstico sospechoso ^B de rabia o rabioso o animal que no puede someterse a observación		Suero más vacuna; interrumpir el tratamiento sólo si se trata de un animal doméstico en observación ^A que continúa sano durante 5 días

- A. Este periodo de observación sólo se aplica a los perros y a los gatos. Otros animales domésticos y silvestres sospechosos de rabia deben ser sacrificados y examinados por la técnica de anticuerpos fluorescente.
- B. En las zonas de endemia, todos los casos de mordedura sin que se haya provocado al animal deben considerarse sospechosos a no se que resulte negativo el análisis de laboratorio del encéfalo del animal.
- C. Durante el periodo habitual de 10 días, tan pronto aparezca el primer signo de rabia en un perro o un gato que haya mordido a alguien, comenzar el tratamiento con vacuna. El animal con síntomas se sacrificara inmediatamente y será examinado por la técnica de anticuerpos fluorescentes.
- D. Si la prueba de anticuerpos fluorescentes en el tejido encefálico del animal da resultado negativo.
- E. En general muy rara vez o nunca, es necesario el tratamiento antirrábico específico cuando el contacto es con roedores, conejos o liebres.³⁰

2.9. Prevención y control de la rabia

La rabia, en la mayoría de casos es mortal, por lo que la prevención es el único método disponible para controlarla. La prevención consiste en la aplicación de vacunas antirrábicas a los animales susceptibles, así como para el personal que trabaja en contacto con los animales que puedan transmitir la rabia como son los veterinarios, personal de laboratorio, agricultores, entre otros.⁹

Los procedimientos usados en los programas de prevención y control y erradicación de la rabia urbana tienen por objeto la reducción rápida de la población de animales susceptibles, mediante la inmunización de perros y gatos con dueño y la eliminación de perros callejeros. Actualmente se dispone de un gran número de vacunas de gran actividad para el uso en perros. Las vacunas son de dos tipos: de virus inactivado y de virus vivo modificado.^{9,31}

El control de la rabia transmitida por quirópteros hematófagos (murciélagos vampiros) resulta de especial interés para América Latina. Los procedimientos principales de control consisten en vacunar el ganado en las áreas expuestas y en reducir la población de los vampiros.⁹

Para prevenir los casos humanos originados por quirópteros, se debe advertir a la población e instruir especialmente a los niños de que se abstengan de tocar o recoger murciélagos caídos o capturar los que vuelan durante el día. Así mismo, se puede impedir la entrada de murciélagos a los edificios sellando las vías de

entrada y de salida. Por otra parte, los murciélagos insectívoros y frugívoros resultan beneficiosos para la agricultura y no deben intentar ser capturados, además de que están protegidos y son considerados como especies en peligro de extinción.^{9, 31}

2.10. Rabia en México y en el mundo

El estudio y atención de la rabia humana requiere de información oportuna y veraz de los factores y condiciones que hacen posible su presentación; de la distribución de la enfermedad, de los riesgos y los daños que generan ante los casos y contactos con este virus.²⁵

En México la transmisión del virus de la rabia se mantiene por que la rabia es enzoótica en los diferentes reservorios de los ciclos: 1) urbano y 2) silvestre, el primero incluye al perro, el cual adquiere la infección por individuos enfermos, tomando en cuenta la libertad que tiene este para deambular en la vía pública. El segundo, transmitida por animales silvestres, se diferencia en terrestre y aérea. Los reservorios son carnívoros como el zorrillo, coyote, zorro; y la otra de gran importancia epidemiológica es la del tipo aéreo, transmitida al hombre y a otros animales de sangre caliente por quirópteros, principalmente por el murciélago hematófago.²⁵

En las zonas rurales de la república mexicana el 50% de los casos de rabia en humanos se debe a la mordedura del murciélago hematófago, seguido por el perro.³²

En 1989 en la ciudad de México, se detectaron 1046 perros rabiosos y se detectaron cinco muertes por rabia humana. Para 1990 la rabia era un serio problema de salud pública en la mayoría de los países de Latinoamérica; los países que más notificaban casos humanos eran México y Brasil con 69 y 73 defunciones, respectivamente. En los años de 1990 y 1995 el estado de México ocupó el primer lugar a nivel mundial en casos de rabia humana y canina; y fue hasta 1996 que en la ciudad de México no se registro ninguna muerte por rabia en humanos.³³

En el año 2000 el Sistema Regional de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas (SIRVERA), publicó en 1991, 7,351 casos de rabia en perros y que en el año 2000 disminuyó a 244 casos. A la par disminuyó el número de casos humanos contagiados.

En la actualidad, en nuestro País se ha logrado el control epidemiológico de la rabia urbana así como la transmisión a seres humanos debido a una serie de campañas nacionales contra la rabia y a diversas medidas que son importantes antecedentes en las investigaciones de campo, clínicas y de laboratorio, para

realizar y promover estudios epidemiológicos de los casos, la notificación oportuna, el análisis de los datos y la publicación técnica y científica.

2.11. Vacunas

Una vacuna es una suspensión de microorganismos (o alguna parte de ellos) que produce inmunidad al ser inoculada en un huésped, ello induce en el huésped la formación de anticuerpos frente al organismo causante de enfermedad; por lo que, durante exposiciones futuras de este microorganismo, el agente infeccioso es inactivado y por lo tanto no se establece el estado de enfermedad.³⁴

La vacunación consiste en la administración de un microorganismo, una parte de él o un producto derivado del mismo (antígenos inmunizantes), con el objeto de producir una ruptura inmunológica similar a la de la infección natural, pero sin peligro para el individuo vacunado.^{35, 36, 37, 38}

La vacunación ha sido una excelente estrategia para reducir los índices de mortalidad de esta enfermedad. La eficiencia de dicha estrategia esta basada en el uso de vacunas inocuas y de potencia adecuadamente, aplicadas de manera oportuna para lograr las coberturas establecidas, en lo que se denomina un programa de vacunación.^{38, 39}

2.11.1. Desarrollo de las primeras vacunas de uso humano para el tratamiento de la rabia

La rabia es la única infección neurológica que se puede prevenir por vacunación antes o después de una exposición al virus, las vacunas tienen que otorgar protección y eficiencia antes de que el virus alcance al sistema nervioso.^{26, 40}

Entre 1800 y 1885 Pasteur junto con sus discípulos Pierre Paul Emile Roux (1853-1933) y Charles Chamberland (1851-1908), trabajaron en la atenuación del virus de la rabia. A partir de tejido nervioso de perros que habían muerto por rabia, obtuvieron un filtrado donde se podía demostrar que aun estaba el agente (virus de la calle), ya que aunque no era cultivable, transmitía la enfermedad al inyectarse en perros sanos. Después lograron establecer que el agente podía multiplicarse localmente si era inoculado directamente en el cerebro y la medula espinal de los animales y eligieron conejos para sus experimentos. Al pasar sucesivamente el virus por el cerebro de conejos, obtuvieron un virus fijo con un período de inoculación constante de 7 días.

A partir de estos hallazgos establecieron un método de atenuación del virus consistente en la desecación a temperatura ambiente de la medula espinal de conejos muertos por la infección.³⁰

El 6 de julio de 1885, Pasteur realizó la primera vacunación contra la rabia con una vacuna que podría considerarse parcialmente inactivada, salvando así la

vida de un niño llamado Joseph Meister, un niño campesino que había sido mordido por un lobo rabioso, inoculándole material desecado procedente de tejidos del sistema nervioso con virus vivo, aplicando una suspensión de medula de 15 días de desecación y posteriormente se le aplico otras 12 inoculaciones en los 10 días siguientes con extractos de virulencia progresivamente mayor, obtenidas de medulas cada vez más recientes hasta llegar a la de un día. Tras la aplicación Joseph se curo a los 4 meses.³⁰

En 1887 el general Porfirio Díaz presidente de México, Comisiono al Dr. Eduardo Liceaga, presidente del Consejo Superior de Salubridad, para estudiar el procedimiento utilizado por Pasteur en las inoculaciones contra la rabia además de traer la vacuna de Paris.

El 19 de enero de 1888 en el Instituto Pasteur, el Dr. Liceaga obtuvo el cerebro de un conejo recién fallecido de rabia, mismo que transportaría a México temiendo que las altas temperaturas de las Antillas y del Golfo hicieran perder su virulencia, el 17 de febrero del mismo año el Dr. Liceaga comenzó sus experimentos siguiendo la técnica que había visto en Paris.

Cabe mencionar que el primer conejo inoculado era de raza Belga, sin embargo la demanda de estos conejos y la dificultad de proveerlos obligo al Dr. Liceaga a utilizar conejos mexicanos que eran inferiores en peso y talla frente a sus homólogos, de esta forma observo que no existían variaciones en sus

resultados. Posteriormente se enfrento al problema de las diferencias de temperatura y presión atmosférica de la ciudad de México, comparadas con las condiciones atmosféricas de Paris, para ello el medico Nicolás Ramírez de Arellano resolvió el problema argumentando que el cerebro de conejo no había perdido virulencia al ser transportado de Paris a México por que se encontraba sumergido en glicerina y si se transporta de la misma forma las medulas producidas en el laboratorio del Dr. Liceaga, podrían llegar a cualquier punto de la republica mexicana, hipótesis que no tardo en demostrarse.

Un periódico político dio la noticia de los experimento del Dr. Liceaga y el 22 de abril del mismo año el niño Isidro Delgadillo de 12 años originario de Texcoco Estado de México fue conducido al laboratorio tras haber sido mordido por un perro rabioso. El Dr. Liceaga encomendó al Medico Veterinario José de la Luz Gómez la preparación de la vacuna para tal efecto, esta vacuna se preparo a partir de medulas espinales desecadas por 12 días de conejos rabiosos; el Dr. Agustín Reyes fue el encargado de aplicar el biológico y de supervisar el tratamiento que fue exitoso. Dentro de las aportaciones del Dr. Liceaga para el combate de esta enfermedad se encuentran; la conservación de cepas en glicerina que permiten la transportación a otras partes del país, así como el establecimiento de la uniformidad en el número y la dosis de las inoculaciones aplicadas a los enfermos. Se decidió aplicar 30 inyecciones conteniendo medio centímetro de médula cada una de ellas, en lugar de un milímetro como Pasteur

recomendaba y por último, el uso de conejos mexicanos para la obtención de la vacuna.⁴¹

En 1908 Fermi y en 1911 David Semple, desarrollaron una vacuna a partir de cerebros de borrego y cabra infectados con el virus fijo de Pasteur, inactivando el producto con formol y fenol, como sustitutos de la inactivación por desecación que utilizaba Luís Pasteur; pero conservaron el mismo esquema de vacunación. Las vacunas de tejido nervioso de animal tipo Fermi o Semple fueron utilizadas hasta los años 50, debido al gran contenido de mielina que presentaba la vacuna y en consecuencia, producía reacciones neurológicas severas en algunos pacientes, asociada a la respuesta inmune contra la proteína.^{6, 25, 32}

En 1950 fue desarrollada la vacuna inactivada para uso humano, producida en embrión de pato (DEV) por *Powell et al.*, con la finalidad de no usar tejido nervioso para evitar accidentes post-vacunales. Esta vacuna DEV comenzó a ser muy comercial en los Estados Unidos en el año de 1957, pero produjo 21 casos de reacciones adversas con complicaciones neurológicas en 597 mil personas vacunadas. En 1977, se hizo un estudio comparado de esta misma vacuna, pero modificada por purificación por medio de la ultracentrifugación llamándose ahora vacuna de embrión de pato purificada (PDEV), desarrollada en huevos de pato embrionados, antes de preparar la vacuna se eliminaba la cabeza del embrión con el fin de remover el tejido nervioso para evitar encefalitis, fue poca la diferencia en cuanto a la formación de anticuerpos contra

la rabia, pero las reacciones adversas fueron menores con la PDEV. La OMS, en 1995 recomendó su uso tanto por vía intradérmica como intramuscular, demostrando ser más inmunogénica por vía intramuscular.⁴²

En 1955, E. Fuenzalida y Palacios del Instituto de Bacteriología de Chile, desarrollaron una vacuna antirrábica a partir de cerebros infectados de ratones recién nacidos, los cuales desarrollan la mielina hasta los 9 días de vida, esta fue la primera vacuna sin mielina que ayudo a disminuir los accidentes neuromusculares que se manifiestan como encefalomielitis o polineurítis. La técnica de preparación de la vacuna Fuenzalida-Palacios, ha sido modificada al emplear ratones de no mas de 1 día de nacidos, inoculando virus CVS por vía intracerebral al día 1 y cosechando a más tardar al día 4. La suspensión obtenida se purifica por medio de centrifugación a altas velocidades, con la intención de reducir aun más el nivel de sustancias encefalitogénicas en el producto acabado. Actualmente esta vacuna se usa de forma constante y exitosa en algunos Países de Latinoamérica y varias partes de Asia y África, tanto para inmunizar humanos como animales domésticos, la OMS ha señalado como fecha límite para su uso el año 2006. En México, el último lote se produjo en 1997.^{6, 32, 40}

En 1960 Tadeo Wiktor y sus colegas del Instituto de Filadelfia (*Wiktor et. al. 1969*), produjeron la primera vacuna de cultivo celular de células diploides humanas (HDCV), la vacuna HDCV es producida en células fibroblásticas

humanas usando la cepa de Pitman-Moore, aislado originalmente del virus rábico de Pasteur. Es purificado y concentrado por ultracentrifugación e inactivado, con β -propiolactona (BPL). La vacuna HDCV probó ser más inmunogénica y menos alergénica en comparación a las vacunas usadas anteriormente. Esta vacuna cambio el concepto de la vacunación antirrábica, ya que provee de eficacia y seguridad, en la profilaxis de preexposición en personal de alto riesgo y post exposición para la gente en general. El único inconveniente que presenta esta vacuna es el costo de producción, ya que se estima en promedio 20 veces mas cara en un País Latinoamericano, que la producción de vacuna del tipo Fuenzalida, por esta razón se utiliza más esta última, para abatir costos en países subdesarrollados.⁴⁰

