



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“INFORME DE ACTIVIDAD PROFESIONAL REALIZADO EN EL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA FMVZ-UNAM”**

TRABAJO PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JOSÉ MANUEL SAAVEDRA MONTAÑEZ

ASESOR:

JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

COASESOR:

RAYMUNDO ITURBE RAMÍREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Dios, por regalarme algo pocas veces valorado, la vida.

A mi padre, donde quiera que te encuentres, vives dentro de mi corazón, esto es para ti, te quiero mucho.

A mi madre y hermanos, por el apoyo económico, material, emocional y espiritual. Por estar conmigo en todo momento, mil gracias.

A mi familia, Laurita gracias por tu amor, Dieguito gracias por llegar a mi vida, los amo.

A mis compañeros y amigos de la FES-C, los tengo presentes en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Quienes ayudaron en mi formación profesional.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, Dr. Francisco Basurto Alcántara, Dra. Laura Patricia Noé Martínez. Por su confianza y facilidades brindadas en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo, por confiar y abrirme la puerta a la realización de este gran anhelo.

Al MVZ. Raymundo Iturbe Ramírez, mil gracias por tu asesoría, tiempo, apoyo, paciencia y comprensión durante todo este tiempo.

A los miembros del jurado, MVZ. José Margarito Rojo López, Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo, MVZ. Susana Elvira García Vázquez, Dr. José Francisco Morales Álvarez y MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce. Por sus acertados consejos, sugerencias y correcciones de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de virología: Alberto, Francisco, Dr. Humberto, Miguel, Rebeca, Rodrigo y Rosalba. Gracias por el apoyo incondicional.

ÍNDICE

1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	2-4
3.- OBJETIVO.....	5
4.- ACTIVIDADES REALIZADAS.....	6
4.1.- PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA PARA DIAGNÓSTICO DE RABIA.....	6-10
4.2.- EVALUACIÓN DE CONJUGADO ANTIRRÁBICO.....	11-12
4.3- PRUEBA BIOLÓGICA EN RATONES LACTANTES PARA DIAGNÓSTICO DE RABIA.....	13-17
4.4.- PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN EN RATÓN PARA RABIA.....	18-24
4.5.- EVALUACIÓN DE INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA ANTIRRÁBICA.....	25-26
4.6.- PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA PARA DISTEMPER CANINO.....	27-30
4.7.- ELABORACIÓN DE CONJUGADO CONTRA DISTEMPER CANINO.....	31-33
4.8.- ELABORACIÓN DE CONJUGADO INMUNOFLUORESCENTE CONTRA FIEBRE PORCINA CLÁSICA.....	34-37
4.9.- ASISTENCIA A CURSOS DE CAPACITACIÓN.....	38
5.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	39
5.1.- RABIA.....	39-41
5.2.- DISTEMPER CANINO.....	42-43

5.3.- FIEBRE PORCINA CLÁSICA.....	44
5.4.- CAPACITACIÓN.....	45
6.- OBSERVACIONES.....	46-47
7.- CONCLUSIONES.....	48
8.- ABREVIATURAS.....	49-51
9.- REFERENCIAS.....	52-53

1. RESUMEN

Actividades realizadas en el Departamento de Microbiología e Inmunología (DMEI) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia–Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ–UNAM), en el área de Virología, del 19 de septiembre de 2006 al 11 de diciembre de 2008. Bajo la supervisión del MVZ. Raymundo Iturbe Ramírez.

- A) Procesamiento de 2267 muestras empleando la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD), 2188 para Distemper canino y 79 de Rabia. La observación de estas muestras por microscopia de fluorescencia consumió un tiempo de 445 horas.
- B) Revisión clínica diaria (30 días) de los ratones sometidos a prueba biológica para Rabia (79 casos).
- C) Evaluación del suero de José Manuel Saavedra Montañez y Alejandra Hernández Herrera personal involucrado en el diagnóstico de Rabia en la FMVZ-UNAM, mediante prueba de seroneutralización, iniciada el 27 de Febrero de 2007. El personal fue inmunizado de manera preventiva contra Rabia del en el centro antirrábico, Dr. Luis Pasteur, Av. 510, No.1510, San Juan de Aragón, México D.F.
- D) Preparación de conjugado para Distemper canino (L-160307) a partir de 50 ml de suero de perro.
- E) Evaluación de la inmunogenicidad en perros xoloitzcuintle de una vacuna antirrábica inactivada comercial (PRONABIVE).
- F) Elaboración y evaluación (PRONABIVE y FMVZ-UNAM) de conjugado para Fiebre porcina clásica (FPC) a partir de 1000 ml de suero porcino inmune proporcionado por (CENASA).
- G) Asistencia a cursos de capacitación.

2. INTRODUCCIÓN

Hay hechos que son básicos para comprender la importancia y el desarrollo de la Medicina Veterinaria en nuestro país. Por su trascendencia, la asignatura de Microbiología fue incorporada al plan de estudios de Medicina Veterinaria en 1883, para impartirse a alumnos de cuarto año de la entonces Escuela Nacional de Agricultura y Veterinaria. La instrucción se inició en mayo de 1886 con estudios de microscopio.

El MV. José de la Luz Gómez fue el primer egresado de esta escuela y el primer instructor de la disciplina. En 1887 recibió del Dr. Eduardo Liceaga, junto con las técnicas de cultivo y producción de vacunas antirrábicas, una médula espinal de conejo infectado con virus rábico traídas del Instituto Pasteur, con el objetivo de desarrollarlas en la Escuela de Medicina Veterinaria. Participó también en el tratamiento de un niño mordido por un perro rabioso, que consistió en la aplicación por primera vez en el continente americano de la vacuna antirrábica. A partir de entonces se inicia el servicio de vacunación antirrábica en perros. ⁽¹⁾

La epizootia de Fiebre Aftosa en 1946 impulso el desarrollo de la Inmunología, Virología, Epizootiología, la producción de vacunas y la constatación de biológicos veterinarios. El plan de estudios de 1955 incluyó las asignaturas de Virología y prácticas de enfermedades infecciosas que habían cobrado un gran impulso a raíz de esta epizootia. En ese mismo año y junto con el cambio de las escuelas y facultades a la Ciudad Universitaria, comenzaron a funcionar los departamentos de Microbiología, Virología e Inmunología. En el año de 1994 se unieron para formar el actual de Microbiología e Inmunología con la jefatura inicial de la Dra. Aurora Velázquez Echegaray. El departamento obtiene en el 2004 la certificación NMX-CC-9001-2000-IMNC para los servicios de diagnóstico en Virología, Serología y Unidad de Bioseguridad. ⁽²⁾

El departamento imparte las asignaturas de Inmunología, Virología, Bacteriología y Micología, en licenciatura y posgrado, realiza investigación a través de tesis y proyectos, proporciona también diversos servicios al público. Ofrece además talleres de actualización

y capacitación específica en diversas pruebas de laboratorio, brinda conferencias en foros nacionales y extranjeros, y apoya a otros departamentos en actividades diversas. ⁽²⁾

El impacto de las actividades del departamento es amplio y diverso e incide en:

- 1) Formación de recursos humanos a nivel técnico, licenciatura y posgrado.
- 2) Difusión de campañas de control y erradicación de enfermedades de importancia nacional e internacional, incluyendo zoonosis y exóticas.
- 3) Servicios de diagnóstico para varias enfermedades de los animales.
- 4) Monitoreo bacteriológico de agua y alimentos.
- 5) Constatación de productos biológicos.
- 6) Investigación y difusión de tópicos relacionados con el departamento.

Los servicios de diagnóstico que ofrece al público abarcan: Bacteriología, Micología, Serología, Virología, Constatación de Biológicos, Diseño y Estandarización de Técnicas Moleculares.

La Unidad de Aislamiento, los laboratorios de Serología y Virología están autorizados por la Dirección Nacional de Salud Animal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) para realizar análisis de Brucelosis, Tuberculosis y Rabia. ⁽²⁾

La profesión tiene un vasto ámbito de opciones laborales, actualmente estoy adscrito al departamento de Microbiología e Inmunología FMVZ-UNAM, ahí me desempeño como: Suplente del diagnóstico virológico, realizo actividades de diagnóstico para Rabia, Distemper canino y evaluación de productos biológicos virales.

RESPONSABILIDADES: ⁽³⁾

- a) Dominar las bases teóricas y prácticas de las pruebas y procedimientos para el área de diagnóstico.
- b) Conocer y aplicar el contenido de los procedimientos documentados para esa área de diagnóstico.
- c) Procesar las muestras de acuerdo al manual de métodos de prueba del laboratorio.
- d) Efectuar el control de calidad de los insumos biológicos y no biológicos necesarios para el proceso de diagnóstico.
- e) Conocer el manejo de residuos peligrosos generados en el laboratorio y aplicarlo a éstos.
- f) Conocer y emplear el manejo y métodos de sacrificio de los animales utilizados.
- g) Participar en la implantación, implementación y mantenimiento del sistema de gestión de la calidad del laboratorio.
- h) Capacitar al personal de nuevo ingreso con relación al proceso de diagnóstico y métodos de prueba.

3. OBJETIVO

Describir las actividades profesionales realizadas del 19 de septiembre del 2006 al 11 de diciembre del 2008 en el DMEI-FMVZ-UNAM, mostrar los resultados obtenidos, analizar y discutir sus repercusiones en el trabajo profesional.

