



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA G DEL VIRUS DE LA
RABIA EN UN *BACULOVIRUS*, PARA
ESTANDARIACIÓN EN UN ENSAYO
INMUNOENZIMÁTICO DE ELISA
CON FINES DIAGNOSTICOS.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
FABIOLA MURRIETA TÉLLEZ GIRÓN**

TUTOR:

DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO

COMITÉ TIUTORAL:

DR. FELICIANO MILIÁN SUAZO

DR. JUAN PEDRO LUNA ARIAS



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.

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes instituciones agradezco su apoyo para el desarrollo de la presente tesis, ya que sin su ayuda no hubiese sido posible la realización de ésta tesis:

- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-Microbiología-INIFAP).
- Departamento de Genética Molecular en Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM.
- Departamento de Ecología de la UNAM.
- Departamento de Inmunología del Centro Medico Siglo XXI.
- Centro de Extensión y Producción Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) campo IV de la UNAM.
- Asociación Ganadera Local del municipio de Jamapa, Veracruz.
- Centro Nacional de Servicios de Diagnostico en Salud Animal (CENASA) de Tecamac.
- Antirrábico de Ecatepec.
- Consultorio veterinario del Dr. Alejandro Gante, ubicado en Cuautitlán Izcalli.
- Centro de Control de Enfermedades (Center for Disease Control and Prevention - CDC), Atlanta.

DEDICATORIA

A mi hija Jeanina y mi esposo Rolando ya que su compañía y apoyo incondicional alegran mi vida y mi corazón. Esperando que siempre sigan sus sueños, expectativas y metas; sin olvidar que yo siempre estaré feliz de sus logros y sin dudar que mi amor siempre estará para sus vidas.

A mi mamá Guillermina que me ha animado recordándome siempre que muy a pesar de cualquier adversidad, hay que ser fuerte como un roble; y a aprender que de cada error se aprende.

A mis amigos que conocí en CU, INIFAP y FESC, por que cada persona que me acompañó en el desarrollo de esta tesis ha dejado un huella en mí, esperado que aunque pase el tiempo sigamos en contacto, ya que indudablemente, la amistad es un regalo de la vida y se debe atesorar para siempre.

RESUMEN

La rabia es una zoonosis de distribución mundial, causada por un virus neurotrópico que pertenece al orden de los *Mononegavirales*, a la familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*. De cinco proteínas que le conforman, la glicoproteína representa ser su determinante antigénico más importante por que induce una producción de anticuerpos específicos que neutralizan al virus rábico. El ensayo inmuno-enzimático absorbente (ELISA) antigenizado con la glicoproteína purificada se considera como una herramienta alternativa, relativamente fácil de desarrollar, que ofrece las ventajas de analizar un alto número de muestras relacionadas con un brote, sin la necesidad de personal especializado que manipule virus vivo o cultivos celulares con un menor tiempo y costo. Para el desarrollo de esta tesis la proteína G del virus de la rabia se expresó de manera recombinante en un sistema eucariótico: *Baculovirus*, con la finalidad de ser evaluada y usada para estandarizar una prueba de ELISA. Los resultados obtenidos entre esta sensibilizada con una glicoproteína purificada y otra con la proteína recombinante, mostraron consistencia en las repeticiones para las tres especies evaluadas (humanos, bovinos y perros). El análisis de concordancia realizado con prueba estadística de Kappa fue mayor al 80 %. Sin embargo, comparando los resultados de algunos sueros con la prueba de referencia (RFFIT: Prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes), las concordancias encontradas fueron moderadas o débiles.

ABSTRACT

Rabies is a zoonosis distributed around the world, it is caused by a neurotropic virus that belongs to *Mononegavirales* order, *Rhabdoviridae* family, and *Lyssavirus* genus. The virus is conformed by five proteins, but has been shown that the glycoprotein is the most important antigen because inducts the production of specific virus rabies neutralizing antibodies. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sensitising with a purify glycoprotein is consider as alternative tool, that offer the advantage of analyze a judge number of samples in outbreak concern without the necessity of personal that manipulate alive virus or culture cells in less time and cost. For the development of this thesis the protein G was expressed in a recombinant way with a eukaryotic system: *Baculovirus* with the purpose to be evaluated and used for the standardization of ELISA. The obtained results between the purify protein and the recombinant protein shown consistency in the repeatability of the three evaluated species (humans, bovine and dogs). The agreement analysis was made with the Kappa statistic test and it was higher to 80%. Nevertheless, comparing the results with the reference test (RFFIT), the agreements founded were moderate or weak.

ÍNDICE

1.0 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Problemática de la Rabia en México.....	1
1.2 Clasificación taxonómica del virus de la Rabia	3
1.3 Biología Molecular del virus.....	4
1.4 Epidemiología Mundial de la rabia	7
1.4.1 Situación actual de la rabia en México.....	9
1.5 Vías de Transmisión.....	11
1.6 Patogenia.....	11
1.7 Control y prevención.....	14
1.8 Tratamiento.....	16
1.9 Pruebas de diagnóstico serológico.....	19
1.10 Baculovirus recombinante.....	22
1.11 Justificación.....	26
1.12 Objetivo general.....	27
1.13 Objetivos particulares.....	27
2.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1 Determinación del tamaño de muestra.	28
2.2 Obtención de sueros a analizar	29
2.2.1 Obtención de muestras de suero de humanos.....	29
2.2.2 Obtención de muestras de suero de bovinos.....	30
2.2.3 Obtención de muestras de suero de perros.....	31
2.3 Obtención del baculovirus recombinante.....	31
3.0 RESULTADOS.....	36

4.0 DISCUSIÓN.....	53
5.0 CONCLUSIONES.....	58
6.0 LITERATURA CITADA.....	59
7.0 ANEXOS.....	64
ANEXO 1. TRANSPOSICIÓN.....	64
ANEXO 2. TRANSFECCIÓN.....	65
ANEXO 3. Requerimientos para la propagación y mantenimiento de las células de insecto.....	67
3.1 Composición (base) del medio de cultivo de insecto.....	69
ANEXO 4. Esquema y características del vector pFastBac HT.....	70
ANEXO 5. Amplificación de las clonas.....	71
5.1 Cosecha de las proteínas del sobrenadante de células de insecto.....	71
ANEXO 6. Preparación del geles de poliacrilamida.....	72
6. 1 Western Blot semiseco para detectar proteína G del virus de la rabia..	74
6. 2 Condiciones del RT-PCR.....	76
ANEXO 7. Desarrollo de la técnica de ELISA	77
7.1 Preparación de reactivos para la prueba de ELISA.....	78
ANEXO 8. Cuestionario para humanos.....	81
ANEXO 9. Cuestionario para propietarios de animales.....	82
ANEXO 10. RFFIT.....	83

LISTA DE CUADROS

	Página
CUADRO 1. Genotipos reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía en Virus.....	3
CUADRO 2. Casos de rabia humana y canina en México, 1990-2003.....	10
CUADRO 3. Esquema donde se observa el tiempo ideal para aplicar la vacuna contra rabia post-exposición.....	18
CUADRO 4. Ventajas y desventajas del sistema baculovirus	23
CUADRO 5. Prevalencia real encontrada en cada especie para calcular tamaño de muestra.....	28
CUADRO 6. Tamaño de muestra para cada especie.....	29
CUADRO 7. Tabla de valoración del índice de Kappa	35
CUADRO 7.1 Ejemplo de cuadro de contingencia obtenido tras el análisis de Kappa	35
CUADRO 8. Resultados obtenidos en DO, de acuerdo a la Figura 11.....	42
CUADRO 9. Interpretación de las DO obtenidas a partir del suero control positivo.	44
CUADRO 10. Promedio de suero problema obtenidas en las placas de ELISA.....	44
CUADRO 11. Controles negativos usados en las placas de ELISA	45
CUADROS 12A - 12B. Datos y resultados de los sueros de bovinos	46- 47
CUADROS 13A - 13B. Datos y resultados de los sueros de humanos.....	48-49
CUADROS 14A - 14B. Datos y resultados de los sueros de perros.....	50-51

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Representación lineal del genoma del virus de la rabia.....	4
FIGURA 2. Representación esquemática del virus rábico con sus proteínas estructurales.....	5
FIGURA 3. Casos de rabia humana a causa de los diferentes vectores y su ubicación geográfica en México, 2000-2006.....	10
FIGURA 4. Esquema del plásmido que presenta la transposición sitio- específica del gen G por medio de las enzimas BamHI Fig 4. PCR del baculovirus con la inserción del gen de la proteína G del virus de la Rabia.....	32
FIGURA 5. Gel de agarosa al 1% que muestra al del gen G de la rabia presente en las tres principales clonas.....	36
FIGURA 6. Gel de acrilamida al 12.5% donde se observó a la glicoproteína con respecto a la curva de albumina, para determinar la cantidad de proteína en mg por μL de cada clona.....	37
FIGURA 7. Western blot donde se observó la unión Ag-Ac entre la glicoproteína y suero bovino...	38
FIGURA 8. Gráfica de dispersión donde se muestra el título de cada clona 283 (-5), 283 (-4) y 284 (0.01), obtenido por ELISA directa	39
FIGURA 9. Gráfica donde se muestra el título de anticuerpos encontrado en diez perros con historial de vacunación (1-10), a diferencia de los cachorros menores de 1 mes de edad sin historial de vacunación (11-15)	39
FIGURA 10. Gráfica que muestra a la dilución 1:25 (ovalo) como la dilución ideal para titular las muestras problemas.....	41
FIGURA 11. Placa de ELISA que muestra la distribución realizada para analizar los sueros problema	42
FIGURA 12. Gráfica donde se observa la clásica curva sigmoidea esperada en el suero control positivo	43

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

Proteína G = glicoproteína

ARN = Ácido ribonucleico

ADN = Ácido desoxirribonucleico

nm = manómetros

pb = pares de bases

kpb = kilopares de bases

US\$ = dólares

Se = sensibilidad

Es = especificidad

UI = Unidades Internacionales

UE = Unidades de ELISA

ORF = marco de lectura abierta (open-reading frame)

PIB = cuerpos polihídricos con cuerpos de inclusión

OMS = Organización Mundial de la Salud

OIE = Organización Mundial de Sanidad Animal

CDC = Centro de Control de Enfermedades

INIFAP = Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

CENASA = Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal

FESC = Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

FAVN = Prueba de virus neutralización de anticuerpos fluorescentes

RFFIT = Prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes

ELISA = Ensayo Inmuno Enzimático Absorbente

ELISA experimental = prueba realizada con la glicoproteína G recombinante

ELISA alterna = prueba realizada con la proteína G comercial

1.0 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Problemática de la Rabia en México

La rabia en México se presenta como una enfermedad enzoótica, zoonótica y de reporte obligatorio. Su problemática a nivel de Salud Pública no se basa únicamente en el número de casos positivos detectados, si no en el número de individuos que estuvieron expuestos y pueden estar desarrollando la enfermedad sin ser detectados, lo cual representa un insumo importante para las organizaciones dedicadas a la vigilancia epidemiológica, tanto en nuestro país como a nivel mundial (1,2, 3).

En México, las acciones de vigilancia epidemiológica se basan en programas de vacunación gratuita en perros y gatos, la profilaxis oportuna a las personas expuestas y el control de perros callejeros a través de redadas y sacrificio humanitario; implementadas por las Instituciones del Sistema Nacional de Salud, con el apoyo del Sistema Nacional Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), logrando así reducir los casos de rabia urbana en humanos y animales, por esta razón en algunos Estados se ha iniciado la certificación de áreas libres de rabia canina, como son: Guanajuato, Nuevo León, Jalisco, Aguascalientes y Baja California (1, 3, 4).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), ha identificado que la rabia se encuentra circunscrita a 24 Estados de la República Mexicana, que van desde el Sur de Sonora por toda la Costa del Pacífico hasta Chiapas, y por el lado del Golfo de México desde sur de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán; donde las condiciones ecológicas favorecen la presencia de vampiros del género *Desmodus rotundus*, el cual es el principal reservorio de la rabia, afectando así poblaciones de ganado bovino, porcino, ovino, caprino y equino (1, 3, 5).

La rabia bovina en México afecta al sector ganadero nacional, provocando hasta 20 000 muertes al año con pérdidas económicas de hasta 120 millones de pesos. Por esta razón, se han establecido una serie de medidas zoonosanitarias y de seguridad obligatorias orientadas al diagnóstico, prevención y control de la rabia transmitida por murciélagos hematófagos, con la finalidad de contrarrestar la incidencia de esta enfermedad y evitar los riesgos zoonosanitarios (1,3).

Los programas de control de la rabia en el ganado bovino se basan en: la vacunación, la evaluación de la incidencia de las mordeduras y la selección de la técnica más conveniente para controlar la población de vampiros. Si a través de la evaluación se encuentra una alta incidencia de mordeduras en el ganado, se realizan una o varias capturas de vampiros a los cuales se les aplica una pomada vampiricida sobre su cuerpo, estimando que por cada vampiro tratado se ocasionará la muerte de 20 a 30 vampiros más y el 10% de los ejemplares se envían al laboratorio para diagnóstico de rabia; pero si la incidencia de mordedura es baja, se aplica una pomada vampiricida sobre las heridas o de manera sistémica sobre el ganado, logrando así que los vampiros que se alimenten de los animales tratados mueran durante los 7 días siguientes (5).

La vacunación de los animales silvestres como son zorros, mapaches y murciélagos hematófagos en México, se ha basado en el uso experimental de vacunas orales y en la llamada “VRG” surgida de la inserción del gen de la glicoproteína rábica a un poxvirus (cepa *Copenhagen*), inoculada por escarificación o en forma de aerosoles, que han mostrado resultados alentadores, ya que se han identificado anticuerpos protectores contra rabia a los 18 o 30 días post-vacunación (6, 7, 8, 9).

En México, a partir del 2004 el número de casos de la rabia humana adquirida por murciélagos hematófagos se han mantenido, a diferencia de los casos de rabia transmitida por perros, que han disminuido considerablemente; lo cual nos hace creer que la cantidad de cantidad de casos de rabia transmitida por vampiros ha aumentado. La eliminación y control de la rabia en los murciélagos a gran escala se dificulta, por que la probabilidad

de contacto con el quiróptero portador de la enfermedad varía de acuerdo a su densidad poblacional, organización social y distribución geográfica (5).

La vacunación pre y post-exposición sigue siendo el método profiláctico en las personas agredidas o que viven y/o laboran en sitios de alto riesgo. Sin embargo, la vacunación es un método que puede presentar ciertas “fallas” (por pérdida de la cadena fría, por variación de la potencia relativa de las vacunas, por mal manejo, por inmunosupresión, etc), lo cual hace necesario que se evalúe la seroconversión post-vacunación. Por esta razón se propone la estandarización de una prueba de laboratorio rápida, fácil de desarrollar, reproducible y de bajo costo que determine el nivel de seroconversión en toda población (10, 11).

1.2 Clasificación taxonómica del virus de la Rabia

El virus de la rabia pertenece la familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus* del orden de los *Mononegavirales*. Se han clasificado siete genotipos por medio de pruebas de anticuerpos monoclonales (MAbs) y secuenciación (12, 13, 14, 15):

CUADRO 1. Genotipos reconocidos por ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).

VIRUS	ABREVIATURA	GENOTIPO
<i>Lyssavirus</i>	RABV	1
<i>Lagos bat</i>	LB	2
<i>Mogola</i>	MOK	3
<i>Duvenhage</i>	DUV	4
<i>Lyssavirus Europeo 1</i>	EBL-1	5
<i>Lyssavirus Europeo 2</i>	EBL-2	6
<i>Lyssavirus Australiano</i>	ABLV	7

Recientemente han emergido cuatro nuevos *Lyssavirus* que aun no han sido clasificados, aislados en murciélagos insectívoros de Eurasia: virus Aravan (ARAV), Khujand (KHUV), Irkut (IRKV) y West Caucasian bat virus (WCBV) (12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20).

1.3 Biología Molecular del virus

El virus de la Rabia es envuelto, presenta genoma ARN, de polaridad negativa, tiene forma de bala, con tamaño promedio de 75 nm de diámetro y 100-300 nm de largo. Su genoma consta de aproximadamente 12,000 pb, con cuatro porciones intergénicas y cinco genes que codifican para el mismo número de proteínas estructurales: la **glicoproteína** (G = antígeno hemaglutinante, neutralizante y activador de la inmunidad celular), la **proteína de la matriz membranal** (M = antígeno que detiene la transcripción celular y permite la salida del virión), la **nucleoproteína** (N = antígeno activador de respuesta celular y humoral), la **fosfoproteína** (NS o P = necesaria en la transcripción, ayuda en la encapsidación e induce respuesta celular) y la **proteína ARN polimerasa dependiente de ARN** (L = antígeno con funciones de transcripción y replicación) (12, 20, 21, 22).

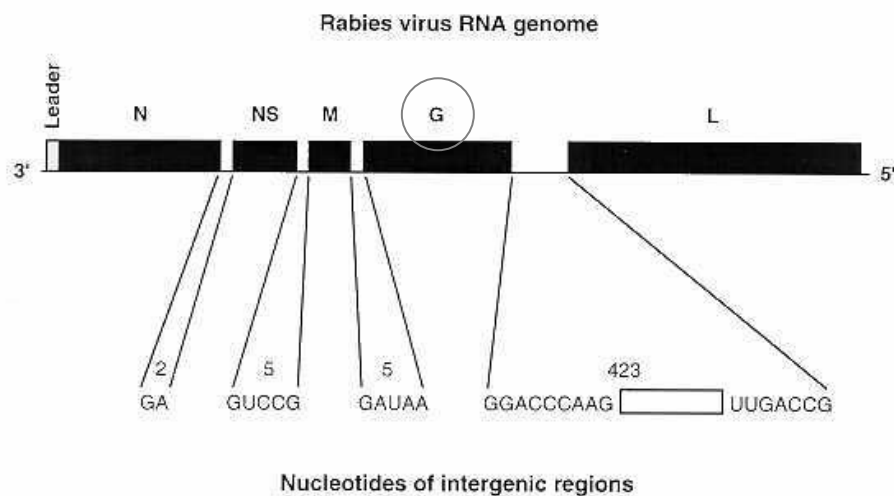


Figura 1. Representación lineal del genoma del virus de la rabia.
Esquema obtenido en: gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig62_2.JPG

Cuando un virus se encuentra infectando una célula hospedadora susceptible, una serie de eventos se desencadenan para su duplicación, que son: **adsorción** mediada por la glicoproteína G, **penetración** por endocitosis en el citoplasma celular, **desnudamiento**, **transcripción** (donde a partir de sus genes y enzimas virales se producen cinco ARNm monocistrónicos), **traducción** (donde se sintetiza su genoma completo como hebra positiva 5'-3'), **replicación** (donde se sintetiza la hebra negativa complementaria), **ensamblaje** de las proteínas y **brote** (produciéndose así la muerte de la célula hospedera) (23).

La proteína G es su antígeno (Ag) principal, codificada por 1575 a 1672 pb, expresando de 522 a 524 aminoácidos que conforman la envoltura viral estriada, la cual le confiere adhesión con las membranas neuronales. También es el determinante antigénico más importante de virulencia, presente en todas las cepas del virus de la Rabia aisladas (14, 20, 22).

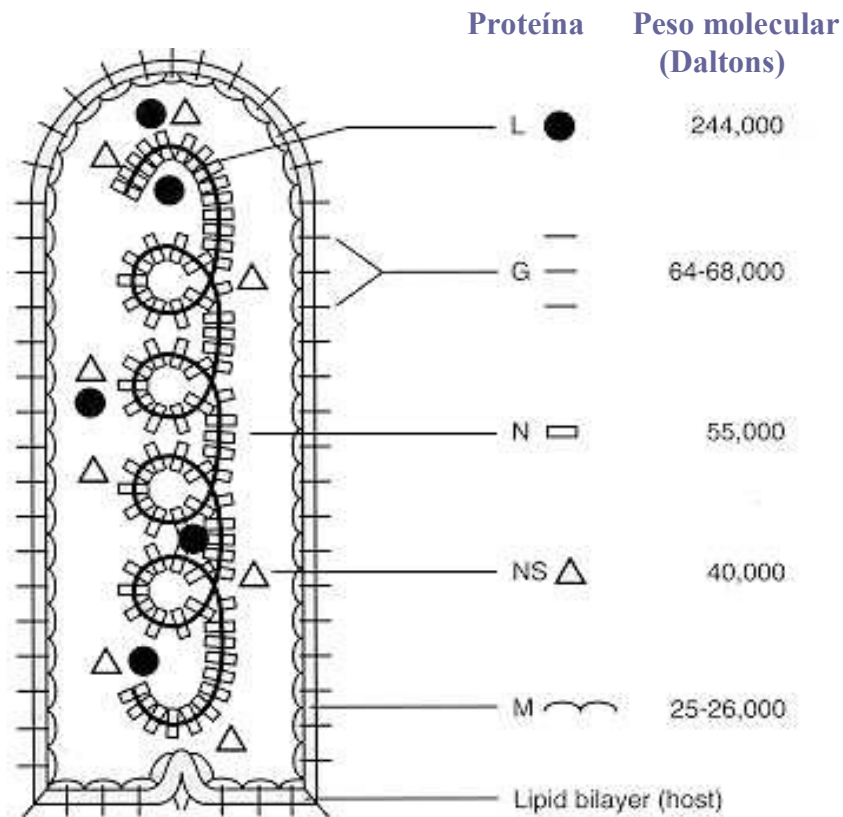


Figura 2. Representación esquemática del virus rábico con sus proteínas estructurales.

Esquema obtenido en: gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig61_2.JPG

La glicoproteína está compuesta de: un dominio citoplasmático también llamado endodominio, un dominio transmembranal y un ectodominio; expuestos en la superficie viral como un trímero. El ectodominio es el receptor que se fusiona con la membrana celular (14, 24, 25).

La proteína G juega un papel importante en la neuropatogenicidad porque la replicación viral se inicia con la unión de la glicoproteína viral a receptores de la membrana en la célula hospedera. Los tres receptores de membrana de tipo proteico para el virus rábico son: 1) el receptor nicotínico para la acetilcolina, 2) el receptor de baja afinidad para neurotrofinas y 3) la molécula celular de adhesión neural “*NCAM*” (*). Están implicados en la adsorción del virus de rabia y en la promoción de la infección directamente a las terminaciones nerviosas y/o gangliósidos localizados en las neuronas o bien en el punto de transporte axoplásmico de los músculos. El virus progresa por ganglios dorsales y la médula espinal, y el cerebro se infecta con rapidez produciendo apoptosis de células nerviosas y células T (26, 27, 28, 29, 30).

La proteína G es una de las proteínas que más se ha aplicado en técnicas moleculares, por ejemplo, se han sintetizado liposomas a los que se les ha recubierto con glicoproteínas purificadas, que han demostrado proteger ratones contra una infección letal de rabia. Asimismo se ha producido como un péptido sintético capaz de inducir anticuerpos neutralizantes, demostrando ser un antígeno inmunogénico idóneo para fines diagnósticos y para la elaboración de vacunas contra rabia, ya que la expresión de la glicoproteína en las células presentadoras de antígeno activa y mejora la respuesta inmune contra el virus rábico (20, 31, 32, 33, 34).

(1*) *NCAM*, es una proteína de superficie perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que interviene en el desarrollo del sistema nervioso, en la elongación de axones y en la formación sinapsis.

1.4 Epidemiología Mundial de la rabia

Rabia es una zoonosis de distribución mundial, que reporta hasta 55 000 muertes humanas al año, lo que equivale a casi una muerte cada 10 minutos (35, 36).

El virus rábico ha sido aislado de individuos de la especie mamífera, predominando el orden *Carnívora* y *Quiróptera*, los cuales son los principales reservorios y transmisores del virus. Badrane y Tordo (2001) analizaron el origen del virus de la rabia en base a estudios moleculares, y consideran que los quirópteros a parte de ser los hospederos primarios de los *Lyssavirus* también son los vectores primarios de la enfermedad, ya que la rabia encontrada ahora en carnívoros tiene su origen de los mismos quirópteros, lo cual sucedió aproximadamente 800 años atrás (37, 38).