En 1984, Barth y sus colegas desarrollaron la segunda vacuna de cultivo a partir de células purificadas de embrión de pollo (PCECV), se demostró que con esta línea celular se obtenía mayor producción de virus y en consecuencia una mayor producción de dosis en comparación con las células diploides humanas. La PCECV se obtuvo propagando la cepa Flury de bajo pasaje (LEP) en fibroblastos primarios de pollo. La vacuna PCECV presento reacciones adversas como dolor de cabeza y mareo en vacunaciones y revacunaciones de acuerdo a lo reportado por Bjok en 1985 y Briggs en 1999, con la aplicación de la PCECV en varios países del mundo. En 1995 Ljubic et al, reportaron que el tratamiento era 100% efectivo en pacientes con exposiciones de rabia muy severas.^{40, 43, 44}

Otro tipo de vacuna desarrollada a partir de cultivo celular es, la vacuna purificada obtenida a partir de la línea celular continua de riñón de mono verde (VERO o PVRV), cuyo costo es aproximadamente la mitad del precio de las células diploides, ya que puede ser cultivada en biofermentadores con microtubos a gran escala obteniendo grandes cantidades de vacuna a bajo costo. La vacuna de células VERO consiste en una suspensión inyectable, obtenida mediante la reconstitución del liofilizado del virus rábico cepa Wistar Rabies PM/WI 38-1503-3M inactivado con BPL con una solución de cloruro de sodio. Esta vacuna demostró buenos resultados en la seroconversión de las personas vacunadas.⁴⁰

En México se emplean principalmente las vacunas de tipo HDCV, VERO y PVRV, vacunas autorizadas que no presentan reacciones neurológicas adversas. Estos biológicos, requieren únicamente 5 dosis como tratamiento profiláctico, a diferencia de las 14 dosis empleadas anteriormente con las vacunas producidas en tejido nervioso.²⁵

2.11.2. Cepas rábicas autorizadas actualmente para la producción de vacunas contra la rabia.

En la actualidad, se emplean diferentes cepas rábicas fijas para la producción de vacunas antirrábicas inactivadas en cultivos celulares, las cuales son:

1. Cepa Pasteur de París de virus rábico fijo de conejo; adaptada a las células VERO.

2. Cepa Pasteur PV-12 de virus rábico fijo de conejo; adaptada a células BHK-21.
3. Cepa Pitman-Moore (PM) de virus rábico fijo, adaptadas a células humanas diploides primarias de riñón de perro, VERO, y Nil-2.
4. Cepa CVS-27 (Challenge Virus Standard) de encéfalo de ratón de virus rábico fijo; adaptada a células BHK-21.
5. Cepa Kissling CVS-11 adaptadas células BHK-21.
6. Virus rábico Flury adaptado al embrión de pollo de bajo pasaje (40-50 pases); adaptado a células primarias de embrión de pollo y BHK-21.
7. Virus rábico Flury adaptado al embrión de pollo de alto pasaje (227-230 pases); adaptado también a células primarias de embrión de pollo.
8. Virus rábico Kelep adaptado al embrión de pollo (100 pases).
9. Virus SAD (Street – Alabama – Duffering); adaptado a células BHK-21.
10. Cepa ERA (Evelyn Rokitniki Abelseth) de virus SAD; adaptado a células de riñón de cerdo; adaptado también a células BHK-21.
11. Cepa Vnukovo-32 de virus SAD; adaptado a células primarias de riñón de hámster.
12. Cepa Beijing de virus fijo de la rabia; adaptado a células primarias de riñón de hámster.²⁵

2.11.2.1. Potencia y requerimientos para vacunas de uso animal y humano contra la rabia

La rabia es una enfermedad fatal, es absolutamente esencial establecer la potencia adecuada. Las pruebas usadas para valorar la potencia de la vacuna es la prueba de la “National Institutes of Health” (NIH).⁴⁵ La potencia mínima requerida para todos los cultivos celulares y las vacunas contra la rabia de huevos embrionados purificados es de 2.5 UI por dosis intramuscular única.⁴⁶

Hoy en día varias vacunas de rabia inactivada son comercialmente avaladas para animales domésticos y estas vacunas han demostrado la inducción protectora de la respuesta inmune seguida de una única vacunación. Sin embargo cada vacuna acarrea riesgo debido a la posibilidad de inactivación del virus y las inadvertidas partículas patógenas residuales del virus de la rabia.

El esfuerzo continuo en estos problemas ha permitido la ventaja de desarrollar vacunas utilizando subunidades de proteínas recombinantes de vectores virales y algunas basadas en ADN.⁴⁷

2.11.2.2. Vacunas recombinantes

Hay microorganismos que son difíciles de cultivar en el laboratorio y esto dificulta la elaboración de las vacunas tradicionales. Una alternativa para superar este problema lo ofrece la tecnología del ADN recombinante. Esta tecnología permite aislar el gene que codifica la síntesis de una proteína antigénica del

patógeno contra el cual se quiere obtener una vacuna. El gene, insertado en un vector de ADN (por ejemplo, un plásmido), se introduce en levaduras, bacterias o células eucarióticas, donde se espera que se replique y fabrique grandes cantidades de la proteína en cuestión. La proteína liberada se recupera, se purifica y se utiliza para preparar la vacuna deseada (**fig. 3**).

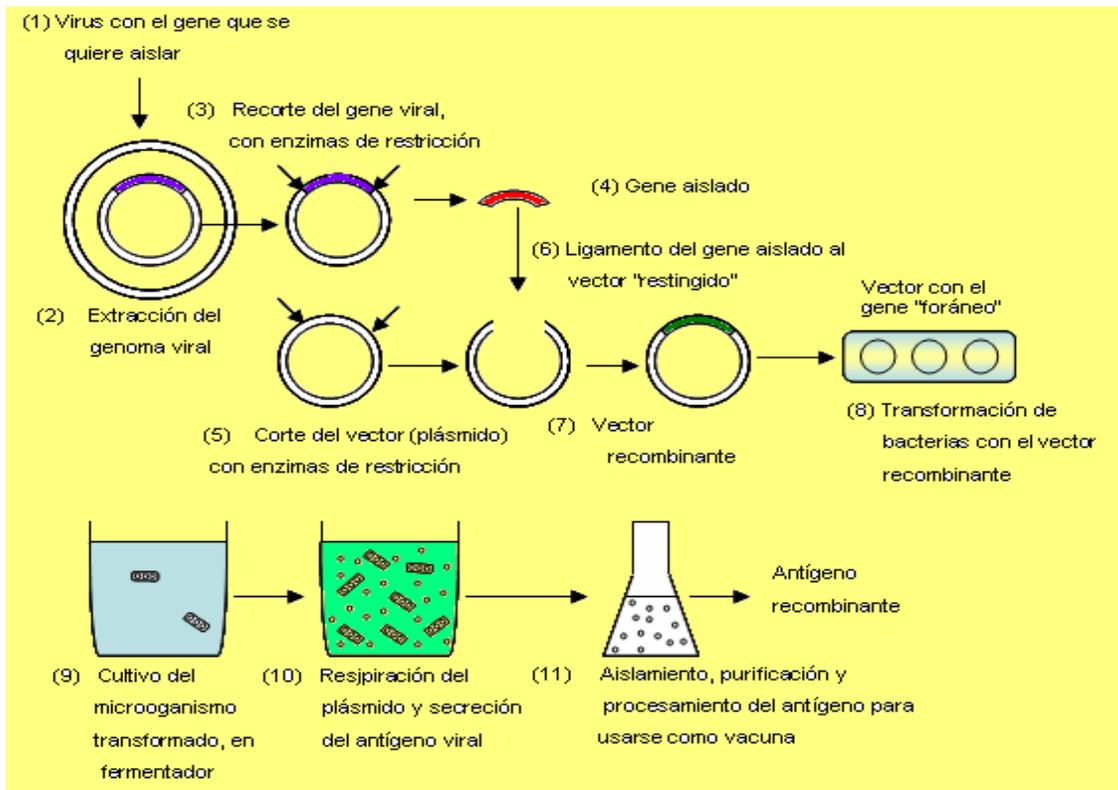


Figura 3. Las proteínas se producen: (1) seleccionando al microorganismo contra el cual se quiere preparar una vacuna, (2) extrayendo el material genético del microorganismo, (3) recortando del genoma microbiano el gene que nos interesa expresar (4), (5) seleccionando un vector de expresión (un plásmido) que después se corta con enzimas de restricción, (6) ligando el gene del microorganismo al genoma "restringido" del plásmido, (7-8) insertando el plásmido con el gene foráneo en una bacteria como *Escherichia coli*, (9) cultivando la bacteria transformada en un fermentador, (10-11) aislando, purificando y procesando la proteína (antígeno) recombinante para usarse como vacuna.⁴⁸

Actualmente sólo se cuenta con una vacuna recombinante de aplicación rutinaria (la vacuna contra el virus de la hepatitis B), pero se están desarrollando otras contra la fiebre tifoidea, el cólera, la malaria, la esquistosomiosis, la hidatidosis (en animales) y otras enfermedades.⁴⁸

2.11.2.4. Vacunas DNA con vectores vacúnales

Las vacunas con vectores son una aportación de Bernard y Enzo Paoletti quienes en forma independiente utilizaron al virus de la vaccinia, como portador de genes foráneos codificantes de antígenos protectores. Además del virus de la vaccinia, se han usado otros vectores como los virus de la polio, del herpes, *avipoxvirus*, *adenovirus* y bacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *Mycobacterium bovis* BCG.⁴⁸

Gracias a que el tamaño del genoma de estos vectores es muy grande, es posible incluir en ellos a varios genes foráneos, cubriendo de esta manera la necesidad de protección contra más de una enfermedad. Una desventaja de las vacunas con vectores vivos es que podrían, en algunos casos, ser causa de enfermedad o muerte en individuos inmunodeficientes. Sin embargo, en un caso este problema se ha resuelto incluyendo en el genoma del vector el gene que codifica para IL-2, un factor de proliferación celular. El virus de la vaccinia con el gene para IL-2 no causa la muerte de los ratones atímicos vacunados con esta construcción. Es importante hacer notar que las vacunas con vectores vivos inducen excelentes respuestas de células T, incluyendo células T citotóxicas

(Tc). **La figura 4** ilustra, de manera muy simplificada, la producción de vacunas recombinantes con vectores que se replican: las células eucarióticas se transforman con un plásmido (como el pBR322) que lleva insertado un gene foráneo codificante de un antígeno inductor de inmunidad y simultáneamente se infectan con un agente vacunal, por ejemplo el virus de la vaccinia. Dentro de las células, el virus se desnuda e inicia su replicación y al hacerlo interacciona con secuencias homólogas del mismo virus insertadas en el plásmido, junto con el gene foráneo. Usualmente las secuencias homólogas del virus insertadas en el plásmido corresponden al gene para la timidínica, pero pueden ser otras secuencias. La replicación del genoma viral y su interacción con el ADN plasmídico permite la formación de recombinantes en las que el gene foráneo acarreado por el plásmido se integra al genoma viral de manera estable. El genoma viral, portador ahora del gene foráneo, continúa su replicación hasta producir partículas virales completas, todas ellas portadoras del gene (o genes) foráneo codificante de antígenos inductores de inmunidad. En este caso, la vacuna de vaccinia recombinante se administra igual que la vacuna de vaccinia sola, por perfusión, a través de la piel.⁴⁸

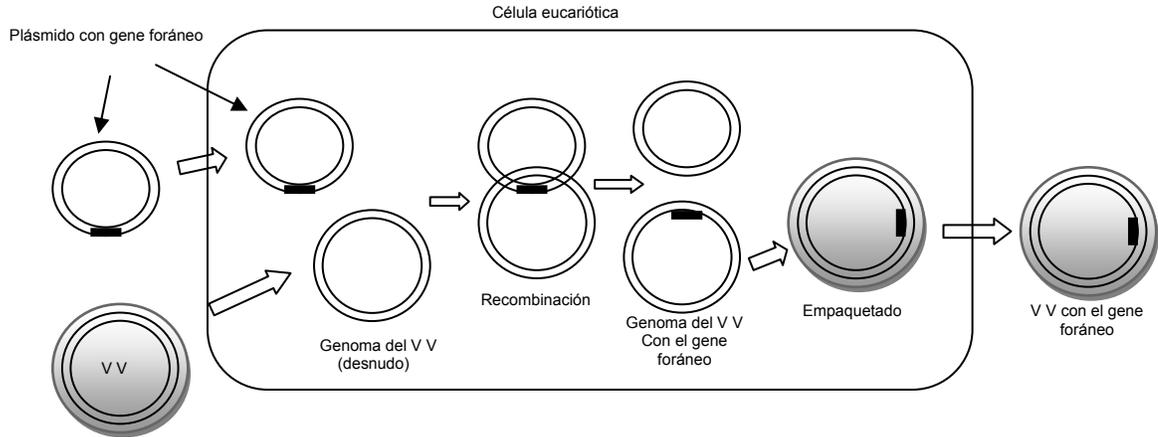


Figura 4. Producción de vacunas recombinantes con vectores que se replican se hace coinfectando células eucarióticas con un plásmido portador de un gene foráneo de interés y un microorganismo vacunal como el virus de la vaccinia (V V). Después de desnudarse, el genoma del virus se replica y al hacerlo interacciona con secuencias homólogas del virus insertadas junto con el gene foráneo, en el ADN plasmídico. Como resultado de la recombinación, el virus de la vaccinia integra el gene foráneo en su genoma y continúa su replicación produciendo partículas virales, todas ellas transfectadas con el gene foráneo. Ahora el virus de vaccinia acarrea un gene que codifica para un antígeno inductor de inmunidad.⁴⁸

2.11.2.4. Vacunas DNA

Las vacunas DNA se basan en la inyección directa de DNA al huésped.