3. ACTIVIDADES REALIZADAS

4.1 PRUEBA DE INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA PARA DIAGNÓSTICO DE RABIA.

Esta prueba se utiliza para determinar la presencia o ausencia del virus de la Rabia en improntas de tejidos de animales sospechosos de la enfermedad. ⁽⁴⁾ Los anticuerpos contra Rabia están marcados con el colorante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC), el cual emite luz (por un tiempo $\leq 10^7$ segundos) cuando se expone a radiaciones de 490 nm de λ . Si se aplica el conjugado a la muestra y esta contiene el virus de la Rabia se forma un complejo antígeno-anticuerpo que se puede observar en un color verde-amarillento brillante en un microscopio para inmunofluorescencia. ^(4,5,6)

EQUIPO E INSTRUMENTOS:

- Incubadora a 37°C.
- Congelador.
- Microscopio para inmunofluorescencia.
- Autoclave.
- Campana de flujo laminar.

MATERIAL:

- Portaobjetos (25 x 75 mm).
- Cubreobjetos (22 x 22 mm).
- Abate lenguas de madera exentos de cera. ⁽⁴⁾
- Lápiz con punta de diamante.
- Cámara húmeda.
- Cajas de Coplin.
- Papel filtro.
- Pinzas y tijeras.
- Cajas de petri.
- Tubos de ensayo (13 x 100).
- Pluma marcadora o corrector.

REACTIVOS:

- Glicerina amortiguada pH de 8.3 a 8.5. ⁽⁷⁾
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.2.
- Acetona.
- Agua destilada.

EQUIPO DE BIOSEGURIDAD:

- Bata.
- Guantes de látex texturizado.
- Lentes de protección.
- Cubre bocas.

BIOLÓGICOS:

- Muestra sospechosa (encéfalo, glándulas salivales, medula espinal).
- Conjugado antirrábico monoclonal, marcado con FITC, de laboratorios Baer, S.A.
- Portaobjetos con impresiones de encéfalo infectado con virus rábico y sin infectar.

PROCEDIMIENTO:

1. Identificar el portaobjetos con el número de caso.
2. En el extremo de un abate lenguas colocar un trozo (0.5 x 0.3 cm) de encéfalo, presionar contra éste un portaobjetos. (Figura 1).
3. Dejar secar la impresión a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Fijar la muestra, en acetona (-20°C), 30 minutos mínimo. ⁽⁶⁾ (Figura 2).
5. Sacar las laminillas de la acetona y esperar a que ésta se evapore.
6. Delimitar con lápiz de punta diamante la impresión con un círculo de 1 cm. de diámetro aproximadamente, para evitar que el conjugado se extienda y seque.
7. Sacar del congelador los testigos positivos y negativos.
8. Hacer una dilución 1/5 del conjugado (0.02 ml) con PBS (0.08 ml).

9. Depositar y extender el conjugado sobre la impresión delimitada. (Figura 3).
10. Colocar los portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a 37°C durante 30 minutos. (Figura 4).
11. Lavar las laminillas con PBS y luego sumergir la caja en un recipiente con la misma solución durante 10 minutos.
12. Enjuagar con agua destilada.
13. Colocar las laminillas verticales para eliminar el exceso de agua y se sequen.
14. Añadir glicerina amortiguada con un pH de 8.3-8.5 a las impresiones.
15. Cubrir las con un cubreobjetos.
16. Observar las preparaciones en microscopio para inmunofluorescencia, equipado con lámpara HBO 50, filtro primario 450-490 nm, secundario 510 nm y oculares 40 y 100 X.
17. Observar el testigo positivo y después el negativo y por último la muestra problema.



Figura 1. Preparación de impronta.

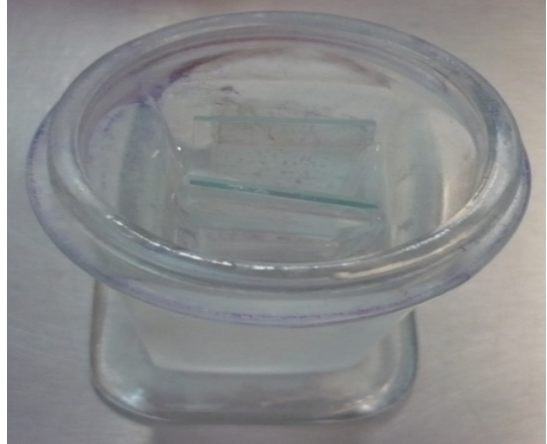


Figura 2. Improntas fijando en acetona.

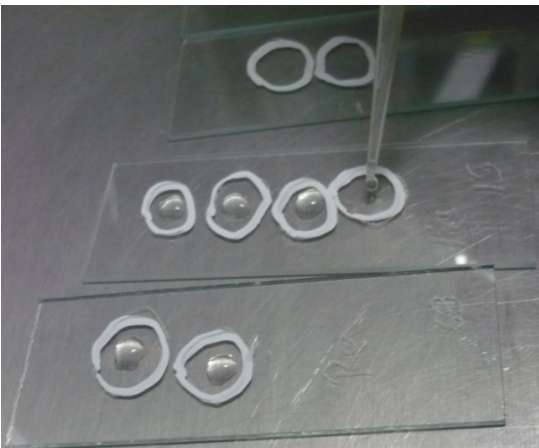


Figura 3. Aplicación de conjugado.

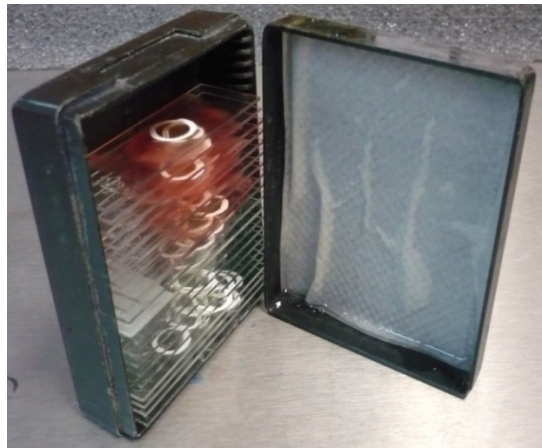


Figura 4. Portaobjetos en cámara húmeda.

LECTURA DE LA PRUEBA:

Si se observa inmunofluorescencia similar al testigo positivo, la muestra también lo es.

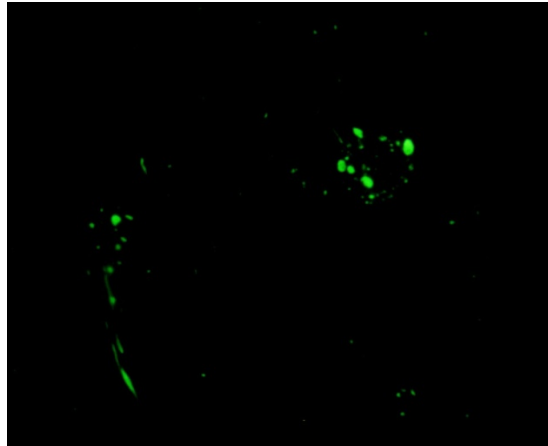


Figura 5. Muestra positiva.

Cuando no se observa inmunofluorescencia, la muestra es negativa.

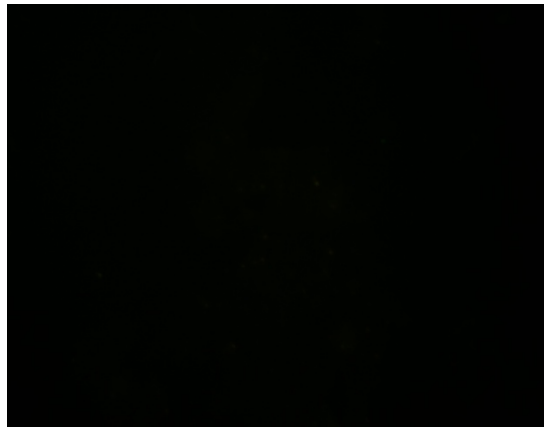


Figura 6. Muestra negativa.

4.2 EVALUACIÓN DEL CONJUGADO ANTIRRABICO.

El producto utilizado en el DMEI es de anticuerpos monoclonales específicos contra la nucleoproteína del virus rábico, marcado con FITC, se compra a laboratorios Baer, S.A. y se transporta en recipientes térmicos a $\leq 0^{\circ}\text{C}$. Los siguientes aspectos se evalúan en cuanto llega al laboratorio:

- Tipo y condiciones del envase en el que se transportó.
- Presencia y estado de los refrigerantes.
- Temperatura del(os) frasco(s) del conjugado.

Registrar los datos obtenidos en la bitácora de control de medios y reactivos biológicos, incluyendo:

- a) Nombre del producto (conjugado/reactivo biológico).
- b) Lote #.
- c) Cantidad de frascos/lote.
- d) Resultados de las pruebas realizadas.

PROCEDIMIENTO PARA TITULAR CONJUGADO ANTIRRABICO.

Descongelar un vial del conjugado (1 ml), tomar una alícuota de 0.02 ml, realizar con ella diluciones dobles seriadas (2, 4, 8, 16 y 32) en PBS, pH 7.2. Cada dilución se coloca por separado sobre laminillas previamente preparadas con impresiones (5mm de diámetro) de tejido nervioso infectado con virus rábico y otra con tejido sin infectar. Las preparaciones se colocan en una cámara húmeda e incuban a $37^{\circ}\text{C}/30$ minutos. Posteriormente lavar con PBS y enseguida con agua destilada durante 5 segundos. Secar las laminillas a temperatura ambiente y proceder a leerlas en el microscopio.