El 99% de las muertes humanas por infección rábica a nivel mundial, ocurren en África con un 43% de los casos y Asia con un 56% de los casos. En Asia, del 94 al 96% de los casos son transmitidos por mordedura de perros (*Canis familiaris*) y en África los genotipos presentes son el 2, 3 y 4, donde el perro es el principal reservorio y transmisor de la rabia, sin embargo, otras especies salvajes juegan un papel importante en su diseminación como las hienas (*Crocotta crocuta*), los chacales (*Canis aureus*), los monos (*Cercopithecus neglectus*) y los murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*). En África y Asia también ocurre la pérdida mundial de mayor magnitud relacionada a la muerte de ganado, con una incidencia de 5 muertes por cada 100 000 animales con costos de US\$ 230 millones anualmente y se calcula que los gastos relacionados con la prevención y el control de esa enfermedad son de US\$ 590 millones anuales en esos dos continentes (13, 35, 36, 39, 40).

Este incremento de casos en África y Asia, se atribuye a que existe un crecimiento constante de la población de perros de hasta un 5-10% al año en zonas rurales, lo cual provoca un crecimiento de la morbilidad humana en zonas urbanas, ya que las medidas de control implantadas subestiman el tamaño de las población de perros, haciendo que las vacunaciones sean insuficientes (2, 12, 13, 20, 35, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46).

En Europa, el principal reservorio y transmisor de la rabia es el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), seguido por los mapaches (*Procyon lotor*). Los genotipos 5 y 6 han sido aislados en el 95% de los murciélagos muestreados entre 1985 y 2004. Turquía es el único país europeo donde el perro es el principal vector (13, 47, 48, 49).

Australia y Antártida eran los únicos continentes reconocidos como libres de rabia, sin embargo en 1996 el *Lyssavirus* genotipo 7 fue aislado en murciélagos frugívoros y se presentaron dos casos en humanos en Australia (12, 13, 50).

En toda América latina la rabia es una enfermedad que se mantiene de manera enzoótica en los diferentes reservorios de los ciclos urbano y silvestre. El primer ciclo incluye principalmente al perro; el segundo se conforma de pequeños carnívoros como el zorrillo (*Mephitis mephitis*), coyote (*Canis latrans*), zorro y mapaches; así como por los quirópteros que son los reservorios y transmisores de mayor importancia epidemiológica, principalmente el murciélago hematófago (13, 51, 52, 53, 54, 55, 56).

Los murciélagos hematófagos, también llamados “vampiros”, se encuentran distribuidos desde Argentina hasta México. Estos murciélagos, antes de la colonización europea, solían afectar a poblaciones silvestres relativamente pequeñas, pero actualmente con el crecimiento de la ganadería sus presas son los animales domésticos que parecen estar a sus expensas, y sus refugios se han ampliado para incluir lugares artificiales creados por el hombre como túneles, minas, pozos o tuberías de agua, establos, casas y/o cabañas. Por estas razones, actualmente la población y distribución de estos murciélagos es más abundante, favoreciendo así la dispersión de enfermedades (57).

1.4.1 Situación actual de la rabia en México

La rabia en la población bovina presentó una prevalencia del 5.6% en México, entre 2001 y 2006 se extendió desde el Sur de Sonora por toda la Costa del Pacífico hasta Chiapas y desde el Sur de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán por el Golfo de México, zonas geográficas donde habita el murciélago hematófago. En este mismo período de tiempo se reportaron 1,531 focos rábicos con una pérdida total de 3,364 cabezas de ganado, lo que provocó una pérdida económica de 27'787,200 pesos en Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán, los cuales son estados donde se concentra el 98.6% de la población ganadera mas afectada (11).

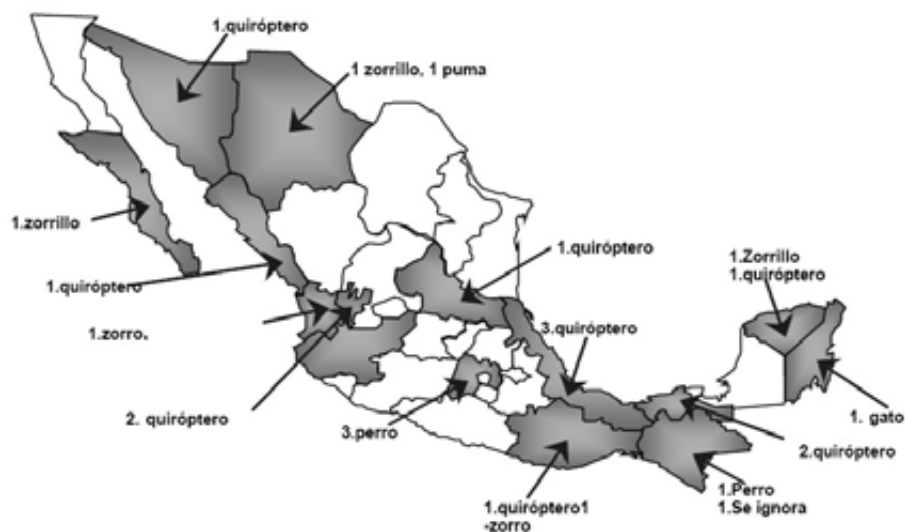
Del 2001 al 2005 la rabia en perros disminuyó hasta un 95% con respecto a la década pasada, gracias un programa coordinado por la Secretaría de la Salud donde se implantaron dos campañas de vacunación anuales. Reduciendo así los casos de rabia, ya que la incidencia de la enfermedad declina en un 69.5% en la primera campaña y hasta 97.4% en la segunda. Entre los años 2004 al 2007 sólo se presentaron entre 5 y 125 casos de rabia canina, y no se registró ningún caso de rabia en humanos transmitida por perro entre 2004 y 2005 (3, 4, 11, 35, 42, 58).

En el período que va de 1990 a 1999 se registraron 306 defunciones, ocasionados por perros (76.4% de los casos), por animales silvestres (17.3% de los casos) y por otras especies (6.3% de los casos). Las estadísticas mostraban una tasa de 98.4 casos por cada 100,000 habitantes; pero a partir del año 2000 y hasta el 2006 los casos de rabia en humanos se redujo hasta un 93%, del cual el 73% de los casos fueron transmitidos por el murciélago hematófago, y sólo el 22.7% de los casos fueron causados por perros y gatos; como se observa en el cuadro 2 y figura 3.

CUADRO 2. Casos de rabia humana y canina en México, 1990-2003.

	Años													
	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Rabia humana total	69	48	35	29	25	31	22	23	15	9	4	7	3	1
Rabia humana por perro	62	46	27	18	16	22	14	19	7	3	0	2	0	1
Rabia humana por animal silvestre	1	1	7	9	4	9	6	3	8	5	4	5	3	0
Rabia humana por otra especie	2	1	0	1	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Rabia humana por esp. ignorada o sin información	4	0	1	1	2	0	0	1		1	0	1	0	0
Rabia canina	11676	7351	2077	1398	1515	1261	852	521	394	317	244	117	105	75

Fuente: 1990-2000: SIRVERA sin actualización por parte del Ministerio de Salud del país; 2001, 2002 y 2003: SIRVERA eventualmente actualizado por el Ministerio de Salud.



Fuente: Anuario epidemiológico de los años 2000 a 2006 y CENAVECE.

Figura 3. Casos de rabia humana a causa de los diferentes vectores y su ubicación geográfica en México, 2000-2006.

1.5 Vías de Transmisión

Es transmitida por la saliva de animales enfermos con capacidad de transmitir el virus generalmente por mordeduras o lameduras sobre heridas de otros animales de sangre caliente, incluyendo al hombre como huésped accidental. En casos aislados se ha transmitido por medio de aerosoles, transplantes de órganos y transfusiones sanguíneas (48, 56, 59, 60, 61, 62).

El virus de la rabia es sensible a los solventes de lípidos como son: el éter, el cloroformo, la acetona, el etanol al 45-70%, compuestos iodados y los cuaternarios de amonio. En el manejo es sensible al congelamiento y descongelamiento sucesivo, a la pasterización y a la luz ultravioleta (UV). Se mantiene estable a un pH entre 5-10, congelado a -70°C , en nitrógeno líquido o liofilizado (22).

1.6 Patogenia

La patogenia del virus de la rabia se ve influenciada por factores del medio ambiente intracelular, por funciones celulares inducidas por el sistema inmune del hospedero, por la velocidad de replicación de las partículas virales, por la citopagenicidad y difusión del virus, entre otros (37, 63).

El periodo de incubación (PI) varía considerablemente por especie, por el sitio de inoculación (zonas corporales muy inervadas y cercanas al cerebro disminuyen PI), la virulencia del virus, el volumen del inóculo viral, el número y/o severidad de la mordida. En los animales se ha reportado un PI promedio de 12 días hasta 15 meses y en el hombre por lo general es de 20 a 90 días, pero se han encontrado casos raros de ocho meses y hasta de 19 años (64, 65).

La rabia se desarrolla fácilmente en las especies de cánidos y el virus puede aparecer en la saliva algunos días antes del comienzo de la enfermedad (2, 3 ó hasta 13

días) y la eliminación del agente por esta vía puede continuar hasta la muerte del animal. Estimándose que cerca de un 60 a 75% de los perros rabiosos eliminan virus por la saliva y su cantidad varía desde apenas vestigios hasta títulos muy altos. Así que, el riesgo de la transmisión del virus por mordedura o abrasión es mayor cuando la dosis es más alta (5).

La capacidad de desarrollar la enfermedad (susceptibilidad) por especie según datos experimentales y epidemiológicos, se ha encontrado que los zorros, coyotes, chacales y lobos son las especies más susceptibles. Las mofetas, mapaches, murciélagos y mangostas con menor susceptibilidad y las zarigüeyas como poco o nada susceptibles. Ensayos experimentales han demostrado que para infectar con el virus de la rabia a las mofetas se necesita una dosis por lo menos 100 veces mayor que para los zorros (5).

El virus persiste en el sitio de inoculación, aparentemente, en forma latente y se replica en la célula muscular para invadir posteriormente nervios periféricos, donde se une a las células nerviosas a través de receptores de acetilcolina, moléculas de adhesión celular y receptores neurotrópicos (NTR75). Una vez que el virus logra entrar a los nervios periféricos avanza diseminándose de manera axoplásmica retrógrada llamada “septineurítis”, a través de las de células vía unión sináptica y paso libre en espacios intracelulares, estimándose un avance de 50 – 100 mm por día. Posteriormente, asciende por médula espinal hasta llegar al SNC (26, 27, 56, 66, 67).

El virus de la rabia se replica en las neuronas del SNC, formando las inclusiones citoplasmáticas llamadas “cuerpos de Negri”, donde se puede observar una apoptosis extensiva e irregular en la sustancia gris, principalmente en el hipocampo (astas de Ammon), mesencéfalo, tálamo y médula. Estos daños se traducen como encéfalo-mielitis en el paciente. Tras su replicación viaja vía centrifuga a través de los axones de los nervios y células de Schwann, llegando a la mayoría de los órganos y tejidos periféricos, como son piel, músculo y órganos de predilección como glándulas salivales (68, 69).

La enfermedad clínica se puede dividir en tres fases (70, 71, 72, 73):

1. La fase prodrómica que es común en perros y gatos se caracteriza por cambios de comportamiento, comúnmente de amigables a agresivos. En el humano se pueden ver cambios como falta de apetito, dolores de cabeza, insomnio, ansiedad, dolor, comezón o sensaciones anormales en el área de la mordedura; donde los síntomas pueden ser confundido con otras patologías.
2. La fase furiosa la cual se presenta en forma pronunciada en las especies carnívoras, como en el caso de los perros. Esta fase es rara en humanos donde se desarrollan signos clínicos como son aerofobia, hidrofobia e irritabilidad en general.
3. La fase paralítica donde se pueden observar espasmos inspiratorios, parálisis flácida debido a que las neuronas pierden la capacidad de neurotransmitir, ya que el virus tiene la capacidad de desmielinizar a las neuronas. En bovinos, según Reis (2003), esta es la fase clínica que predomina, donde la sintomatología típica es: rechinar de dientes, sialorrea, apetito y deglución ausentes o disminuidos, opistótonos, retención de heces y orina, disminución de reflejos centrales y periféricos. Así mismo se presenta pérdida de la sensibilidad cutánea, parálisis de los miembros posteriores, tambaleo seguido de caídas que los coloca en posiciones de cúbito lateral con una respiración marcadamente abdominal y muerte en un tiempo de seis a ocho días de iniciados los signos.

La muerte se presenta eventualmente por insuficiencia respiratoria, fallo cardíaco y/o respiratorio. La sintomatología encontrada en los murciélagos hematófagos, específicamente *Desmodus rotundus*, son: alimentación diurna, hiperexcitabilidad a la luz que manifiestan con sonidos agudos, agresividad, temores, falta de coordinación, contracciones musculares y parálisis. La muerte se presenta a las 48 hrs de comenzados los signos (70, 72, 74).

1.7 Control y Prevención.

El control de la Rabia en México, tiene sus fundamentos legales a partir de la III Reunión Interamericana de Salud Animal a Nivel Ministerial (RIMSA III) y el XXXI Consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud realizados en 1983, donde los países adquirieron el compromiso de eliminar la Rabia urbana de las principales ciudades, de modo que hacia el año 2000 la meta alcanzó los pequeños conglomerados y áreas rurales, y se enfatizó la importancia de la vigilancia epidemiológica de la rabia silvestre, especialmente la transmitida por murciélagos vampiros (3, 4).

La rabia se controla y previene mediante acciones conjuntas de los sectores público, social y privado ofreciendo información educativa al respecto en función de una vigilancia epidemiológica eficaz, la vacunación y el control de la población canina, el control de la población murciélago hematófago (vampiro) y la vacunación de animales de otras especies domésticas susceptibles particularmente las de interés económico en riesgo, a fin de reducir las considerables pérdidas económicas en la ganadería del país (75).

El control de la rabia depende de:

- 1 El diagnóstico temprano de los casos rábicos en los animales reduce su difusión a otras especies animales y se disminuye el riesgo a de exposición en humanos (71, 76).
- 2 Prevenir la enfermedad con vacunaciones masivas en perros y gatos domésticos, con la captura de perros callejeros los cuales se mantienen en custodia para ser entregados a sus dueños en el lapso de tres días y solo si son reclamados se vacunan antes de ser entregados, en caso contrario son sacrificados. De la misma manera se aplican vacunaciones masivas en el ganado apoyado por programas control de murciélagos hematófagos. En Europa, el control de la rabia se centra principalmente en la vacunación de su principal fuente de infección que es el zorro (60, 77).

- 3 Desde 1992, la OMS implantó la norma donde los perros y gatos que viajan a otros países deben presentar un certificado veterinario internacional, en el que conste que los animales cumplieron con un período de cuarentena, que hayan sido vacunados al menos dos veces en su vida y presentado inmunológicamente al menos 0.5 UI/ml de anticuerpos neutralizantes contra rabia. En el caso del ganado doméstico, también deben presentar un certificado veterinario internacional en el que conste que los animales no presentaron ningún signo clínico de rabia el día del embarque y permanecieron durante los seis meses anteriores en una explotación, apartados de los animales silvestres y que en la explotación no haya sido declarado ningún caso de rabia durante los doce meses anteriores al embarque (1, 78).

La profilaxis previa a la exposición se limita a los grupos con alto riesgo, tales como personal de laboratorios, de bioterios, de centros de zoonosis, de control de murciélagos, de antirrábicos, veterinarios, espeleólogos, guardabosques e investigadores. Este esquema pre-exposición consiste en la administración de tres dosis de vacuna antirrábica los días 0, 7 y 28; y deben recibir un refuerzo al año después de la primera vacunación o si se presentan títulos de anticuerpos seroneutralizantes inferiores a 0.5 UI /mL. Por ahora no se recomienda la vacunación en masa, incluso en áreas epizoóticas, ya que ninguna vacuna es completamente inocua (2).

Desde que Pasteur aplicó la primera vacuna en el año de 1885, se han venido desarrollando mejoras de ésta, para tener una mayor inmunogenicidad, seguridad y eficacia tanto para uso humano, como animal. Actualmente en los países desarrollados se usa la vacuna en cultivo de células diploides humanas (HDCV = Human diploid cell vaccine) a base del virus de la rabia cepa Wistar Pitman-Moore L503-3M liofilizado e inactivado, que es altamente inmunogénica pero de un costo inaccesible para los países en desarrollo (1, 2, 3).

En México la vacuna mas usada es la basada en el virus inactivado cepa Wistar Rabies PM / WI 38-1503-3M reproducido en cultivo celular sobre células VERO. Y las vacunas de uso animal se basan del virus de la rabia cepa Acatlán que se reproduce e inactiva de igual manera en cultivos celulares (1, 2, 3).

En 2002 la Secretaria de Salud organizó la XIII Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas, en donde se presentaron trabajos y estudios basados en la vacunación por medio de vacunas génicas con ADN desnudo, donde se utilizan plásmidos que tienen inserto al gen de la glicoproteína (2, 3).

Este tipo de vacunas génicas presentan ventajas sobre las vacunas tradicionales, ya que son más seguras por que en ningún momento se maneja al virus, son de fácil producción porque no se requiere de cultivo de células animales *in vitro*, promueven una respuesta inmune tanto humoral como celular y pueden aplicarse por diferentes vías de inoculación (intranasal o por aerosoles u orales) en animales domésticos, silvestres o en el humano (1, 3).

1.8 Tratamiento.

Como tratamiento inmediato, es necesario el lavado de la herida con abundante agua y jabón o detergente, dejando enjabonada la zona afectada durante cinco minutos y enjuagando con agua a chorro, procedimiento que debe repetirse tres veces. Adicionalmente se debe aplicar un agente viricida, como: amonio cuaternario, soluciones yodadas, alcohol o agua oxigenada. Este cuidado oportuno a la(s) herida(s) ayuda a eliminar el virus depositado a través de la saliva del animal en el sitio de la mordedura, evitando en lo posible emprenda su viaje hacia la medula espinal y el encéfalo. De manera adicional se aconseja dar tratamiento para infecciones bacterianas y la vacuna preventiva contra tétanos (79, 80, 81, 82).

La inmunoglobulina o suero antirrábico se indican para las exposiciones graves en dosis 40 UI/kg de peso para la heteróloga (de origen equino) o de 20 UI/kg de peso para la homóloga (de origen humano), gran parte infiltrada alrededor del sitio de la mordedura y el resto en región glútea, por vía intramuscular. Confiere una protección pasiva inmediata, seguida de la aplicación de la vacuna antirrábica post-exposición (79, 80, 81, 82).

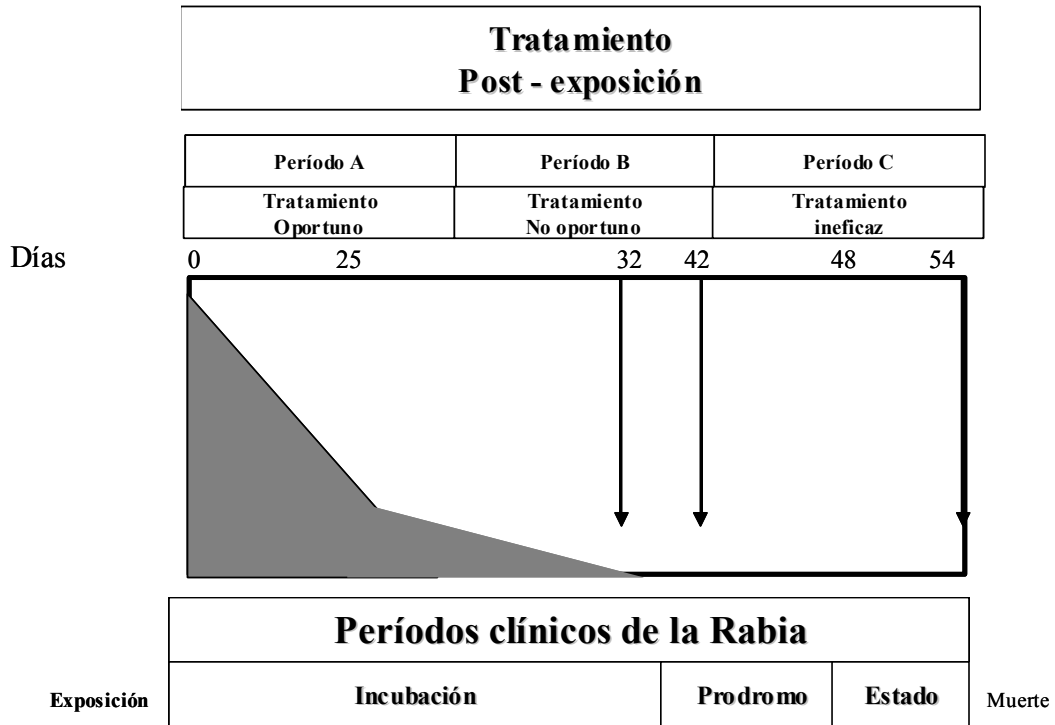
Los anticuerpos monoclonales contra rabia (SANOFI PASTEUR Y CRUCCELL) son productos biotecnológicos de nueva generación, que se visualizan como una alternativa innovadora que se piensa podrán ser aplicadas en lugar de las inmunoglobulinas anteriormente mencionadas (83).

La vacunación post- exposición en las personas expuestas, de cualquier edad, que no hayan recibido anteriormente ningún tratamiento antirrábico, se usa una serie de cinco dosis los días 0, 3, 7, 14 y 30 por vía intramuscular en región deltoidea; esquema que debe cumplirse estrictamente, a excepción de que al quinto día de observación el animal agresor no muestre signos de rabia (79, 80, 81, 82).

La vacunación post-exposición ha mostrado ser eficaz, si es aplicada inmediatamente después de la exposición, existiendo una mayor posibilidad de sobrevivir en este primer periodo de tiempo (como se esquematiza como el área gris del cuadro 3) (71, 76, 84).

Ya que generalmente, una vez desarrollados los signos de la enfermedad no existe tratamiento capaz de revertir los daños causados por el virus (81, 83).

CUADRO 3. Esquema donde se observa el tiempo ideal para aplicar la vacuna contra rabia post-exposición.



En la historia sólo existen seis casos de sobrevivientes a la rabia después de la aparición de los síntomas: El primer caso de Ohio (Hattwick et al, 1972), el segundo de Argentina (Porrás et al, 1976), el tercero de New York (Tillostson et al, 1977), el cuarto de México (Álvarez et al, 1994), el quinto de la India (Mashusudana et al, 2002) y el sexto de Wisconsin (Rupprecht et al, 2004). De estos seis casos solo los primeros cinco recibieron la vacunación post-exposición. Sin embargo, el único que todavía sigue vivo sin signos clínicos es el paciente de Ohio, el de Nueva York sigue vivo pero con secuelas y los pacientes de Argentina, México e India murieron por fallas en la vacuna (83).

La primera y única persona conocida en sobrevivir a la rabia sintomática sin haber recibido la vacuna antirrábica es una joven del el Estado de Wisconsin (USA), que el año 2004 recibió únicamente un tratamiento experimental de neuroprotección basado en el uso de benzodiazepinas usada para las lesiones traumáticas, la ketamina por su efecto antiviral, la ribavirina por su utilidad *in vitro* contra la rabia, la amantadina por su actividad contra la influenza y el uso de anticonvulsivantes como el phenobarbital (83, 85).

1.9 Pruebas de diagnóstico serológico.

En los individuos que han recibido vacunas pre-exposición y post-exposición se observa una seroconversión en el 90% de los casos entre el día 15 y 21 post-vacunación. Actualmente existen varios métodos de diagnóstico para la detección y titulación de anticuerpos contra el virus rábico, entre las que se encuentran la prueba de contraelectroforesis (CIE), el radioinmunoensayo (RIA), la prueba de aglutinación en látex (LAT), la prueba de citometría de flujo, la prueba de virus neutralización de anticuerpos fluorescentes (FAVN), la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT) y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (41, 70, 71, 77, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91).

En el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, la técnica más sensible ante-mortem es a través de un PCR de la saliva, suero, líquido cefalorraquídeo y biopsia de la nuca con folículos (83, 85).