Dichas vacunas codifican para un gen antigénico de un patógeno, en lugar del antígeno proteico o del patógeno atenuado/muerto. La expresión endógena del antígeno dentro de las células del huésped puede inducir una respuesta inmune completa y duradera.³⁶

Pocas áreas de experimentación en vacunación se han desarrollado tan explosivamente como las vacunas de ADN (también llamadas vacunas de ADN desnudo).⁴⁹

En 1990, Wolf y colaboradores fabricaron un plásmido portador de un gene reportero y lo inyectaron intramuscularmente en el ratón. Después encontraron que la proteína codificada por el gene se encontraba presente en el líquido intersticial de los animales inoculados. Más tarde, en 1993, el grupo de Margaret Liu demostró que se podía inducir inmunidad protectora en ratones vacunados con ADN desnudo portador del gene para la nucleoproteína del virus de la influenza de tipo A.⁴⁸

A diferencia de las vacunas que emplean vectores vacunales, la mayoría de las vacunas con ADN plasmídico no se replican dentro del animal inmunizado. Los plásmidos recombinantes que contienen las secuencias que codifican para antígenos protectores se amplifican *in vitro* en cultivos de *E. coli*, y su origen de replicación no funciona en células de mamíferos.⁴⁸

Las vacunas de ADN consisten de un gene foráneo clonado en un plásmido bacteriano, el cual está construido de tal manera que pueda expresarse en células eucariotas. Los requisitos incluyen:

- a. Un origen de replicación que permita su multiplicación en bacterias (el origen de replicación de *E. coli*, Co1, en plásmidos PUC es el más utilizado para este propósito porque proporciona un gran número de copias en bacterias).
- b. Un gene de resistencia a antibióticos (este permite la selección de las bacterias transformadas con el plásmido) y para uso en humanos se recomienda la kanamicina.
- c. Un promotor fuerte para expresión óptima en células de mamíferos (como el promotor de *citomegalovirus*).
- d. Un estabilizador de los transcritos de mRNA, como la secuencia de poli-A obtenida del virus SV-40. Además, las vacunas de ADN también requieren de oligonucleótidos específicos, que funcionando como adyuvantes y confieren inmunogenicidad a estas vacunas. Los oligonucleótidos son hexámeros palindrómicos, abundantes en el ADN de bacterias, que incluyen el dinucleótido no metilado citosina-fosfato-guanosina (CpG, en inglés se le llama *motifs*) y que pueden tener secuencias como las siguientes: 5'-GACGTC-3', 5'-AGCGCT-3' y 5'-AACGTT-3' (**Figura 5**).⁴⁸

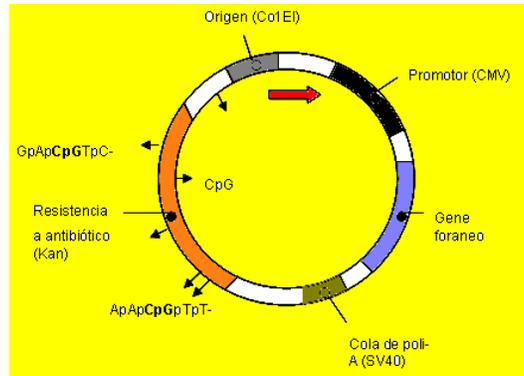


Figura 5. Los requisitos básicos de un vector de ADN plasmídico incluyen: **a.** una unidad transcripcional que consiste en un promotor (por ejemplo, de citomegalovirus, CMV), un inserto del gene foráneo y la secuencia de transcripción/terminación (poli-A), y **b.** un origen de replicación bacteriano (Co1E1) y gene de resistencia a un antibiótico (kanamicina, kan, por ejemplo) que permita el crecimiento y la selección de la bacteria transformada. Los residuos de 5'purina-purina-citidina-guanosina (CpG)-pirimidina-purina-3' en el esqueleto del plásmido funcionan como adyuvantes al inducir la proliferación de las células APC, T y B.⁴⁸

2.11.2.5. Mecanismo de acción de las vacunas DNA

La eficiencia de las vacunas DNA se debe principalmente a los mecanismos de presentación de antígenos involucrados.⁵⁰ Estudios iniciales debatieron el papel respectivo de las células presentadoras de antígenos (CPA) y de las células no linfoides (musculares o de la dermis) para la producción del antígeno y la inducción de la respuesta inmune. Recientemente el uso de sondas de DNA marcadas con moléculas fluorescentes permitió seguir con precisión la distribución del DNA después de una inyección, confirmando el papel de ambos tipos de células. Así, se demostró que el DNA se encuentra inicialmente distribuido en los espacios extracelulares de la mayor parte del músculo, antes de ser captado rápidamente por células musculares próximas al sitio de inyección y células mononucleares localizadas entre las fibras musculares. Tres

horas después de la inyección, se empieza a detectar el DNA dentro de los nódulos linfáticos, en vesículas fagocíticas de CPAs.

De esta manera, las vacunas de DNA pueden inducir la presentación del antígeno a través de las vías tanto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I como del CMH clase II, lo que lleva a la activación de células T cooperadoras CD4⁺ y citotóxicas CD8⁺.³⁶

La inyección intramuscular del plásmido permite la transfección de las células musculares y las dendríticas. El plásmido entra primero al citoplasma y posteriormente al núcleo de estas células, pero no se integra a sus genomas y, aunque ocurre expresión de los antígenos recombinantes por los miocitos, estos antígenos se “escurren” continuamente de estas células y son capturados por las células dendríticas (DC, dendritic cells) en un fenómeno conocido como “cross-priming” o sensibilización cruzada. Las DC viajan constantemente a los ganglios linfáticos donde presentan el antígeno asociado a moléculas MHC a las células T reactivas.

Cuando se usa la pistola de ADN, el plásmido se inyecta intradérmicamente. En este caso, son principalmente las células de Langerhans las que se transfectan, y las que viajan a los ganglios regionales, estas expresan, procesan y presentan los antígenos recombinantes.

Las vacunas de ADN tienen varias ventajas sobre las vacunas con proteínas recombinantes clásicas: no hay problemas en el re-arreglo de los antígenos ni modificaciones postranscripcionales que afecten, por ejemplo, su glicosilación; las vacunas de ADN son muy estables y por esto más baratas y, aunque se requiere de refuerzos, las dosis de refuerzo son muy pequeñas. No obstante estas ventajas, hasta el momento las vacunas de ADN no han sido autorizadas para su uso rutinario en el humano. Esto se debe a las estrictas regulaciones en el uso del ADN ya que se tiene el temor de que estas moléculas pudieran sufrir o causar mutaciones en el genoma celular y promover el desarrollo de cáncer o de autoinmunidad contra el ADN, además de que la expresión continua del antígeno podría provocar tolerancia de larga duración.²²

La seguridad y eficacia de las vacunas ADN han sido probadas predominantemente en ratones pero también existen reportes donde utilizaron especies mayores, como cerdos, ganado vacuno, equinos y primates no humanos.⁴⁷

2.11.2.6. Vacunas Orales

La idea de las vacunas Orales deriva de los trabajos originales de Charles J. Arntzen, quien demostró que las plantas transgénicas pueden expresar proteínas recombinantes. El proyecto del desarrollo de estas vacunas toma en cuenta dos consideraciones favorables: *a.* las plantas pueden ser un sistema de producción masiva de antígenos protectores recombinantes y *b.* las vacunas se

pueden administrar por vía oral, aprovechando la existencia de tejido linfoide asociado a la mucosa del tracto digestivo.^{48, 51} Desde la década de 1981-1990, las plantas se han usado como sistemas de expresión de proteínas de mamíferos. Así se logró que la planta de tabaco expresara moléculas completas de IgG y se demostró que las plantas y los mamíferos comparten procesos biosintéticos fundamentales. Las plantas transfectadas pueden expresar simultáneamente varios genes y producir los antígenos correspondientes a un costo relativamente bajo, aprovechando los cultivos que ya existen en cada país. La producción de antígenos recombinantes en plantas transgénicas comestibles no requieren de practicas de esterilidad ni de cuidados extremos en los cultivos. Por si fuera poco, la estructura de las células vegetales permite la bioencapsulación de los antígenos recombinantes y su protección contra el proceso digestivo hasta ser liberados en el intestino. Esa protección está dada por la pared y la membrana de las células que contienen al antígeno.^{48, 52}

La planta ideal para la preparación de vacunas comestibles debe de tener un alto contenido de proteína recombinante, ingerirse cruda, tener una amplia distribución geográfica y ser fácilmente manipulable genéticamente.⁵²

Aunque la planta del tabaco no tiene todas estas características, se utilizó para clonar, por primera vez, el gene del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). El antígeno recombinante estimuló en ratones la producción de anticuerpos específicos. Otras vacunas comestibles recombinantes son las

subunidades B de las toxinas termolábiles de *E. coli* y de *V. cholerae*. En un estudio de fase I se logró que 10 de 11 individuos inmunizados oralmente con pedazos de papa transgénica para la subunidad B de la LT de *E. coli*, produjeran anticuerpos neutralizantes. Dadas las características de estas vacunas es muy probable que las primeras aprobadas sean aquellas para uso en el ganado.^{48, 53}

2.11.2.6. Vacunas DNA presente y futuro.

La gran mayoría de las vacunas en uso actualmente están dirigidas contra patógenos que pueden ser controlados eficazmente con anticuerpos. Sin embargo, un gran número de patógenos han desarrollado una multitud de estrategias de escape y mecanismos de resistencia a la actividad lítica de los anticuerpos y han frustrado los esfuerzos de desarrollo de vacunas. La eliminación de estos patógenos requiere de la activación de ciertas poblaciones específicas de linfocitos T, y las vacunas de DNA representan una de las estrategias novedosas para lograr la activación de tal respuesta inmune celular.⁵⁰

2.11.2.7. Importancia social de las vacunas DNA

Los resultados obtenidos con las vacunas de DNA en modelos pre-clínicos justifican plenamente los esfuerzos realizados para optimizar su eficacia en humanos y todavía se tienen que buscar estrategias para permitir el desarrollo potencial de estas vacunas.⁵⁴

De esta manera, es muy probable que el desarrollo de los sistemas de administración resulte en la eficiencia más grande de las vacunas de DNA, lo que llevaría a cambios dramáticos en el control de varias enfermedades infecciosas y no infecciosas.⁵⁵

El proceso de control de calidad de las vacunas es necesariamente complicado y laborioso y consume mucho tiempo y esfuerzo a causa de la duración de las pruebas efectuadas en animales de laboratorio, que además son costosas y sujetas a su propio control interno de calidad.⁵⁴

De esta forma, es imposible hacer frente a una nueva forma de pandemia como puede llegar a convertirse la gripe aviar. La Organización Mundial de Salud procura, que si se llegase a convertir en pandemia, se cuente con nuevos fármacos inhibidores de la neuraminidasa, pero se advierte que nos hallemos lejos de contar con la infraestructura que se requiere para hacer frente a semejante amenaza.⁵⁵

Nunca como ahora el mundo había podido divisar una pandemia de gripe, ni contando con tantas herramientas para atenuar su impacto, pero todavía quedan cuestiones por resolver. La amenaza, sea esta inminente o remota, existe: aunque el virus H5N1 nunca evolucionará hacia una forma capaz de expandirse entre los humanos, otro virus lo hará.⁵⁴

Esto deja de manifiesto que los métodos tradicionales de obtención de vacunas todavía se encuentran lejos de ser eficientes, es por ello que es primordial cambiar las estrategias y dirigir parte de un sector económico encaminado a concretar los proyectos prometedores para las vacunas de origen genómico.⁵⁵

La OMS estima que millones de muertes infantiles en el mundo se deben a enfermedades que podrían prevenirse con las vacunas existentes, ya que existen vacunas eficaces y seguras para 5 de los 10 azotes principales de la infancia. Sin embargo, la incapacidad de conseguir niveles más elevados de vacunación es un problema para consumir esta tarea.⁴⁶

Además de estos desafíos, persiste la necesidad de elaborar vacunas para las enfermedades que aún no hay vacunas que sean de bajo costo, termoestables y accesibles en todo el mundo, para poder hacerlas llegar a las poblaciones que las necesitan, de manera particular en los países en vías de desarrollo. En este sentido las nuevas investigaciones deben utilizar herramientas como la genómica y la proteómica con el fin de mejorar la seguridad y la eficiencia de las vacunas disponibles en la actualidad así como para elaborar nuevas vacunas.⁴⁶

2.11.2.9. Rutas de inoculación para las vacunas contra la rabia existentes en el mercado

La OMS recomienda una dosis intramuscular (IM) y una intradérmica (ID) para la inmunización pre-exposición, dos IM y dos ID para la profilaxis post-exposición.⁴⁶

2.11.2.10. Construcción de la vacuna antirrábica (DNA desnudo) empleada en este proyecto

La vacuna de DNA contra la rabia se construyo siguiendo la técnica descrita por Bahloul⁵⁶ y Perrin.⁵⁷ Esta consiste en la inserción del gen que codifica para la proteína G del virus de rabia de un aislado mexicano (HQ01-IMSS).en el plásmido de expresión mamífero pCI-neo (**Figura 6**), el cual, cuenta con un potente promotor eucariótico de Citomegalovirus (CMV). Por la ruta parenteral permite obtener buenos títulos de anticuerpos y protección contra la rabia en ratones y perros.⁵⁸

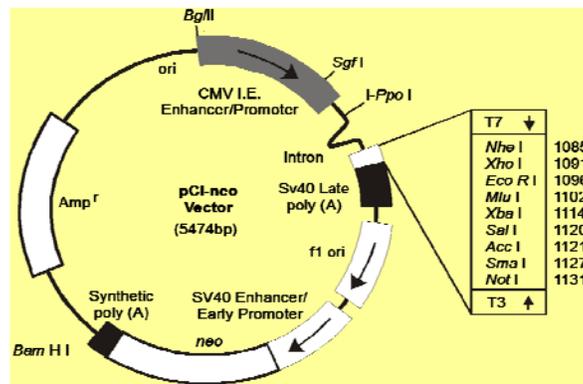


Figura 6. Esquema del plásmido comercial pCI-neo empleado para la inserción del gen que codifica para la proteína G del virus de la rabia.^{56, 57}

3. Planteamiento del problema

La rabia es una enfermedad viral que aun se encuentra vigente en muchos países del mundo, primordialmente los que se encuentran en Asia, África y América Latina. La enfermedad se ha controlado en países desarrollados pero no así en países que se encuentran en vías de desarrollo. En México se ha podido disminuir la rabia urbana gracias a las campañas de vacunación antirábica promovidas por la Secretaria de Salud (SSA).