La evaluación del producto se realiza cada dos años, si el conjugado no muestra el comportamiento esperado, se identifica para evitar su utilización y se notifica por escrito al proveedor, para que proporcione otro lote, el cual se somete a las mismas pruebas. Todo se registra en la bitácora correspondiente.

El conjugado debe tener las características mínimas expresadas en el (Cuadro 1).

Se emplea la mayor dilución (título) que muestre la máxima:

Cantidad de antígeno (4+).

Intensidad específica (4+).

Y tinción inespecífica de (0).

El grado de intensidad específica y de tinción inespecífica son términos característicos, reconocidos por la O.M.S.).⁽⁸⁾

Los conjugados son almacenados a -70°C.⁽⁸⁾

Cuadro 1. Evaluación de conjugado contra Rabia L=0503/Baer, efectuado el 12.06.07.

	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Dilución del producto	1/2	1/2	1/4	1/4	1/8	1/8	1/16	1/16
Cantidad de antígeno	4	0	4	0	4	0	2	0
Intensidad específica	4	0	4	0	4	0	3	0
Tinción inespecífica	0	0	0	0	0	0	0	0

Título = 8

4.3 PRUEBA BIOLÓGICA EN RATONES LACTANTES PARA DIAGNÓSTICO DE RABIA.

INTRODUCCIÓN:

La prueba biológica (PB) determina la presencia del virus de la Rabia a través de la signología que presentan los ratones lactantes de 1 a 21 días inoculados con una suspensión de tejido nervioso sospechoso.⁽⁴⁾

La prueba confirma el resultado obtenido con la técnica de IFD.

ELEMENTOS:

- Muestra problema.
- Ratones CF1.

EQUIPO E INSTRUMENTOS:

- Centrifuga clínica o refrigerada.
- Refrigerador.
- Congelador.
- Campana de flujo laminar.

EQUIPO DE BIOSEGURIDAD:

- Guantes de látex texturizado.
- Cubre bocas
- Lentes.
- Mascarilla.

MATERIALES:

- Mortero de porcelana con pistilo o mortero de Tembröeck.
- Pinzas y tijeras.
- Tubos de ensaye (13 x 100).
- Jeringas de insulina calibre 27.

- Algodón.
- Alimento para ratones.
- Jaulas, comederos y bebederos para ratones.

REACTIVOS:

- Solución amortiguadora de fosfatos PBS, pH 7.2-7.4.
- Éter.
- Antibióticos: penicilina (400,000 UI/ml), estreptomina (1000 mg/ml).

BIOLÓGICOS:

- Ratones lactantes de 1 a 21 días, cepa CF1, del mismo sexo.
- Las muestras pueden ser frescas, refrigeradas, congeladas o conservadas en una solución de glicerina amortiguada. Estas últimas deben lavarse con PBS tres veces a intervalos de 10 minutos. Las muestras congeladas deben descongelarse previamente.

PROCEDIMIENTO:

1. Se prepara una suspensión de la muestra problema al 10% peso/volumen que servirá de inóculo para los ratones. Pesar 1.0 g de tejido, agregar 9.0 ml de PBS, macerar, añadir antibiótico para obtener la concentración de (100 UI de penicilina y 100 µg de estreptomina/ml). (Figuras 7 y 8).
2. Dejar actuar el antibiótico por 6 a 24 horas. (Figura 9).
3. Centrifugar a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C.
4. Anestesiarse los ratones con éter e inocular mínimo 5 animales por vía intracerebral con 0.03 ml de inóculo. (Figura 10).

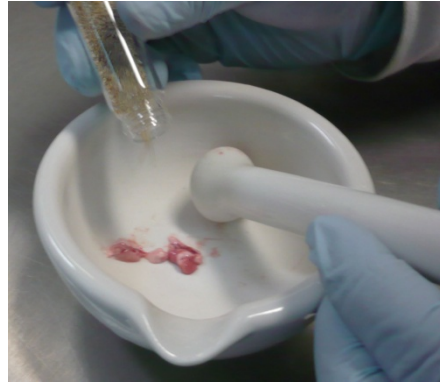


Figura 7. Preparación de inóculo.



Figura 8. Se agrega PBS, Penicilina/Estreptomina.



Figura 9. Inóculo con antibiótico.

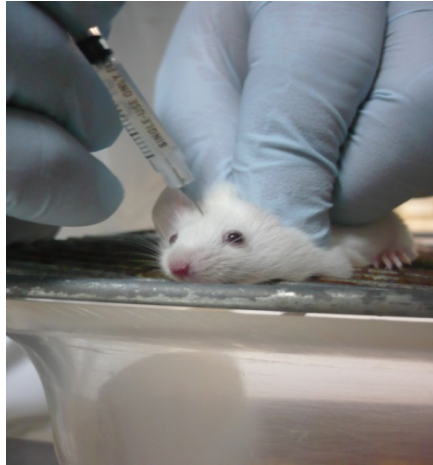


Figura 10. Inoculación vía intracerebral.

LECTURA DE RESULTADOS:

Observar los animales inoculados diariamente por 30 días, la muerte de los ratones en las primeras 72 horas se atribuye a (toxicidad, contaminación y traumatismo) y no se toman en cuenta.⁽⁴⁾

El diagnóstico es negativo si los ratones sobreviven el periodo de observación.⁽⁴⁾ (Figura 11).



Figura 11. Ratones sin signos nerviosos, 30 días postinoculación.

El resultado es positivo cuando los ratones además de presentar signos nerviosos (tremores, incoordinación, ataxia, parálisis postración y muerte), resultan positivos al realizar la prueba de IFD. Es posible ganar tiempo en esta prueba, si a partir del 5° día se sacrifica un ratón al azar y se realiza la prueba de IFD aún sin que los animales presenten signos.⁽⁴⁾ (Figura 12).



Figura 12. Ratones con signos nerviosos, 6 días postinoculación.

El registro de los animales positivos y muertos de la prueba biológica se hace en el formato FS4-MEI-MV-004B.

Terminado el periodo de observación, los animales sobrevivientes son sacrificados⁽⁹⁾ y se disponen de acuerdo al procedimiento PMRP-UNAM-MV-001 para el manejo de residuos peligrosos.

4.4 PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN EN RATÓN PARA RABIA.

INTRODUCCIÓN:

Esta prueba cuantifica los anticuerpos contra el virus de la Rabia en muestras de suero de caninos o personas que han sido vacunados o están expuestos al virus.

GENERALIDADES:

Determinar el nivel de anticuerpos contra el virus de la Rabia realizando diluciones base 5 del suero que después se mezclan con una cantidad constante de virus, incuban e introducen en un sistema huésped (ratón) si el virus está sin neutralizar, se produce el efecto de muerte en los ratones. ⁽¹⁰⁾

ELEMENTOS DE LA PRUEBA:

- Muestra problema.

EQUIPO E INSTRUMENTOS:

- Campana de flujo laminar.
- Estufa de 37°C.
- Jaulas para ratones.
- Congelador (-70°C).

EQUIPO DE SEGURIDAD:

- Guantes de látex texturizado.
- Lentes de protección.
- Cubre bocas.
- Bata.

MATERIALES:

- Gradilla.
- Tubos de ensaye.

- Pipetas.
- Pipetas de seguridad o propipetas.
- Charola con hielo.
- Jeringa de insulina con aguja calibre 27.
- Algodón.
- Alimento para ratones.

REACTIVOS:

- PBS.
- Éter.

BIOLÓGICOS:

- Ratones de 21 días (11-13 g), cepa CF1.
- Suero testigo positivo de referencia.
- Suero testigo negativo de referencia.
- Virus rábico de confrontación (CVS) al 20% (Suspensión de cerebro de ratón infectado) Titulo = 5.5 DLRA 50%/ml.

Los sueros testigo y el CVS se conservan a -70°C .

PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA:

Los sueros deben estar sin hemolizar, contaminar e inactivados a 56°C por 30 minutos y congelados hasta la realización de la prueba.

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar tres filas de 5 tubos cada una, identificar de la siguiente manera:
 - a) Suero problema.
 - b) Suero positivo.
 - c) Suero negativo.
2. Agregar 0.8 ml de diluyente PBS en cada uno de los tubos.
3. Agregar 0.2 ml de suero problema en el primer tubo.

4. Mezclar y transferir 0.2 ml al siguiente tubo, mezclar y transferir 0.2 ml y así sucesivamente, hasta llegar al tubo 5, obteniendo las diluciones de suero de 1:5 a 1:3125 (quíntuples seriadas) en un volumen final de 0.8 ml. (Cuadros 3 y 4).
5. Realizar lo mismo con los sueros testigo. (Cuadros 5 y 6).
6. Adicionar 0.5 ml de CVS previamente titulado y diluido para proporcionar 180 DLRA50%. (Cuadro 7).
7. Tapar los tubos y agitar.
8. Para evaluar si las DLRA50% calculadas corresponden con las empleadas, se diluye una parte del CVS utilizado para someterlo a las condiciones de prueba.
9. Incubar a 37°C durante 90 minutos.
10. Después todos los tubos se colocan en un recipiente a -4°C.
11. Anestesiarse con éter los ratones a inocular 7, por cada dilución, con 0.03 ml por vía intracerebral. Se repite la misma operación con los sueros y con el virus testigo.