Sin embargo, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) sólo aprueba los resultados obtenidos por laboratorios aprobados, los cuales llevan a cabo el diagnóstico serológico contra rabia únicamente con las pruebas de referencia FAVN y RFFIT (86, 92, 93):

- 1 FAVN. Es una técnica descrita en 1998 por Cliquet et al, se basa en la neutralización del virus *in vitro* que sustituyó al método *in vivo* descrito en 1935 por Webster y Dawson, ya que demostró ser más barata, reproducible y rápida. En lugar de obtener resultados en 21 días en ratón, su desarrollo es de 48 horas en un cultivo celular previamente infectado, donde el título del suero es la dilución donde el 100% del virus es neutralizado en el 50% de los pozos infectados (TCID₅₀), expresando resultados en unidades internacionales UI/ml.

- 2 RFFIT. Es una prueba *in vitro* publicada desde 1973, la cual cuantifica la presencia de anticuerpos neutralizantes contra rabia en aproximadamente 24 horas. Es menos tediosa y de fácil lectura en comparación con la FAVN *in vivo*, pero a diferencia de la FAVN *in vitro* en placa puede llegar a presentar falsos positivos cuando las muestras están contaminadas o en descomposición y se requiere de un microscopio UV para su determinación (Descrita en el Anexo 10).

La prueba de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) es descrita por la OIE, como una herramienta con la cual se plantea se puede hacer frente al análisis de un alto número de muestras relacionadas con un brote, debido a que ofrece muchas ventajas como: rapidez, es relativamente fácil de desarrollar sin la necesidad de personal especializado, no hay necesidad de manejar virus o cultivos celulares y se puede desarrollar con muestras contaminadas (21, 22, 71, 86).

Es un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) mediante un trazador enzimático. Se fundamenta en el uso de la glicoproteína G antirrábica purificada, para así visualizar por medio de diferentes grados de coloración el nivel de densidad óptica y/o medir la cantidad de anticuerpos neutralizantes del virus, proporcionando resultados en pocas horas y no requiere uso de microscopio UV para su determinación (21, 22, 71, 86, 92, 94, 95, 96).

Su desarrollo llevado a cabo con la proteína G purificada ha sido considerada por la OMS como una alternativa óptima en relación a la prueba de FAVN cuando hay dificultad para realizar cultivos celulares. Los factores que se deben tomar en cuenta para el desarrollo de esta prueba deben ser: una óptima dilución del antígeno, una óptima dilución del suero problema y una óptima dilución del segundo anticuerpo de otra especie unido a una enzima peroxidasa, que es específico para detectar el primer anticuerpo (21, 22, 71, 86, 92, 94, 95, 96).

En el mercado han surgido varios kits de ELISA:

- Arai *et al*, en 2002 analizó con el Kit de ELISA *Diagnostics* del laboratorio Pasteur y con la prueba de referencia FAVN a 86 muestras séricas de humanos que recibieron tratamiento pre o post-exposición, encontrando una correlación del 0.697 (97).

- Cliquet *et al*, en 2004 observó que se corría el riesgo de obtener interpretaciones erróneas por la existencia de tantos componentes antigénicos cuando se usaba un kit basado en la antigenización de las placas de ELISA con un virus completo. Concluyendo que únicamente con el uso de la glicoproteína purificada se induce una adecuada neutralización de anticuerpos específicos contra rabia (86).

- El kit *Serelisa TM Rabies Ab mono Indirect* del laboratorio Synbiotics, aprobado en 2005 y publicado en 2006 por Servat y Cliquet, evaluado por 16 laboratorios aprobados por el Comité Europeo y la OIE y los resultados obtenidos se expresaron en unidades equivalentes de “unidades de ELISA” (UE), donde las muestras seropositivas se encontraban arriba de 0.6 UE/mL. Esto se comparó con los resultados obtenidos por medio de las pruebas de FAVN y RFFIT expresados en “unidades internacionales” (UI), donde las muestras seropositivas se encontraban arriba de 0.5 UI/mL. Observando que del 10 al 30 % de los sueros de perros y gatos evaluados, tuvieron que ser reanalizados por los métodos de referencia FAVN y RFFIT; ya que de 1675 muestras problemáticas, el 20% resultó tener resultados diferentes, o sea, un 23 % de falsos-positivos de 422 muestras de sueros negativos y un 54.5% de falsos-negativos de 1253 muestras de sueros positivos (92).

- Stantić-Pavlinić M *et al*, en 2006 analizó 41 muestras séricas de humanos que recibieron tratamiento pre-exposición con el Kit de ELISA *Platelia* del laboratorio BIO-RAD y encontró una correlación significativa con respecto a resultados obtenidos con la prueba de referencia FAVN (98).

- Posteriormente en 2007, se halló una correlación del 94% entre la prueba de FAVN y una nueva ELISA comercial llamada Platelia II (versión modificada del kit Platelia desarrollada con el uso de la proteína G purificada de la rabia de la cepa PV, por los laboratorios Sanofi/Francia y Bio-Rad/USA). En este estudio se analizaron 1178 muestras de perros, gatos y zorros; obteniéndose un valor de corte óptimo de 0.2 UE/mL, sin embargo, este valor se amplió hasta 0.5 UE /mL para minimizar el riesgo de generar resultados falsos positivos, la sensibilidad fue de 0.793 y la especificidad de 0.993 para el caso de los sueros de perros y gatos. Para el caso de los sueros de zorro las densidades ópticas (DO) fluctuaban entre 0.18 y 0.46 UE /mL, la sensibilidad fue de 0.925 y la especificidad de 0.97. Los resultados falsos-negativos se generaron en sueros con rangos cercanos a 0.5 y 1 UI/mL, debido a diluciones erróneas, por contaminación de las muestras o por excesiva proteína bloqueadora, que interferían para en adecuada unión entre Ag-Ac esperada. (12, 86, 92, 99).

1.10 Baculovirus recombinante

En las últimas dos décadas se ha aprendido a manipular el ADN para identificarlo, cortarlo y moverlo de lugar a otros organismos que son genéticamente diferentes. La finalidad de obtener estos organismos recombinantes es el producir proteínas que comercialmente son caras, por esta razón numerosos estudios se enfocan en encontrar la manera de producirlas fácilmente a bajo costo y con alto nivel de funcionalidad (100).

Los baculovirus como sistemas de expresión son relativamente simples de usar, ya que el construir el baculovirus recombinante es un proceso considerablemente rápido (por lo menos 6 semanas). Tiene la capacidad de expresar genes eucarióticos con la finalidad de obtener proteínas biológicamente activas, ya que mimetiza al sistema de células en los vertebrados creando generalmente un medio ambiente específico que ayuda a la formación de proteínas que conservan las cualidades nativas, presentando el plegado apropiado, la formación de puentes de bisulfuro, la oligomerización y otras

modificaciones postraduccionales requeridas para la actividad biológica de muchas proteínas eucarióticas (101).

CUADRO 4. Ventajas y desventajas del sistema baculovirus.

VECTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<i>Baculovirus</i>	Virus que crecen con gran facilidad en células de larvas y su mantenimiento resulta barato. Sistema que presenta una potente expresión de genes heterólogos, por que contiene un número de genes no esenciales que pueden ser reemplazados por múltiples genes exógenos. La producción de la proteína celular total es hasta de 25-50%, lo que corresponde a un gramo de producto proteico por litro de cultivo celular con 10 millones de células (102, 103, 104, 105).	El gen heterólogo no se puede expresar continuamente ya que las células infectadas mueren, lo cual limita el crecimiento de células de insecto a solo una semana de tiempo de vida (101).

La infección por baculovirus tiene un rango de hospedero específico, esto quiere decir que está limitada a insectos, por lo tanto no son perjudiciales para los mamíferos y las aves (105).

Baculovirus es un virus DNA de doble cadena que pertenece a (105):

Familia : *Baculoviridae*

Subfamilias: *Eubaculovirinae* (baculovirus cerrados)

Nudibaculovirinae (no-cerrados)

Su nombre viene del vocablo *baculo* ya que su nucleocápside es de forma de barra, también llamado “baciliforme”, la cual tiene un diámetro de 35-50 nm y una longitud de 200-400 nm, permitiendo a su DNA acomodarse sin problema, aun conteniendo grandes insertos de genes. Esta nucleocápside está rodeada por una membrana de lípidos llamada envoltura que presenta unas formaciones terminales llamada peplómeros. El DNA de los baculovirus es de doble cadena, de forma circular, y presenta un tamaño aproximado de 100-200 kpb (103, 104, 105, 106).

Para la obtención de la proteína recombinante deseada a través de este sistema, es necesario (105, 106, 107, 108, 109):

1. Un plásmido que contenga el gen de la proteína recombinante, el cual se obtiene mediante estrategias de intercambio alélico con la finalidad de insertar un gen extraño dentro de un plásmido; con el requerimiento de que exista un sitio promotor y dos sitios de flanqueamiento, los cuales serán sitios clave para poder recombinarse homológamente con el genoma viral del baculovirus.
2. El plásmido recombinante, se obtiene a través de la recombinación entre el gen de interés y el genoma del baculovirus de manera artificial dentro de una *Escherichia coli*, y de esta manera la bacteria se transforma en “célula competente” por medio de un proceso llamado la “*transposición*” (Anexo 1).
3. En el genoma nuclear de las células SF9 (2*), vector comúnmente usado para reproducir la proteína recombinante, se encuentra en una zona llamada “*marco de lectura abierta*” (open-reading frame = ORF). Él cual es un espacio de corto tamaño rico en A+T (adeninas y timinas), relacionado con el sitio promotor y funciones de transcripción; siendo este sitio donde se inserta el gen al ser infectado por el baculovirus, y así obtener la proteína recombinante deseada.

En el ciclo silvestre, la oruga *Spodoptera frugiperda* ingiere algunas hojas contaminadas con la forma infectante del baculovirus llamadas cuerpos polihídricos con cuerpos de inclusión (PIB), siendo estas inclusiones un alto número de viriones, los cuales son liberados dentro del sistema digestivo de la oruga y posteriormente se fusionan a la membrana de las microvellocidades intestinales por medio de endocitosis; empezando a infectar diversas células corporales transportándose vía hemolinfa hacia otros órganos, provocando que en

(2*) La línea celular SF9 se trata de células clonales aisladas originalmente de las células clonales SF21 que derivan de ovario de pupa de oruga *S. frugiperda*, adaptadas en Inglaterra en el año de 1983 por G. Smith y C. Cherry. Esta ha sido inscrita como una línea de cultivo celular de colección en ATCC (Cell biology collection CRL 1711) asociación ubicada en la ciudad de Virginia (US).

cinco a siete días estas células se hinchen ya que contienen miles de generaciones virales haciendo que la células de los músculos se disgreguen y el cuerpo de la oruga luzca como un saco que contiene un líquido lechoso, hasta provocar su muerte. El baculovirus recombinante a nivel laboratorio se obtiene por medio de un proceso llamado "*Transfección*"(Anexo 2).

Los baculovirus cambian de tal manera que las formas infectantes silvestres se pueden diferenciar de los virus con genes recombinantes, ya que su infección es capaz de realizarse en tan sólo 30 minutos post-inoculación, seis horas después se lleva a cabo la replicación viral provocando re-arreglos en el citoesqueleto de las células y en aproximadamente 72 horas la presencia de material fibroso que provoca que las células se lisen.

4. Para poder mantener este baculovirus recombinante se deben de realizar reinfecciones en cultivos celulares de insecto que deben de ser cosechados a los 4-5 días después o bien hasta que la monocapa presenta una citólisis importante y se deben de almacenar para mantener una reserva o "*stock*". Sin embargo, uno debe de tener cuidado de realizar repeticiones seriales de esto ya que esto puede provocar virus mutantes que pueden predominar o bien tener un alto acúmulo de partículas virales defectivas que son aquellos que presentan mutaciones extensivas en su genoma. Sin embargo esto se puede evitar al realizar reinfecciones con cantidades mínimas que permitan que haya un virus por célula.

Las ventajas de producir proteínas a gran escala con este sistema es que su cinética y niveles de proteína son siempre los mismos y su purificación es casi innecesaria sobre todo aquellas células que crecen en un medio libre de suero (ej. SF900, SF900-II, medio Grace, entre otros- Anexo 3.1) (106).

Sin embargo a este nivel la desventaja es su alto costo, ya que el medio tiene un costo de mayor de 25 dólares por litro a nivel comercial, así como también el costo del equipo especializado necesario (ej. fermentadores) (106).

1.11 JUSTIFICACIÓN:

La proteína G del virus de la rabia que representa ser el principal componente antigénico, ahora expresada de manera recombinante y en mayores cantidades con el sistema eucariótico *Baculovirus*, será usada para estandarizar una prueba de ELISA. Con la finalidad de reducir tiempos para el diagnóstico de seroconversión postvacunación dentro del laboratorio con respecto a las prueba de referencia RFFIT y con la posibilidad de que sea útil en estudios seroepidemiológicos.

La OIE reporta que la técnica de ELISA para detectar anticuerpos antirrábicos ha demostrado ser efectiva en muestras de perros y gatos vacunados, desarrollándose en tan sólo cuatro horas. Recomendando que las muestras que presenten un bajo título deben ser confirmadas por la técnica de RFFIT o FAVN por ser técnicas de mayor sensibilidad (86).

1.12 OBJETIVO GENERAL:

Utilización de la proteína G del virus de la rabia expresado en un *Baculovirus* para la estandarización de una prueba de ELISA para el diagnóstico de anticuerpos contra Rabia.

1.13 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Propagación y cosecha de proteína G recombinante en células de insecto SF-9.
- Evaluar la expresión y pureza de la proteína G recombinante.
- Determinar el título de la proteína G a través de la prueba de ELISA.
- Detectar las lecturas más altas (muestras positivas) y más bajas (muestras negativas) a través de una prueba de ELISA antigenizada con proteína G recombinante y a partir de esto establecer el “punto de corte”.
- Estandarizar una prueba de ELISA como sistema de diagnóstico, para tres especies (humano, perro y bovino).
- Comprobar que el sistema propuesto es eficiente comparando los resultados con respecto a la prueba de referencia RFFIT.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS:

Refiriendo a cada especie como “población de estudio”, se decidió analizar los sueros de tres poblaciones, los cuales fueron: **humanos, bovinos y perros**.

2.1 Determinación del tamaño de muestra.

El muestreo realizado en cada población fue aleatorio y representativo, usando la fórmula para estudios seccionales (110, 111):

$$n = \frac{\ln(\text{tasa de error tipo II})}{\ln[p(1-Se) + (1-p)Sp]}$$

Donde:

In = Logaritmo natural que es el logaritmo en base al valor aproximado de $e \approx 2.7182818284590452354\dots$

Tasa de error tipo II (β) = 0.05

p = Valor dado de la **prevalencia real**, donde:

Prevalencia real = No. de casos / No. de población a muestrear $\times \mathcal{K}$

\mathcal{K} = es una constante (100, 1000, 10 000 ó 100 000)

Encontrando que la prevalencia real, la sensibilidad y la especificidad de cada población es:

CUADRO 5. Prevalencia real encontrada en cada especie para calcular tamaño de muestra .

Población de humanos:	$p = 8 / 14\ 007\ 495 \times 100\ 000 = 0.05711228$
Población de bovinos:	$p = 55 / 3\ 113\ 539 \times 1\ 000 = 0.02911392$
Población de perros:	$p = 23 / 7\ 900 \times 10 = 0.01766479$

FUENTE: OPS 2005, INEGI 2005, Boletín-267-2006 SSEM, Dirección General de Salud Animal 2006

Se = Sensibilidad, capacidad de la prueba de referencia (RFFIT) para clasificar como positivos a los animales vacunados de la población = **0.986**

Sp= Especificidad de la prueba de referencia (RFFIT) = **0.994**

Entonces despejando datos, se encontró que el tamaño de muestra para cada especie fue:

CUADRO 6. Tamaño de muestra para cada especie

Población de humanos:	$n = \ln(0.05) / \ln [0.06(1-0.986) + (1-0.06) 0.994] = 47$
Población de bovinos:	$n = \ln(0.05) / \ln [0.03(1-0.986) + (1-0.03) 0.994] = 85$
Población de perros:	$n = \ln(0.05) / \ln [0.02(1-0.986) + (1-0.02) 0.994] = 127$

2.2 Obtención de sueros a analizar.

Se contactaron a los centros de investigación y ranchos participantes, a los cuales se les explicó la finalidad de este estudio y se les proporcionó un cuestionario a resolver (Anexos 8 y 9); seguido por la donación voluntaria de las muestras sanguíneas.

2.2.1 Obtención de muestras de suero de humanos:

La obtención de las muestras sanguíneas fueron realizadas por punción de la vena humeral, usando equipo vacutainer estéril. Obteniendo 61 muestras sanguíneas de personal vacunado que labora en:

- El Antirrábico de Ecatepec (20 muestras), ubicado en la calle Primero de Mayo número uno de la colonia Ruiz Cortínez en Ecatepec, Estado de México.
- El Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal “CENASA” (31 muestras), ubicado en el km 37.5 carretera libre México-Pachuca en Tecamac, Estado de México.
- El Departamento de Ecología de la UNAM (10 muestras), ubicado en el edificio “B”, Departamento "F" de Ecología Funcional.

Los sueros negativos (sin historial de vacunación) se obtuvieron de ocho individuos del Hospital Regional del ISSSTE 1º de Octubre, ubicado sobre Gustavo A. Madero, Tlalnepantla, Estado de México.

2.2.2 Obtención de muestras de suero de bovinos:

Las muestras fueron obtenidas de Veracruz, el cual es un Estado que dedica 3,687.4 millones de hectáreas a la cría de ganado bovino que ocupa el primer lugar en producción de carne y el quinto en producción de leche de bovino en todo el país. Las muestras fueron obtenidas gracias al apoyo de la Asociación Ganadera Local del municipio de Jamapa, ubicado en la zona del centro del Estado. Es una zona enzoótica de rabia, por esta razón la mayor parte de los productores eligen vacunar al ganado contra rabia. La obtención de la muestra sanguínea, se llevo a cabo usando equipo vacutainer estéril, puncionando la vena caudal o yugular e identificando cada tubo. De esta manera se obtuvieron 77 sueros de bovinos de los cuales 11 reportaron no haber sido vacunados contra rabia (112, 113).

Los sueros negativos (sin historial de vacunación) se obtuvieron de 20 bovinos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-INIFAP) ubicado en el km 1 de la carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro. Se trató de un hato de hembras mayores de 2 años de edad, usadas para experimentos en el área de nutrición para estudios de alimentos de engorda y micotoxinas, las cuales se habían mantenido bajo condiciones de aislamiento y sin la aplicación de vacunas de ningún tipo.

El suero control positivo, se obtuvo desarrollando un suero de tipo hiperinmune en un bovino macho, raza holstein, con 1 año 3 meses de edad; el cual es una animal de estudio ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) campo IV de la FMVZ-UNAM. A este bovino se le sometió a vacunaciones subsecuentes, cada 15 días durante dos meses, con la vacuna comercial “Derriper”, cepa Pasteur inactivada de SAGARPA.

2.2.3 Obtención de muestras de suero de perros:

Las muestras de la población de perros se obtuvieron del Antirrábico de Ecatepec. El muestreo se realizó a 80 individuos mayores de 1 año de edad y sin más registros que el sexo, ya que se trataba de animales destinados al sacrificio, por lo tanto se trataba de individuos que no se conocía su historial de vacunación. La obtención de las muestras sanguíneas fue por punción cardíaca directa minutos después del sacrificio. De manera conjunta, se obtuvieron sueros de diez individuos con historial de vacunación, por medio de una punción a la vena cefálica ante-braquial usando equipo vacutainer estéril, en un consultorio veterinario ubicado en la Avenida Archipiélago de la colonia Atlanta en Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

El suero control positivo, se obtuvo desarrollando un suero de tipo hiperinmune en una hembra, raza criolla, de 3 años, a la cual se le vacunó de manera subsecuente cada 15 días por dos meses, con la vacuna contra rabia cepa Acatlán del laboratorio Intervet.

El suero control negativo provenía de un perro que pertenece al Departamento de Inmunología del Centro Médico siglo XXI; macho, raza beagle, de un año de edad, destinado a la investigación. Por esta razón, era un animal en aislamiento, al cual no se le ha administrado vacunas de ningún tipo. A parte se tomaron muestras sanguíneas de 5 cachorros criollos menores de 1 mes de edad antes de ser sacrificados.

2.3 Obtención del baculovirus recombinante.

La obtención del antígeno recombinante fue realizado por personal que labora en el laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ de la UNAM. Utilizaron como cebadores: BamG1F (5'atggatccgATGGTTCCCKCARGCTCTCCTG 3') BamG1R (5'atggatccgTCACAGTCYRGCTCACCCCC 3')

Estos cebadores fueron diseñados sintéticamente a partir del genoma completo del virus de la rabia (NC_001542) del genbank y sirvieron para amplificar el gen de la

glicoproteína a través de RT-PCR usando un cDNA originario del RNA de un virus de la rabia extraído de un encéfalo de ratón infectado con la cepa ERA. Posteriormente, dichas copias del gen G obtenidas las clonaron a través del sistema comercial *Bac-To-Bac* (Invitrogen). Este sistema consiste en la utilización de un plásmido llamado “*pFastBac HT*” (Anexo 4), el cual tiene dos sitios de unión enzimática (BamHI) donde se insertó el gen G (ORF-1), como se puede observar en el siguiente mapa:

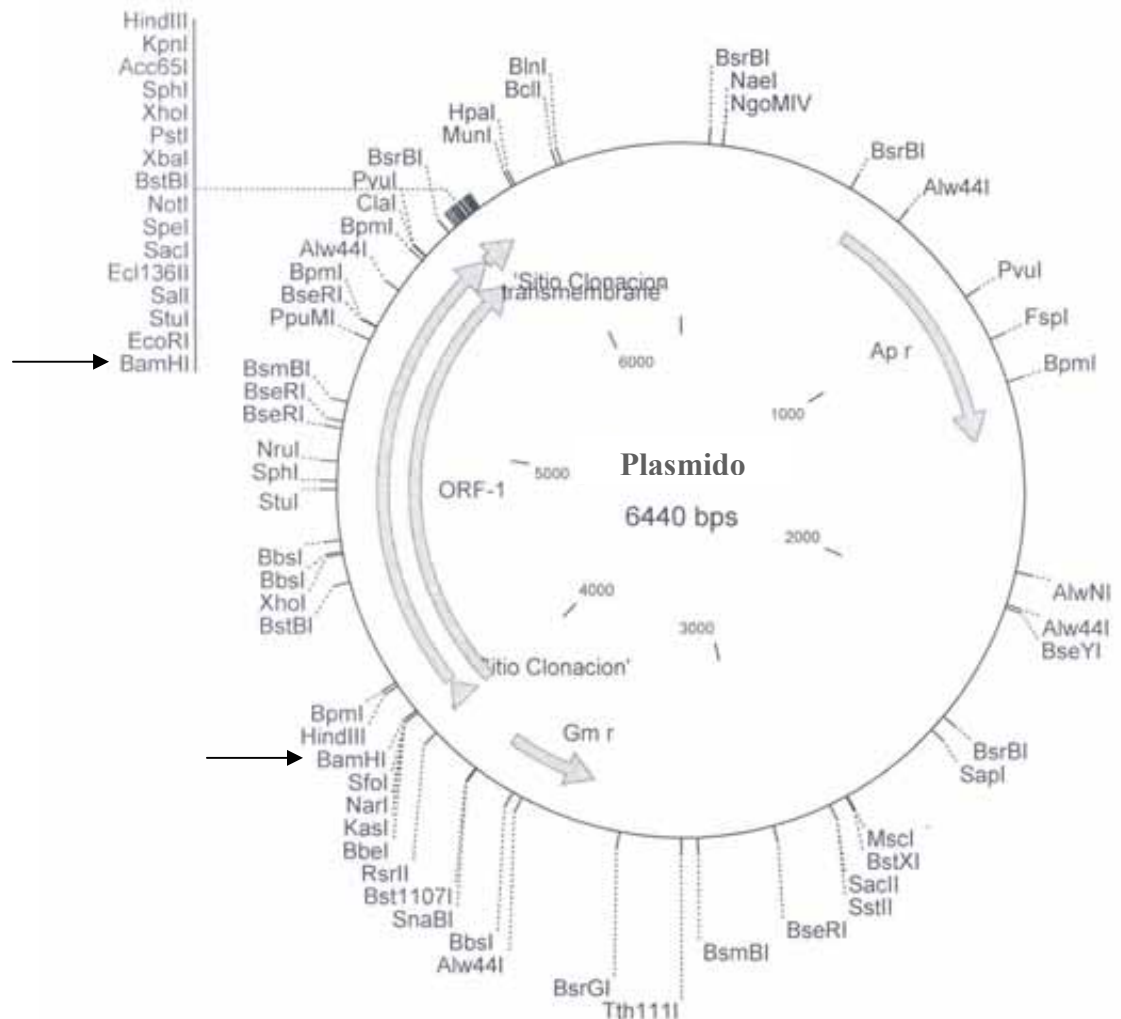


Figura 4. Esquema del plásmido pFastBacHT que presenta la transposición sitio- específica del gen G por medio de las enzimas BamHI .