La vacunación es el medio principal para el control de esta enfermedad. El desarrollo de vacunas modernas y el estudio de nuevas vías de inoculación permitirán la disponibilidad de nuevas estrategias para el control de la rabia, así como su posible erradicación.

La vacuna génica ADN contra la rabia ha mostrado la capacidad de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular, proporcionando protección en modelos animales vacunados.⁵⁸ Estudios recientes con la vacuna génica en especies de mayor riesgo como el perro, muestran que la misma genera niveles protectores de anticuerpos neutralizantes superiores a 0.5 UI que establece la OMS contra el virus rábico.

Lo anterior sugiere que el probar la vacuna prototipo en gatos adultos por diferentes vías permitirá conocer si se genera una respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos neutralizantes capaces de proteger contra el virus de rabia y conocer que ruta es la mas eficaz.

4. Objetivos

1. Estudiar la respuesta inmune humoral inducida por un prototipo de vacuna génica DNA en gatos adultos.
2. Evaluar la eficacia de la vacuna génica ADN contra la rabia, administrada por la vía intramuscular (IM), intranasal (IN) e intradérmica en la punta de la oreja (ID-PO) en gatos.

5. Hipótesis

La vacuna génica pGQH es capaz de generar una respuesta inmune en perros al aplicarse por la vía intranasal, intradérmica e intramuscular. Si se emplea pGQH en otra especie de riesgo como el gato, entonces, esta podrá inducir una respuesta inmunológica suficiente (>0.5 UI) para proteger a la especie a probar.

6. Criterios de inclusión

- Gatos adultos hembras y machos de 3 a 4 Kg de peso, libres de anticuerpos contra la rabia, clínicamente sanos, desparasitados, y vacunados contra Calicivirus, Rinotraqueitis y Panleucopenia Felina.

7. Materiales

7.1. Equipo:

- Lector de ELISA (*BECKMAN COULTER, DTX 800/880*); Equipo indispensable para determinación de los niveles de anti-cuerpos contra la rabia.
- Microscopio Invertido de fluorescencia (*OLYMPUS Z215D*), equipo utilizado para monitoreo de cultivo celular infectado con virus de la rabia.
- Cámara de electroforesis, (*BIORAD*); utilizada para la separación de proteínas del virus de la rabia a un voltaje de 100 mV en geles de acrilamida al 12%.
- Equipo de electro-transferencia para geles de acrilamida, (*BIORAD, TE16*), equipo útil para transferir las proteínas separadas del gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa para el desarrollo del Western blot.
- Centrifuga (*BECKMAN COULTER, G1500*), de gran utilidad para procesamiento de las muestras biológicas.

7.2. Material

- Placas de 96 pozos (*NUNC*) para cultivo celular; utilizadas para determinación del título viral.
- Placas de 96 pozos (*NUNC Polysorb*), utilizadas para la prueba de ELISA sensibilizadas con virus rábico CVS.
- Tubos con gel separador para suero (*SARSTED*), utilizados para contener la muestra.

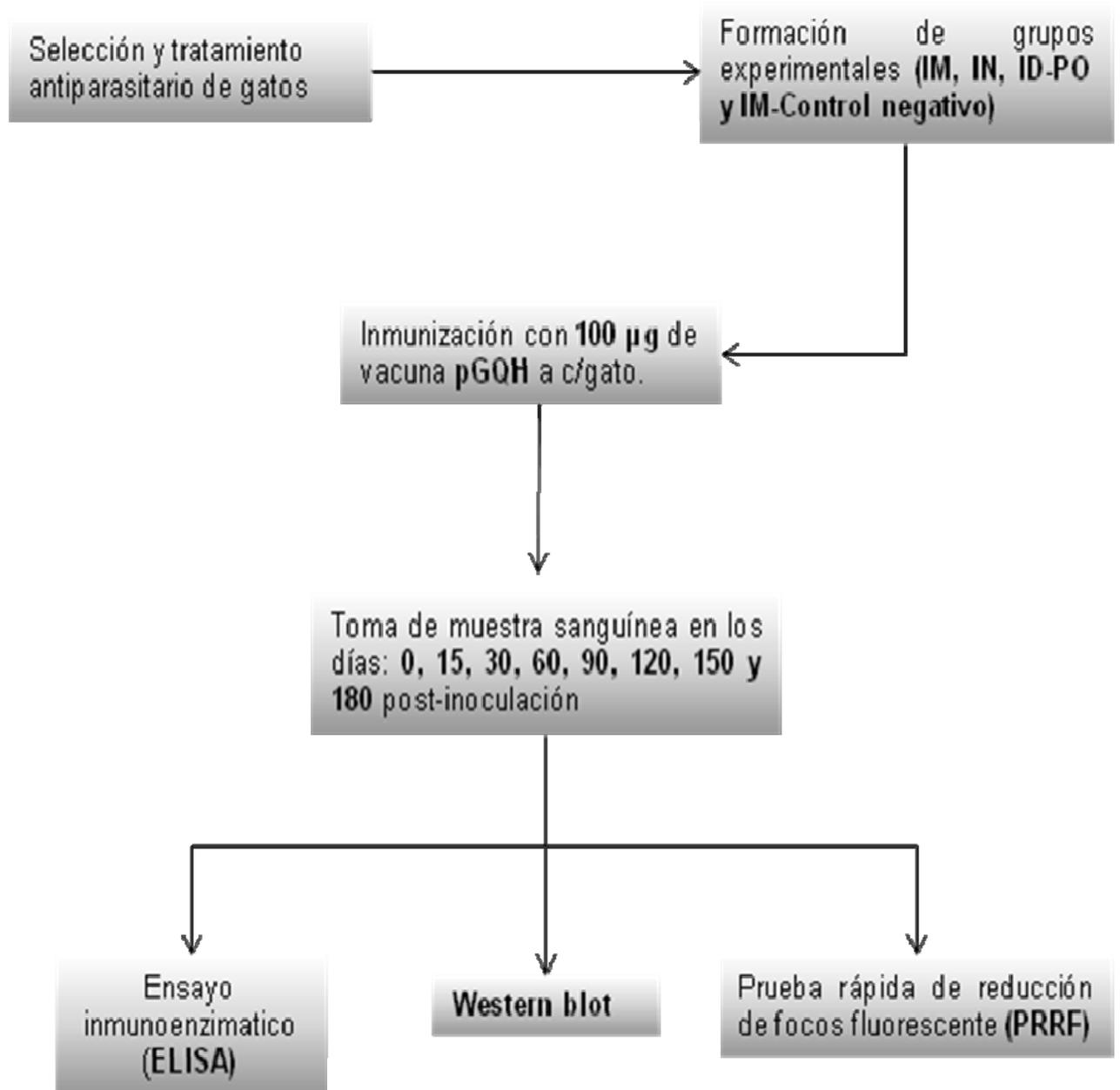
- Jaulas especiales para gatos. Especificadas en la NOM-062-ZOO-1999.
- Anestesia: Xilacina 0.4 mg y Ketamina 0.2 mg/kg de peso del animal.
- Alimento comercial balanceado para gato (*Wiskas®*).
- Botellas de cultivo celular T-25 cm² (*SARSTED*) utilizadas para propagación de células BHK-21 y Neuroblastoma.
- Botellas para cultivo celular T-75 cm² (*SARSTED*) utilizadas para propagación de virus CVS.

7.3. Material Biológico

- 12 gatos adultos hembras y machos de 3 a 4 kg de peso, clínicamente sanos libres de anticuerpos contra la rabia.
- Línea celular Neuroblastoma Murino (*ATCC: CCL 131*) útil para la realización de la prueba rápida de detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia.
- Línea celular BHK-21 indispensable para replicar el virus de la rabia y obtención del mismo para la realización de las pruebas pertinentes.
- Virus rábico (*CVS*), virus utilizado para la sensibilización de placas de ELISA.
- Medio RPMI-Glasgow (*Invitrogen®*), medio utilizado para el crecimiento de las líneas celulares Neuroblastoma y BHK-21.
- Anticuerpo anti-IgG de gato ligado a peroxidasa; (*Jackson Immuno Research*) en concentración de 0.8 mg/mL y reconstituida en 2 mL de agua destilada.

8. Metodología

El siguiente diagrama de flujo resume el camino seguido para el desarrollo del proyecto:



- Se formaron 4 grupos experimentales **A, B, C y D (Tabla 3)**. Cada grupo formado por 3 gatos adultos hembras y machos, de peso aproximado de 3 o 4 kilogramos y entre 1 y 2 años de edad cada uno, clínicamente sanos, libres de anticuerpos contra la rabia, vacunados contra Calicivirus, Rinotraqueitis y Panleucopenia Felina (*Feligen Virbac®*). Tratados bajo la norma oficial mexicana de manejo de animales de experimentación NOM-062-ZOO-1999, y puestos en cautiverio en una área certificada por la Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) of USA Public Health Services and the animal welfare assurance # A5600-1, en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ).
- Se realizó el primer sangrado de los grupos formados tomando este mismo como muestra pre-inoculación y blanco del mismo grupo y después se procedió a la inmunización con la vacuna pGQH.

Tabla 3: Características de los cuatro grupos de gatos utilizados en el proyecto.

Grupo	No. de gato	Sexo	Edad (Meses)	Ruta de inoculación
A	1	Hembra	12	Intramuscular (IM)
	2	Macho	12	Intramuscular (IM)
	3	Hembra	16	Intramuscular (IM)
B	4	Macho	12	Intranasal (IN)
	5	Hembra	15	Intranasal (IN)
	6	Hembra	16	Intranasal (IN)
C	7	Hembra	16	Intradérmica punta oreja (ID-PO)
	8	Hembra	18	Intradérmica punta oreja (ID-PO)
	9	Macho	24	Intradérmica punta oreja (ID-PO)
D	10	Macho	24	Control negativo (IM)
	11	Macho	18	Control negativo (IM)
	12	Hembra	14	Control negativo (IM)

8.1. Inmunización

Grupo A



Gatos 1, 2 y 3 inmunizados por vía intramuscular (**IM**) en el Cuadriceps con 100 μg de vacuna DNA desnudo (pGQH) en 500 μL de PBS (Solución amortiguadora de fosfatos).

Grupo B



Gatos 4, 5 y 6 inmunizados por vía intranasal (**IN**) por instilación con 100 μg de vacuna DNA desnudo (pGQH) en 500 μL de PBS.

Grupo C



Gatos 7, 8 y 9 inmunizados por vía intradérmica en la punta de la oreja (**ID-PO**) con 100 μg de vacuna DNA desnudo (pGQH) en 100 μL de PBS.

Grupo D



Gatos 10, 11 y 12 vacunados con 200 μL de PBS por vía intramuscular (**IM**). Este grupo fue usado como control negativo.

A los 30 días post-inoculación se suministro un refuerzo de la misma dosis y misma vía de administración para los grupos **A, B y C**.

8.2. Detección y evaluación de anticuerpos contra la rabia por ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano, (*NUNC PoliSorp*) las cuales fueron sensibilizadas con virus rábico estándar cepa CVS (Challenge Virus Standard) de encéfalo de ratón de virus rábico fijo; adaptada a células BHK-21. (**Anexo 1**). Dichas placas fueron ocupadas para hacer el diagnóstico de rabia, evaluando la producción de anticuerpos específicos contra el virus, usando la técnica de ELISA (**Anexo 1**) directa, descrita y estandarizada por Atanasiu y Perrin⁵⁹, así de esta forma se analizaron las muestras de suero de los 4 grupos de gatos en los días; 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 post-inoculación.

8.3. Detección de la proteína G de rabia por Western-blot

Se realizó la electroforesis colocando el antígeno rábico en gel de acrilamida 12%, 10% SDS y corrido a 100 volts durante 2 horas (**Anexo 2**), después se realizó la electro transferencia por 30 minutos en membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia, (**Anexo 3**). Posteriormente se utilizó la membrana de nitrocelulosa para la identificación de la proteína G de rabia (Western-blot)⁶⁰ (**Anexo 3**) en los sueros obtenidos en los días; 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 post-inoculación, en los 4 grupos de gatos.