CALCULO DE LAS DOSIS DE DESAFIO:

Para hallar la dilución CVS que contenga 180 dosis letales ratón adulto 50% (DLRA50%) en 0.03, se resta el logaritmo de 180 (2.2) del logaritmo del título. $5.5 - 2.2 = 3.3 =$ anti logaritmo 1995, la preparación CVS debe diluirse 1: 1995, agregando 0.5 ml de diluyente por cada 1 ml de la dilución al $10^{-3.3}$ de esta forma, la dilución final contendrá 180 DLRA 50%.⁵⁰ de virus por 0.03 ml. ⁽¹⁰⁾ (Cuadro 2).

PREPARACIÓN DEL VIRUS DE DESAFIO:

Cuadro 2. Preparación de diluciones décuples 1/2, 1/20, 1/200, 1/2000, 1/20000, 1/200000 = $(10^{0.3}, 10^{1.3}, 10^{2.3}, 10^{3.3}, 10^{4.3}, 10^{5.3})$

TUBO	0	1	2	3	4	5
CVS	0.5 ml					
Volumen de transferencia		0.3ml	0.4 ml	2 ml	0.3ml	0.3 ml
Diluyente PBS	0.5 ml	2.7 ml	3.6 ml	18 ml	2.7 ml	2.7ml
Dilución	1/2	1/20	1/200	1/2000	1/20000	1/200000
Lograda	$2 \times 10^{0.3}$	$2 \times 10^{1.3}$	$2 \times 10^{2.3}$	$2 \times 10^{3.3}$	$2 \times 10^{4.3}$	$2 \times 10^{5.3}$
Volumen final	1 ml	3 ml	4 ml	20 ml	3 ml	3 ml

SERONEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS: (cuadros 3 al 7).

Preparación de diluciones seriadas de los sueros: 1/5, 1/25, 1/125, 1/ 625, 1/3125 = (0.69, 1.39, 2.09, 2.79, 3.49).

Los sueros se Inactivan a 56°C/30 minutos.

Cuadro 3. Dilución del suero AH.

DILUCIÓN	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
Suero AH	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Diluyente	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
Volumen de transferencia	0.2 ml				
Volumen final	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml

Cuadro 4. Dilución del suero testigo MS.

DILUCIÓN	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
Suero MS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Diluyente	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
Volumen de transferencia	0.2 ml				
Volumen final	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml

Cuadro 5. Dilución del suero testigo negativo.

DILUCIÓN	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
Suero testigo negativo (SFB)	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Diluyente	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
Volumen de transferencia	0.2 ml				
Volumen final	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8ml	0.8ml

Cuadro 6. Dilución del suero testigo positivo.

DILUCIÓN	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
Suero testigo positivo (EQ REF)	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Diluyente	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
Volumen de transferencia	0.2 ml				
Volumen final	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml

Cuadro 7. Mezcla de CVS con sueros (-), (+), AH, y MS.

TUBOS	1-5 CVS	1/5 a 1/3125 SFB (-)	1/5 a 1/3125 EQ REF (+)	1/5 a 1:3125 AH	1/5 a 1/3125 MS
		0.5 ml c/u	0.5 ml c/u	0.5 ml c/u	0.5 ml c/u
CVS		0.5 ml 10 ^{-3.3} c/u	0.5 ml 10 ^{-3.3} c/u	0.5 ml 10 ^{-3.3} c/u	0.5 ml 10 ^{-3.3} c/u
Volumen final	3, 4, 20, 3, 3.	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Incubar a 37°C durante 1.5 horas, inocular intracerebralmente 0.03 ml de cada dilución a lotes de 7 ratones de 21 días (11 a 13 g de peso).

Colocar los grupos de ratones en diferentes recipientes rotulados y mantener diariamente en observación; tomar nota de los que mueren a partir del sexto día.

El período de observación de los animales inoculados debe ser de 30 días, la muerte de los ratones en las primeras 72 horas se considera inespecífica.

El suero testigo positivo debe neutralizar hasta la dilución donde hay las 180 DLRA 50%.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS: Empleando el método de Reed y Muench. ⁽¹⁰⁾
(Cuadros 8 al 12).

Cuadro 8. Resultado del CVS

LOGARITMO DILUCIÓN	1.3 1/20	2.3 1/200	3.3 1/2000	4.3 1/20000	5.3 1/200000
# Inoculados	7	7	7	7	7
Vivos *	0	0	2	7	7
Muertos +	7	7	5	0	0
Suma vivos	0	0	2	9	16
Suma muertos	19	12	5	0	0
Total	19	12	7	9	16
% Muertos	100	100	71.42	0	0
$Dp = \frac{MM50\% - 50(k)}{MM50\% - Mm50\%} \times \log \text{ dilución} = \frac{71 - 50}{71 - 0} = 0.29 \times \log \text{ fac dilución (1)} = 0.29$					
$3.3 + 0.29 = 3.59$ $1/0.03 = 33.33 = \log 1.52$			$3.59 + 1.52 = 5.11/\text{ml}$		

Cuadro 9. Resultado del suero testigo positivo.

LOGARITMO	0.69	1.39	2.09	2.79	3.49
DILUCIÓN	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
# Inoculados	7	7	7	7	7
Vivos *	7	7	7	6	6
Muertos +	0	0	0	1	1
Suma vivos	33	26	19	12	6
Suma muertos	0	0	0	1	2
Total	33	26	19	13	8
% Muertos	0	0	0	7.69	25
$Dp = \frac{50(k) - Mm50\%}{MM50\% - Mm50\%} \times \log \text{ dilución} = \frac{50 - 25}{100 - 25} = 0.33 \times \log \text{ fac dilución (0.69)} = 0.23$					
$3.49 + 0.23 = 3.72$					
$\text{dil fin ref} \quad \text{dil fin prob} \quad \text{patr suero ref}$					
$-3.72 \quad - \quad (-3.72) = 0 \quad \text{antilog} = 1 \quad \times 100 = 100 \text{ UI}$					

Cuadro 10. Resultado del suero testigo negativo.

LOGARITMO	0.69	1.39	2.09	2.79	3.49
DILUCIÓN	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
# Inoculados	7	7	7	7	7
Vivos *	1	1	2	1	1
Muertos +	6	6	5	6	6
Suma vivos	6	5	4	2	1
Suma muertos	6	12	17	23	29
Total	12	17	21	25	30
% Muertos	50	70.58	80.95	92	96.66
$Dp = \frac{50(k) - Mm50\%}{MM50\% - Mm50\%} \times \log \text{ dilución} = \frac{50 - 49}{70 - 49} = 0.04 \times \log \text{ fac dilución (0.69)} = 0.03$					
$1.39 + 0.03 = 1.42$					
$\text{dil fin ref} \quad \text{dil fin prob} \quad \text{patr suero ref}$					
$-3.72 \quad - \quad (-1.42) = -2.3 \quad \text{antilog} = 0.005 \quad \times 100 = 0.5 \text{ UI}$					

Cuadro 11. Resultado del suero MS.

LOGARITMO	0.69	1.39	2.09	2.79	3.49
DILUCIÓN	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
# Inoculados	7	7	7	7	7
Vivos *	7	7	7	7	6
Muertos +	0	0	0	0	1
Suma vivos	34	27	20	13	6
Suma muertos	0	0	0	0	1
Total	34	27	20	13	7
% Muertos	0	0	0	0	14.28
$Dp = \frac{50(k) - Mm50\%}{MM50\% - Mm50\%} \times \log \text{ dilución} = \frac{50 - 14}{100 - 14} = 0.41 \times \log \text{ fac dilución (0.69)} = 0.29$					
$3.49 + 0.29 = 3.78$					
$\text{dil fin ref} \quad \text{dil fin prob} \quad \text{patr suero ref}$					
$-3.72 \quad - \quad (-3.78) = 0.06 \quad \text{antilog} = 1.14 \quad \times 100 = 114 \text{ UI}$					

Cuadro 12. Resultado del suero AH.

LOGARITMO DILUCIÓN	0.69 1/5	1.39 1/25	2.09 1/125	2.79 1/625	3.49 1/3125
# Inoculados	7	7	7	7	7
Vivos *	5	4	0	1	1
Muertos +	2	3	7	6	6
Suma vivos	11	6	2	2	1
Suma muertos	2	5	12	18	24
Total	13	11	14	20	25
% Muertos	15.38	45.45	85.71	90	96
$Dp = \frac{50(k) - Mm50\%}{MM50\% - Mm50\%} \times \log \text{ dilución} = \frac{50 - 45}{85 - 45} = 0.12 \times \log \text{ fac dilución } (0.69) = 0.08$					
$2.09 + 0.08 = 2.17$					
$\begin{matrix} \text{dil fin ref} & \text{dil fin prob} & & \text{patr suero ref} \\ -3.72 & -(-2.17) & = -3.56 \text{ antilog} = 0.028 & \times 100 = 2.81 \text{ UI} \end{matrix}$					

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

- A) El suero con anticuerpos neutraliza al virus y el ratón vive.
- B) El suero sin anticuerpos no neutraliza al virus y el ratón muere.
- C) El suero testigo negativo no neutraliza al virus en ninguna dilución y todos los animales mueren.