Los plásmidos recombinantes obtenidos los pusieron en contacto con el baculovirus dentro de bacterias *E. coli* a través de un proceso llamado “*transposición*” (Anexo1). Tras la obtención de varias colonias de esta bacteria, se seleccionaron aquellas que por sus características cromógenas y que por PCR demostraron tener inserto el gen deseado, para posteriormente “transfectarlos” (Anexo 2).

A partir de estos procedimientos surgieron las clonas (sobrenadantes) originales del baculovirus, a las cuales las llamaron “MOI 283” y “MOI 284”. Ambas clonas que presentaban la proteína G expresada en forma soluble en el sobrenadante de las células, procedimiento desarrollado bajo los requerimientos del Anexo 3, para mantener las características infectantes y el título adecuado del baculovirus.

La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio CENID-Microbiología en el INIFAP, ubicado en la carretera México-Toluca km.2.5, colonia Palo Alto, delegación Cuajimalpa, México, DF. Se inició con la amplificación de ambas clonas (MOI 283 y MOI 284) en células de insecto y la cosecha de las proteínas (procedimiento desarrollado bajo los requerimientos del Anexo 3 y Anexo 5).

Se obtuvieron sobrenadantes que contenían las partículas virales libres y se procedió a identificar al gen G, extrayendo el DNA del baculovirus con ayuda del kit de Qiagen, seguido de la realización de la técnica RT-PCR bajo las condiciones del Anexo 6.2, usando los cebadores originalmente diseñados en el laboratorio CENID-Microbiología del INIFAP, mediante los programas Cprimer 3.0 y ClustalW a partir de la secuencia del genoma de rabia de la cepa ERA: Oligo G + p (5' GGA ATT CAT GGT TCC TCA GGC TCT CC 3') y Oligo G – p (3' GCT CTA GAC AGT CTG GTC TCA CCC CC 5').

Posteriormente, se buscó la presencia de la glicoproteína por medio de la prueba de Western-blot (Anexo 6.1), sobre geles de acrilamida al 12.5% (Anexo 6). Y de manera conjunta se calculó la cantidad de proteína en mg/mL, por medio de densitometría, la cual se desarrolló corriendo los sobrenadantes obtenidos a la par de una curva de albúmina

sobre geles de acrilamida al 12.5%. La lectura se realizó con el lector de píxeles del programa Kodak 1D™.

Los sobrenadantes se titularon por medio de ELISA directa haciendo diluciones triples del antígeno, para determinar cual sería la clona con un mayor título y pureza, con la finalidad de estandarizar la prueba experimental de ELISA de tipo indirecto.

La estandarización de ELISA indirecta fue desarrollada con la finalidad de conocer las diluciones correctas del antígeno, del suero problema, del segundo anticuerpo y de cada reactivo necesario para el desarrollo de la prueba (Anexo 7.1). Conociendo estos parámetros se procedió a analizar los sueros problema por cuadruplicado, en placas de 96 pozos tipo maxisorp de acuerdo al procedimiento explicado en el Anexo 7. Éste mismo procedimiento se desarrolló con una prueba de ELISA alterna con la proteína G comercial (derivado de un hibridoma monoclonal purificado con no. de cat R0013-25 - United States Biological).

Los resultados obtenidos a través de la ELISA experimental (glicoproteína G recombinante), la ELISA alterna (proteína G comercial) y la prueba RFFIT, se analizaron estadísticamente por medio del programa SAS V9.1 con la prueba de concordancia [Kappa (k)].

Primero se analizaron ambas pruebas de ELISA y después la ELISA experimental con la prueba de referencia RFFIT. De cada análisis se obtuvo un porcentaje de asociación que varía entre -1 y +1. Si el resultado resulta cercano a 1, mayor es la concordancia; pero si es cercano a -1, mayor es la discordancia. $K = 0$ indica que no hay asociación y su interpretación se realizó como lo indica el cuadro 6. Pero para conocer la significancia de la prueba estadística se reanalizó la concordancia diagnóstica con valores de " p " con un alfa (α) de 0.05; o sea, que si α es mayor a 0.05 no existe significancia estadística, pero si es menor a 0.05 si la hay. Donde lo mejor es tener una $p < 0.05$, lo cual nos indicaría una asociación verdadera y significativa, aunque esta sea muy mínima (114, 115).

CUADRO 7. Tabla de valoración del índice de Kappa

Valoración del Índice Kappa	
Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

La sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA se realizó, como se ve en el siguiente ejemplo (3*):

CUADRO 7.1 Cuadro de contingencia obtenido tras el análisis de Kappa para el análisis de Se y Es de la prueba ELISA

ELISA test result (0.9-EU/ml cutoff)	FAVN test result (0.5-IU/ml cutoff)			
	Naïve sera (n = 100)		Vaccinated sera (n = 400)	
	No. negative	No. positive	No. negative	No. positive
Negative	95	1	121	19
Positive	3	1	8	252
Total	98	2	129	271

Donde, sensibilidad (Se) se calcula: $[(1+252)/(2+271) \times 100]=92.67\%$

y la especificidad (Es): $[(95+121)/(98+129) \times 100]=95.15\%$

(3*) Ejemplo tomado del artículo publicado: Li-Min Y, Liang-Zhen Z, Rong-Liang H, Zhen-Sheng S. A Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Antibodies against Rabies Virus. Clinical and vaccine immunology, 2006; p. 966–968.

3.0 RESULTADOS

Tras el desarrollo del RT- PCR fue posible observar, sobre un gel de agarosa al 1%, al gen de la proteína G del virus de la rabia inserto en el DNA del baculovirus de las tres principales clonas obtenidas en el laboratorio del CENID-Microbiología del INIFAP [clonas 283 (-5), 283 (-4) y 284 (0.1), los nombres de las clonas provienen de acuerdo a la infección realizada en *MOI's** el laboratorio de Genética Molecular]. Mostrando un peso molecular de 1 580 pares de bases (pb), como se puede observar en la figura 5:

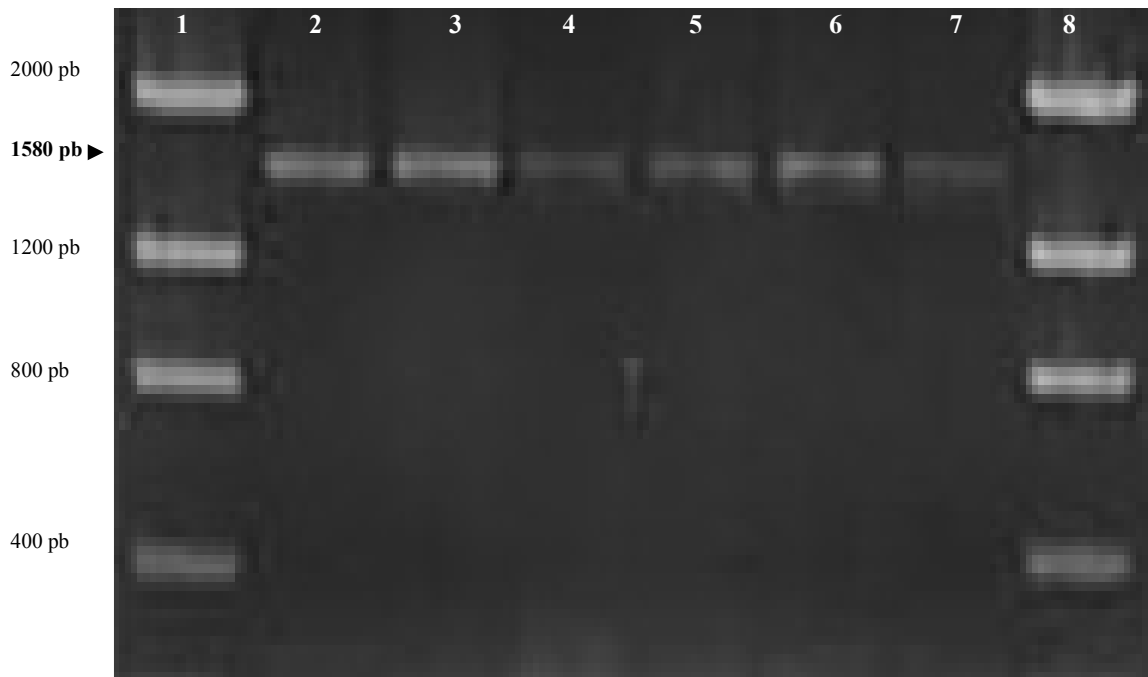


Figura 5. Gel de agarosa al 1% que muestra al del gen G de la rabia presente en las tres principales clonas. Los carriles 1 y 8 muestran al marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder-Invitrogen-no.cat.10068-013), los carriles 2 y 3 muestran glicoproteína de la clona 283 (-5) que es la clona principal con la que se trabajo para el desarrollo de esta tesis, los carriles 4 y 5 muestran glicoproteína de la clona 283 (-4) y los carriles 6 y 7 muestran glicoproteína de la clona 284 (.01).

*MOI's** : Multiplicidad de infección (proporción del número de partículas víricas infecciosas añadido a un número conocido de células de un cultivo)

En un gel de acrilamida al 12.5%, se analizó a la glicoproteína por medio del método de densitometría, donde de acuerdo a la cantidad de pixeles expresados se calculó la cantidad de proteína expresada en miligramos (mg) de cada clona con respecto a la curva de albúmina, encontrando que la clona 283 (-5) presentó 750 mg de proteína total en un mL de sobrenadante y la clona 284 (0.01) presentó 620 mg de proteína total en un mL de sobrenadante. También se pudo observar que la glicoproteína de las clonas 283 y 284 presentaban un peso molecular de 66 kilo daltons (kD), muy similar al de la albúmina (Figura 6):

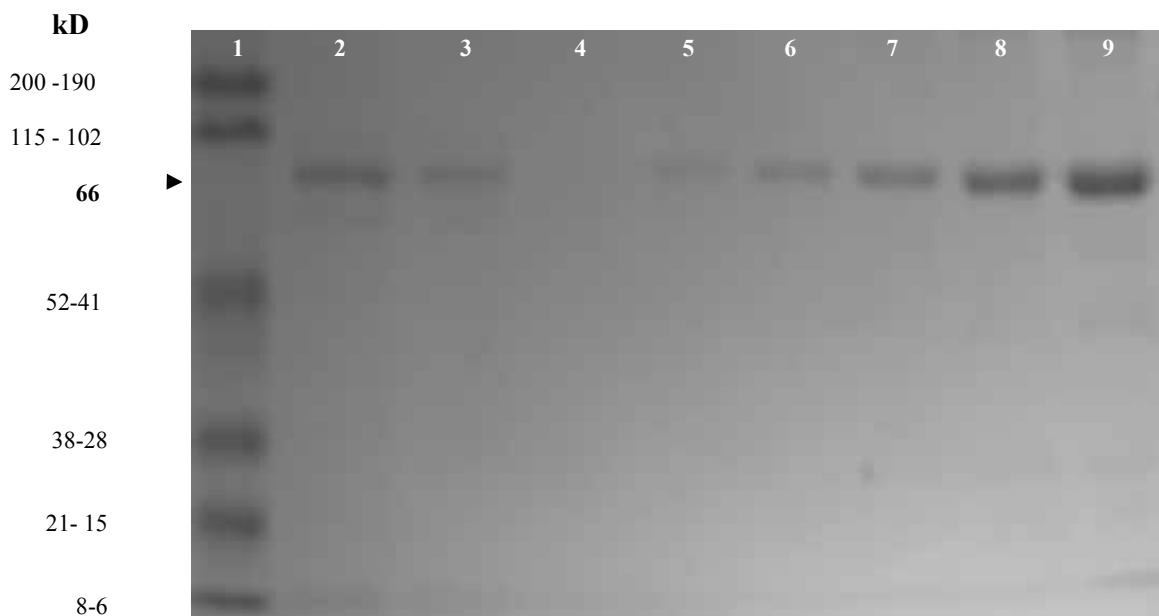


Figura 6. Gel de acrilamida al 12.5% donde se observó a la glicoproteína con respecto a la curva de albumina, para determinar la cantidad de proteína en mg por μL de cada clona. El carril 1 muestra al marcador de peso molecular (Low Density Prestained SDS-PAGE – BIORAD – no. cat. 161-0318). Los carriles 2 y 3 presentan a la proteína G de la clona 283 (-5) y 284 (0.01), respectivamente. El carril 4 no se observa ninguna proteína presente ya que se trata de el sobrenadante de un baculovirus sin SFB y sin la proteína G inserta. Los carriles 5 al 9 se observa la curva de albúmina; donde el carril 5 muestra a la albúmina en concentración de 0.3mg/mL, el carril 6 a concentración de 0.6mg/mL, el carril 7 a concentración de 1.2 mg/mL, el carril 8 a concentración de 2.5 mg/mL y el carril 9 a concentración de 5 mg/mL.

Las proteínas se observaron sobre papel de nitrocelulosa usado en el método de SDS-PAGE (Western Blot), confirmando que su peso molecular se encuentra en el rango de 66 kD.

En la Figura 7 se muestra que en los carriles 3 y 4 existió una unión Ag-Ac específica, entre la proteína G del sobrenadante clona 283 (-5) y el suero hiperinmune de bovino:

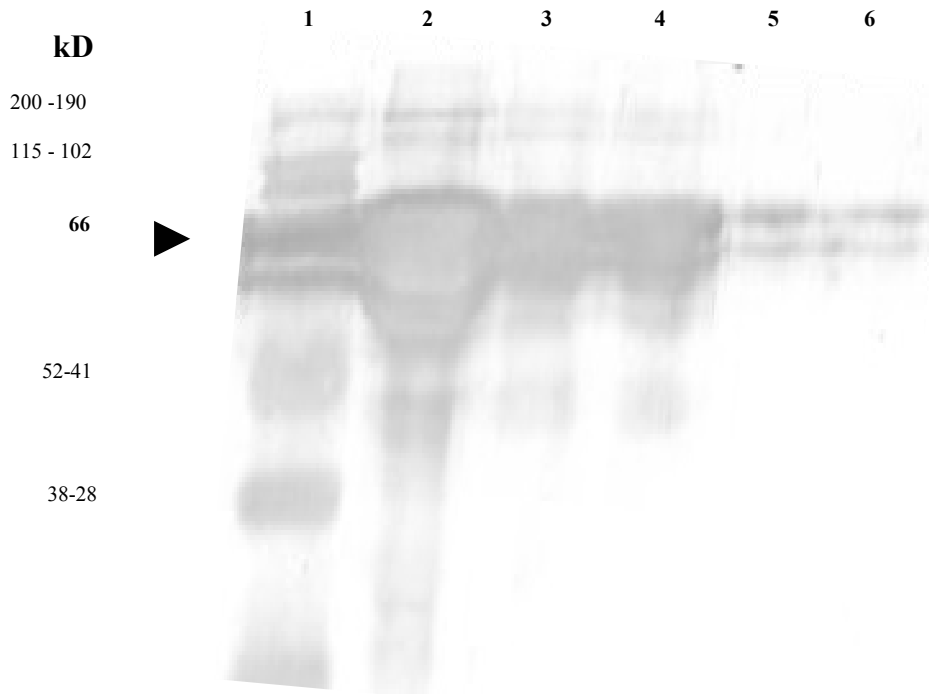


Figura 7. Western blot donde en el carril 1 se observa la distribución del marcador de peso molecular (Low Density Prestained SDS-PAGE – BIORAD – no. cat. 161-0318), en el carril 2 el control positivo que fue el virus completo cepa Acatlán, suero hiperinmune de bovino en los carriles 3 y 4 y como controles negativos el sobrenadante de baculovirus sin la glicoproteína inserta y sin SFB (carril 5) y al medio SF900 sin SFB (carril 6).

Por medio de una ELISA directa se tituló cada clona, en diluciones triples de cada clona y al observar que la clona 283 (-5) fue la que presentó mayor cantidad de proteína y un mayor título que las otras dos, fue entonces cuando se decidió usar esta clona para desarrollar la estandarización de la prueba de ELISA experimental (Figura 8):

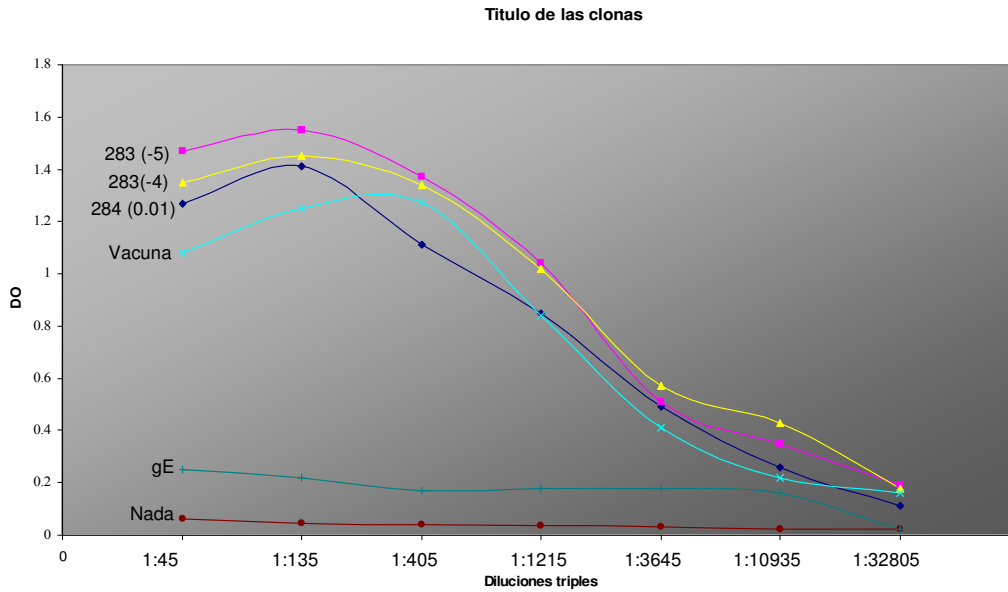


Figura 8. Gráfica de dispersión donde se muestra el título de cada clona 283 (-5), 283 (-4) y 284 (0.01), obtenido por ELISA directa. El control positivo usado fue la vacuna de virus completo de rabia (Virbac) y como controles negativos una proteína recombinante de otra enfermedad obtenida por el sistema baculovirus (gE de Aujeszky) y pozos sin ningún antígeno (nada).

La estandarización comenzó realizando repeticiones de la prueba de ELISA indirecta haciendo diluciones quíntuplas de los sueros problema, usando controles de sueros positivos (diez sueros de perro con historial de vacunación que fueron analizados por medio de la prueba RFFIT en el CDC, donde todos presentaban valores ≥ 0.48 UI/mL) y negativos (cinco sueros de los cachorros menores de un mes del Antirrábico). Existía una diferencia marcada en el nivel de anticuerpos detectables de ambos grupos (Figura 9):

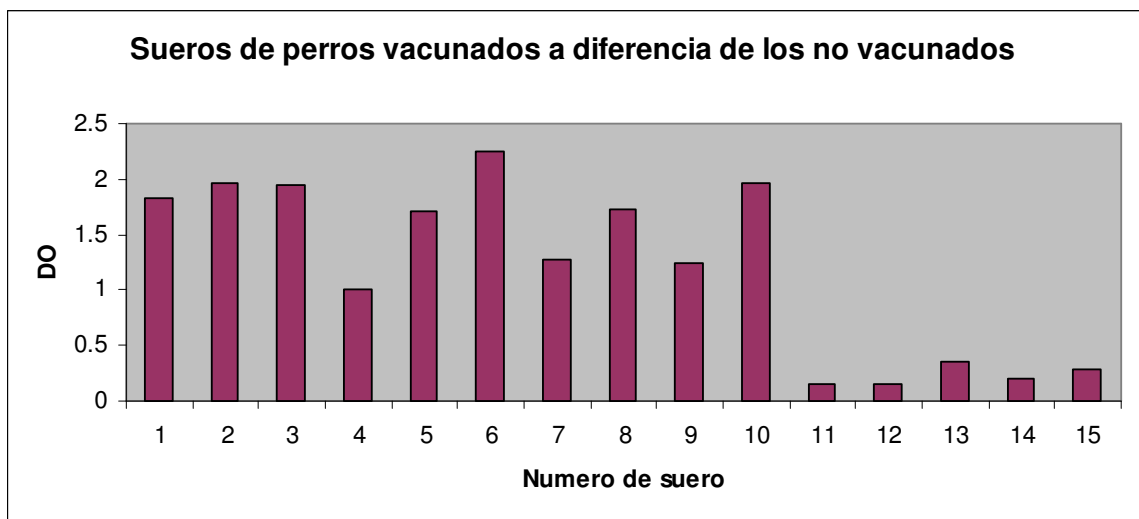


Figura 9. Gráfica donde se muestra el nivel de anticuerpos encontrado en diez perros con historial de vacunación (1-10) a diferencia de los cachorros menores de 1 mes de edad sin historial de vacunación (11-15), diluidos en 1:125.

Se tomaron al azar 10 sueros problema de cada población (debido a que la DO es diferente por especie) y se analizaron por separado a través de la prueba de ELISA indirecta sensibilizada con la clona 283(-5) (según Anexo 7). Se hicieron diluciones quintuples de cada suero, y se encontró que en la dilución de 1:125 el suero ya se une inespecíficamente con los controles negativos [sobrenadante de baculovirus sin glicoproteína inserta sin suero fetal bovino (A), el sobrenadante de baculovirus sin glicoproteína inserta con 1% de suero fetal bovino (B) y carbonatos (C), como se observa en la Figura 10].

También se observó que a partir de la dilución 1:125, el suero control positivo (+) se une de manera específica a la glicoproteína del sobrenadante del baculovirus y el suero control negativo (-) definió el punto de corte, y a partir de esto se definió como seropositivos o seronegativos a los sueros problema (Figura 10).

Las diluciones 1:5 y 1:25 el suero presenta fragmentos del sistema complemento sanguíneo que pueden unirse inespecíficamente a porciones del sobrenadante del baculovirus, alterando, enmascarando y aumentando el resultado original, pero en la dilución 1:125 estos fragmentos del suero disminuyen y es posible observar el nivel de anticuerpos específicos contra rabia; pero el nivel de anticuerpos se reduce a la mitad del nivel real de anticuerpos a partir de la dilución 1:625 (Figura 10).