8.4. Determinación de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia por prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (PRRFF)

Por medio de la prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (PRRFF) (**Anexo 4**) descrita por Smith,⁶¹ se determinó el nivel de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia en los sueros obtenidos en los días; 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 post-inoculación, en los 4 grupos de gatos. Cabe mencionar que el suero de referencia tiene un título conocido en unidades internacionales por mililitro (UI/mL) y como células susceptibles al virus de la rabia se utilizó la línea celular de neuroblastoma murino (CCL 131), las cuales fueron replicadas en botellas de plástico para cultivo celular de 25 cm² (*SARSTED*); con medio mínimo esencial (MEM) Glasgow (*IN VITRO*), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (*HYBRIMAX*) al 10% para crecimiento y 2% para mantenimiento, además de una solución antibiótica y antimicótica (penicilina G 10,000 µg/mL y estreptomina con anfotericina 25 µg/mL) al 1% (*SIGMA*), los cultivos se mantuvieron en una estufa con incubadora (*LAB-LINE microprocesor CO₂ incubator*) a 37°C, con atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

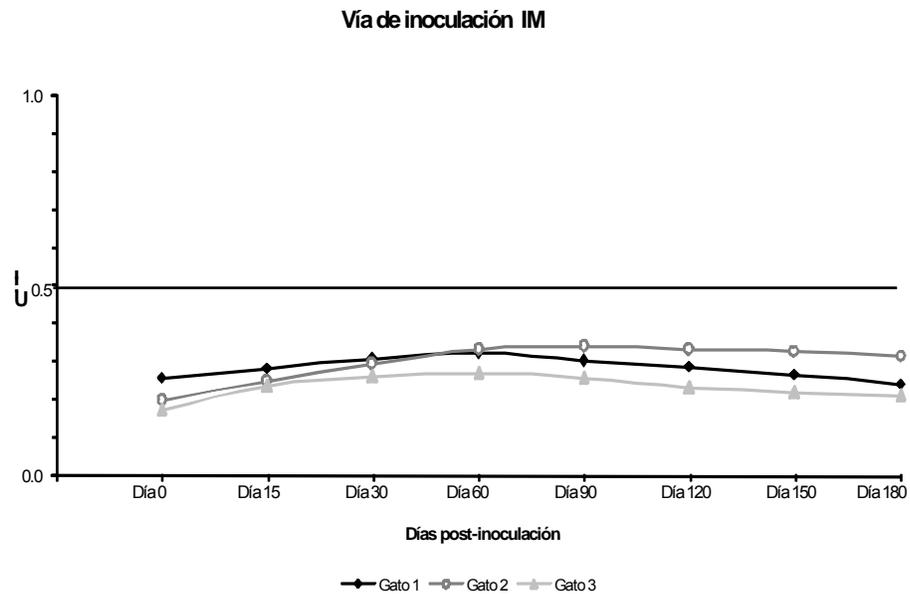
9. Resultados

9.1. Enzayo inmunoenzimático (ELISA)

Grupo A. Vía de inoculación IM

	Día 0	Día 15	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180
Gato 1	0.2581	0.2837	0.3078	0.3240	0.3016	0.2874	0.2673	0.2417
Gato 2	0.1970	0.2491	0.2933	0.3328	0.3408	0.3329	0.3304	0.3175
Gato 3	0.1736	0.2357	0.2604	0.2695	0.2577	0.2318	0.2181	0.2099

Tabla 4. Los valores representados en la tabla, están dados en unidades internacionales UI equivalentes, calculados a partir de las densidades ópticas expresadas en cada gato.

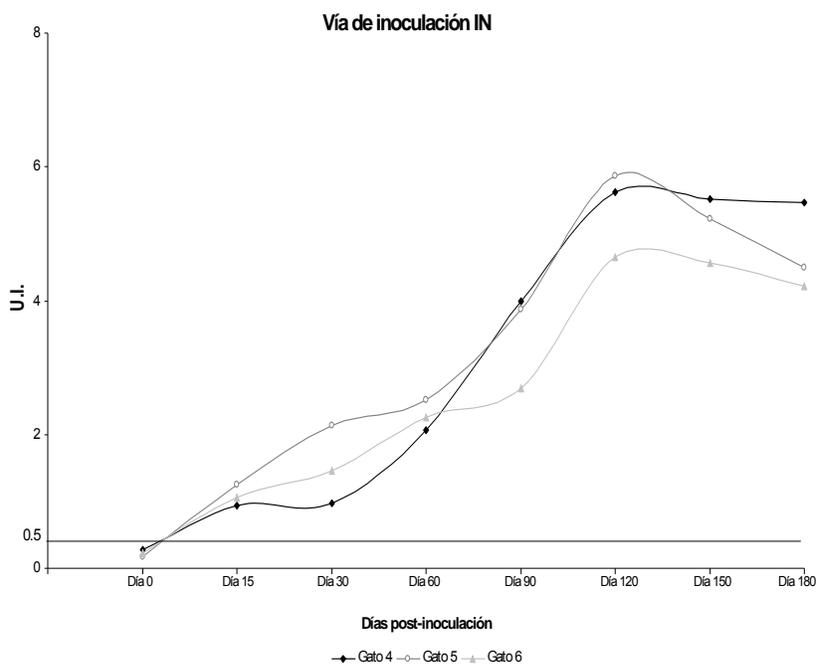


Gráfica 1. Grupo A (IM), desarrollo no significativo de anticuerpos protectores contra el virus de la rabia en ninguno de los integrantes de este grupo, cuantificado en UI equivalentes.

Grupo B. Vía de inoculación IN

	Día 0	Día 15	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180
Gato 4	0.2761	0.9394	0.9644	2.0662	3.9972	5.6192	5.5159	5.4684
Gato 5	0.1808	1.2502	2.1339	2.5226	3.8624	5.8610	5.2241	4.4952
Gato 6	0.2261	1.0625	1.4554	2.2589	2.6859	4.6518	4.5669	4.2227

Tabla 5. Los valores representados en la tabla, están dados en unidades internacionales UI equivalentes, calculados a partir de las densidades ópticas expresadas en la prueba de ELISA en cada gato.

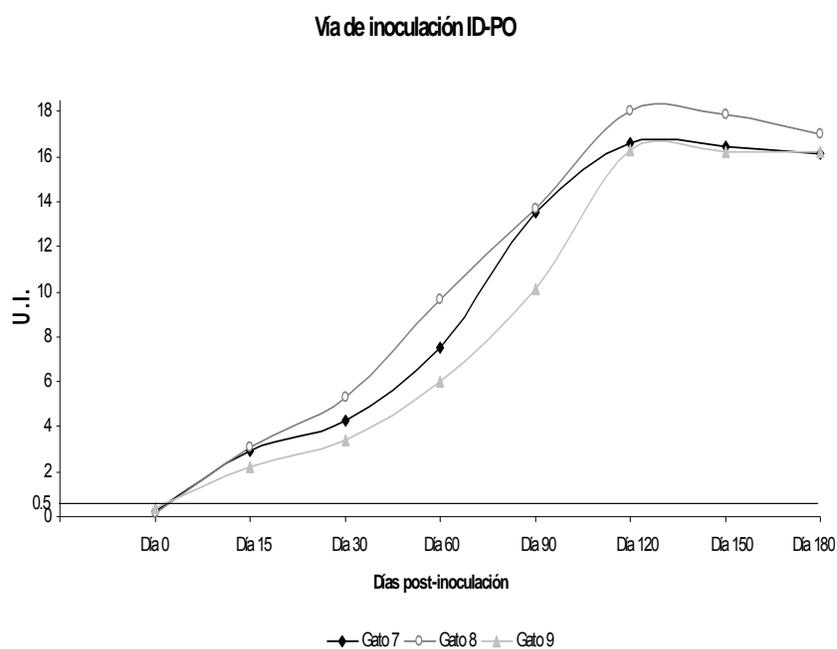


Gráfica 2. Grupo B (IN), el desarrollo de anticuerpos protectores contra el virus de la rabia, es elevado, los tres individuos de este grupo duplican exponencialmente los niveles de anticuerpos hasta el día 120 y pasado este, empieza a decaer lentamente la producción de anticuerpos, ya para el día 180 los niveles de anticuerpos medidos en UI bajaron en promedio de 1 hasta 2 UI en este grupo. Esta ruta podría ser una forma óptima de inmunización con vacunas génicas similares a la vacuna pGQH en animales domésticos.

Grupo C. Vía de inoculación ID-PO

	Día 0	Día 15	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180
Gato 7	0.2201	2.8981	4.3042	7.4866	13.5017	16.6307	16.4777	16.1212
Gato 8	0.1395	3.0854	5.3085	9.6667	13.6453	18.0276	17.8477	16.9917
Gato 9	0.3838	2.2490	3.4210	6.0313	10.1291	16.2710	16.2465	16.2203

Tabla 6. Los valores representados en la tabla, están dados en unidades internacionales UI equivalentes, calculados a partir de las densidades ópticas expresadas en cada gato.

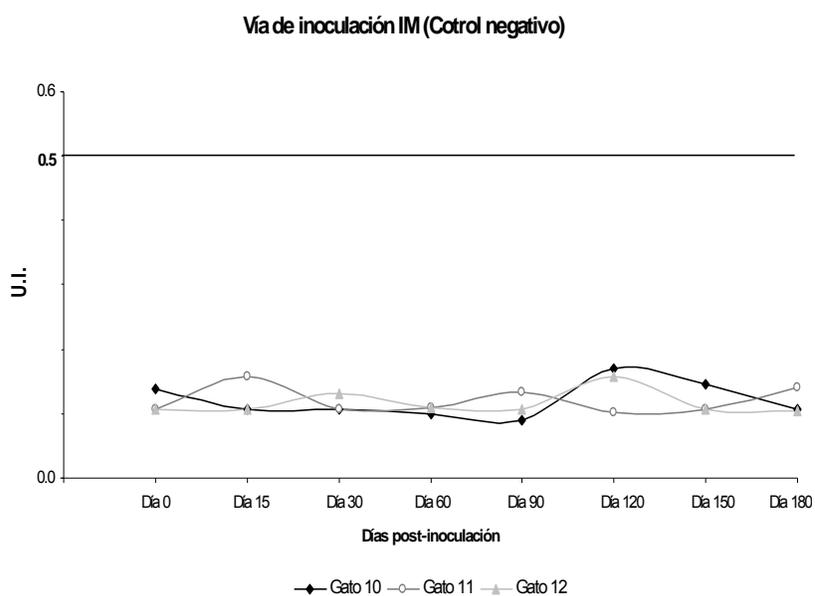


Gráfica 3. Grupo C (ID-PO), el desarrollo de anticuerpos protectores contra el virus de la rabia, es tres veces mas elevado que la ruta de inoculación IN, alcanzando protección óptima desde los primeros 15 días antes del refuerzo y para el día 180 solo bajo la respuesta inmune 2 UI respecto a su máximo.

Grupo D (control negativo). Vía de inoculación IM

	Día 0	Día 15	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120	Día 150	Día 180
Gato 10	0.1381	0.1070	0.1073	0.0985	0.0897	0.1698	0.1460	0.1068
Gato 11	0.1073	0.1588	0.1060	0.1085	0.1330	0.1032	0.1073	0.1405
Gato 12	0.1063	0.1066	0.1308	0.1085	0.1065	0.1567	0.1060	0.1051

Tabla 7. Los valores representados en la tabla, están dados en unidades internacionales UI equivalentes, calculados a partir de las densidades ópticas expresadas en cada gato.



Gráfica 4. Grupo D control negativo (IM), sin cambios significativos en la respuesta inmune antes y después de suministrar PBS.

9.2. Western-blot

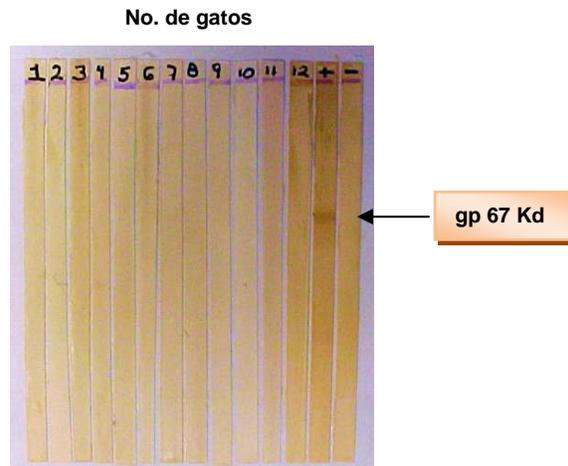


Figura 7. Monitoreo por Western blot de los 4 grupos de gatos en el día 0 preinoculación, cada tira mostrada en la foto corresponde a un gato diferente: el grupo **IM** esta formado por los gatos 1, 2 y 3, el grupo **IN** esta formado por 4, 5 y 6, el grupo **ID-PO** esta conformado por los gatos 7, 8 y 9, **IM** control negativo lo conforman los gatos 10, 11 y 12. El control (+) mostrado en la foto corresponde a un gato macho adulto inmunizado con Virus Rábico Inactivado P.V. (virus Pasteur), vacuna autorizada por la SSA manufacturada por los laboratorios Pet Guard de México S.A de C.V. Reg. SAGARPA B-0073-024, producida en cultivo de células VERO, mientras que el control (-) corresponde a gato adulto hembra libre de anticuerpos contra la rabia.