Para expresar en unidades internacionales (UI) la actividad de un suero problema, se compara su poder neutralizante con el de un suero de referencia. Para ello se calcula la diferencia entre los logaritmos de las diluciones finales del 50% de ambos sueros.⁽¹⁰⁾

4.5 EVALUACIÓN DE LA INMNOGENICIDAD DE UNA VACUNA ANTIRRÁBICA.

Las vacunas evitan la infección, la presentación de la enfermedad, e incluso la muerte. Actualmente las vacunas deben satisfacer diversos requisitos internacionales y nacionales, que pueden cambiar dependiendo de información, tecnología y recursos disponibles. ⁽⁸⁾

Esta prueba se realiza en la semilla maestra del biológico en prueba, para corroborar su efectividad, la cual debe efectuarse en animales susceptibles, de edad y peso establecidos, libres de anticuerpos específicos los cuales deben inocularse por la vía recomendada en el protocolo de manufactura. ⁽¹¹⁾

Con la finalidad de ofrecer productos que cumplan con la normatividad vigente, se evaluó la inmunogenicidad de una vacuna antirrábica inactivada, cepa Pasteur (PV) en perros Xoloitzcuintle. Empleando la prueba de seroneutralización (SN) en ratón, con 180 DLRA50%.

MATERIAL:

- Vacuna antirrábica inactivada cepa PV, con adyuvante.
- Cuatro perros de raza Xoloitzcuintle clínicamente sanos, sin vacunar, desparasitados (48 hrs antes de ser vacunados), peso promedio de 15 kg, 3 hembras y 1 macho, edad 5 años.

MÉTODO:

- Calendario de inoculación, se aplicaron dos dosis los días 12 (0) y 19 (7) de agosto del 2007, volumen 1.0 ml, vía intramuscular.
- Cinco sangrías, los días 0, 7, 14, 21 y 28.
- Prueba de seroneutralización en ratón, se realizaron dos ensayos con:
 - Sueros de los días 0 y 14, total 12 sueros. Del 27/08 al 10/09/del 2008.

- Sueros de los días 7, 21 y 28, total 16 sueros. Del 03/09 al 13/10 del 2008
- Diluciones de suero empleadas: 5, 25, 125, 625 y 3125.
- DLRA 50%, se emplearon 180.
- CVS: Título 5.34/1 ml.
- Animales utilizados: 980 ratones CF1 de 21 días, 420 para el primer ensayo y 560 para el segundo.

Cuadro 13. Material de apoyo.

	ENSAYO 1	ENSAYO 2
Ratones	420	560
PBS	120 ml	160 ml
Tubos con tapa	61	81
Jaulas con bebedero	60	80
Jeringas de 0.5 ml	60	80
Jeringas de 5 ml	10	10
Gradillas	4	5
Pipetas de 1 ml	12	15
Pipetas de 5 ml	12	15
Pipetas de 10 ml	12	15
Torundas	60	80
Alcohol	200 ml	300 ml
Etiquetas	60	80
Cinta adhesiva	1	1
Pipeteros	3	3
Refrigerantes	10	15
Frascos de 200 ml	1	1

El procedimiento y cálculo de resultados se adaptó de la metodología empleada en el punto 4.4.

Cuadro 14. Resultados (UI). Empleando el método Reed y Muench ⁽¹⁰⁾.

DIA	PERRO				TESTIGO	
	A	B	C	D	POSITIVO	NEGATIVO
0	0.28	0.28	0.29	0.28	100	0.28
7	0.28	64.56	0.28	0.28		
14	2.95	281.83	91.20	75.85	100	0.28
21	12.88	380.18	28.84	67.60		
28	1.41	380.18	30.19	60.25		

4.6 PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA PARA DISTEMPER CANINO.

INTRODUCCIÓN:

Esta prueba se usa para descubrir antígenos virales en improntas de tejidos sospechosos. Los anticuerpos contra el virus de Distemper canino (VDC) se conjugan químicamente con el colorante fluorescente FITC, el cual produce fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta. Si se aplica un conjugado a la muestra que contiene el VDC se forma un complejo marcado antígeno-anticuerpo y se puede observar fluorescencia verde-amarillo brillante en un microscopio de fluorescencia. ^(5, 6)

EQUIPO E INSTRUMENTOS:

- Incubadora a 37°C.
- Congelador.
- Microscopio para inmunofluorescencia.
- Autoclave.
- Campana de flujo laminar.

MATERIAL:

- Portaobjetos (25 x 75 mm).
- Cubreobjetos (22 x 22 mm).
- Abate lenguas de madera exentos de cera. ⁽⁴⁾
- Lápiz con punta de diamante.
- Cámara húmeda.
- Cajas de Coplin.
- Pinzas y tijeras.
- Tubos de ensayo (13 x 100).
- Pluma marcadora o corrector.

EQUIPO DE BIOSEGURIDAD:

- Bata.
- Guantes de látex texturizado.
- Lentes de protección.
- Cubre bocas.

REACTIVOS:

- PBS, pH 7.2.
- Acetona.
- Agua destilada.
- Glicerina amortiguada pH de 8.3 a 8.5. ⁽⁷⁾

BIOLÓGICOS:

- Muestra sospechosa (encéfalo, sangre, impronta conjuntival).
- Conjugado contra Distemper canino.
- Portaobjetos con impresiones de tejido positivas y negativas al virus de Distemper canino.

PROCEDIMIENTO:

ENCÉFALO:

1. Identificar el número de caso en el portaobjetos.
2. En el extremo de un abate lenguas, colocar un trozo pequeño de encéfalo y presionar contra el portaobjetos, las impresiones deben ser delgadas.
3. Dejar secar la impresión a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Fijar la muestra, en acetona (-20°C), 30 minutos mínimo. ⁽⁶⁾
5. Sacar las laminillas de la acetona y esperar a que se evapore.

6. Delimitar la impresión con un círculo de 1 cm² de diámetro aproximadamente para evitar que el conjugado se extienda y se seque.
7. Sacar del congelador los controles positivos y negativos.
8. Hacer una dilución 1/5 del conjugado con PBS.
9. Depositar el conjugado sobre la impresión delimitada cubriéndola.
10. Colocar los portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a 37°C durante 30 minutos.
11. Lavar las laminillas con PBS y luego sumergir la caja en un recipiente con la misma solución durante 10 minutos.
12. Enjuagar con agua destilada.
13. Colocar las laminillas verticales para eliminar el exceso de agua y se sequen.
14. Para observar la laminilla se debe agregar glicerina amortiguada con un pH de 8.3 a 8.5.⁽⁷⁾
15. Cubrir con un cubreobjetos.
16. Observar en microscopio de inmunofluorescencia, filtros primarios 450-490 nm y secundarios 510 nm.
17. Observar primero el testigo positivo, después el testigo negativo y por último la muestra problema.

SANGRE:

1. Se realiza un frotis sanguíneo previa agitación de la muestra por 30 segundos y continuar a partir del punto 3.

IMPRONTA CONJUNTIVAL:

1. Con un hisopo se toma una muestra de la conjuntiva, se deposita sobre un portaobjetos y se continua a partir del punto 3.

LECTURA DE LA PRUEBA:

Cuando se observa Inmunofluorescencia similar al testigo positivo la muestra es positiva.

Figura 13.

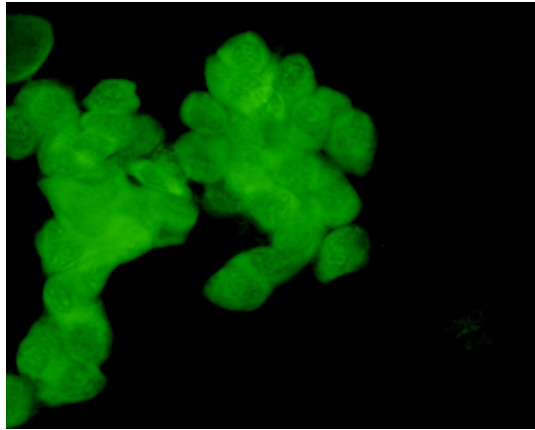


Figura 13. Muestra positiva (impronta conjuntival).



Figura 14. Muestra negativa (impronta conjuntival).

4.7 ELABORACIÓN DE CONJUGADO CONTRA DISTEMPER CANINO.

SUERO HIPERINMUNE

Un suero hiperinmune es aquel procedente de un animal al cual se le ha expuesto en repetidas ocasiones a un mismo antígeno. El suero utilizado en este caso se elaboró en el laboratorio de Virología DMEI-FMVZ empleando perros, con base en lo señalado por Larghi, O.P. ⁽⁷⁾

Cuadro 15. Esquema de vacunación al que se sometieron los perros.

DIA	ACTIVIDAD
0	Recepción y observación de los animales
1	Sangrado de animales para determinar Igs contra Distemper canino (DC)
2	Prueba de SN para DC
3	1 ^a inoculación con virus vacunal (VA) de DC, 2 ml/IM
10	2 ^a inoculación con VA de DC, 4 ml/IM
17	3 ^a inoculación con VA de DC, 4 ml/IM, sangrado y evaluación de Igs vs DC
24	4 ^a inoculación con VA de DC, 4 ml/IM, sangrado y evaluación de Igs vs DC
38	Sangrado y evaluación de Igs vs DC

Una vez iniciado el esquema de inmunización se sangra rutinariamente a los animales para evaluar la seroconversión por medio de seroneutralización, inmunodifusión doble y, contrainmunolectroforesis. ^(12, 13)

El sangrado de los animales se hace antisépticamente, desinfectando con alcohol la zona a puncionar. Las jeringas, agujas y recipientes donde se recibe la sangre deben estar estériles. Para obtener el suero, se deposita la sangre en tubos de centrifuga estériles y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. No mezclar el suero de los animales, se fracciona en viales estériles, se identifica y congela a -20°C. El volumen dependerá del uso.