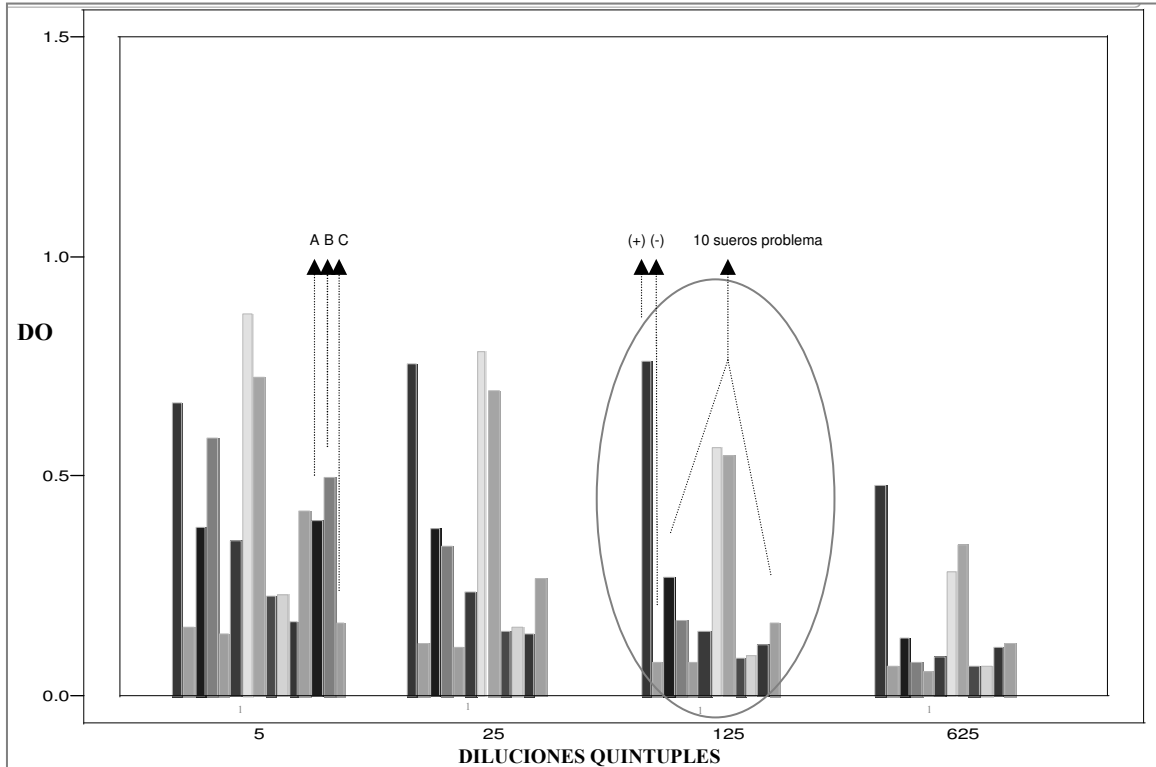


Figura 10. Gráfica que muestra a la dilución 1:125 (ovalo) como la dilución ideal para titular las muestras problemas, los controles negativos [últimas 3 barras que sólo se observan en la dilución 1:5, definidas como: sobrenadante de baculovirus sin gen inserto y sin SFB (A), el sobrenadante de baculovirus sin gen inserto y con 1% de SFB (B) y carbonatos (C)], el suero control positivo (+), el suero control negativo (-) y los sueros problema (en este ejemplo se muestra lo encontrado con los sueros de perro del Antirrábico).

Los sueros problemas de cada especie se analizaron a través de la prueba de ELISA indirecta, haciendo solo diluciones quintuples de los sueros control positivo y haciendo repeticiones cuádruples en la dilución 1:125 de los sueros problema (19 por placa) y agregando los controles negativos con la misma dilución (Figura 11):

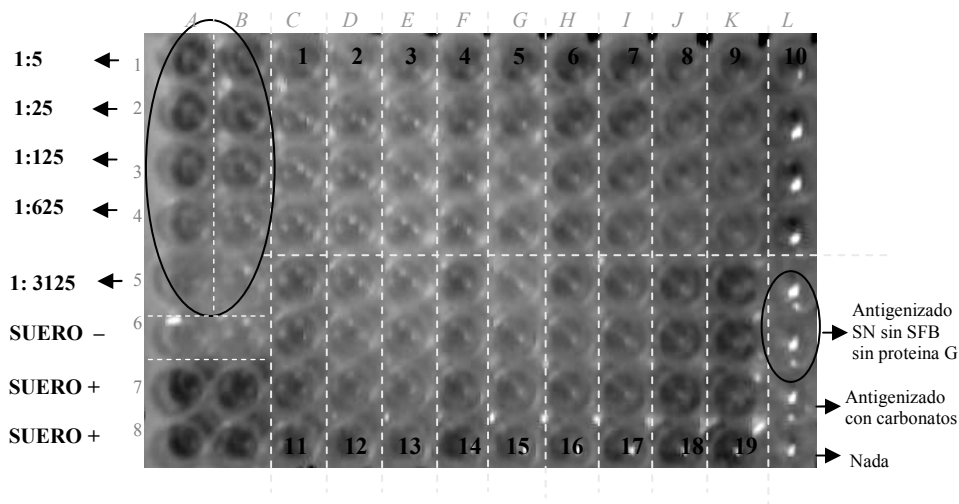


Figura 11. Placa de ELISA que muestra la distribución realizada para analizar los sueros problema, donde al suero control positivo se le realizó diluciones quintuplas de forma descendente y por duplicado (pozos A1 a A4 y B1 a B4, como lo indica el ovalo superior izquierdo). Los sueros problema de cada especie, suero control negativo y control positivo se les realizó únicamente una dilución de 1:125 y por cuadruplicado, lo cual se puede observar con las divisiones punteadas a lo largo de la placa. Los controles negativos se colocaron en los pozos L5 a L8 a la dilución de 1:125.

La lectura en DO, se obtuvo de la siguiente manera:

CUADRO 8 . Resultados obtenidos en DO, de acuerdo a la Figura 11 .

Dilucion/ Suero	Positivo (A)	Positivo (B)	1 (C)	2 (D)	3 (E)	4 (F)	5 (G)	6 (H)	7 (I)	8 (J)	9 (K)	10 (L)
1:5 (1)	1.784	1.815	0.816	0.58	0.324	0.76	0.983	0.514	0.719	0.898	0.801	0.536
1:25 (2)	1.882	1.739	0.777	0.603	0.283	0.803	1.017	0.497	0.723	0.942	0.807	0.52
1:125 (3)	1.726	1.294	0.781	0.607	0.263	0.777	0.968	0.475	0.752	0.919	0.815	0.554
1:625 (4)	1.035	0.785	0.781	0.574	0.374	0.761	0.962	0.447	0.753	0.883	0.818	0.542
1:3125 (5)	0.542	0.533	0.882	0.702	0.45	0.982	0.803	0.957	0.943	1.18	1.145	0.354
Negativo (6)	0.326	0.34	0.868	0.743	0.383	0.876	0.784	0.878	0.932	1.128	1.076	0.343
Positivo (7)	1.782	1.564	0.886	0.684	0.386	0.834	0.754	0.894	0.895	1.106	1.081	0.278
Positivo (8)	1.504	1.512	0.82	0.753	0.391	0.746	0.801	0.86	0.936	1.087	1.077	0.181
			11	12	13	14	15	16	17	18	19	

De acuerdo a los resultados anteriores, el *suero control positivo** mostró la clásica curva sigmoidea esperada (Figura 12), la cual se puede dividir en 2 extractos, para determinar el punto de corte (0.4 DO) de acuerdo al *suero control negativo**. Así que, los valores que están por arriba de 0.41 DO en adelante se denominaron como seropositivos contra rabia, los cuales posteriormente se compararon con los resultados de RFFIT.

El punto de corte se estableció de acuerdo al desarrollo de la curva de cada placa, donde la DO podía variar de acuerdo a cada especie y a diferentes factores de desarrollo de la ELISA (tiempo de revelado, edad de cada reactivo, etc). Por esta razón, la lectura se basa principalmente de acuerdo a los valores de los controles positivos y negativos.

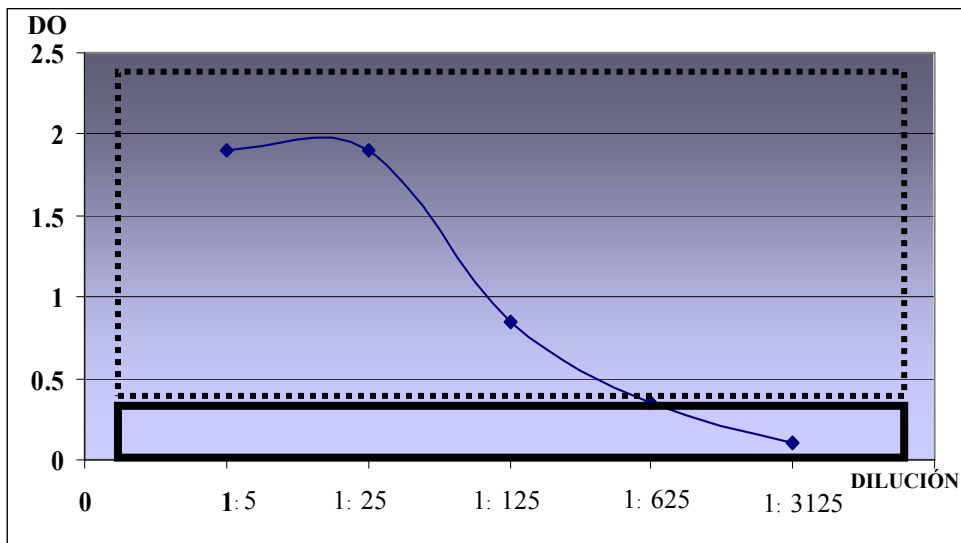


Figura 12. Grafica donde se observa la clásica curva sigmoidea esperada en el suero control positivo. Esta grafica se encuentra dividida: rectángulo inferior de línea continua donde se encuentran los sueros negativos y el rectángulo punteado superior muestra el área donde se esperan encontrar a los sueros positivos, de acuerdo a ELISA.

El control positivo* es aquel suero que proviene de un individuo que ha recibido previamente una serie de vacunas contra rabia (hiperinmune) y presenta anticuerpos protectores mayores a 0.5 UI/mL, previa verificación con alguna prueba de referencia (RFFIT o FAVN).

El control negativo* es aquel suero que proviene de un individuo que nunca ha sido vacunado contra rabia, por lo tanto no presenta anticuerpos protectores (menor a 0.5 UI/mL).

En el cuadro 7 se muestran los valores de la Figura 12 y la manera en como se interpretaron:

CUADRO 9. Interpretación de las DO obtenidas a partir del suero control positivo.

DILUCIÓN	LECTURA (DO)	INTERPRETACIÓN
1:5	1.898	Valor elevado
1:25	1.905	Valor elevado
1:125	0.8465	Valor al cual se le restan 0.2 DO (desviación estándar) y a partir de este valor hacia arriba nos indica que el suero es positivo.
1: 625	0.3455	Valor que indica un valor positivo pero cercano al punto de corte.
1:3125	0.1105	Valor al cual se le suma 0.2 DO ($0.1+0.2=0.3$) para que a partir de este valor hacia abajo se les consideran sueros negativos.

De acuerdo al punto de corte definido anteriormente, las cuatro lecturas obtenidas en DO de cada *suero problema**, se promediaron y a partir de este se definió el nivel de seroprotección aproximado de cada individuo, según la prueba de ELISA (posteriormente analizados con RFFIT):

CUADRO 10. Promedio de cada suero problema obtenidas en las placas de ELISA (ejemplo tomado de los sueros de bovinos).

No. suero	1	2	3	4	5	6	7	8
	0.689	0.163	0.77	1.155	0.721	1.162	0.996	1.262
	0.659	0.171	0.775	1.166	0.729	1.96	0.505	1.2
	0.704	0.174	0.775	1.166	0.745	1.186	0.432	1.234
	0.766	0.185	0.682	1.21	0.775	1.81	0.506	1.261
Promedio =	0.7045	0.17325	0.7505	1.17425	0.7425	1.5295	0.60975	1.23925
Interpretación	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

El suero problema* son las muestras obtenidas de cada población y que se van a analizar para conocer su título de anticuerpos protectores contra rabia.

Los controles negativos nos indicaron que no hay resultados inespecíficos (pozos L5 a L8):

CUADRO 11. Controles negativos usados en las placas de ELISA (ejemplo tomado de los sueros de bovinos).

CONTROL NEGATIVO	DO
Pozo con baculovirus sin SFB y sin inserción de proteína G (SN 0%)	0.289
Pozo con carbonatos (C)	0.11
Nada (N)	0.105

En los cuadros 12, 13 y 14 se muestran los resultados de cada suero para las tres poblaciones, donde la columnas denoinadas (I) representan la interpretación de cada prueba: ELISA experimental (donde se uso como antígeno la proteína G recombinante), ELISA alterna (donde se uso como antígeno la proteína G purificada) y la prueba RFFIT. Las pruebas de ELISA se desarrollaron en dos diferentes tiempos y con cuatro repeticiones en cada intento, como se explicó en la Figura 11.

Los sueros de los 77 bovinos (cuadros 12A y 12B) pertenecían en su mayoría a hembras (a excepción del suero número 76 que correspondía a un macho), de razas holstein por cebú y suizo por cebú. Los resultados obtenidos a través de prueba de ELISA experimental presentaron su punto de corte en 0.4 DO y los resultados de la ELISA alterna con un punto de corte de 0.2 DO.

CUADRO 12 A. Datos y resultados de los sueros de bovinos.

No. suero	Edad (Meses)	Última vacunación	ELISA		ELISA		RFFIT	
			(Grecombinante- DO)	(I)	(Gpurificada- DO)	(I)	(CDC-UI/mL)	(I)
1	7	No	0.69325	+	0.7045	+	0.04	-
2	3	No	0.1365	-	0.17325	-	0.061	-
3	7	No	0.62725	+	0.7505	+	0.04	-
4	24	No	0.8815	+	1.17425	+	0.04	-
5	84	No	0.695	+	0.7425	+	0.04	-
6	72	No	0.695	+	1.5295	+	0.04	-
7	60	No	0.695	+	0.60975	+	0.061	-
8	72	No	0.86525	+	1.23925	+	0.09	-
9	60	No	0.77575	+	0.883	+	0.04	-
10	60	No	0.85	+	1.25925	+	0.04	-
11	120	May-07	0.534	+	0.501	+	≥0.48	+
12	60	May-07	0.59625	+	0.756	+	≥0.48	+
13	72	May-07	0.47975	+	0.56125	+	≥0.48	+
14	60	May-07	0.4485	+	0.492	+	≥0.48	+
15	60	May-07	0.62325	+	0.78325	+	≥0.48	+
16	72	May-07	0.8075	+	0.993	+	≥0.48	+
17	84	May-07	0.407	+	0.63575	+	≥0.48	+
18	60	May-07	0.57375	+	0.75675	+	≥0.48	+
19	240	May-07	0.58875	+	0.7545	+	≥0.48	+
20	2	No	0.117	-	0.1675	-	≥0.48	-
21	12	May-06	0.979	+	1.38025	+	0.04	+
22	36	May-06	0.67825	+	0.8105	+	0.252	-
23	60	May-06	0.61425	+	0.65775	+	0.391	-
24	36	May-06	0.695	+	1.04225	+	≥0.48	+
25	84	May-06	0.695	+	0.9265	+	≥0.48	+
26	24	May-06	0.695	+	0.85025	+	≥0.48	+
27	76	Abr-06	1.7105	+	0.83525	+	≥0.48	+
28	76	Abr-06	1.868	+	0.74425	+	≥0.48	+
29	76	Abr-06	2.1425	+	0.8205	+	0.04	-
30	76	Abr-06	0.628	+	0.86975	+	≥0.48	+
31	36	May-06	0.49425	+	0.5695	+	0.086	-
32	60	May-06	0.47475	+	0.46975	+	0.469	-
33	48	May-06	0.4895	+	0.58625	+	≥0.48	+
34	18	Abr-07	1.69675	+	0.814	+	≥0.48	+
35	18	Abr-07	1.0335	+	0.44225	+	≥0.48	+
36	18	Abr-07	1.44175	+	0.51	+	≥0.48	+
37	18	Abr-07	1.87025	+	0.8455	+	0.04	-
38	18	Abr-07	2.00325	+	1.0285	+	0.04	-
39	18	Abr-07	1.55575	+	0.833	+	0.09	-
40	18	Abr-07	1.69675	+	0.7045	+	≥0.48	+

CUADRO 12 B. Datos y resultados de los sueros de bovinos.

No. suero	Edad (Meses)	Última vacunación	ELISA		ELISA		RFFIT	
			(Grecombinante- DO)	(I)	(Gpurificada- DO)	(I)	(CDC-UI/mL)	(I)
41			1.33975	+	0.6315	+	≥0.48	+
42	18	Abr-07	1.6255	+	0.7065	+	≥0.48	+
43	18	Abr-07	1.75875	+	0.76	+	≥0.48	+
44	72	May-06	1.516	+	0.726	+	≥0.48	+
45	72	May-06	1.80975	+	0.65975	+	≥0.48	+
46	72	May-06	1.85375	+	1.008	+	0.469	-
47	72	May-06	1.38175	+	0.61925	+	0.469	-
49	72	May-06	1.008	+	0.5595	+	≥0.48	+
50	72	May-06	1.19775	+	0.481	+	≥0.48	+
51	72	May-06	1.37625	+	0.4995	+	≥0.48	+
53	72	May-06	1.954	+	0.91075	+	≥0.48	+
55	72	May-06	0.5595	+	1.265	+	≥0.48	+
56	72	May-06	1.02125	+	0.4585	+	≥0.48	+
57	72	May-06	1.008	+	0.95325	+	≥0.48	+
58	72	May-06	1.08125	+	0.4875	+	≥0.48	+
59	72	May-06	1.8245	+	1.037	+	≥0.48	+
60	72	May-06	1.66	+	0.832	+	≥0.48	+
61	72	May-06	1.28975	+	0.76175	+	≥0.48	+
62	72	May-06	1.6645	+	0.57025	+	≥0.48	+
63	72	May-06	1.265	+	0.847	+	≥0.48	+
64	72	May-06	1.102	+	0.8055	+	≥0.48	+
65	72	May-06	0.84025	+	0.46525	+	≥0.48	+
66	72	May-06	0.86175	+	0.52225	+	≥0.48	+
67	72	May-06	1.5105	+	1.193	+	≥0.48	+
68	72	May-06	1.02325	+	0.61525	+	≥0.48	+
69	72	May-06	1.09625	+	0.743	+	≥0.48	+
70	72	May-06	1.963	+	1.2935	+	≥0.48	+
71	72	May-06	1.4145	+	0.77525	+	≥0.48	+
72	72	May-06	0.91125	+	0.7635	+	≥0.48	+
73	72	May-06	1.01025	+	0.575	+	≥0.48	+
74	72	May-06	0.6	+	0.389	+	≥0.48	+
75	72	May-06	1.555	+	0.934	+	≥0.48	+
76	72	May-06	1.589	+	0.9775	+	≥0.48	+
77	72	May-06	1.09875	+	0.7625	+	≥0.48	+

En los cuadros 13A y 13B se muestran la seroconversión encontrada en 60 muestras séricas de personal que labora en los en tres diferentes centros de alto riesgo. Los resultados obtenidos a través de prueba de ELISA experimental presentaron un punto de corte de 0.45DO y la ELISA alterna con un punto de corte de 0.12 DO.

CUADRO 13 A. Datos y resultados de los sueros de humanos.

No. suero	Sexo	Edad (Años)	Última vacunación	Lugar donde labora	ELISA (Grecombinante- DO)		ELISA (Gpurificada- DO)		RFFIT (CDC-UI/mL)	
					(I)	(I)	(I)	(I)	(I)	(I)
1	M	43	Feb-07	Antirrábico Ecatepec	0.732	+	0.257	+	≥0.48	+
2	F	26	Feb-07	Antirrábico Ecatepec	0.9745	+	0.218	+	0.434	+
3	F	26	Ene-06	Antirrábico Ecatepec	0.8685	+	0.2815	+	≥0.48	+
4	M	31	Mar-06	Antirrábico Ecatepec	1.53725	+	0.41875	+	≥0.48	+
5	M	43	Sep-06	Antirrábico Ecatepec	1.1155	+	0.5025	+	≥0.48	+
6	M	21	Feb-07	Antirrábico Ecatepec	1.771	+	0.5595	+	0.069	+
7	M	25	May-06	Antirrábico Ecatepec	1.83025	+	0.525	+	≥0.48	+
8	M	23	Abr-06	Antirrábico Ecatepec	0.8155	+	0.5595	+	≥0.48	+
9	M	44	Feb-07	Antirrábico Ecatepec	0.649	+	0.525	+	≥0.48	+
10	M	68	May-06	Antirrábico Ecatepec	0.903	+	0.1795	+	≥0.48	+
11	F	43	Dic-00	Antirrábico Ecatepec	1.73175	+	0.972	+	≥0.48	+
12	M	49	Abr-07	Antirrábico Ecatepec	1.05275	+	0.3625	+	≥0.48	+
13	M	43	Abr-07	Antirrábico Ecatepec	0.94925	+	0.2055	+	≥0.48	+
14	M	27	Feb-07	Antirrábico Ecatepec	1.9275	+	0.6025	+	≥0.48	+
15	M	22	Feb-07	Antirrábico Ecatepec	1.12275	+	0.301	+	≥0.48	+
16	F	26	Ene-07	Depto. Ecología	1.42475	+	0.2585	+	≥0.48	+
17	F	25	Ene-07	Depto. Ecología	1.36675	+	0.304	+	≥0.48	+
18	F	24	Feb-07	Depto. Ecología	1.9105	+	0.372	+	≥0.48	+
19	M	27	Dic-03	Depto. Ecología	1.952	+	0.57	+	≥0.48	+
20	F	22	Mar-07	Depto. Ecología	1.6325	+	0.596	+	≥0.48	+
21	M	50	Mar-07	Depto. Ecología	1.16425	+	0.261	+	≥0.48	+
22	F	37	Mar-07	Depto. Ecología	1.11675	+	0.381	+	≥0.48	+
23	F	29	Ene-07	CENASA	1.1275	+	0.212	+	≥0.48	+
24	F	53	Mar-07	CENASA	1.13975	+	0.284	+	≥0.48	+
25	M	49	Nov-05	CENASA	0.97425	+	0.247	+	≥0.48	+
26	M	34	Ene-07	CENASA	1.23875	+	0.191	+	≥0.48	+
27	M	52	Abr-07	CENASA	0.76925	+	0.185	+	≥0.48	+
28	M	39	Mar-07	CENASA	0.83725	+	0.159	+	≥0.48	+
29	F	50	Mar-07	CENASA	2.09075	+	0.651	+	≥0.48	+
30	M	47	Feb-07	CENASA	0.4675	+	0.119	+	≥0.48	+
31	F	59	Mar-07	CENASA	1.556	+	0.4635	+	≥0.48	+
32	M	46	Mar-07	CENASA	0.8555	+	0.2125	+	≥0.48	+
33	F	62	Mar-07	CENASA	1.4305	+	0.3255	+	≥0.48	+
34	F	38	Mar-07	CENASA	1.4985	+	0.4285	+	≥0.48	+
35	F	47	Nov-05	CENASA	0.448	+	0.119	-	0.434	-

CUADRO 13 B. Datos y resultados de los sueros de humanos.