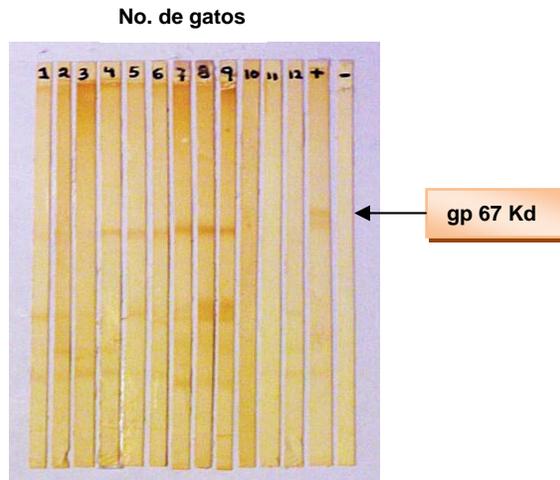
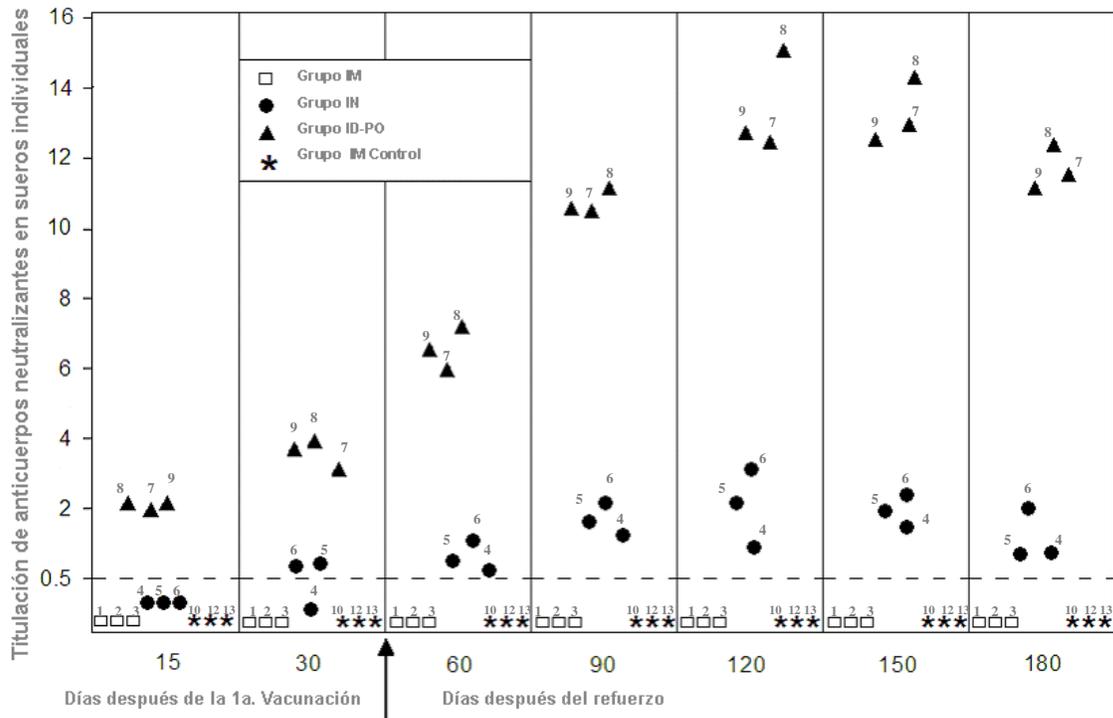


Figura 8. Western blot de los 4 grupos de gatos realizado en el día 180 post-inoculación, cada tira mostrada en la foto corresponde a un gato diferente: el grupo **IM** esta formado por los gatos 1, 2 y 3, el grupo **IN** esta formado por 4, 5 y 6, el grupo **ID-PO** esta conformado por los gatos 7, 8 y 9, **IM** control negativo lo conforman los gatos 10, 11 y 12. El control (+) mostrado en la foto corresponde a un gato macho adulto inmunizado con Virus Rábico Inactivado P.V. (virus Pasteur), vacuna autorizada por la SSA manufacturada por los laboratorios Pet Guard de México S.A de C.V. Reg. SAGARPA B-0073-024, producida en cultivo de células VERO, mientras que el control (-) corresponde a gato adulto hembra libre de anticuerpos contra la rabia.

9.3. Prueba Rápida de Reducción de Focos Fluorescentes (PRRFF)

Los resultados obtenidos al realizar la prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (PRRFF) están representados en la grafica N. 5 mostrando los valores para cada individuo en U.I.



Gráfica 5. Se muestran los 4 grupos a partir de los 15 días hasta los 180 post inoculación.

El grupo IN, al día 30 dos de tres gatos han seroconvertido y al día 60 los tres integrantes del grupo ya presentan títulos ≥ 0.5 UI.

Los tres gatos del grupo ID-PO, presentan títulos ≥ 1.8 UI desde los 15 días post-vacunación, alcanzando títulos ≥ 14 UI a los 120 días. En los gatos del grupo IM no presentan seroconversión. En ningún momento alcanzan las 0.5 UI, las cuales la OMS recomienda como mínimo para protección contra la rabia. Los gatos del grupo control carecen de anticuerpos contra rabia durante todo el experimento.

10. Discusión

Los resultados obtenidos en los tres grupos de gatos inmunizados con la vacuna pGQH muestran que la ruta de inoculación más eficaz es la vía intradérmica en la punta de la oreja (ID-PO), seguida de la ruta intranasal (IN), mientras que la vía intramuscular (IM) no alcanzó las 0.5 UI que recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS) como mínimo para proteger contra el virus de la rabia.

Cabe mencionar que el grupo de gatos inoculados ID-PO, la respuesta inmunológica humoral se observan títulos de anticuerpos neutralizantes superiores a 2 UI 15 días después de la primera inoculación. Después del refuerzo al día 30, el título de anticuerpos neutralizantes se incrementó a más de 14 UI evaluada por PRRFF.

Al día 120 y 180 post-inoculación, se encontró una disminución poco significativa (11 y 12 UI). Sin embargo estos títulos están muy por arriba de lo que establece la OMS. Estos resultados sugieren que la punta de la oreja de los gatos se puede considerar como una excelente ruta para la administración de vacunas DNA.

En estudios anteriores, se ha encontrado que la inoculación con vacuna génica en primates con y sin adyuvantes en la punta de la oreja, no produce ninguna respuesta inmune,⁶⁷ mientras que en perros adultos de la raza Beagle

vacunados con pCMV4 usando la misma ruta de inoculación,⁶⁸ se alcanzan niveles óptimos de protección contra el virus de la rabia.

Con respecto a la vía de inoculación intranasal (IN), se ha reportado que en perros adultos de la raza Beagle vacunados con **pGQH** la respuesta inmune desencadenada es óptima,⁵⁸ mientras que en el grupo B de gatos vacunados por vía IN fue aceptable, ya que en el día 30, dos de los tres gatos del grupo IN mostró anticuerpos neutralizantes por arriba de las 0.5 UI y al día 60 todos los animales de ese grupo presentaban anticuerpos neutralizantes protectores. El pico más alto de seroconversión se observó al día 120 (2 UI).

En la administración intranasal por instilación, el DNA se absorbe en la superficie epitelial del tejido linfoide nasal, que contiene linfocitos T intraepiteliales y células transportadoras (también conocidas como células M). Estas captan los antígenos que serán transportados y presentados a células presentadoras de antígeno las cuales viajarán a nódulos linfáticos asociados al NALT.⁶³

La vacunación intramuscular (IM) no desencadena respuesta inmune en el grupo de gatos seleccionados para este fin. Se ha reportado en humanos que para esta ruta la activación de células dendríticas está mediada por miocitos,⁶⁹ por lo que es posible que dicha activación, en los gatos utilizados, no haya sido la adecuada, lo que conlleva a un poco o nula activación de la células dendríticas y con ello la respuesta inmune insuficiente para proteger contra la rabia.

11. Conclusiones

- La vacuna pGQH podría ser una alternativa para el control de la rabia silvestre en México por su fácil producción, y aplicación, así como su estabilidad por ser de ADN, además de que no requiere de una cadena fría para su almacenaje y su distribución.
- La vacuna recombinante empleada en este proyecto es de uso seguro por que no se trabaja con virus vivo atenuado, solo se induce la respuesta inmune por la proteína G del virus de la rabia.
- La ruta de inoculación más efectiva para inducir anticuerpos neutralizantes contra rabia en gatos, fueron la ID-PO y la IN.
- En contraste la ruta IM no resultó efectiva para la protección del virus contra la rabia en gatos.
- La ruta IN constituye un método práctico de aplicación, no causa dolor y podría ser utilizado en campañas de vacunación de animales domésticos, así como animales silvestres (Aplicación de la vacuna DNA por aerosol en cuevas de murciélagos).
- El tiempo requerido para producir anticuerpos neutralizantes por la ruta IN podría disminuir si la vacuna DNA se combina con adyuvantes específicos de mucosas, además podrían incrementar la respuesta inmune.
- La vía ID-PO se reveló como un sitio excelente para inducir anticuerpos neutralizantes contra rabia en gatos y deberá ser estudiada con mayor profundidad

- El tiempo requerido para producir anticuerpos neutralizantes por la ruta IN podría disminuir si la vacuna DNA se combina con adyuvantes específicos de mucosas, además podrían incrementar la respuesta inmune.

12. Anexos

1. Ensayo inmunoenzimático ELISA

Esta técnica de ELISA fue descrita en Suecia en 1971 por Envall y Perlmanm y en Holanda por Van Weemen y Schuurs. Es un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase solida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático. La técnica de ELISA se puede clasificar en dos grandes grupos: técnicas no competitivas y competitivas. Cualquiera de estas modalidades puede ser usada para medir los niveles de antígeno y anticuerpos específicos en una muestra.

La técnica de ELISA tiene cuatro etapas básicas: 1) unión del inmunoreactivo (antígeno o anticuerpo) a la fase solida que comúnmente las mas usadas son el poliestireno, el cloruro de polivinilo (PVC), el polipropileno, la nitrocelulosa, la celulosa, la goma de silicona y el vidrio; 2) reacción de los inmunoreactivos en solución y en fase solida; 3) Reaccion con el conjugado enzimático, este conjugado realiza la unión covalente de una una enzima con un anticuerpo o un antígeno. Las enzimas mas utilizadas han sido la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa; 4) Determinación de la actividad enzimática unida a la fase solida con un cromógeno, de todos los que hay en el mercado el mas preciso pero toxico es la orto-fenilendiamina (OPD) que tiene una absorción de luz uv-visible de 492 nm.

Material:

- Placas de 96 pozos para ELISA (*polisorb NUNC*)
- Puntas para micro pipeta de 10-100 μL

Material Biológico:

- Suero inactivado de gato 50 μL
- Virus Rábico.

Equipo:

- Lector de placas de ELISA (*BECKMAN COULTER DTX 880*)

Soluciones y Reactivos:

- Buffer de carbontos;** carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6
- Buffer de lavado;** cloruro de sodio 1.25 M, 250 mM tris-HCl pH 7.9, Tween 20 1%
- Buffer de bloqueo o buffer de muestra;** leche descremada 1%, 125 mM de cloruro de sodio, 25 mM de Tris-HCl pH 7.9, Tween 20 0.1%
- Solución reveladora;** ácido cítrico 0.1 M pH 4.5, citrato de sodio 0.1 M pH 4.5, (para cada 5 mL de ácido cítrico y 5 mL de citrato de

sodio, agregar una tableta de 5 µg de orto-fenilen-diamina OPD y 5 µL de peróxido de hidrógeno).

E. **Solución de frenado;** ácido sulfúrico 2N

Metodología:

1. Sensibilizar una placa con antígeno de rabia producido en células BHK-21 con **buffer de carbonatos**,^A colocando 100 µL de esta dilución por cada pozo de la placa para ELISA.
2. Dejar incubando a 4°C toda la noche.
3. Pasado el tiempo de incubación lavar la placa 4 veces por periodos de 5 minutos con **buffer de lavado**.^B
4. Bloquear la placa por espacio de 1 hora a 37°C colocando a cada pozo 100 µL de **buffer de muestra o de bloqueo**.^C
5. Repetir el paso 3
6. Agregar el primer anticuerpo en un rango de dilución recomendada (**1:10**) **suero:buffer de bloqueo** , en un volumen para cada pozo de 100 µL.
7. Incubar la placa por 1 hora a 37°C por espacio de 1 hora.

8. Repetir el paso 3

9. Incubar el 2º anticuerpo y este deberá ser acoplado a **Peroxidasa (HRP)** o a **Fosfatasa** **recomendablemente en una dilución (1:1000 hasta 1:20,000 de acuerdo al instructivo del producto)** anticuerpo: **Buffer de Bloqueo** por un tiempo de 1 hora a 37 °C

10. Repetir el paso 3

11. Colocar 100 µL a cada pozo de **solución reveladora^D** y esperar aproximadamente 5 minutos o hasta que el control negativo empiece a dar color e inmediatamente parar la reacción con 50 µL a cada pozo de **solución de frenado.^E**

12. Leer a 492 nm en el equipo (*BECKMAN COULTER DTX 880*)

2. Electroforesis en gel de poliacrilamida para el virus de la rabia

La electroforesis es un método analítico de alto poder resolutivo que cambia la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida.

Los geles de poliacrilamida son el producto de la polimerización en largas cadenas de *acrilamida monomérica* ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y del entrecruzamiento por intermedio de la *N,N'-metilenbisacrilamida* ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) corrientemente designada *bisacrilamida*. El poro del gel formado dependerá de las concentraciones relativas de ambos reactivos durante la polimerización.

La polimerización de la acrilamida necesita de un iniciador del proceso. Los más comúnmente usados son el persulfato de amonio y la riboflavina. Se añade, además, como acelerador, *N,N,N',N'-tetrametiletildiamina* (**TEMED**), en el sistema **persulfato de amonio-TEMED**, este último cataliza la formación de radicales libres a partir del persulfato, lo que en definitiva inicia la polimerización. En este mecanismo interviene la base libre TEMED, por lo que la acidificación retarda la polimerización. Cuando se usa riboflavina, para que la polimerización se inicie se requiere luz; ésta, origina radicales libres al fotodescomponer la riboflavina.

El oxígeno inhibe la polimerización; es por esta razón los reactivos que se ocupan deberán ser previamente desgasificados.