CONJUGACIÓN DE SUERO INMUNE:

Se seguirá el proceso descrito por Larghi, O.P. ⁽⁷⁾

- a) Precipitar las globulinas del suero (10 ml) con un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio (SSSA 78 g en 100 ml de agua destilada pH 7), que se agrega en un período de 2 minutos en agitación. Mantener la mezcla en agitación por 1 hora.
- b) Centrifugar a 2500 rpm/20 minutos/4°C, descartar sobrenadante.
- c) Resuspender el precipitado en agua destilada, en un volumen igual a la mitad del volumen descartado.
- d) Reprecipitar con un volumen igual de SSSA, en frío y en constante agitación.
- e) Centrifugar a 2500 rpm/20 minutos/4°C, descartar sobrenadante.
- f) Resuspender el precipitado en agua destilada, en un volumen igual a la mitad del suero procesado (5 ml).
- g) Colocar las globulinas en una membrana de diálisis y dializar en 1 litro de solución salina fisiológica fría (SSF 8.5 g de NaCl en un litro de agua). Cambiar la solución cada 4 horas. Después del tercer cambio determinar si la diálisis se ha completado, colocando para ello en un tubo de ensayo partes iguales del dializado y solución de cloruro de bario al 5% (5 g de cloruro de bario en 100 ml de agua destilada).
- h) Determinar proteínas con un espectrofotómetro empleando el método de Bradford.
- i) Calcular la cantidad de FITC a utilizar de acuerdo a la ecuación:
$$\% \text{ de proteínas} \times 10 \times \text{volumen total de globulinas (ml)} = \text{mg de globulinas totales}$$
$$\frac{\text{mg de globulinas totales}}{60} = \text{mg de FITC}$$
- j) Diluir las globulinas con SSF hasta obtener una concentración final de proteínas del 2 - 3%.
- k) Ajustar el pH de las mismas a 9.0-9.5 con una mezcla a partes iguales de soluciones 0.5 M de carbonato y bicarbonato de sodio.
- l) Colocar las globulinas en un vaso de precipitados sobre un agitador magnético y añadir el FITC en pequeñas cantidades, durante un lapso de 3-4 horas.
- m) Eliminar el exceso de FITC empleando una columna de cromatografía.

- n) Pesar 5 g de Sephadex G25, colocarla en vaso de precipitados de 250 ml, agregar 200 ml de PBS, mezclar, dejar sedimentar y decantar el sobrenadante. Repetir el proceso 4 veces.
- o) Suspender el Sephadex en 50 ml de PBS, empacarlo en una columna cromatográfica de 1.5 x 30 cm, pasar 10 ml de PBS y enseguida depositar cuidadosamente el conjugado. Cuando todo el producto ha entrado en la columna agregar más PBS, el material pasará por la columna separado en dos bandas, la más rápida es el conjugado.
- p) Recoger el efluente teñido de amarillo, serán 5-6 ml, la segunda banda de fluoresceína no conjugada se elimina posteriormente con más PBS.

4.8 ELABORACIÓN DE CONJUGADO INMUNOFLUORESCENTE CONTRA FIEBRE PORCINA CLÁSICA.

1.- Elaboración del conjugado empleando 1000 ml de suero hiperinmune de cerdo. El suero utilizado en este caso se elaboró en CENASA y se entregó con el siguiente título de anticuerpos: ≥ 160 DNCC 50%/1 ml, titulado por inmunoperoxidasa.

2.-Se conjugó el suero siguiendo el procedimiento descrito por Kreese, J. ⁽¹⁴⁾

- a) Adicionar 20 ml de solución saturada de sulfato amonio (SSSA 540 g en 1000 ml de agua destilada) a un volumen igual de suero.
- b) Permitir que precipiten las globulinas a 4°C durante 30 minutos. De ser posible en un cuarto frío.
- c) Separar las globulinas en centrifuga refrigerada a 2900 rpm durante 30 minutos y decantar el sobrenadante.
- d) Preparar agua destilada ajustando el pH a 7.5 con una solución de Na_2HPO_4 al 0.1 M. disolver lentamente las globulinas precipitadas adicionando una cantidad de agua destilada pH 7.5 restaurando el volumen original (20 ml).
- e) Adicionar 10 ml de SSSA por cada 20 ml de solución con globulinas, en frío y constante agitación.
- f) Centrifugar inmediatamente como en el paso C.
- g) Disolver el precipitado como en el paso D y precipitar las globulinas como en el paso E.
- h) Resuspender las globulinas en un 50% del volumen original del suero (10 ml) con agua destilada pH 7.5.
- i) Dializar las globulinas disueltas con solución SSF (0.85 g de NaCl en 100 ml de agua). Cambiar esta solución cada 2-4 horas y repetir el proceso de ser posible toda la noche. Determinar si la diálisis se ha completado colocando en un tubo de ensayo partes iguales del dializado y solución saturada de cloruro de bario. Si la mezcla no se observa opaca o turbia, las globulinas son libres de sulfato.
- j) Determinar proteínas con el método de Bradford. (Figuras 15 y 16).

- k) Preparar buffer de carbonato-bicarbonato 0.5 M, pH 9.0 como se indica a continuación:
- Solución A: 5.3 g de Na_2CO_3 cbp 100 ml de agua destilada.
- Solución B: 4.2 g de NaHCO_3 cbp 100 ml de agua destilada.
- Adicionar 17 ml de solución A en 100 ml de solución B. se ajusta el pH con un potenciómetro.
- l) Medir el buffer de carbonatos en un volumen equivalente a 10% de la solución de globulinas (1 ml para 10 ml).
- m) Pesar 0.025 mg de FITC por cada miligramo de proteína en la solución de globulinas y disolverlo en el buffer de carbonatos.
- n) Adicionar esta mezcla lentamente en la solución de globulinas. Agitar constantemente durante toda la noche a 4°C.
- o) Eliminar el exceso de FITC empleando una columna de cromatografía.
- p) Pesar 20 gramos de Sephadex G-25, colocarlo en vaso de precipitados de 1000 ml, agregar 800 ml de PBS, pH de 7.2, mezclar, dejar sedimentar y decantar el sobrenadante. Repetir el proceso 4 veces.
- q) Suspender el Sephadex en 200 ml de PBS, empacarlo en una columna de cromatografía de 1.5 x 30 cm, pasar 100 ml de PBS y enseguida depositar cuidadosamente el conjugado. Cuando todo el producto ha entrado en la columna agregar más PBS, el material pasara por la columna separado en dos bandas, la que pasa primero es el conjugado. (Figuras 17 a 19).
- r) Recoger el efluente teñido de amarillo, serán 50-60 ml, la segunda banda es de FITC no conjugado y se elimina posteriormente con mas PBS. (Figura 20).

COMENTARIOS:

- 1.- El producto se comparó con el de United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service (USDA-APHIS), y mostró una lectura equivalente en marca específica, cantidad de antígeno y mínima inespecificidad.
- 2.- El producto ya diluido (1/20), sin congelar, mantiene su título después de 60 días a 4°C.

3.- Evaluación del producto en CENASA empleando células PK-15 infectadas en PRONABIVE con virus PAV 250, Título = 16.

4.- Evaluación del producto en CENASA utilizando linfonodos provenientes de cerdos experimentalmente infectados ahí con virus patógeno de FPC, Título = 16.

5.- Evaluación del producto en DMEI- FMVZ-UNAM empleando células PK-15 infectadas en PRONABIVE con virus PAV 250, Título = 32.



Figuras 15 y 16. Determinación de proteínas método de Bradford.



Figura 17.



Figura 18.

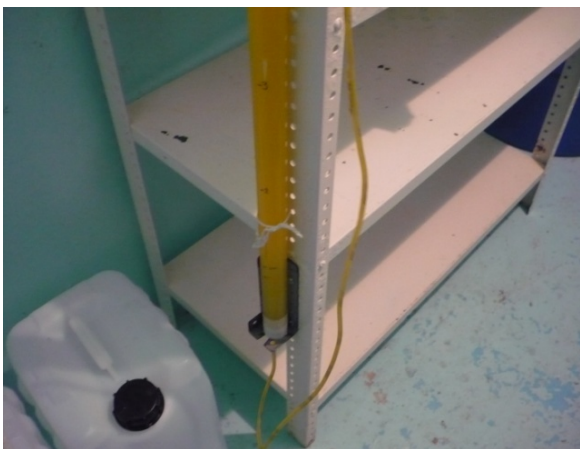


Figura 19.

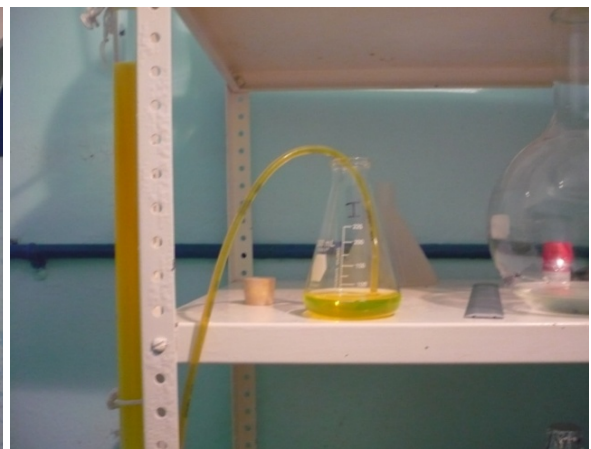


Figura 20.