No. suero	Sexo	Edad (Años)	Última vacunación	Lugar donde labora	ELISA		ELISA		RFFIT	
					(Grecombinante)	(I)	(Grecombinante)	(I)	(CDC-UI/mL)	(I)
36	F	52	Oct-05	CENASA	0.5565	+	0.214	+	0.434	-
37	F	51	Mar-07	CENASA	1.02775	+	0.2855	+	≥0.48	+
38	F	48	Mar-07	CENASA	1.6145	+	0.573	+	≥0.48	+
39	F	46	sin vacunación	CENASA	0.4235	-	0.45	-	≥0.48	-
40	M	40	Mar-07	CENASA	0.7045	+	0.1675	+	≥0.48	+
41	F	56	Mar-07	CENASA	0.95925	+	0.2295	+	0.469	-
42	F	49	Mar-07	CENASA	1.31075	+	0.3325	+	≥0.48	+
43	F	43	sin vacunación	CENASA	0.3075	-	0.172	-	0.04	-
44	F	49	sin vacunación	CENASA	0.98475	+	0.119	-	0.04	-
45	F	41	Mar-07	CENASA	1.4485	+	0.43375	+	0.04	-
46	F	49	Mar-07	CENASA	0.76025	+	0.23375	+	≥0.48	+
47	M	45	Mar-07	CENASA	0.6885	+	0.2745	+	≥0.48	+
48	F	53	Mar-07	CENASA	0.724	+	0.25325	+	≥0.48	+
49	M	48	Oct-05	CENASA	0.688	+	0.2075	+	0.469	-
50	F	41	Mar-07	CENASA	1.5045	+	0.30475	+	0.469	-
51	M	51	Mar-07	CENASA	2.073	+	0.59775	+	0.04	-
52	M	52	Mar-07	CENASA	0.693	+	0.27075	+	≥0.48	+
53	M	40	Jul-04	CENASA	1.12575	+	0.33575	+	≥0.48	+
54	F	30	Mar-07	CENASA	1.76925	+	0.4945	+	≥0.48	+
55	M	27	Feb-07	Antirrábico Ecatepec	0.97975	+	0.3025	+	≥0.48	+
56	M	49	May-06	Antirrábico Ecatepec	0.55775	+	0.2405	+	≥0.48	+
57	M	28	Nov-06	Antirrábico Ecatepec	1.35175	+	0.5635	+	≥0.48	+
58	M	20	May-06	Antirrábico Ecatepec	0.9365	+	0.1655	+	0.04	-
59	F	22	Feb-07	Antirrábico Ecatepec	1.813	+	0.132	+	≥0.48	+
60	M	53	Mar-07	CENASA	0.98475	+	0.1255	+	≥0.48	+

Las tablas 14A y 14B muestran los resultados de la seroconversión encontrados en 77 perros del Antirrábico de Ecatepec, la prueba de ELISA experimental presentó un punto de corte de 0.6 DO y la prueba de ELISA alterna de 0.3 DO.

CUADRO 14A. Datos y resultados de los sueros de perros.

No. suero	Sexo	ELISA		ELISA		RFFIT	
		(Grecombinante)	(I)	(Gpurificada)	(I)	(CDC-UI/mL)	(I)
1	M	0.915	+	1.3455	+	≥0.48	+
2	H	1.144	+	0.5895	+	≥0.48	+
3	H	1.07525	+	1.726	+	≥0.48	+
4	H	0.9165	+	0.7685	+	0.04	-
5	M	1.17025	+	1.03	+	0.469	-
6	M	0.66025	+	0.867	+	≥0.48	+
7	M	1.01525	+	1.191	+	≥0.48	+
8	M	0.9355	+	0.5932	+	≥0.48	+
9	H	0.4595	-	0.117	-	0.365	-
10	M	0.427	-	0.0695	-	0.04	-
11	H	0.45875	-	0.541	-	≥0.48	+
12	M	1.01125	+	0.9315	+	≥0.48	+
13	M	1.287	+	0.4385	+	≥0.48	+
14	H	1.8255	+	0.417	+	0.16	-
15	H	0.314	-	0.0805	+	0.04	-
16	H	0.2355	-	0.064	+	0.04	-
17	H	0.0465	-	0.538	+	≥0.48	+
18	M	2.013	+	1.0995	+	≥0.48	+
19	M	1.3255	+	0.2365	-	0.391	-
20	H	0.8975	+	0.1955	-	0.434	-
21	M	1.3255	+	0.441	-	0.04	-
22	H	0.1595	-	0.0595	-	0.069	-
23	M	1.0845	+	0.3785	+	≥0.48	+
24	H	1.9595	+	1.1805	+	≥0.48	+
25	H	1.996	+	0.702	+	0.469	-
26	M	1.3805	+	0.47	+	≥0.48	+
27	M	1.1125	+	0.336	+	≥0.48	+
28	H	1.6745	+	0.948	+	≥0.48	+
29	H	1.902	+	0.9115	+	≥0.48	+
30	M	0.9395	+	0.7295	+	≥0.48	+
31	M	1.2015	+	1.1375	+	≥0.48	+
32	H	0.2445	-	0.058	-	0.04	-
33	M	0.592	-	0.286	-	0.04	-
34	H	2.09	+	0.521	+	0.04	-
35	H	1.0845	+	0.3785	+	0.04	-
36	M	2.3225	+	0.848	+	≥0.48	+
37	M	1.4315	+	0.2515	+	≥0.48	+
38	H	1.8625	+	0.9135	+	≥0.48	+
39	M	0.658	+	0.1165	+	≥0.48	+
40	M	1.235	+	0.2375	-	0.04	-

CUADRO 14 B. Datos y resultados de los sueros de perros.

No. suero	Sexo	ELISA		ELISA		RFFIT	
		(Grecombinante)		(Gpurificada)		(CDC-UI/mL)	
41	H	1.1305	+	0.2605	-	0.04	-
42	M	1.3795	+	0.2685	-	0.04	-
43	M	2.09	+	0.521	+	0.086	-
44	H	3.268	+	2.1635	+	≥0.48	+
45	H	1.2485	+	0.2105	+	0.054	-
46	M	1.8935	+	0.7525	+	≥0.48	+
47	M	0.9395	+	0.7295	+	≥0.48	+
48	M	1.0905	+	0.48625	+	≥0.48	+
49	H	1.564	+	0.63875	+	≥0.48	+
50	H	1.2295	+	0.6395	+	≥0.48	+
51	M	0.6685	+	0.9275	+	≥0.48	+
52	H	0.311	-	0.8225	+	≥0.48	+
53	M	0.77525	+	1.2025	+	≥0.48	+
54	M	0.9825	+	1.4275	+	≥0.48	+
55	H	0.48325	-	0.7775	+	≥0.48	+
56	M	1.12525	+	1.9495	+	≥0.48	+
57	M	0.9105	+	1.637	+	≥0.48	+
58	H	0.81025	+	1.302	+	≥0.48	+
59	M	0.538	+	1.073	+	≥0.48	+
60	M	0.8285	+	0.937	+	≥0.48	+
61	M	0.6955	+	1.3565	+	≥0.48	+
62	M	0.24125	-	0.397	-	0.26	-
63	H	0.38875	-	0.4475	-	≥0.48	+
64	M	0.5955	-	0.8655	-	≥0.48	+
65	M	0.61425	+	0.664	+	≥0.48	+
66	M	0.67125	+	0.643	+	≥0.48	+
67	M	0.7785	+	1.4755	+	≥0.48	+
68	M	0.61075	+	1.0175	+	≥0.48	+
69	M	0.63825	+	0.8455	+	≥0.48	+
70	H	1.42625	+	2.118	+	≥0.48	+
71	H	1.44	+	2.056	+	≥0.48	+
72	H	0.561	-	0.451	-	0.06	-
73	M	1.01975	+	1.555	+	≥0.48	+
74	H	0.62	-	0.2985	-	0.03	-
75	H	1.49025	+	1.638	+	≥0.48	+
76	H	1.1935	+	1.088	+	≥0.48	+
77	M	0.73675	-	0.25	-	0.04	-

Los cuadros 12, 13 y 14 fueron analizados con la prueba de concordancia o Kappa, encontrando que entre las pruebas de ELISA (experimental y alterna):

- Una concordancia del **0.7933** en la población de bovinos, con una $p < 0.001$, por lo tanto es un resultado estadísticamente significativo.
- Una concordancia del **0.8462** en la población de humanos, con una $p < 0.001$, por lo tanto es un resultado estadísticamente significativo.
- Una concordancia del **0.8204** en la población de perros, con una $p < 0.0006$, por lo tanto es un resultado estadísticamente significativo.

Y de los cuadros 10, 11 y 12 analizados con la prueba de Kappa, encontrando que entre la prueba de ELISA experimental y RFFIT:

- Una concordancia del **0.2965** en la población de bovinos, con una $p < 0.012$, por lo tanto es un resultado estadísticamente significativo.
- Una concordancia del **0.4615** en la población de humanos, con una $p < 0.0004$, por lo tanto es un resultado estadísticamente significativo.
- Una concordancias del **0.3636** en la población de perros, con una $p < 0.0039$, por lo tanto es un resultado estadísticamente significativo.

Se encontró en bovinos una Se de 74% y una Es del 87%, en humanos una Se de 86% y Es del 24% y en perros (***) una Se del 60% y Es del 33%.

(***) En la población de perros la Se y Es fueron datos que debieron tomar con mesura, ya que nunca existió un historial de vacunación que los validara.

4.0 DISCUSIÓN

Los casos de infección por el virus de rabia han disminuido a través de los años debido a los programas de vigilancia y control alrededor del mundo, basados en el costo-beneficio de realizar medidas zootécnicas adecuadas de manejo, sanidad y vacunaciones masivas. Sin embargo, la rabia aún constituye un problema de Salud Pública sobre todo en países en desarrollo como el nuestro, por esta razón el diagnosticar la enfermedad oportunamente permite su control, sobre todo en áreas de alta prevalencia donde existe una transmisión activa del virus.

La creación de un “banco de sueros” nos permitiría obtener un perfil inmunológico de tipo transversal, retrospectivo y/o prospectivo de cualquier población en nuestro país. Ya que es importante conocer la eficacia de las vacunas usadas para cada especie manteniendo un monitoreo constante con el uso de técnicas de serodiagnóstico sensibles, específicas, rápidas y a bajo costo; como lo es la prueba ELISA propuesta en ésta tesis que tiene como ventaja: su facilidad de desarrollo (Cliquet et al, 2003) por que no se requiere exposición al virus vivo, ni el manejo del cultivo celular; además de que su desarrollo se realiza en un menor tiempo y costo (Cliquet, 2000; Servat, 2007), con respecto a las pruebas de referencia (RFFIT y FAVN) y los kits de ELISA comerciales.

La técnica ELISA para el diagnóstico de rabia que fue propuesta desde 1979 por Atanasio y Perrin, y a partir de estos estudios se han publicado artículos donde la prueba de ELISA ha sido usada para cuantificar anticuerpos antirrábicos en humanos (Kavaklova et al, 1984), en animales domésticos (Sugiyama et al, 1997; Cliquet et al, 2004; Li-Min et al, 2006) y en zorros (Barton y Campbell, 1988; Cliquet et al, 2000); empleando como fase sólida tanto al virus entero o sus componentes antigénicos solos o en combinación (glicoproteína, nucleoproteína y/o fosfoproteína), obtenidos directamente del virus o de manera recombinante. Sin embargo, cuando se usa como fase sólida a un antígeno que proviene de una vacuna se corre el riesgo de contener algunos elementos contaminantes que pueden unirse de manera inespecífica a algunos anticuerpos ya que estos antígenos son obtenidos en cultivo celular.

En cambio se ha comenzado a extender el interés de desarrollar pruebas de ELISA con la presencia de la proteína G de la rabia purificada, por que ha demostrado ser altamente sensible y específica. Por esta razón la OIE la recomienda desde 2004 como una herramienta alternativa.

La prueba de ELISA indirecta desarrollada en esta tesis, es una técnica donde la DO es resultado de la cantidad de antígeno-anticuerpo específico unido a las paredes de los pozos; de los cuales según Crowther (1995) el título óptimo de un suero positivo se presenta alrededor del 1-1.5 DO y los sueros negativos deben presentar un nivel inferior alrededor o debajo los 0.15 DO. Sin embargo, otros autores (Servat, 2007; Cliquet, 2003, 2004) mencionan diferentes puntos de corte que fluctúan entre 0.2 y 0.3 DO, pero lo amplían como una medida estándar hasta 0.5 ó 0.6 DO; para volver estricta su lectura, ya que el no ampliar este punto de corte provocaría falsos positivos, por que en el mismo sobrenadante que acompaña a la proteína G pueden existir epítopes inespecíficos que suelen unirse al pozo de la placa y que pueden llegar a reaccionar con anticuerpos inespecíficos de los sueros policlonales, elevando la DO sobretodo en individuos que presentan títulos cercanos al punto de corte.

Por esta razón, el punto de corte obtenido a partir de los sueros control negativos usados en este estudio se les aumentaron 0.2 DO a la lectura de los datos, para calificar de manera más estricta a los sueros problemas. Ya que es mejor tener falsos negativos que se pueden reanalizar, a diferencia de aquellos falsos positivos que corren el riesgo de ser focos de infección y/o perecer por exposición al virus.

Tras los resultados encontrados se observó que: 1) los resultados pueden variar por causas intrínsecas a la población muestreada, ya que de acuerdo a la especie la DO varía, por esta razón se optó por trabajar con sueros control positivos, sueros control negativos e inmunoglobulinas secundarias específicas de especie y 2) la presencia de individuos que no seroconvierten post-vacunación es posible por razones como pueden ser la edad, una

posible “agamablobulinemia” (traducida como una incapacidad de reconocer antígenos e inhabilidad de producir anticuerpos) u otras razones intrínseca de cada individuo.

Con la prueba de ELISA: los bovinos mostraron un porcentaje de anticuerpos protectores contra rabia del 97%, los humanos del 94% y los perros del 47%. En cambio con la prueba de RFFIT: los bovinos mostraron un porcentaje de anticuerpos protectores contra rabia del 73%, los humanos del 83% y los perros del 58%. Esto hace ver que existió un porcentaje importante de falsos positivos encontrados en la población de bovinos y humanos, las cuales son poblaciones donde el costo-beneficio de vacunar es preferible a perder a un animal productivo o peor aún una vida humana.

La prueba de ELISA fue repetida en tres diferentes tiempos (dos veces con la proteína G recombinante y una con la proteína G comercial), con repeticiones cuádruples en cada intento. Los resultados obtenidos para las tres especies con ambas pruebas de ELISA demostraron tener una gran asociación, indicándonos consistencia en las repeticiones de las tres especies, con un nivel de concordancia que fue de muy buena a buena (mayor al 80%). Sin embargo, comparando los resultados con la prueba de RFFIT las concordancias encontradas fueron débiles o moderadas (menores del 40%).

En el caso de los bovinos, los primeros diez individuos del cuadro 12A pertenecían a un propietario que no vacunaba contra rabia a su hato, lo cual se confirmó con la prueba de referencia RFFIT. Sin embargo, con la prueba de ELISA sólo un becerro concordó con estos resultados (suero número 2).

Los falsos positivos que alteraron los resultados tanto en la población de bovinos como en la de humanos, se debieron posiblemente a que el suero podía unirse inespecíficamente con el reactivo bloqueador que era la leche, esto se plantea debido a que también se experimentó bloqueando con albúmina bovina y la reacción encontrada fue que en al revelar la placa en menos de un minuto todos los sueros sobrerreaccionaron como si fueran altamente positivos, lo cual sería erróneo, ya que ambas especies han

estado en contacto con algún componente de la albúmina por lo cual es posible la existencia de anticuerpos contra este.

Los resultados de la figura 9, que pertenecían a la sub-población de los diez perros provenientes de un consultorio ubicado en Cuautitlán Izcalli (Estado de México), presentaron anticuerpos protectores contra rabia, siendo consistentes de acuerdo a su historial de vacunación. Los cinco sueros de cachorros menores de un mes muestreados del Antirrábico de Ecatepec no presentaron anticuerpos protectores contra rabia. A partir de estos resultados, fue posible distinguir positivos de negativos, y de esta manera se comenzó la estandarización de la prueba ELISA.

Sin embargo, al no conocer historiales de vacunación de los perros del Antirrábico, no es posible establecer de manera certera a la sensibilidad, especificidad y presencia de falsos positivos o falsos negativos con respecto a la prueba de ELISA. Sin embargo, lo que si se pudo calcular fue su posible nivel de seroprotección contra rabia que fue menor al 60% con ambas pruebas diagnosticas (RFFIT y ELISA). Estos resultados reflejaron lo esperado, por que se sabe que los perros callejeros y/o “ferales” (animales sin dueño), comúnmente sufren de parasitismo y malnutrición; lo cual limita su capacidad de seroconversión (en caso de que alguna vez hayan sido vacunados). De tal manera que sin un programa de vacunación adecuado en Ecatepec, se provocaría nuevamente un brote como el detectado en 2005.

El uso del sistema *baculovirus* mostró ser útil para la obtención de la proteína G, que de manera alterna sirvió para poder desarrollar una prueba de ELISA indirecta que fue capaz de detectar y cuantificar anticuerpos contra rabia en muestras séricas de tres poblaciones; obteniendo resultados similares a los ya publicados (Servat, 2007; Lin- Min, 2006; Cliquet, 2000, 2003, 2004, 2006; Grassi, 1989; Mansfield, 2004).

Para la población de bovinos la concordancia encontrada fue débil, en los humanos fue moderada y en la población de perros fue débil. Estas concordancias encontradas entre RFFIT y ELISA fueron menores con respecto a ambas pruebas de

ELISA, debido a errores humanos, falla de los controles usados u otros factores como el mencionado con la albúmina. Sin embargo, en las tres poblaciones las concordancias encontradas fueron verdaderas y significativas, lo cual nos da mayor relevancia al hallazgo y nos indica una asociación real aunque esta sea mínima, como lo plantea Stantić-Pavlinić M *et al*, en 2006.

Y sabiendo que la sensibilidad de la prueba es la capacidad de esta misma para detectar desde niveles bajos de anticuerpos específicos en individuos verdaderamente protegidos y que la especificidad es la capacidad de no producir reacciones cruzadas con antígenos relacionados, se encontró que la sensibilidad fue de 74- 86%, lo cual es aceptable y la especificidad no alcanzo a ser representativo con respecto a las pruebas de referencia (87-24%), lo cual hace pensar que existieron uniones inespecíficas entre los sueros con ciertas fracciones encontradas en sobrenadante de la glicoproteína recombinante, con la misma placa o con solución de bloqueo usada.

La prueba de ELISA desarrollada en esta tesis, mostró ser una prueba que puede servir para buscar anticuerpos en grandes poblaciones como un tipo de "*screening*" o tamizado rápido, que puede ser usada en medicina veterinaria para estudios seroepidemiológicos que tienen la finalidad de evaluar seroconversión las primeras fases de un programa de post-vacunación, ya que puede detectar un número considerable de animales que efectivamente han seroconvertido con la capacidad de ser reproducida en el laboratorio con un desarrollo en menor tiempo diferencia de las pruebas de referencia.

Aunque hay que tener presente que existe el riesgo de obtener un porcentaje mayor o igual a 30% de falsos positivos con la prueba de ELISA, dato que concuerda con lo descrito por Servat y Cliquet en 2006, por lo tanto es importante cotejar resultados con la prueba de referencia (RFFIT o FAVN), como lo estipula la OMS y la OIE; ya que como se observó tras el desarrollo de esta tesis, la prueba de ELISA es capaz de diferenciar a las muestras altamente seropositivas, pero no se comporta igual con aquellas muestras que tienen un bajo o nulo nivel de anticuerpos.

5.0 CONCLUSIONES

El uso de la proteína G recombinante para desarrollar esta prueba de ELISA, con la finalidad de diagnosticar anticuerpos seroneutralizantes contra rabia, es un método que a pesar de su complejidad primaria de realizar una adecuada inserción del gen G sobre el vector eucariótico, que en este caso fue el sistema *baculovirus* ya estandarizado por el personal del Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ de la UNAM (y que amablemente nos donaron para el desarrollo de ésta tesis), demostrando ser de gran utilidad para obtener la glicoproteína del virus rábico, sin problemas de ser reproducida sobre células de insecto, con propiedades similares a la original y con la capacidad de unirse a anticuerpos protectores específicos con una mayor afinidad que la observada con la partícula viral completa.

Se logró estandarizar una prueba de ELISA capaz de detectar anticuerpos seroneutralizantes contra rabia, que puede ser usada como una herramienta que detecta el nivel de protección adquirida postvacunación en estudios seroepidemiológicos, sin exponerse al virus vivo, sin que sea necesario personal y tecnología especializada reduciendo así riesgos, tiempos y costos.

6.0 LITERATURA CITADA

1. Office Internacional des Epizooties Rabies (OIE) Manual: In Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. 5th ed. Paris, 2004; Capitulo 2.2.5
2. World Health Organization (WHO), Expert Consultation on Rabies: First Report (Geneva), 2004.
3. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Sistema de vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas (SIRVERA), PANAFTOSA, Brasil, 2005.
4. OPS. Eliminación de la rabia humana transmitida por perro en América Latina: Análisis de la situación. Washington DC, 2005.
5. OPS, Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, 3rd ed, vol.1, Washington DC, 2001.
6. Binns MM, Smith GL, Recombinant Poxviruses. Boca Raton: CRC Press; 1992.
7. Aguilar-Setién A, León Campos Y, Tesoro Cruz E, Kretschmer R, Brochier B, Pastoret P. Vaccination of vampire bats using recombinant Vaccinia-Rabies Virus, J Wildlife Diseases 2002, 38(3).
8. Loza-Rubio E y Gomez Lim MA, producción de vacunas y otros compuestos biológicos en plantas transgénicas, Vet Mex 2006; 37(004): 4441-451.
9. Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T. Expressions in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. Vaccine 2002; 20, 3155-3164.
10. Schneider MC, Burgoa CS. Algunas consideraciones sobre la rabia humana transmitida por murciélago. Revista de Salud Pública de México 1995; 37(4).
11. Jiménez Ramírez A (Coordinador de Rabia Bovina), Impacto de la rabia transmitida por vampiros en la ganadería bovina de México, SENASICA-DGSA, 2007.
12. Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New *lyssavirus* genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. Emerg Infect Dis 2003; 9(3):333-337.
13. Cliquet F, Picard-Meyer E. Rabies and rabies-related viruses: a modern perspective on an ancient disease. Rev sci tech Off int Epiz 2004; 23 (2), 625-642.
14. 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.
15. WHO, Workshop on Genetic and Antigenic Molecular Epidemiology of Lyssaviruses, 1994.
16. Guyatt KJ, Twin J, Davis P, Holmes EC, Smith GA, Smith IL, Mackenzie JS, Young PL. A molecular epidemiological study of *Australian bat lyssavirus*. J Gen Virol 2003; 84 : 485-496.
17. Hanlon CA, Kuzmin IV, Blanton JD, Weldon WC, Manangan JS, Rupprecht CE. Efficacy of rabies biologics against new *lyssaviruses* from Eurasia. Virus Res. 2005 Jul;111(1):44-54.
18. Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, Rupprecht CE. Bat *lyssaviruses* (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. Virus Res 2003; 97(2):65-79.
19. Kuzmin, IV. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for *lyssavirus* genotype definition. Virus Res 2005; 111, 28-43.
20. Meng S-L, Yan J-X, Xua G-L, Nadin-Davis SA, Minga P-G, Liu S-Y, Wu J, Mingc H-T, Zhud F-C, Zhoue D-J, Xiao O-Y, Dongg G-M, Yang X-M. Molecular epidemiological study targeting the glycoprotein gene of rabies virus isolates from China. Virus Res. 2006.
21. Jackson A, Wunner W. Rabies, Academic Press, 2002.
22. WHO, Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. WHO, Geneva, Switzerland; 1996.
23. Wagner R, Rose J. K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. Fields virology. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Raven 1996, 1121-1159.
24. Durrer P, Gaudin Y, Ruigrok, RWH, Graf R, Brunner J. Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis virus. J. Biol. Chem 1995; 270, 17575-17581.
25. Jallet C, Jacob Y, Bahloul C, Drings A, Desmezieres E, Tordo N, Perrin P. Chimeric *Lyssavirus* Glycoproteins with increased Immunological potential. J of Virol 1999; 73(1), 225-233.
26. Thoulouze, MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. J. Virol. 1998; 72, 7181-7190.

27. Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *Embo J* 1998; 17,7250–7259.
28. Gaudin Y. Rabies virus-induced membrana fusion pathway. *J Cell Biol* 150, 601-12, 2000.
29. Kasper C, Rasmussen H, Kastrup JS, Ikemizu S, Jones EY, Berezin V, Bock E, Larsen IK. Structural basis of cell-adhesion by NCAM. *Nat Struct Biol* 5, 389-93, 2002.
30. Corredor Figueroa, Martínez-Gutiérrez M, Castellanos JE. La heparina produce inhibición de la infección con virus de rabia adaptado a fibroblastos (CVS-BHK). *Revista de la Facultad de Medicina* 64 Vol. 9 No. 2, 2004.
31. Faber M, Pulmanusahakul R, Hodawadekar SS, Spitsin S, McGettigan JP, Schnell MJ, Dietzschold B. Overexpression of Rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J Virol* 2002; 76(7), 3374-3381.
32. Faber M, Faber M-L, Papaneri A, Bette M, Weihe E, Dietzschold B, Schnell MJ. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J Virol* 2005; 79, 14141–14148.
33. Morimoto K, Hooper DC, Spitsin S, Koprowski H, Dietzschold B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J Virol* 1999; 73, 510–518.
34. Prehaud CJ, Lay SJ. Glycoprotein of Nonpathogenic Rabies Viruses Is a Key Determinant of Human Cell Apoptosis. *J Virol* 2003; 77 (19), 10537-10547.
35. Cleaveland S, Kaare M, Knobel D, Laurenson MK. Canine vaccination. Providing broader benefits for disease control. *VETMIC* 2006; 3328.
36. Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fevre E, Metlzer MI, Miranda MEG, Shaw A, Zinsstag J, Meslin FX. Re-evaluating the burden of rabies in Asia and Africa. *Bull World Health Organ.* 2005; 83, 360-368.
37. Silva Kimura LM. Epidemiologia molecular del virus de la rabia en mamíferos domésticos y silvestres de Brasil. Tesis Rio de Janeiro, 2006.
38. Badrane H, Tordo N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J. Virol.* 2001; 75, 8096-8104.
39. Dodet B, Meslin F-X, Aubert M. Executive summary in Rabies control in Asia. John Libbey Eurotext, Paris, 191-196.
40. Cleaveland S, Kaare M, Tiringa P, Mlengeya T, Barrat J. A dog rabies vaccination campaign in rural África: impact on the incidence of dog rabies and human dog-bite injuries. *Vaccine* 2003; 21, 1965-1973.
41. Madhasudana SN, Saraswati S. Development and evaluation of latex agglutination test for rabies antibodies. *J Clin Virol* 2003; 27, 129-135.
42. WHO, Expert consultation on Rabies. First Report; WHO technical report series no. 931, Geneva, Switzerland, 2005.
43. Cleaveland S. The epidemiology of rabies and canine distemper in the Serengeti. Ph D Thesis, University of London. 1996.
44. Cleaveland S. Epidemiology and control of rabies. The growing problem of rabies in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92, 131-134.
45. Laurenson K, Sillero-Zubiri C, Thompson H, Shiferaw F, Thirgood S, Malcolm J. Disease as a threat to endangered species: Ethiopian wolves, domestic dogs and canine pathogens. *Animal Conservation* 1998; 1: 273-280.
46. Grenfell BT, Björnstad ON, Kappey J. Travelling waves and spatial hierarchies in measles epidemics. *Nature* 2001; Macmillan Magazines Ltd (414).
47. Fooks AR, Brookes SM, Johnson N, McElhinney LM, Hutson AM. *European bat lyssaviruses*: an emerging zoonosis. *Epidemiol Infect* 2003; 131(3): 1029-1039.
48. Jonson N, Phillpotts R and Fooks AR. Airborne transmission of *lyssaviruses*. *J Med Microbiol* 2006; 55, 785–790.
49. Brookes SM, Aegerter JN, Smith GC, Healy DM, Jolliffe TA, Swift SM, Mackie IJ, Pritchard JS, Racey PA, Moore NP, Fooks AR. European Bat *Lyssavirus* in Scottish Bats. *Emerg Infect Diseases* 2005; 11 (4), www.cdc.gov/eid
50. Fraser GC, Hooper PT, Lunt RA. Encephalitis caused by a *Lyssavirus* in fruit bats in Australia. *Emerg Infect Dis* 1996; 2 : 327 - 331.

51. Hosokawa-Muto J, Ito N, Yamada K, Shimizu K, Sugiyama M, Minamoto M. Characterization of Recombinant Rabies Virus carrying double Glycoprotein Genes, *Microbiol Immunol* 2006; 50(3), 187-196.
52. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Manual para la vigilancia epidemiológica de la rabia, 2004. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Veracruz, 2005. <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/veracruz/>
53. Loza-Rubio E, Pedroza-Requenés R, Montaña JA, Aguilar-Setién A. Caracterización con anticuerpos Monoclonales del Virus de la Rabia aislados de Fauna Doméstica y Silvestre de México, *Vet Mex* 1998; 29: 345-350.
54. 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.
55. Pringle CR. Chapter 29: Molecular Basis of Virus Evolution, Ed. Gibbs, Calisher and Garcia-Arenal, Cambridge Univ Press, 1995.
56. Woldehiwet Z. Rabies: Recent developments. *Res in Vet Sci.* 2002; 75, 17-25.
57. Lord RD. Manual de la campana para el control de vampiros con rabia. Austin: Bat Conservation International 1998, 39.
58. Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo H, Correa E. Overview of rabies in the Americas. *Virus res.* 2005; 111, 5-12.
59. Holmes EC, Woelk CH, Kassis R, Bourthy H. Genetics constrains and the adaptative evolution of rabies virus in nature. *Virology* 2002; 292, 247-257.
60. Ronsholt L, Sorensen KJ, Brusche CJM, van Oirschot JT, Johnstone P, Clinically silent rabies infection in (zoo) bats. 1998.
61. Jackson AC. Rabies: new insights into pathogenesis and treatment. *Demyelinating diseases. Current Opinion in Neurology* 2006; 19(3),267-270.
62. Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ, Rupprecht C, Sutker WL, Ksiazek TG, et al. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 2005;352:1103-1111.
63. Marsch M; Bron R. SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface. *J. Cell Sci., Essex* 1997; 110, 95-103.
64. Hemachudha T, Chutivonges S, Wilde H. Latent rabies. *N. Engl. J. Med* 1991; 324, 1890-1891.
65. Rojas AE, Loza-Rubio E, banda RVM, Hernández BE. The use of PCR to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. *J Vet Diagn Invest* 2004.
66. Lafon M. Rabies virus receptors. *J Neurovirol* 2005; 11(1), 82-7.
67. Tsiang H, Ceccaldi PE, Lycke E. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal ganglia neurons. *J. of General Virology*. 1991; 72, 1191-1194.
68. Secretaría de Salud (SSA). Manual para la vigilancia epidemiológica, 1999.
69. Weiland F, Cox JH, Meyer S, Dahme E, Reddehase MJ. Rabies virus neuritic paralysis: Immunopathogenesis of Nonfatal paralytic rabies. *J Virology* 1992; 66(8), 5096-5099.
70. Hemachudha T. Human rabies: clinical aspects, pathogenesis and potential therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 187: 121-143.
71. Woldehiwet Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clin Chim Acta* 2005; 351 (1-2), 49-63.
72. Xia-Qing L, Sarmiento L, Zhen FF. Degeneration of neuronal processes after infection with pathogenic, but not attenuated Rabies viruses. *J Virology* 2005; 79(15), 10063-68.
73. Reis MC, et al. Aspectos clínicos y epidemiológicos da rabia bovina, casuística de la Clínica de Bovinos (Oliveira dos Campinos, Santo Amaro, Bahia), Universidad Federal de Bahia, durante o período de enero de 1990 a diciembre del 1999. *Rev Brasil de Salud y Prod Animal* 2003; 4, 12-17.
74. Fundación Nacional de Salud. Murciélagos en áreas urbanas e rurales: manual de manejo y control. Brasília 1998, 117.
75. Norma Oficial Mexicana, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la rabia en las especies domésticas, NOM-035-ZOO-1996.
76. Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. Intravitam Diagnosis of Human Rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *Clin Microbiol* 1998; 36 (4), 1117-1121.

77. Kallel H, Fethi Diouani M, Loukil H, Trabelsi, K, Snoussi MS, Majoul S, Rourou S, Dellagi K. Immunogenicity and efficacy of an in-house developer cell-culture derived veterinarian rabies vaccine. *Vaccine* 2006.
78. Briggs DJ, Smith JS, Mueller FL, Schwenke J, Davis RD, Gora CR, Schweitzer K, Orciari LA, Yager PA, Rupprecht CE. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals* 1998; 26, 347-355.
79. OPS/OMS. El control de las enfermedades transmisibles. Rabia. Washington DC, 2001.
80. INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCION DE ALIMENTOS Y ZONOSIS (INPPAZ). Guía para el tratamiento de la rabia en el hombre. Publicación técnica (2), Buenos Aires, 1994.
81. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Compendium of Animal Rabies Prevention and Control, 2000.
82. NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS (NASPHV), Compendium of Animal Rabies Prevention and Control, 2001.
83. Oficina de Epidemiología del Instituto Nacional de Salud del Niño. *Salud Pública Veterinaria* 2008; (003), Perú.
84. Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostics challenges. *The Lancet Neurol* 2002; 2(1): 5- 20.
85. Willoughby RE et al, Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma. *New England J Med* 2005; 352 (24).
86. Cliquet F, McElhinney LM, Servat A, Boucher JM, Lowings JP, Goddard T, Mansfield KI, Fooks AR. Development of qualitative indirect ELISA for measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dog and cats. *J Virol Methods* 2004; 117(1), 1-8.
87. Hemachudha T, Phuapradit P. Rabies. *Curr Opin Neurol* 1997; 10, 260-267.
88. Ribas M de los A, Rebull A, Torres G, Álvarez M, Morier L, Tejero Y, García D, Rodríguez C. Detección de anticuerpos antirrábicos en personal de riesgo con el empleo de la técnica de neutralización por reducción del número de placas. *Rev Cub Med Trop* 2003; 2 (55): 91-95.
89. Miceli G, Torroba, J, Díaz AM. Evaluación de la técnica de contraelectroforesis para determinar la potencia antigénica de las vacunas antirrábicas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 1993; 35: 543-550.
90. Miceli G, Torroba J, Torres W, Esteves Madero J, Díaz AM. Evaluation of Standard Reagents for Radial-Immunodiffusion Assays In Vitro Control of Rabies vaccines. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2000; 42 (3): 153-156.
91. Bordignon J, Comin F, Ferreira SCP, Caporales GMM, Lima Filho Jh, Zanett CR. Calculating rabies virus neutralizing antibodies titres by flow cytometry, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2002; 44, 151-154.
92. Servat A, Cliquet F. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. OIE referente Laboratory for rabies, WHO Collaborating Centre for research and Management in Zoonoses Control, Community referente Institute for rabies Serology, France. *Vir Res* 2006.
93. Meisner FL, Davis RD, Brown MK, Rupprecht CE. Rabies serological testing in dogs and cats exported to rabies-free countries: does the choice of test make a difference? *United States Animal Health Association* 1997.
94. Vasanth JP, Madhusadana SN, Abhilash KV, Suja MS, Mahamuda K. Development and evaluation of an enzyme immunoassay for rapid diagnosis of rabies in humans and animals. *Indian J Pathol Microbiol* 2004; 47(4), 574-8.
95. Whitby JE, Heaton PR, Whitby HE, O'Sullivan E, Johnstone P. Rapid detection of Rabies – related viruses by RT-PCR and enzyme – linked immunosorbent assay. *J Virol Method* 1997; 69, 63-72.
96. Crowther JR, *ELISA Theory and Practice*, Humana Press, 1995.
97. Arai YT, Kimura M, Sakahue Y, Hamada A, Yamada K, Nakayama M, Takasaki T, Kurane I. Antibody responses induced by immunization with a Japanese rabies vaccine determined by neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Vaccine* 2002; 20(19,20), 2448-2453.

98. Stantić-Pavlinić M, Hostnik P, Levičnik-Stežinar S, and Zaletel-Kragelj L. Vaccination against rabies and protective antibodies - comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays. *Veterinarski Arhiv* 76 (4), 281-289, 2006.
99. Fachin N, Carvalho BA, Cardoso TC. A comparison of serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cows from Rabies-Endemic areas in Brazil. *Intern J Appl Res Vet Med* 2005; 3(3), 199-206.
100. Yang, X. Optimization of a cultivation process for recombinant protein production by *Escherichia coli*. *J. Biotechnol* 1992.; 23, 271-289.
101. Russell D, Sambrook J. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. CSHL. 3^a ed. vol. III.
102. Banks M. Aujeszky's disease ELISA using *baculovirus* expressed glycoproteins, *Acta Vet, Hung* 1994; 42, 359-367.
103. Berguer I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. *Nat Biotechnol* 2004; 22, 1583-1587.
104. Gut –Winiarska M, Jacobs L, Kerstens H, Bienkowska-Szewezyk K. A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein, *B.J. Virol. Methods* 2000; 88, 63-71.
105. Vialard JE, Arif BM, Richardson CD. *Introduction to the Molecular Biology of Baculoviruses*. New Jersey. Humana Press, 1995: 1-24.
106. O'Reilly, D. R., Miller, L. K., and Luckow. V. A. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Oxford University Press, New York, 1994.
107. Huynh, C. Q., and H. Zieler. 1999. Construction of modular and versatile plasmid vectors for the high-level expression of single or multiple genes in insects and insect cell lines. *J. Mol. Biol.* 288:13-20.
108. Zheng YZ, Greenfield PF, Reid S. Optimized production of recombinant bluetongue core-like particles produced by the baculovirus expression system. *Biotechnology and Bioengineering* 1999; 65 (5) , 600 – 604.
109. Iwanaga M, Kang WK, Kobayashi M, Maeda S. Baculovirus infection blocks the progression of fat body degradation during metamorphosis in *Bombyx mori*. *Arch of Virol*, 2000; 145 (90).
110. Thomas B. Farver, *Some Practical Considerations In Sampling Livestock Populations To Estimate Disease Prevalence And Other Parameters*, *Preventive Veterinary Medicine*, 1984; 2, 453—462.
111. Milián F, *Manual para determinar el tamaño de muestra para estudio de campo en medicina veterinaria*.
112. Herrera BF, *1er Informe de Gobierno. Gobierno del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave. Xalapa* 2005, 266.
113. Instituto Nacional de Salud, 2005.
114. Azzimonti Renzo JC, *Bioestadística aplicada a Bioquímica y Farmacia*. Ed. Universitaria de la UNAM, 2^a Edición, 2003. Disponible en <http://www.fceqyn.unam.edu.ar/bio>
115. Azzimonti Renzo JC, La concordancia entre dos tests clínicos para casos binarios: problemas y solución, *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005; 39 (4): 435-44.
116. Li-Min Y, Liang-Zhen Z, Rong-Liang H, Zhen-Sheng S. A Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Antibodies against Rabies Virus. *Clinical and Vaccine Immun* 2006; 966–968.

ANEXO 1

TRANSPOSICIÓN :

- 1) Se agregaron 40 ng de plásmido recombinante a 100 μL de células competentes *DH10bac*(*) y se incubaron en hielo por 30' (minutos).
- 2) Se les dio un choque térmico de 42°C por un minuto y en seguida se enfriaron en hielo durante dos minutos. Se añadieron 900 μL de medio SOC (20 g de bacto triptona, 5 g de bacto extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl, 20 mM de glucosa).
- 3) Los tubos se incubaron en agitación (225 rpm o bien en conversión 15 gravedades “G”) a 37°C por 4 hrs.
- 4) Se realizaron diluciones a las células con medio SOC 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Con una espátula se agregaron aproximadamente 100 μL de cada dilución a placas de agar LB preparadas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bluogal y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG. Se incubaron las placas a 37°C por 48 hrs.
- 5) De las colonias obtenidas se observaron dos tipos: unas de color blanco y otras de color azul. De las cuales, se seleccionaron las colonias blancas que son las que aparentemente si permitieron el recambio de genes, debido a que estas células son resistentes a kanamicina presentaban un sitio en su genoma llamado *Lac Z* que en presencia del indicador cromogénico llamado Bluogal o X-gal (*β -galactosidasa*) y el inductor IPTG que les conferían a las células un tono azul (Lac^+); sin embargo, al insertarse el gen deseado se rompía la unión la porción *Lac Z* por lo tanto las colonias no se coloreaban, ya que no reaccionaban con el indicador cromogénico.
- 6) Las colonias blancas seleccionadas se les realizó una extracción de DNA, para amplificar el gen de la proteína G por medio de PCR, para comprobar la transposición.

DH10bac (*) Estas células son bacterias *E. coli* que actúa como una caja de expresión que contiene un baculavirus transformado, que en contacto con el plásmido se busca que el gen deseado se inserte en el sitio Bamh I para su clonación a través del crecimiento bacteriano.

ANEXO 2

TRANSFECCIÓN:

1) Se sembraron 9×10^5 células SF-9 en cada pozo de una placa de 6 pozos con fondo plano. Se le agregaron 2 mL de medio SF-900 II (GIBCO no. cat. 10902) sin suplemento, sin antibiótico y sin suero fetal bovino por pozo.

2) Se dejó que las células se adhirieran al fondo de la placa por lo menos 1 hr.

3) Mientras transcurría la hora, se prepararon dos soluciones:

- Solución A

Por cada pozo de la placa o por cada transfección, se colocó en un tubo eppendorf el equivalente a 1 o 2 μg del DNA (Bacmido recombinante) y se agregaron 100 μL de medio SF-900 II sin suplemento, sin antibiótico y sin suero fetal bovino (SFB) y se mezcló lentamente por inversión.

- Solución B

Por cada transfección, se colocó en un tubo eppendorf 100 μL medio SF-900 II sin suplemento, sin antibiótico y sin SFB y se agregaron 6 μL de Cellfectin® Reagent (Invitrogen No. Cat. 10362-010) y se mezcló lentamente por inversión.

4) Se combinaron las soluciones A y B muy lentamente por inversión.

5) Se dejaron incubar por 15 a 45 ' a temperatura ambiente.

6) Pasado el tiempo de incubación de la mezcla, se sacó la placa de la incubadora y se retiró el sobrenadante con extremo cuidado.

7) Se agregó a cada pozo de la placa 800 μ L de medio SF-900 II sin suplemento, sin antibiótico y sin SFB.

8) Se agregaron por goteo los 200 μ L de la mezcla A y B, cuidando que el goteo de la mezcla no toque las paredes de la placa, ya que la mezcla de las soluciones es muy densa y se podía adherir con facilidad al la pared del pozo, y la finalidad era que se encontrara con las células.

9) Se incubó la placa por 5 hrs a 27°C.

10) Pasado el tiempo de incubación se removió el sobrenadante de cada pozo con extremo cuidado y se agregó medio SF-900 II suplementado, con antibiótico y sin SFB.

11) Se observó la placa a las 72 hrs para verificar que presente lisis celular y si no fuera así, entonces dejarla otro día.

12) De cada pozo se obtuvo sobrenadante, el cual se identificó y se centrifugó a 4000 rpm (1610 G) por 10' para posteriormente guardar sobrenadante y así titularlo con ELISA indirecta, aquellos sobrenadantes que presentaron un título mayor a 0.7 DO (densidad óptica), identificando cada clona, de las cuales se eligió una clona para amplificarla.

Adicionalmente se obtuvo una clona de una monocapa de células que no fue infectada y que se dejó creciendo sin SFB, se cosechó el día 3, la cual sirvió como control negativo de la prueba.

ANEXO 3

Requerimientos para la propagación y mantenimiento de las células de insecto (102):

- a) Temperatura de 27°C que les permite producir la mayor cantidad de proteínas activas que en aquellos vectores que necesitan crecer a 37°C. Se ha descubierto que estas células pueden tolerar temperaturas de 25°C a 28°C, por esta razón en laboratorios donde no suele fluctuar la temperatura estas células crecen a temperatura ambiente sobre una mesa sin ningún problema.
- b) Humedad controlada lo cual se logra colocando un balde de agua destilada en la base de la incubadora.
- c) Medio de cultivo suplementado con los nutrientes básicos de sales, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y elementos trazas (Anexo 3.1), al cual se le debe adicionar glutamina (1%) y piruvato de sodio (2 µM /mL). El medio de elección para las células SF-9 es el llamado SF900 o SF900 II (Invitogen) basado en el medio IPL-41(cuadro 3.1); la diferencia es que el medio SF900 no contiene suero y contiene una muy baja concentración de proteínas, este medio de cultivo tiene un pH de aproximadamente 6.2 con una solución buffer de fosfato de sodio; esto contrasta con los medios usados en células de mamífero ya que estas necesitan de un sistema buffer de bicarbonato con bióxido de carbono (CO₂), por esta razón no es necesario el CO₂ en cultivos celulares de insecto.
- d) Una solución antibiótica-antimicótica puede ser adicionada si se desea, para minimizar contaminaciones bacteriana y de hongos.
- e) La población celular suele aumentar el doble cada 19 a 24 hrs. Por lo tanto se les deben de realizar pases dos veces a la semana. Sin embargo, estas células se deben mantener bajo observación por que depende de la cantidad de suero fetal bovino (SFB) añadido (con un 10% SFB de estas se estimulan a mayor

- crecimiento). Cuando el monoestirato se encuentre con un 80 a 90% de confluencia es cuando se le debe realizar el pase.
- f) Microscopio invertido, con lentes de alta magnificación es posible diferenciar aquellas células saludables de las que no lo son, ya que con aumentos de 320X-400X es posible observar un núcleo redondeado y sus organelos sin presencia de gránulos en las células sanas, a diferencia de las células anómalas que presentan gránulos internos y con una apariencia de estar aumentadas de tamaño o hinchadas.
 - g) No es necesario el uso de sustancias que desprendan a las células como lo es la tripsina o EDTA, ya que con un raspador estéril es posible desprenderlas y disgregarlas con ayuda de una pipeta estéril.
 - h) La conservación de estas células por un largo periodo de tiempo es posible llevarlo a cabo congelándolas a -80°C o en nitrógeno líquido, con una viabilidad mayor al 98% usando un 85% de medio celular adicionado con un 15% de DMSO, manteniéndolas libres de contaminaciones y crecimientos exponenciales innecesarios; creando así una conserva celular que puede ser usada en cualquier momento.

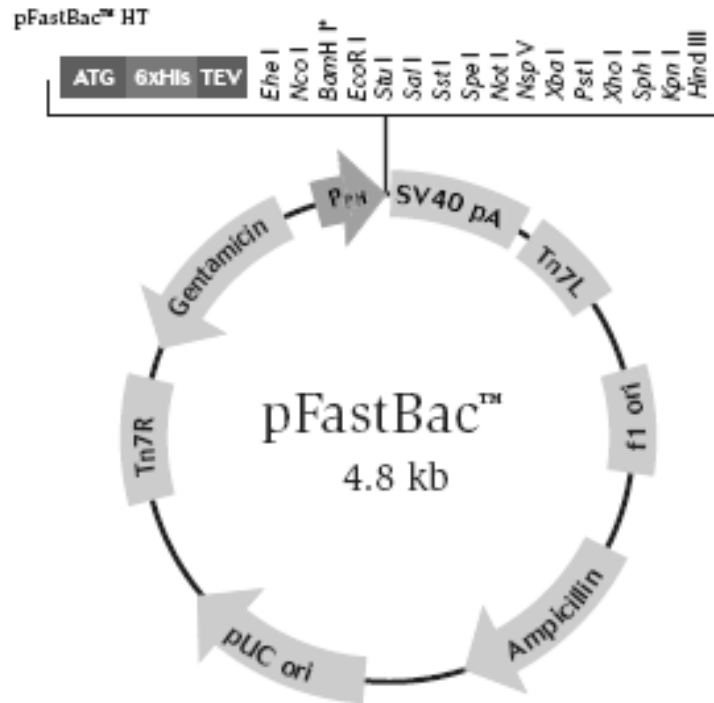
ANEXO 3.1

TABLE 11-1 Composition of insect cell culture media (mg/l)

Component	Grace's	IPL-41	TC-100
<i>Inorganic Salts</i>			
CaCl ₂ (anhyd)	750.00	500.00	996.49
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.05	
CuCl ₂ ·2H ₂ O		0.20	
FeSO ₄ ·7H ₂ O		0.55	
KCl	4100.00	1200.00	2870.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2280.00		
MgCl ₂			1067.95
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2780.00		
MgSO ₄		918.00	1357.67
MnCl ₂ ·4H ₂ O		0.02	
NaCl		2850.00	500.00
NaHCO ₃	350.00	350.00	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1013.00	1160.00	1008.36
(NH ₄) ₂ MoO ₇ ·4H ₂ O		0.04	
ZnCl ₂		0.04	
<i>Sugars, Other</i>			
D(-)-Fructose	400.00		
Fumaric acid, free acid	55.00	4.40	
D(+)-Glucose	700.00	2500.00	1100.00
α-Ketoglutaric acid	370.00	29.60	
L(-)-Malic acid	670.00	53.60	
Maltose		1000.00	
Succinic acid	60.00	4.80	
Sucrose	26,680.00	1650.00	
<i>Amino Acids</i>			
β-Alanine	200.00	300.00	
L-Alanine	225.00		225.00
L-Arginine·HCl	700.00	800.00	665.11
L-Asparagine	350.00	1300.00	350.00
L-Aspartic acid	330.00	1300.00	350.00
L-Cystine	22.00		
L-Cysteine·2Na		119.40	28.68
L-Glutamic acid	600.00	1500.00	600.00
L-Glutamine	600.00	1000.00	600.00
Glycine, free base	650.00	200.00	650.00
L-Histidine	2500.00	200.00	
L-Histidine·HCl·H ₂ O			3697.89
L-Isoleucine	50.00	750.00	50.00
L-Leucine	75.00	250.00	75.00
L-Lysine·HCl	625.00	700.00	625.00
L-Methionine	50.00	1000.00	50.00
L-Phenylalanine	150.00	1000.00	150.00
L-Proline	350.00	500.00	350.00
Hydroxy-L-Proline		800.00	
DL-Serine	1100.00	400.00	
L-Serine			550.00
L-Threonine	175.00	200.00	175.00
L-Tryptophan	100.00	100.00	100.00
L-Tyrosine	50.00		
L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O		360.40	72.08

ANEXO 4

Esquema y características del vector pFastBac HT:



Sitio de origen f1: 2-457 bases.