La electroforesis en geles de poliacrilamida puede desarrollarse también usando sustancias disociantes, en especial detergentes no iónicos. De los detergentes más usados está el *dodecilsulfato de sodio* (**SDS**). Las proteínas a analizar son desnaturalizadas a 100°C en presencia de un exceso de SDS y 2-mercaptoetanol. En esas condiciones el tiol rompe los puentes de disulfuro que pudieran existir y el agente desnaturalizante hace que la proteína se desdoble en sus polipéptidos constitutivos y de esta forma las proteínas ya desnaturalizadas están listas para ser fraccionadas en un gel de poliacrilamida⁶⁵

Material:

- Recipiente para desechos de poliacrilamida, especificado en la NOM 087 de residuos peligrosos.
- Peine continuo para cámara de electroforesis
- Tubos eppendorf de 500 µL con tapa

Material Biológico:

- Antígeno viral Rábico
- Marcador de peso molecular (*BIORAD*)

Equipo:

- Cámara de electroforesis con accesorios (*BIORAD*)

- Fuente de poder de voltaje continuo (*BIORAD*)
- Agitador tipo vortex (*BIORAD*)
- Baño Maria (*BIORAD*)

Soluciones y Reactivos:

- A. **Solución de persulfato de amonio al 10%**
- B. **SDS al 10%**
- C. **TEMED[®]**
- D. **Buffer de Muestra** (*para 100 mL*): 0.75g de trizma base, 10 mL de glicerol, 2g de SDS, 2 mL de β -mercaptoetanol, 0.05g de azul de bromofenol, pH 6.8
- E. **Acrilamida/Bis-Acrlamida al 40%**
- F. **Buffer pH 8.8**: trizma base 1.5M, SDS 0.4%, pH 8.8
- G. **Buffer pH 6.8**: trizma base 0.5M, SDS 0.4% pH 6.8
- H. **Buffer de Corrida** (*para 1 L*): 14.48g de glicina, 3g de trizma base, 1g de SDS, no ajustar el pH.

Metodología

1. Lavar y limpiar perfectamente bien los accesorios de la cámara de electroforesis (empaques, vidrios, acrílicos y gomas).
2. Ensamblar los cristales para vaciar las soluciones que forman el gel separador y el gel concentrador.

3. Preparar las soluciones para el gel separador y el concentrador como se muestra en la tabla:

Mezcla para preparar el gel separador al 12% (*cantidad suficiente para 2 geles de poliacrilamida*)

Reactivo	Cantidad en mL y μL
Agua destilada	3.5 mL
Acrilamida/Bis-Acrilamida	4.0 mL
Buffer pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 μL
*Persulfato de Amonio 10%	50 μL
*TEMED [®]	5 μL

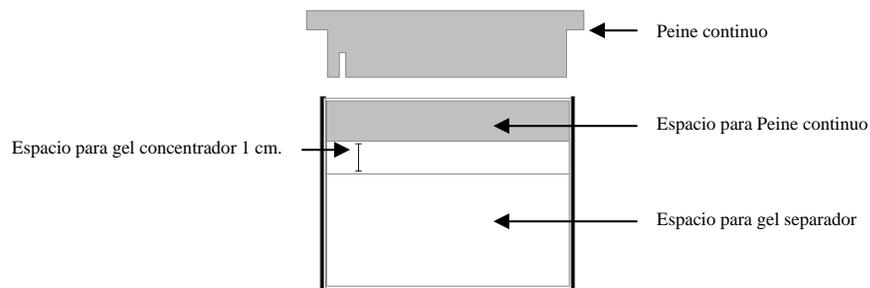
*** Estos reactivos se agregan al final de la mezcla.**

Mezcla para preparar el gel concentrador al 4% (*cantidad suficiente para 2 geles de poliacrilamida*)

Reactivo	Cantidad en mL y μL
Agua destilada	3.5 mL
Acrilamida/Bis-Acrilamida	4.0 mL
Buffer pH 6.8	2.5 mL
SDS 10%	100 μL
*Persulfato de Amonio 10%	50 μL
*TEMED [®]	5 μL

*** Estos reactivos se agregan al final de la mezcla.**

- Realizar la mezcla para los geles, separador y concentrador en tubos separados perfectamente bien rotulados y dejarlos en reposo para que se desgasifiquen 5 minutos, sin que a estos se les agregue el **persulfato de amonio y el TEMED®**.
- Transcurrido el tiempo de desgasificación agregar inmediatamente el **persulfato de amonio y el TEMED®** y vaciar cuidadosamente en los vidrios que forman la placa en la cámara de electroforesis, hasta la marca donde va el gel separador y agregar en el espacio del gel de concentrado isopropanol con la finalidad de eliminar las burbujas y permitir que la polimerización del gel se haga de forma nivelada, **guiarse por el siguiente esquema;**



- Una vez polimerizado el gel separador proceder a eliminar los residuos de isopropanol por decantación y secar las orillas con papel absorbente.
- Combinar el **persulfato de amonio y el TEMED®** con la mezcla para el gel concentrador y vaciarlo en el espacio marcado en los vidrios que

- forman la placa para la cámara de electroforesis e inmediatamente después colocar el peine continuo y esperar unos cuantos minutos a que polimerice el gel.
8. Colocar la placa en la cámara de electroforesis y agregar aproximadamente hasta la mitad del espacio que tiene la cámara, el **buffer de corrida**.
 9. Colocar en un tubo ependorff de 500 μL , la cantidad de 50 μL de buffer de muestra con 50 μL de antígeno viral y dejar en baño María a 96°C por un periodo de 5 minutos.
 10. Pasado el tiempo de incubación retirar el peine continuo del gel y colocar 6 μL de marcador de peso molecular en el único poso del gel y colocar 100 μL de antígeno viral en el espacio continuo al poso.
 11. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder a un voltaje de 100 volts y un tiempo de 2.5 horas.
 12. pasado el tiempo de corrida del gel proceder a la electrotransferencia.

1. Westen-blot

La técnica de inmunotrasferencia (**Western blot**) se utiliza para determinar la cantidad relativa y el peso molecular de una proteína en una mezcla de proteínas u otras moléculas. La mezcla se somete primero a una separación analítica como lo es la electroforesis (*descrita en el anexo 3*), seguida de la electrotransferencia (*descrita en el anexo 4*). La posición del antígeno proteico en la membrana puede detectarse gracias a la unión del antígeno con el anticuerpo marcado específico para la proteína, lo que proporciona información sobre el tamaño y la cantidad del antígeno. La sensibilidad y la especificidad de esta técnica pueden incrementarse comenzando por proteínas inmunoprecipitadas en lugar de mezclas proteicas crudas.⁶⁵

Material:

- Una hoja de nitrocelulosa de 10X10 cm² sensibilizada con virus rábico CVS.
- Una navaja o bisturí.
- Recipiente carrilero para Western-blot.
- Una regla.

Material Biológico:

- 20 µL de suero de gato positivo a rabia.
- 20 µL de suero de gato negativo a rabia.

- 20 μL de suero de gato problema.
- 1 μL de peroxidase-conjugated AffinPure Goat Anti-Cat IgG (H+L), (*Jackson*). Diluido en 3000 μL de Buffer de bloqueo. **Nota: cada 3000 μL de esta solución alcanza para 3 muestras problema.**

Equipo:

- Un agitador orbital de placa eléctrico. (*BIORAD*)
- Equipo de electrotransferencia para geles de acrilamida, (*BIORAD TE16*)

Soluciones:

- A. **Buffer de Transferencia;** Tris-HCl 20 mM, 200 mM Glicina, 20% Metanol absoluto.
- B. **Buffer de bloqueo;** buffer de lavado con 5% de leche descremada.
- C. **Buffer de lavado;** 1.25 M NaCl, 250 mM de Tris-HCl pH 7.9, Tween 20 1%
- D. **PBS;** Fosfato de sodio monobásico 0.1 M, fosfato de sodio dibásico anhidro, cloruro de sodio 0.15 M.
- E. **Solución reveladora;** 10 mL de PBS, 5 mg en polvo ó una tableta de 5 mg de DAB (diaminobencidina) y 5 μL de H_2O_2 (peróxido de hidrógeno 30%).

Metodología:

1. Realizar la electro-transferencia por espacio de 1 hora a 30 volts, con **Buffer de transferencia.**^A

2. Se manipula con guantes de látex y extremo cuidado la membrana de nitrocelulosa obtenida de la electrotransferencia y se corta en delgadas tiras para hacer el diagnóstico, como se muestra en la figura:

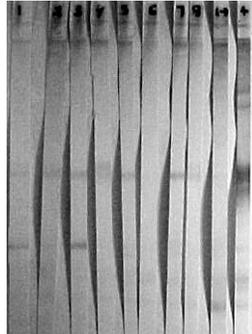


3. Después se colocan las tiras cortadas de nitrocelulosa en el recipiente carrilero y se bloquean con 1000 μL de **Buffer de Bloqueo^B** por carril o por tira de nitrocelulosa, e incubar por 60 minutos en agitación constante.
4. Pasado el tiempo de incubación lavar cada tira de nitrocelulosa por tres periodos de 5 minutos con 1000 μL de **Buffer de lavado^C** y 2 periodos de 5 minutos con 1000 μL de **PBS.^D**
5. Se retira el exceso de buffer y se agrega el primer anticuerpo en el rango de dilución recomendada para un suero problema que es de 1 μL (*suero problema*): 50 μL (*buffer de bloqueo^A*) en un volumen de 1000 μL para cada tira de nitrocelulosa.
6. Se incuba a 4°C por 18 horas en agitación constante.

NOTA: *es importante dejar la incubación a 4°C ya que de hacerlo a 37°C por 1 hora puede existir la contaminación del medio y esta puede destruir los grupos fosfato de las proteínas.*

7. Pasado el tiempo de incubación a 4°C se repite el paso **2**
8. Se incuba el **2°** anticuerpo *Anti-Cat IgG, (Jackson)*, en una dilución **1:3000 (anticuerpo:Buffer de Bloqueo)** y colocar 1000 µL de esta dilución a cada tira de nitrocelulosa por un tiempo de 1 hora a 37°C
9. Pasado el tiempo de incubación a 27°C se repite el paso **2**
10. Mientras se ejecuta el tiempo de lavado preparar la **solución reveladora.**^E
11. Se coloca a cada tira de nitrocelulosa 1000 µL de solución reveladora a temperatura ambiente y agitación constante, hasta por 30 minutos.
12. Se retira la solución reveladora de cada tira y dicha solución es inactiva con cloro al 3%, mientras las tiras de nitrocelulosa son enjuagadas con agua abundante.
13. Se dejan secar las tiras el tiempo que sea necesario.

14. Las Bandas reveladas en las tiras de nitrocelulosa deberán estar perfectamente bien definidas y claras como se muestra en la figura:



4. Prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (PRRFF)

La prueba rápida de reducción de focos fluorescentes consiste en incubar cantidades constantes de virus rábico utilizando diluciones seriadas de los sueros a estudiar, utilizando como suero de referencia un título conocido en unidades internacionales por mililitro (UI/mL), a una monocapa de células susceptibles al virus. Después de 24 horas de incubación se observa la diferencia del número de focos de infección, entre el suero de referencia y los sueros problema.

Material:

- Una botella para cultivo celular de 25 cm² (*BIORAD*).
- Placa para cultivo celular de 96 pozos de fondo plano (*SARSTED*).
- Conjugado fluorescente antirrábico (monoclonal antinucleocápside) (*BAER*)
- Puntas para micropipeta de 500 µL (*eppendorf*).
- Puntas para micropipeta de 100 µL (*eppendorf*).
- Puntas para micropipeta de 50 µL (*eppendorf*).
- Micropipeta de 20 µL – 200 µL (*eppendorf*).
- Micropipeta de 5 µL – 50 µL (*eppendorf*).
- Micropipeta de 50 µL – 1000 µL (*eppendorf*).

Material Biológico:

- Suero Humano con 10 UI/mL de anticuerpos contra la rabia (el necesario).

- Botella confluyente de células de Neuroblastoma murino CCL 131
- 100 µL de suero de gato positivo contra rabia.
- 100 µL de suero de gato negativo contra rabia.
- 100 µL de suero problema de gato.
- Antígeno viral Rábico PV3o.

Equipo:

- Gabinete de seguridad clase II.
- Incubadora-estufa calibrada a 37°C con atmósfera de humedad y 5% de CO₂ (*LAB-LINE*).
- Microscopio óptico con fluorescencia (*OLYMPUS .LH50A*).
- Baño María

Soluciones y reactivos:

1. **Suero fetal bovino (SFB) Inactivado** (*HYBRIMAX*)
2. **Medio mínimo esencial Glasgow** (*INVITRO*)
3. **Medio mínimo esencial Glasgow** (*INVITRO*), con 10% de **SFB**.
4. **Antibiótico y antimicótico** (*SIGMA*).
5. **Líquido de montaje** (50% glicerina: 50% PBS pH 8.0)
6. **Solución al 80% de acetona** (*SIGMA*)-agua.
7. **Tripsina 0.3%** (*INVITRO*)

Metodología:

1. Inactivar los sueros en baño María a 56°C por un tiempo de 30 minutos.

2. Trabajar en el gabinete de seguridad clase II, las células de neuroblastoma murino 131, despegar con cuidado y con **tripsina**⁷ las células adheridas a la botella y agregar 10 mL de **medio con suero**.³
3. Homogenizar las células con el medio en la misma botella y posteriormente agregar 100 µL de esta suspensión de células a cada pozo de la placa a usar.
4. Dejar incubar la placa por 24 horas en atmósfera de CO₂.
5. En otra placa de cultivo celular agregar 100 µL de **medio sin suero**² y 50 µL de suero problema, homogenizar cuidadosamente en el pozo con micropipeta y pasar 50 µL al siguiente pozo y así sucesivamente hasta completar 4 diluciones seriadas.
6. Agregar 50 µL de virus diluido (1:4) en **medio sin suero** a cada pozo dando un volumen final de 150 µL, e incubar por una hora a 37°C en una atmósfera de CO₂.
7. Se retira el sobrenadante de la placa que contienen las células de neuroblastoma murino 131 trabajada en el paso 3 y agregar a esta los 150 µL de cada pozo de la placa preparada en el **paso 5 y 6**.
8. En el control negativo, agregar solamente al tapete celular 200 µL de **medio con suero** y para el caso del control positivo agregar 50 µL de virus sin diluir y 150 µL de **medio sin suero**.
9. A cada pozo que contiene el suero problema agregar 50 µL de **medio sin suero** para tener un volumen final de 200 µL por cada pozo, excepto los controles positivos y negativos.