Figuras 17-20. Obtención del conjugado a través de columna cromatografica.

4.9 ASISTENCIA A CURSOS DE CAPACITACIÓN

- A) Diplomado en Vacunología Veterinaria. Del 01 de octubre de 2007 al 03 de octubre de 2008, Secretaria de Educación Continua y Tecnología, FMVZ-UNAM.
- B) 2° Encuentro Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Rabia, Mérida, Yucatán. del 25 al 29 de septiembre de 2006.
- C) IV° Foro Nacional de Rabia, Puebla, Puebla. primero y 2 de Diciembre de 2006.
- D) Curso “Buenas Prácticas de Laboratorio”, DMEI-FMVZ-UNAM, 13 de octubre de 2006, con duración de 2 Horas.
- E) Curso “Manejo de Residuos Peligrosos”. DMEI-FMVZ-UNAM, 31 de octubre de 2006, con duración de 2 horas.
- F) Exposición “Rabia: Pecado de Acción o de Omisión”. FMVZ-UNAM, 22 de Marzo de 2007.
- G) V° Foro Nacional de Rabia, Boca del Río Veracruz, Veracruz. El 31 de Mayo y 1 de Junio de 2007.
- H) Foro: Día Mundial de la Rabia, FMVZ-UNAM, 7 de septiembre de 2007, con duración de 4.5 horas.
- I) 3^{er} Encuentro Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Rabia, Querétaro, Querétaro. Del 5 al 9 de noviembre de 2007.
- J) Curso “De una a un Billón de Células, recorrido a través del Escalamiento Celular”. México DF, 13 de noviembre de 2007.
- K) 4° Seminario de Virología. FMVZ-UAEM, Toluca, Estado de México. 29 de Mayo de 2008.
- L) 4° Encuentro Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Rabia, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Del 27 al 30 de octubre de 2008.

1. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

1.1. RABIA.

La Rabia es una zoonosis mortal de los mamíferos, es causada por un *Rhabdovirus*, del género *Lyssavirus*, se transmite al hombre y otros animales por la saliva de animales infectados o material contaminado, a partir de una mordedura, rasguño, herida y lamedura sobre mucosa o piel con solución de continuidad. ^(8, 15)

La Rabia es una enfermedad controlable y prevenible mediante acciones conjuntas de los sectores público, social y privado, ofreciendo información eficaz de la vigilancia epidemiológica, atención médica oportuna y adecuada, vacunación y control de la población canina y del murciélago hematófago, así como de otras especies susceptibles. ^(8, 15)

Toda persona que tuvo contacto con un animal sospechoso de estar enfermo de Rabia, previa valoración médica, debe recibir en su caso, el tratamiento antirrábico específico, el cual puede ser interrumpido cuando el diagnóstico por laboratorio y el estudio epidemiológico así lo determine. ⁽¹⁵⁾

A continuación se mencionan los resultados y comentarios relevantes:

1.- Las 79 muestras para Rabia representaron el 3.48% del total de casos trabajados (2267). Todas se procesaron por prueba biológica y los resultados concordaron al 100% con los de inmunofluorescencia. (Cuadro 16).

2.- El conjugado que se utiliza es de anticuerpos monoclonales contra Rabia (laboratorios Baer S.A.). La evaluación que se realizó de este producto dio un título de 8, y la dilución de trabajo se utiliza 1:5. Un vial de 1 ml es suficiente para 50 muestras, considerando que en la prueba se utiliza para cada caso un testigo negativo, un positivo y el problema.

El título puede variar dependiendo de las características de la óptica del microscopio; utilizando, objetivos diafragmados, de inmersión, y de mayor apertura numérica se aumenta el título.

3.- La prueba biológica para Rabia, permite: Monitorear y confirmar la prueba de inmunofluorescencia, de los casos positivos se puede cosechar el virus de campo y establecer a que variante pertenece y sus características moleculares.

4.- La prueba de seroneutralización da una evidencia de que el personal involucrado en el diagnóstico cuenta con Igs con capacidad de neutralizar al virus in vivo, aunque requiere más tiempo que la ELISA ó inmunoperoxidasa, y debe realizarse cada año, evita las vacunaciones innecesarias y garantiza que las que se apliquen brinden el efecto deseado.

5.- La prueba de inmunogenicidad de las vacunas contra Rabia en la especie blanco. Ofrece una evaluación cuantitativa de la capacidad inmunogenica del producto probado.

Cuadro 16. Resultados de Rabia por IFD y PB.

MES/AÑO	Cantidad de casos (RM)	RESULTADO por IF		PRUEBAS BIOLÓGICAS	RESULTADO PB	
		Positivo	Negativo		Positivo	Negativo
10/06	6	1	5	6	1	5
11/06	3	1	2	3	1	2
12/06	2	0	2	2	0	2
01/07	4	0	4	4	0	4
02/07	4	1	3	3	1	3
03/07	4	0	4	4	0	4
04/07	1	0	1	1	0	1
05/07	1	0	1	1	0	1
06/07	3	0	3	3	0	3
07/07	2	0	2	2	0	2
08/07	5	0	5	5	0	5
09/07	4	0	4	4	0	4
10/07	3	0	3	3	0	3
11/07	1	0	1	1	0	1
12/07	0	0	0	0	0	0
01/08	1	0	1	1	0	1
02/08	1	0	1	1	0	1
03/08	0	0	0	0	0	0
04/08	11	0	11	11	0	11
05/08	4	0	4	4	0	4
06/08	3	0	3	3	0	3
07/08	1	0	1	1	0	1
08/08	1	0	1	1	0	1
09/08	3	1	2	3	1	2
10/08	5	0	5	5	0	5
11/08	5	0	5	5	0	5
12/08	1	0	1	1	0	1
Total	79	4	75	79	4	75
%	100	5.0	94.9	100	5.0	94.9

1.2. DISTEMPER CANINO.

El Distemper canino se considera una enfermedad infecciosa viral causada por un *Paramyxovirus* del género *Morbillivirus*, de capital importancia en los perros ya que provoca cuadros que van de agudos a crónicos, incluyendo la persistencia viral durante toda la vida del individuo. Provoca inmunosupresión marcada y abre la puerta a otros agentes infectantes que complican la severidad de los cuadros clínicos observados. ⁽¹⁸⁾

A continuación se mencionan los resultados y comentarios relevantes:

1.- Las muestras para Distemper canino (2188) representaron el 96.52% del total de casos. (Cuadro 17).

Cuadro 17. Resultados de Distemper canino por IFD.

MES/AÑO	Cantidad de casos (RM)	RESULTADO por IF	
		Positivo	Negativo
09/06	17	6	11
10/06	59	18	41
11/06	45	18	27
12/06	37	16	21
01/07	62	19	43
02/07	61	17	44
03/07	68	25	43
04/07	64	22	42
05/07	64	22	42
06/07	80	44	36
07/07	21	9	12
08/07	93	51	42
09/07	86	47	39
10/07	126	68	58
11/07	90	54	36
12/07	50	37	13
01/08	106	55	51
02/08	102	53	49
03/08	76	48	28
04/08	93	50	43
05/08	130	83	47
06/08	120	65	55
07/08	25	12	13
08/08	108	47	61
09/08	107	43	64
10/08	129	49	80
11/08	119	59	60
12/08	50	19	31
Total	2188	1056	1132
Porcentaje	100	48.26	51.74

2.- El conjugado que se utiliza es de anticuerpos policlonales contra Distemper canino, es elaborado en DMEI-FMVZ. La evaluación que se realizó de este producto dio un título de 8, y como dilución de trabajo se utiliza 1:8. Un vial de 1 ml es suficiente para 50 muestras, considerando que en la prueba se utiliza para cada caso un testigo negativo, un positivo y el problema.

El título puede variar dependiendo de las características de la óptica del microscopio utilizando, objetivos diafragmados, de inmersión, y de mayor apertura numérica se aumenta el título.

1.3. FIEBRE PORCINA CLÁSICA

Conocida también como Cólera porcino, es una enfermedad viral altamente transmisible de rápida diseminación que afecta al ganado porcino de todas las edades, con morbilidad y mortalidad variable dependiendo de la virulencia de la cepa viral, se encuentra difundida a nivel mundial. No tiene tratamiento, pero existen vacunas eficaces. Es producida por un virus de la familia *Flaviviridae*, del género *Pestivirus*.^(16,18)

1.- Enfermedad incluida en las campañas sanitarias vigentes en nuestro país y supervisadas por la SAGARPA, la Fiebre porcina clásica fue declarada erradicada de México en enero de 2009. Por lo tanto es de vital importancia que se cuente con técnicas de diagnóstico que nos permitan asegurar su vigilancia epidemiológica. Para tal efecto CENASA produce el suero hiperinmune que se utiliza para pruebas de Inmunoperoxidasa, los kits lo produce y comercializa PRONABIVE, los cuales se utilizan en la evaluación de las vacunas contra Fiebre porcina clásica (PRONABIVE fabrica la PAV 250) y la determinación de Igs en cerdos vacunados, expuestos, infectados o sospechosos de ser seropositivos.

Con la finalidad de ofrecer otra alternativa de diagnóstico se solicito a la FMVZ su participación en la elaboración de conjugado fluorescente, pues se sabe que muchos laboratorios de diagnóstico realizan la prueba con conjugados importados cada vez más difíciles de obtener, que se cotizan en dólares. CENASA aprobó el conjugado (T = 16) elaborado en PRONABIVE con personal de la UNAM, con el que se han obtenido los mismos resultados que con el producto de referencia (elaborado por APHIS-USDA), que además se ha mantenido estable en su título por 60 días después de ser descongelado.