Gen de resistencia a ampicilina: bases 589-1449.

Origen de replicación PUC: bases 1594-2267.

TN7R: bases 2511-2735.

Codón de inicio ATG: bases 4050-4052.

Cola de 6 histidinas: bases 4062-4079.

Sitio de reconocimiento TEV: bases 4101-4121.

Sitio múltiple de clonación : bases 4119-4222.

Señal de poliadenilacion de SV40: bases 4240-4480.

TnTL: bases 4509-4674.

ANEXO 5

La **amplificación** de la clona elegida, se llevo a cabo:

- 1) A tres cajas de 150 cm³ con una monocapa de células SF9 con un 80 a 90% de confluencia, se decantó el medio donde crecieron, se le agregaron 300 µl de la clona 283 (-5) y 10 mL SF-900 II sin SFB. Se incubaron a temperatura ambiente por 90 ´
- 2) Posteriormente se decantó sobrenadante y se les agregó 30 mL a cada caja de Medio SF900 sin SFB y se dejaron incubando a 28°C por 8-11 días o bien hasta que se observo citólisis en la monocapa.

La **cosecha** de las proteínas de células de insecto SF9, se llevo a cabo:

1. Las 3 cajas se incubaron por 30´ en hielo.
2. Se rasparon las paredes donde quedaron adheridas las células y se decantaron.
3. El decantado se centrifugo a 4000 rpm (1610 G) por 10´.

ANEXO 6

PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Gel de separación 12.5%

Acrilamida – bis (30:0.8)	6.25mL
Buffer pH 8.8	1.875 mL
SDS 10%	150µL
Persulfato de amonio 1.5%	750 µL
Agua destilada	5.975 mL
TEMED	10 µL

Gel de concentración

Acrilamida – bis (30:0.8)	625 µL
Buffer pH 6.8	1.25 mL
SDS 10%	50 µL
Persulfato de amonio 1.5%	250 µL
Agua destilada	2.825 mL
TEMED	5 µL

MUESTRAS

1. En tubos limpio y estériles se colocaron la muestra de proteínas a la concentración que se deseada.
2. Se adicionaron 8 µL de buffer de muestra y X µL de buffer de lisis para acompletar 15µL de muestra total.

* Opcional: Hervir muestras 3 minutos antes de cargar en el gel

MÉTODO

1. Se limpiaron los vidrios con alcohol y se ensamblaron
2. Se agregó el gel de separación
3. Se agregó 1mL de alcohol isopropílico o agua
4. Se dejó gelificar durante 20 ´
5. Se decantó para eliminar alcohol o agua y se limpió con papel
6. Se puso el gel de concentración

7. Inmediatamente se colocó el peine y se espero aproximadamente 20 ´
8. Se quitó el peine y se desmontaron los vidrios
9. Se preparó la cámara de electroforesis y se agregó buffer de corrimiento
10. Se colocaron 20 µL de cada muestra en los pozos
11. Se corrieron los geles a 100V por 30 ´ o hasta que la muestra saliera del gel de concentración y después se aumentaba a 120V hasta terminar la corrida.
12. Se tiño el gel durante toda la noche con azul de Coomasie
13. Se destiño el gel con solución decolorante
14. Se observaron corrimiento de el o los gel(es) en una pantalla con luz blanca

SOLUCIONES

- Buffer de muestra 2X

0.308g DTT
1% Azul de bromofenol
2 mL de glicerol
800 µL agua destilada
3.2 mL Tris-HCl pH 6.8
4 mL SDS 10%

- Buffer de lisis

0.05M TrisHCl 6.8
0.15M NaCl
0.1% SDS
0.1% Triton X-100
1% Acido desoxicólico
1mM PMSF

- Buffer de corrida 10X

30.3g Trisma base
144g Glicina
10g SDS

Se ajustó a 1 L con agua destilada y desionizada. Para usar en la corrida preparar a 1X.

- Coomassie para PAGE

Agua bidestilada.....	227mL
Metanol absoluto.....	227mL
Ácido acético glacial.....	45mL
Coomasie R250.....	1.25g

Se disolvió con agitación y almacenar en frasco ámbar. El reactivo es estable y reciclable en estas condiciones. El gel se sumergió en el reactivo 1.30hrs en agitación constante, tapando el recipiente para evitar que se evaporara el colorante y se resecara el gel.

- Decolorante para PAGE.

Agua bidestilada.....	227mL
Metanol absoluto.....	227mL
Ácido acético glacial.....	45mL

El reactivo se podía reciclar filtrándolo en carbón activado, este se desechó cuando presentaba una coloración azul muy fuerte. El gel se sumergió en el reactivo en agitación constante, tapando el recipiente para evitar que se evaporara el colorante y se resecara el gel y haciendo cambios constantes del mismo, hasta obtener las bandas visibles.

6.1 WESTERN BLOT SEMISECO PARA DETECTAR PROTEÍNA G DEL VIRUS DE LA RABIA

1. Se realizó el PAGE 10 o 12% (sin teñir)
2. Se equilibraron dos cojinetes y la membrana de nitrocelulosa para realizar la transferencia en buffer de transferencia por 10 min
3. Se colocó un cojinete en la placa y encima la membrana, después el gel y en la parte superior el otro cojinete
 - a. Se transfirieron las proteínas a la membrana de nirtrocelulosa a 22V durante 45 min
 - b. Una vez terminada la transferencia se teñía el gel para comprobar que la transferencia de las proteínas fue completa
2. Se bloqueo la membrana con el buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C
3. Se lavó la membrana cuatro veces con buffer de lavado por 10 ´ a temperatura ambiente

4. Se aplicó el primer anticuerpo inmunoglobulinas anti-proteína G diluido en buffer de dilución a la concentración deseada y se incubó a 37°C 1 hr
5. Se lavó la membrana cuatro veces con buffer de lavado por 10 ´ a temperatura ambiente.
6. Se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG específica de especie conjugado con peroxidada, la cual se aplica a la concentración que indique el fabricante diluido con buffer de dilución. Se incubó a 37°C 30 ´
7. Se lavó la membrana tres veces con buffer de lavado por 5 ´ en agitación y una vez más con PBS a temperatura ambiente.
8. Se preparó la solución de revelado justo antes de usar y se adicionó 1 mL en caso de estas usar la membrana cortada en tiras o 30 mL si es la membrana completa. Se agrega con la membrana en agitación hasta observar la aparición de bandas, para posteriormente detener la reacción con agua a chorro.

SOLUCIONES

- Buffer de transferencia

Buffer de corrida para geles PAGE 1X y metanol 20%

- Buffer de bloqueo.

3% Leche descremada.....3g
 0.2% Tween 20.....200µL
 PBS.....100ml

- Buffer de lavado

0.2% Tween 20.....200 µL
 PBS.....100mL

- Buffer de dilución

1% Leche descremada1g
 Buffer de lavado.....100mL

- Revelador de peroxidasa.

30 mg de 2,4 diaminobencidina
 60 mL de PBS
 30 µL H₂O₂
 Preparar al momento de usar.

6.2 CONDICIONES DEL RT-PCR :

Buffer de PCR 10X	5 μ L
Cloruro de Magnesio 50 mM	1.5 μ L
Oligo G + p	0.5 μ L
Oligo G – p	0.5 μ L
dNTPs	1 μ L
Agua	31 μ L
Taq	1 μ L
cDNA	5 μ L
	94°C 1'
	94°C 30'
	55°C 30''
	68°C 1'
	72°C 2'
	4°C -----

ANEXO 7

DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE ELISA:

1. Se sensibilizó (antigenizó) una placa con la glicoproteína recombinante obtenido de las células SF9 en una dilución 1 μ L de proteína G : 100 μ L de **buffer de carbonatos**, por pozo
2. Se dejó incubando a 4°C toda la noche
3. Pasado el tiempo de incubación se lavó la placa 4 veces por periodos de 5 ' con 200 μ l de **buffer de lavado** por pozo. En el último lavado, se debió eliminar el exceso de buffer de lavado haciendo un golpeteo exhaustivo de las placas sobre papel absorbente
4. Se agregó **buffer de bloqueo** y se incubó por espacio de 1 hr a 37°C.
5. Se repitió paso 3
6. Se añadió el primer anticuerpo en un rango de dilución recomendada de 1 μ L suero: 100 μ L de **buffer de muestra** en los pozos para sueros problema y negativo (Figura 11), por cuadruplicado; y se realizaron diluciones quintuples únicamente con suero control positivo (Figura 11)
7. Se incubó la placa por 1 hora a 37°C
8. Se repitió paso 3

9. Se agregó el 2° anticuerpo (peroxidase-conjugated rabbit anti-dog IgG, Fc fragment specific, no. cat 304-035-008; peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG, Fc fragment specific, no. cat 309-035-008 y peroxidase-conjugated rabbit anti-bovine IgG, Fc fragment specific no. cat 301-035-003 - JACKSON) en una dilución de 1 μ L del 2° anticuerpo : 10,000 μ L del buffer de muestra (de acuerdo al instructivo y especie), agregando 100 μ L de esta dilución por pozo. Se incubó por un tiempo de 1 hr a 37 °C
10. Se repitió paso 3
11. Se colocaron 100 μ L de **solución reveladora** a cada pozo y se incubó por aproximadamente 5 ´ o hasta que el control negativo empezara a colorear e inmediatamente se frenó la reacción con 50 μ L de **solución de frenado** en cada pozo
12. La lectura se realizó con un lector de placas de ELISA a una densidad óptica de 490 nm de longitud de onda en el aparato Microplate Reader Modelo 55 (Biorad - CENID Microbiología-INIFAP)

7.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.6

Se disolvieron los siguientes reactivos en 800 mL de agua bidestilada:

- 3.18g de Na₂CO₃ (Carbonato de sodio)
- 5.86g de NaHCO₃ (Bicarbonato de sodio)

Se ajustó pH a 9.6 con NaOH (Hidroxido de sodio) 1N, se aforó a 1000 mL y su conservación fue a 4°C

- Buffer de muestra

Se disolvieron los siguientes reactivos en 800 mL de agua bidestilada:

25 mL de TRIS-HCL (25 mM)

(Su preparación se realizó disolviendo 3.09 g de Tris-HCL en 800 mL de agua bidestilada. Se ajustó pH a 7.9 bajando pH con ácido sulfúrico y se aforó a 1000 mL)

7.3 g de NaCl (cloruro de sodio, lo que corresponde a 125 mM)

1000 μ L de Tween 20 (1%)

Se aforó a 1000 mL y su conservación fue a 4°C

- Buffer de bloqueo

Se disolvieron los siguientes reactivos:

100 mL de solución de muestra

1g de leche descremada (1%)

- Buffer PBS (1x)

Se disolvieron los siguientes reactivos en 800 mL de agua bidestilada:

8 g de NaCl

1.21g de K₂HPO₄ (fosfato de potasio dibásico)

0.34g de KH₂PO₄ (fosfato de potasio monobásico)

Se ajustó pH a 7.2 y aforar a 1000 mL.

- Buffer PBS + Tween (Buffer de lavado)

Se disolvieron los siguientes reactivos:

1000 mL de PBS 1x

500 mL de Tween 20 (0.05%)

- Solución reveladora (citratos):

A) cido cítrico 0.1 M

Se el siguiente reactivo en 80 mL de agua bidestilada:

2.1 g de C₆H₈O₇ (Acido cítrico)

Se ajustó pH a 4.5 con NaOH 1N, se aforó a 100 mL y su conservación fue a 4°C

B) Citrato de sodio

Se disolvió el siguiente reactivo en 80 mL de agua bidestilada:

2.94 g de Na₂C₆H₆O₇ (Citrato de sodio)

Se ajustó pH a 4.5 con ácido clorhídrico 1N, se aforó a 100 mL y su conservación fue a 4°C

Se preparó en el momento del revelado y por cada placa se hizo una mezcla de:

- 5 mL de ácido cítrico (A)
- 5 mL de citrato de sodio (B)
- 1 tableta de OPD (5 µg de orto-fenilen-diamina)
- 5-7 µL de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno)

Como medida de precaución se usaron guantes y se evitó el contacto con el OPD ya que es un producto carcinogénico (en caso de accidente este reactivo se inactiva con cloro al 50-70%)

- Solución de frenado (Ácido sulfúrico 2N):

Se disolvió el siguiente reactivo en 16.7 ml de agua bidestilada:

3.3ml de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 3 M, PM 98.08, pureza 97.6%

Su preparación se llevó a cabo con sumo cuidado en una cámara de extracción de aire para evitar su contacto en mucosas y piel, ya que es un reactivo corrosivo.

ANEXO 8

PROYECTO CONACYT:

“Utilización de la proteína G del virus de la rabia expresada en un baculovirus, para la estandarización de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) con fines diagnósticos”

Con la finalidad de procesar adecuadamente los sueros problema que nos proporciona, se pide anexe datos de la muestra sérica los siguientes datos:

No. de suero: _____

Sexo: Femenino Masculino

Edad: _____

Procedencia: _____

Vacunado: si no

En el caso de conocer lo datos de la vacunación:

Última fecha de vacunación: ____/____/____

Vacuna aplicada: _____
(Nombre comercial)

Las muestras serán analizadas con la prueba experimental ELISA para conocer el nivel de anticuerpos contra rabia de los individuos de su población.

Agradeciendo su apoyo, se le hará de su conocimiento los resultados de los sueros en el tiempo pertinente.

Firma del donador

ANEXO 9

PROYECTO CONACYT:

“Utilización de la proteína G del virus de la rabia expresada en un baculovirus, para la estandarización de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) con fines diagnósticos”

Con la finalidad de procesar adecuadamente los sueros problema que nos proporciona, se pide anexe datos de la muestra sérica los siguientes datos:

No. de suero: _____

Sexo: Hembra Macho

Edad: _____

Procedencia: _____

Vacunado: si no

En el caso de conocer lo datos de la vacunación:

Última fecha de vacunación: _____ / _____ / _____

Vacuna aplicada: _____
(Nombre comercial)

Las muestras serán analizadas con la prueba experimental ELISA para conocer el nivel de anticuerpos contra rabia de los individuos de su población.

Agradeciendo su apoyo, se le hará de su conocimiento los resultados de los sueros en el tiempo pertinente.

Firma del propietario

ANEXO 10

Prueba rápida de inhibición de foco fluorescente (RFFIT)

- Procedimiento estándar (1, 22)

- **Preparación de la suspensión de virus de inóculo**

i) Tripsinizar un cultivo de 3 días de células de neuroblastoma de ratón (MNA) en botella de 150 ml. Puede obtenerse una línea celular similar (CCL-31) por petición a la ATCC (ver nota 1 a pie de página).

ii) En un tubo cónico de centrifuga de 50 ml, resuspender 3×10^7 células en 2,7 ml de medio mínimo esencial de Tagle (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (EMEM-10).

iii) Con procedimientos estándar de seguridad contra la rabia, añadir 1×10^7 unidades infecciosas del virus de la rabia CVS-11 (ATCC, VR959) y mezclar con el vórtex una vez. Incubar las células y el virus durante 15 minutos a 37°C; durante este tiempo, someter una vez las células al vórtex.

iv) Añadir 10 ml de EMEM-10, mezclar con vórtex, y centrifugar las células a 500 g durante 10 minutos.

v) Eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en 30 ml de medio de cultivo y transferir a una botella de 150 ml.

vi) Agitar el recipiente suavemente para mezclar la suspensión celular y después preparar tres portas con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos pipeteando 0,2 ml de la suspensión celular en un pocillo de cada porta.

[****] Rabies Laboratory, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centres for Disease Control and prevention, Atlanta, Georgia, EE.UU.

vii) Incubar las botellas y los portas a 37°C en un incubador con humedad con 0,5% de CO₂. La botella debe incubarse como cultivo cerrado (tapón ajustado).

viii) A las 20, 40 y 60 horas después de la infección, fijar con acetona y teñir un porta por la técnica de inmunofluorescencia (23) para determinar la infectividad vírica. 24 horas después de que las células muestren un 100% de infectividad (generalmente a las 40 horas de la infección), debe recogerse el sobrenadante.

ix) Transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 50 ml y centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.

x) Distribuir y guardar el sobrenadante a -70°C en alícuotas de 0,5 ml.

• **Titulación de la suspensión vírica de inóculo**

i) Descongelar una alícuota del virus de inóculo y preparar diluciones decimales seriadas (de 10⁻¹ a 10⁻⁸) en EMEM-10.

ii) Distribuir 0.1 ml de cada dilución de virus en un pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. Añadir a cada pocillo 0,2 ml de células MNA suspendidas en EMEM-10 (concentración de 5 x 10⁴ células por 0,2 ml).

iii) Mezclar las células y el virus moviendo suavemente el porta e incubar después durante 40 horas a 37°C en un incubador con humedad y 0,5% de CO₂.

iv) Fijar con acetona y teñir el porta por la técnica de inmunofluorescencia. Se debe observar infección vírica con la dilución 10⁻⁶ del virus, lo que indica que el stock de la suspensión vírica contiene al menos 1 x 10⁶ unidades infecciosas por 0,1 ml. Preparar suficiente virus de inóculo para que no sean necesarios frecuentes pases seriados del virus.

• **Preparación de la suspensión stock de virus**

i) Infectar 3 x 10⁷ células MNA con 1 x 10⁷ unidades infecciosas de la preparación de virus de inóculo (ver anteriormente).

ii) Recoger el sobrenadante 24 después de que las células alcancen el 100% de infectividad (generalmente a las 40 horas de la infección).

iii) Distribuir y guardar el sobrenadante a -70°C en alícuotas de 0,5 ml.

Titulación de la suspensión stock de virus

i) Descongelar una alícuota del virus de inóculo y preparar diluciones decimales seriadas (de 10^{-1} a 10^{-8}) en EMEM-10.

ii) Distribuir 0,1 ml de cada dilución de virus en un pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. Añadir a cada pocillo 0,2 ml de células MNA suspendidas en EMEM-10 (concentración de 1×10^5 células por 0,2 ml).

iii) Mezclar las células y el virus moviendo suavemente el porta e incubar después a 37°C en un incubador con humedad y 0,5% de CO_2 durante 20 horas.

iv) Fijar con acetona y teñir el porta por la técnica de inmunofluorescencia.

Cada pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos contiene 25-50 campos microscópicos distintos cuando se observan a $\times 160-200$ aumentos. Una unidad de virus por la prueba RFFIT se expresa como la dilución a la que el 50% de los campos microscópicos observados contiene uno o más focos de células infectadas (dosis formadora de focos, FFD50). La suspensión stock de virus debe contener al menos 1×10^4 FFD50 por 0,1 ml (es decir, el pocillo con la dilución 10^{-4} de virus debe contener por lo menos un foco de células infectadas en el 50% de los campos microscópicos observados). Una suspensión stock de virus con este título se puede diluir luego a $10^{-2,3}$ para obtener una suspensión de virus que contenga 50 FFD50.

• Sueros de referencia

En cada prueba debe incluirse un suero estándar de referencia nacional o internacional diluido a una potencia de 2,0 IU/ml. El suero de referencia utilizado en los Centros para Control y Prevención de Enfermedades es el primer estándar internacional de inmunoglobulina antirrábica (35) y puede obtenerse del NIBSC (ver nota 2 a pie de página). El suero de referencia debe mantenerse en alícuotas

congeladas en cantidad suficiente para 1 semana de pruebas. También deben prepararse por el laboratorio, e incluirse en cada prueba, un suero control estándar positivo diluido a una potencia de 0,1 IU/ml y un suero control estándar negativo.

• **Sueros problema**

Antes de la prueba los sueros problema deben calentarse a 56°C durante 30 minutos para inactivar el complemento. Si están congelados, deben ser recalentados después de la descongelación. Se pueden preparar diluciones seriadas de los sueros problema en un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. El análisis de las diluciones 1/5 y 1/50 es suficiente para una evaluación rutinaria de la eficacia vacunal y se hacen como se indica:

- i) Preparar una dilución 1/2,5 añadiendo a uno de los portas 0,1 ml del suero inactivado y 0,15 ml de EMEM-10. Mezclar por agitación suave del porta.
- ii) Transferir 0,05 ml de la dilución 1/2,5 a un segundo pocillo que contenga 0,45 ml de EMEM-10. Desechar todo excepto 0,1 ml del pocillo que contiene la dilución 1/2,5.
- iii) Mezclar el segundo pocillo y desechar todo excepto 0,1 ml.
- iv) Añadir a todas las diluciones de suero 0,1 ml de la preparación de stock de virus (que contenga 32-100 FFD₅₀).
- v) Mezclar e incubar a 35°C durante 90 minutos en un incubador con humedad y 5% de CO₂.

• **Adición de células**

- i) Durante el período de incubación, tripsinizar un cultivo de 3-5 días de células MNA.
- ii) Resuspender las células en EMEM-10 a una concentración final de 1 x 10⁵ células por 0,2 ml.

iii) Distribuir 0,2 ml de la suspensión celular en cada pocillo del porta e incubar a 35°C en un incubador con humedad y 5% de CO₂ durante 20 horas.

• **Fijación con acetona y tinción por inmunofluorescencia**

i) Después de 20 horas, sacar los portas del incubador y eliminar el medio vertiéndolo sobre una solución virucida.

ii) Lavar los portas una vez con PBS y luego fijar con acetona fría (-20°C). durante 10 minutos a temperatura ambiente

iii) Dejar secar los portas durante 10 minutos antes de añadir el suero antirrábico conjugado con FITC. El conjugado se puede preparar en EMEM-10 o PBS; no hay necesidad de adsorber el conjugado con papel o células. La dilución del conjugado debe determinarse por titulación. Los portas se tiñen durante 20-30 minutos a 37°C y después se lavan con PBS y agua destilada, respectivamente.

iv) Observar los portas con un microscopio de fluorescencia.

• **Determinación de los títulos de anticuerpo neutralizante**

Los virus residuales se detectan mediante un microscopio normal de fluorescencia. El título de neutralización a punto final del suero se define como el factor de dilución de la dilución más alta de suero a la que el 50% de los campos microscópicos observados contiene una o más células infectadas (es decir, un 97% de reducción en el inóculo vírico). Este valor se puede obtener por interpolación matemática. Alternativamente se puede determinar un título del 100% de neutralización anotando la dilución más alta de suero a la que se neutraliza el 100% del inóculo y no hay células infectadas en ninguno de los campos de observación. Por ambos métodos de titulación, se puede obtener el título de anticuerpo en el suero problema (en IU/ml) mediante comparación con el título del estándar nacional de referencia incluido en cada prueba. Debe señalarse que también resulta válido realizar la prueba RFFIT utilizando células BHK-21 en lugar de células de neuroblastoma.