10. Incubar por 24 horas.
11. Pasado el tiempo de incubación se tira el medio y se fijan las células con 100 ó 200 μL de **solución fría al 80% de acetona-agua**⁶ y se deja a temperatura de -20°C por $\frac{1}{2}$ hora.
12. Tirar la **solución fría al 80% de acetona-agua** y secar muy bien la placa (se puede guardar a -20°C para el día siguiente).
13. Diluir el antígeno conjugado con fluoresceína anti-nucleocápside (1:4) agua destilada, teniendo la precaución de protegerlo de la luz.
14. Agregar 40 μL del conjugado recién preparado e incubar por $\frac{1}{2}$ hora a 37°C , tapando la placa con una gasa húmeda con la intención de simular una atmósfera húmeda.
15. Pasado el tiempo decantar el sobrenadante y enjuagar la placa con agua de la llave.
16. Colocar **líquido de montaje**,⁵ en un volumen de 80 a 100 μL por pozo y cubrir en bolsa de aluminio (se puede guardar a 4°C si no se va a leer).

13. Referencias

1. Pringle, C.R. In: Molecular Basis of Virus Evolution. Cambridge Uni. Press. Eds.: Gibbs, Calisher and Garcia-Arenal. 1995: 426-437
2. Aguilar-Setién A., Aguila-Tecuatl H., Tesoro-Cruz E., Ramos-Ramirez L., and Kretschmer R. Preservation of rabies virus RNA from brain tissue using glicerina. Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene 2003; 97:1-3.
3. Tordo, N. and Badrane, H. Molecular Epidemiology of wild isolates of Lyssaviruses Practical Course. Paris: Institut Pasteur. 1995: 15-22
4. Loza-Rubio E, Papel de la biología molecular en la investigación del virus de la rabia en México, Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria INIFAP, 2003
5. Loza –Rubio E, Pedroza-Requenes R, Montaña Hirose JA, Aguilar Setién A. Caracterización con anticuerpos monoclonales del virus de la rabia aislados de fauna domestica y silvestre de México, Vet. Méx. 1998b; 29:345-350
6. Schneider MC, Santos Burgoa C. Tratamiento contra la rabia humana: un poco de su historia, Revista de Salud Publica de Sao Paulo 1994; 6:28

7. Vargas, G.R. y Cárdenas, L.J. Epidemiología de la Rabia: situación actual en México. *Ciencia Veterinaria* 7 – TALLERES EDITORES DE LA UNAM. México, D.F., 1996: 331-360
8. K.A. McColl, N. Tordo & Aguilar Setién. Bat Lyssavirus Infections. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2000; 19(1): 177-196
9. Acha P. N. y Szyifres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Revista Española Salud Publica* 2001; 75(3):263-264
10. Fraser G. C., Hooper P.T., Luna R.A. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 1996; 2:327-331.
11. Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J. Virol.* 2001; 75(7):3268-3276
12. Fooks AR, Brookes SM, Johnson N, McElhinney LM, Hutson AM. European bat lyssavirus: an emerging zoonosis. *Epidemiol Infect.* 2003; 131(3): 1029-1039

13. Acha, N.P. y Szyfres, B. Zoonosis y enfermedades trasmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª ed. OPS/OMS. 1991: 502-526
14. Swanepoel, R., Barnard, B.J.H., Meredith C.D., Bishop, G.C., Brückener, G.K., Fuggin, C.M. and Hübschle, O.J.B. Rabies in Southern Africa. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993; 60(4):325-346
15. Tordo, N, and Kouknetzoff, A. The rabies virus genome: an overview. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993; 60(3): 263-269
16. Bahloul, Ch., Immunization génique: Immunogénicité glycoprotéine rabique et vaccins élargis aux Lyssavirus. Thèse Présentée à l'Unité Formation et recherché, Université de Paris XI pour l'obtención de grade de Docteur, Paris 1997; 181
17. Smith, J.S., Orciari, L.A., Yager, P.A., Seidel, H.D. and Warner, C.K. Epidemiologic and Historical Relationships among 87 Rabies Virus Isolates as Determined by Limited Sequence Analisis. J of Infect. Diseases 1992; 166(2):296-307
18. Tordo, N., Bourhy, H. and Sureau, P. Rabies and rabies-related viruses. First Congress of the European Society for Veterinary Virology. Contribution of Molecular Biology to Veterinary Virology. Liege, Belgium, 1989; 3: 5-7

19. Bouhry, H., Kissi, B., Lafon M., Sacramento, D. and Tordo, N. Antigenic and Molecular Characterization of bat Rabies Virus in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(9): 2419-2426
20. Montaña-Hirose, J.A., Bourhy, H. and Lafon, M. A reduce panel of antinucleocapside monoclonal antibodies for bats rabies virus identification Europe. *Res. Virol.* 1990; 141: 571-581
21. Mohanty, S.B. Dutta, S.K. *Virología Veterinaria*. 1a. Edición. México D.F. Interamericana 1985: 234-236
22. Heaton, P.R., Johnstone, P., McElhinney, L.M., Cowley, R., O'Sullivan, E. and Whitby, J, E. Heminsted PCR Assay For Detection of six Genotypes of Rabies and Rabies-Related Viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2762-2766
23. Tordo, N. and Kouknetzoff, A. The rabies virus genome: an overview. *Ondersteport J. of Vet. Res.* 1993; 60(3): 263-269
24. Corey L. Rabies. *Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill, Inc. 1992: 832-836
25. Secretaria de Salud (SSA), *Manual de vigilancia epidemiológica*. 1999

26. Lopez Ingunza R., Condori RE y Dias Olivera A. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la rabia, ministerio de salud, Instituto Nacional de Salud de Lima Perú. 2002; 1-46
27. Stanley A Plotkin., Rabies, Clinical Infectious Diseases. 2000;30:4-12
28. Soria-Baltazar R. Elementos que intervienen en la respuesta inmunitaria antirrábica, Ciencia y Desarrollo, 1992;18(105):88-96
29. Zuckerman A.D., Banatuala J.E., Pattison J.R. Principles and Practice of Clinical Virology. England: Ed. Wiley, 4ª ed. 2000
30. Secretaria de Salud (SSA), Vacunas Ciencia y Salud. 1992
31. Organización Mundial de la Salud – Organización Panamericana de la Salud (OMS-OPS), boletín: Vigilancia epidemiológica de la rabia en las Americas, vol. XXXIII. 2001
32. Loza-Rubio E. y Gómez Lim M.A. De Pasteur a nuestros días Batalla contra la Rabia, Ciencia y desarrollo 2004: 26-33

33. Organización Mundial de la Salud-Organización Panamericana de la Salud (OMS-OPS), Consultation intradermal application of human rabies vaccines. 1995.
34. Zerai Woldehiwet, Rabies recent developments. Research in Veterinary Science 2002;73: 17-25
35. Beran GW, Steele JH. Viral zoonoses. Handbook of zoonoses. Boca Ratón: CRC Press; 1994:307-57
36. Dumonteil E., Vacunas de DNA: El presente y el futuro, Rev. Biomed. 2000; 11: s7-12
37. Cupillard I., Juillard V., Latour S., Colombet G., Cachet N., Richard S., Blanchard S., Fischer L. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of rabies DNA Vaccine to protect cats. Vaccine 2005; 23: 1910-1916
38. Donnelly J.J., Ulmer J.B., Cciver J. and Liu A.M. DNA vaccines, Ann. Rev. Immunol. 1997;15: 617-48
39. Vogel F.R. Improving Vaccine Performance With Adjuvants. Clinial Infectious Diseases 2000; 30: s266-70

40. Jackson Alan & Wunner William, Rabies Academic Press, 2002
41. Betanzos I.C., Aceves P.P. Introducción de la vacuna antirrábica en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 1996; 26: 5-6, 37-40
42. Khawplot P., Glueck R., Wilde H., Tantawichien T., Chomchey P., Thipkong P., Benjavongkulchai M., Sumboonanondha A., Prakongsri S., Siakasem A. Immunogenicity of purified duck embryo rabies vaccine (Lyssavac-N) with use of the WHO-approved intradermal postexposure regimen. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 3(20):646-51
43. Benjavongkulchai M, Kositprapa C, Limsuwun K, Khawplod P, Chomchey P, Yountong C, Naraporn N, Bangjongkasaena Na Ayuthya A, Raksakate S, Samranweaya P, Oka T, Ohkuma K, Hamasaki T y Wilde H. An Immunogenicity and efficacy study of purified chick embryo cell culture rabies vaccine manufactured in Japan. *Vaccine* 1997; 18:1816-1819
44. Briggs DJ, Drewssen DW, Nicolay U, Chin JE, Davis R, Gordon C, Banzhoff A. Purified Chick Embryo Cell Culture Rabies Vaccine: Interchangeability with Human Diploid Cell Culture Rabies Vaccine and comparison of one versus two-dose post-exposure booster regimen for previously immunized persons. *Vaccine* 2001; 19: 1055-1060

45. Meslin FX, Kaplan MN, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies, Genova, 4th ed. World Health Organization, 1996
46. WHO Expert Consultation on Rabies. First report. Genova, World Health Organization, 2005 (WHO Technical Report Serie No. 931)
47. Osorio, J.E., Tomlinson, C.C., Frank, R.S., Haanes, E.J., Rushlow, K., Haynes, J.R., Stinchcomb, D.T. Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine* 1999; 17:1109-1116
48. Rojas E. O. Inmunología de memoria. 2ª. ed., México: Ed. Panamericana, 2004: 319-37
49. Juardo A. Herrero J. Vacunas de ADN en el tratamiento de la alergia, *Can. Ped.* 2001; 1:25
50. Seder R.A., Hill AVS. Vaccine against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 2000;16:863
51. Wilmsley AM, Arntzen CJ. Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol.* 2000; 11: 126-129

52. Ticket CO, Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect.* 1999; 1: 777-783
53. Meloen RH, Hamilton WD, Casal JI, Dalsgaard K, Langeveld JP. Edible vaccines. *Vet Q* 1998; 20:S92-S95
54. Cichutek k, DNA Vaccines: Development, Standardization and Regulation. *Intervirology* 2000; 43: 331-338
55. Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, Zagursky RJ. Mining genomes and mapping proteomes: identification and characterization of protein subunit vaccines. *Dev. Biol. (Basel)*. 2000; 103: 81-90
56. Bahloul Ch, Jacob Y, Tordo N, Perrin P. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine* 1998; 16: 417-425
57. Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Setién A, Loza Rubio E, Jallet C, Desmézières E, Aubert M, Cliquet F, Tordo N. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999; 18: 479-486

58. Tesoro Cruz E., Hernandez Gonzalez R., Alonso Morales R., Aguilar Setién A. Rabies DNA vaccination by the intranasal route in dogs. *Developments in biologicals* 2006;125: 221-31
59. Atanasio P. and Perrin P. Micromethode immunoenzymatique de titrage des anticorps antirabiques: utilisation de la glycoprotéine rabique et de la protéine conjuguées à la preoxidase, *Ann Microbiol (Institut Pasteur)* 1999; 7: 213-220
60. Grassi M, Wandeler A, Peterhans E. Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibodies to the envelope glycoprotein of rabies virus. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:899-902
61. Smith JS, Yager PA, Baer GA. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies neutralizing antibodies. In: Meslin IX., Kaplan MM, Koprowski H. editors. *Laboratory Techniques in Rabies*, Geneva, WHO 1996:181-192
62. Cupillard L, Juillard V, Latour S, Colombet G, Cachet N, Richard S, Blanchard S, Fischer L. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine* 2006; 23: 1910-1916
63. Yu-Kyoung Oh, Jong-Pil Kim, Tae Sun Hwang, Jung Jae Ko, Jung Mogg Kim, Ji-Sun Yang , Chong-Kook Kim. Nasal absorption and bio-distribution of

plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery, *Vaccine*. 2001; 19: 4519-4525.

64. Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity, *J Exp Med*, 1999; 189:169-178.

65. Abbas AK., Lichtman AH., *Inmunología celular y molecular*, Ed. Saunders-Elsevier, 5ª ed., España 2005, pp. 524-526.

66. Margni AR, *Fundamentos de Inmunología e Inmunoquímica*. 4ª edición, Medica Panamericana, Buenos Aires 1989, pp. 645-751

67. Lodmell LD, Parnell JM, Bailey RJ, Ewalt CL, Halon AC. One-time gene gun or intramuscular rabies DNA vaccination of non-human primates: comparison of neutralizing antibody responses and protection against rabies virus 1 year after vaccination. *Vaccine* 2002; 20: 838-844

68. Lodmell LD, Parnell JM, Weyhrich TJ, Ewalt CL. Canine rabies DNA vaccination: a single-dose intradermal injection into ear pinnae elicits elevated and persistent levels of neutralizing antibody. *Vaccine* 2003; 21: 3998-4002