1.4. CAPACITACIÓN

Integrar un equipo de trabajo con personas que tengan objetivos determinados y comunes es un gran reto que debe incluir la formación de recursos humanos, la actualización y reposición de los mismos, con la finalidad de dar continuidad a todas las actividades realizadas y por realizar.

Para integrar estos equipos un punto prioritario es la selección de los candidatos para los diferentes niveles y actividades, con la misión de satisfacer las necesidades y compromisos de las áreas y la visión de generar y explotar conceptos básicos para generar nueva tecnología.

Para la integración de estos equipos la comunicación es una herramienta fundamental ya que facilita la difusión del conocimiento, la formación de equipos y el fomento del sentido de pertenencia a la institución. Esto es muy importante ya que es el trabajador (académico o administrativo) el que a través de su actividad genera valor agregado que incide en el producto final de su labor.

Es conveniente también que el trabajador tome conciencia de la importancia que tiene la modificación constante y oportuna de la misión ya que esto implica que se advierten y aprovechan los cambios científicos, tecnológicos, de mercado y económicos que tan claramente se manifiestan y evidencian en las instituciones de educación superior.

Es este valor agregado el que eleva el factor de oportunidad y competitividad elementos prioritarios en la conservación de nuestros usuarios, que siempre buscaran y optaran por las mejor desarrolladas y más competitivas. Actualmente en técnicas de biología molecular la UNAM mantiene un liderazgo reconocido mundialmente, lo que constituye un fuerte obstáculo para posibles competidores, muchos de los cuales tienen como prioridad el factor económico, no el de la solución de los problemas que atañen al país.

6. OBSERVACIONES

A) Destacar que en los programas de control y erradicación de la Rabia participan diversas instituciones que trabajan en forma conjunta, para conservar el estatus sanitario de la enfermedad.

Mantener una comunicación eficiente, entre los laboratorios de diagnóstico a nivel nacional, a fin de apoyarse en el resultado y proporcionar la información obtenida al sistema de vigilancia epidemiológica.

Conocer las consideraciones en el fracaso del uso de vacunas, y la duda que hay en la práctica profesional acerca del uso correcto de estos inmunogenos. Haciendo énfasis en la vía de inoculación y calendarios de vacunación.

B) Cumplir con la normatividad vigente y aprovecharla para obtener, autorizaciones, certificaciones y valor agregado.

Tener en cuenta que para informar la aparición de casos nuevos de Rabia, esta se considera de notificación inmediata según el punto 7.12 de la NOM-017-SSA2-1994.⁽¹⁷⁾

Valorar el riesgo de contraer Rabia, y conocer sus medidas preventivas, en este sentido se recomienda valorar los niveles de anticuerpos en personal que trabaja con el virus, para que siempre se encuentren por arriba del mínimo establecido.

C) Contribuir a través del diagnóstico al monitoreo de la efectividad de las medidas implantadas por las campañas (Rabia, FPC), producción de vacunas (Rabia, Distemper canino) y programas de vacunación (Distemper canino).

Informar la importancia de la Rabia como problema de salud pública, y el riesgo que representan los animales no vacunados considerados en la cadena de transmisión.

- D) Continuar con las dinámicas de actualización al personal involucrado en el diagnóstico.

- E) Ofrecer al público opciones de diagnóstico incluyendo técnicas de histoquímica y biología molecular (Inmunoperoxidasa y RT-PCR).

6. CONCLUSIONES

La formación de recursos humanos es fundamental para dar continuidad a todas las actividades en que se involucra un profesional que se desempeña en un laboratorio de la FMVZ-UNAM y participar de manera constante y permanente en la actualización de los objetivos, la misión y visión de su área de competencia.

El trabajo realizado evidencia la formación de estos recursos en áreas en las que México ha mostrado su eficiencia, competencia e independencia, que no deben ser descuidadas sobre todo cuando se trata de enfermedades de campaña que se encuentran en fases de erradicación, control, y en el caso de las erradicadas evitar su resurgimiento.

Se forman recursos en:

- a) Diagnóstico de (Rabia, Distemper canino y Fiebre porcina clásica).
- b) Producción de conjugados que han mostrado ser competitivos económicamente por la cantidad de muestras procesadas.
- c) El control de calidad es fundamental en la vigilancia del diagnóstico, la producción y evaluación de productos que se producen en el país y en los importados.
- d) Cabe señalar que los recursos humanos formados son capaces de trabajar de manera eficiente, competitiva y productiva en áreas de la industria pecuaria e instituciones de educación superior.

8. ABREVIATURAS

AH: Suero de Alejandra Hernández Herrera.

antilog: Antilogaritmo.

APHIS: Animal and Plant Health Inspection Service.

cbp: Cuanto baste para.

CENASA: Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal.

CF1: Cepa de ratones sensibles al virus rábico.

cm³: Centímetro cúbico

CVS: Virus estándar de confrontación.

dil: Dilución.

DL: Dosis letal.

DLRA: Dosis letal en ratón adulto.

DMEI: Departamento de Microbiología e Inmunología.

DNCC: Dosis neutralizante en cultivo celular.

EQ REF: Suero equino de referencia.

fac: Factor.

fin: Final.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

FPC: Fiebre porcina clásica.

FS4-ME-MV-004B: Formato de registro de la prueba biológica para Rabia del DMEI-FMVZ.

g: Gramo.

IFD: Inmunofluorescencia directa.

Igs: Inmunoglobulinas.

IM: Intramuscular.

K: Constante.

log: Logaritmo.

M: Molar.

mg: Miligramo.

ml: Mililitro.

mm: Milimetro.

MM: Mortalidad mayor.

Mm: Mortalidad menor:

MS: Suero de José Manuel Saavedra Montañez.

MV: Médico veterinario.

nm: Nanómetro.

NMX: Norma mexicana.

NOM: Norma oficial mexicana.

NMX-CC-9001-2001-IMNC: Norma mexicana de sistemas de gestión de la calidad-requisitos.

O.M.S: Organización Mundial de la Salud.

patr: Patrón.

PAV 250: Virus porcino atenuado de Fiebre porcina clásica pase 250.

PB: Prueba biológica.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos (por sus siglas en ingles).

PCR: [Polymerase chain reaction] Reacción en cadena de la polimerasa.

pH: Potencial de hidrogeniones.

PK-15: [Porcine kidney] Línea celular de riñón de cerdo.

PMRP-UNAM-MV-001: Manual de procedimiento para el manejo de residuos peligrosos de la FMVZ.

prob: Problema.

PRONABIVE: Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.

PV: Cepa Pasteur.

ref: Referencia.

RM: Recepción de muestras.

rpm: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: [Reverse transcriptase - polymerase chain reaction] Reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SFB: Suero fetal bovino.

SN: Seroneutralización.

SSA: Secretaría de Salud.

SSF: Solución salina fisiológica.

T: Título.

UI: Unidades internacionales.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

USDA: United States Department of Agriculture.

VA: Virus activo.

VDC: Virus de Distemper canino.

λ : Longitud de onda.

μg : Microgramo.

9. REFERENCIAS

- 1.- Dr. Héctor Quiroz Romero, Dr. Juan Manuel Cervantes Sánchez. Historia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, 1853-2003. Ed. Medicina y Cultura, S.A de C.V. México D.F. 2003.
- 2.- URL: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/inmunologia/antecedentes.htm>
- 3.- Manual de métodos de prueba (LS4-MEI-MV-001), soporte documental del sistema de gestión de la calidad FMVZ-UNAM, Ed. 5, 2008.
- 4.- Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria.
- 5.- Coons, A. H. Fluorescent Antibody Techniques in the Diagnosis of Communicable Diseases. United States Government Printing Office, Washington, D.C. 1961.
- 6.- Akiyoshi Kawamura, Jr. Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications. University of Tokyo Press, 1997.
- 7.- O.P. Larghi. Nota técnica N° 8, Rev. 2. “Prueba de anticuerpos fluorescentes para Rabia”. Centro Panamericano de Zoonosis, Oficina Sanitaria Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- 8.- Norma Oficial Mexicana NOM-035-ZOO-1996, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la rabia en las especies domésticas.

- 9.- Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
- 10.- M. Kaplan y H. Koprowski. La Rabia técnicas de Laboratorio. OMS, Ginebra, Suiza, 1976.
- 11.- Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999, Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control que afectan a los animales domésticos.
- 12.- Coria Galindo E.M. Utilización de RT-PCR, ELISA y Cultivo Celular para detectar la presencia del virus de Distemper en Lobos Marinos de California, en Sonora. (tesis de licenciatura). México, D.F. UNAM. 2005.
- 13.- Amaro Lara M.E. Identificación del Virus del Moquillo Canino en Muestras Sanguíneas de Pacientes con Esclerosis Múltiple. (tesis de licenciatura). México, D.F. UNAM. 2007.
14. - Kreese, J. de United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service (USDA-APHIS), Ames, Ia, USA.
- 15.- Norma Oficial Mexicana NOM-011-SSA2-1993, Para la prevención y control de la rabia.
- 16.- Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, Campaña nacional contra la Fiebre porcina clásica.
- 17.- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994, Para la vigilancia epidemiológica.
- 18.- URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/ICTVindex.htm>