

**COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD DE LAS PRUEBAS
DE SERONEUTRALIZACION CON DIFERENTES VIRUS
DE LA RABIA**

**III. Comparación de la prueba de seroneutralización en ratones con la
prueba de reducción de placas**

E. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN ¹
D. CORZO CASTILLEJOS ²

Resumen

Los sueros empleados para este estudio procedían de 40 vaquillas criollas encastadas de cebú de dos años de edad, seronegativas a rabia al empezar el experimento. Se vacunaron cada una con una dosis (10^{6.7} UFP) de la vacuna antirrábica cepa V-319. Se sangró a los animales a 2, 3, 4 y 8 semanas y a 3 y 6 meses de la vacunación. Se efectuaron pruebas de seroneutralización en ratones y de reducción de placas con los sueros mencionados, a fin de comparar la sensibilidad relativa de las dos pruebas en la detección de anticuerpos tempranos (menos de 30 días) y tardíos (más de 30 días). Se observó que la prueba de reducción de placa es 10 veces más sensible que la seroneutralización en ratones para detectar anticuerpos tempranos y cinco veces más sensible en la detección de anticuerpos tardíos. La prueba de reducción de placas resultó más confiable y reproducible que la prueba de seroneutralización en ratones.

El departamento de rabia paralítica ha estado realizando la cuantificación de anticuerpos contra rabia por medio de dos sistemas: la seroneutralización en ratones (Johnson, 1973) y la prueba de reducción de placas (Sedwick y Wiktor, 1967; Bijlenga y Hernández, 1977a y b).

Kaplan y Koprowski (1973) en el sexto informe del comité de expertos en rabia indican que existe una "correlación completa" entre la prueba de seroneutralización en ratones (SNR) y la reducción de placas (PRP), siendo esta última diez veces más sensible que la prueba en ratones en la detección de anticuerpos tardíos y cien veces más sensible en la detección de anticuerpos tempranos. Corzo, Hernández y Bijlenga (1977); Bijlenga y Hernández (1977b) notaron discrepancias serias con lo dicho por Kaplan y Koprowski (1973). Desafortunadamente el sexto informe del comité de expertos en rabia no cita literatura relevante, de modo que la afirmación ya mencionada no pudo ser confrontada directamente con el autor.

Recibido para su publicación el 15 de marzo de 1977.

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F.

² Central Sur 216, Arriaga, Chiapas.

Con base en estos resultados fue que se decidió reexaminar el asunto a fin de decidir si la diferencia observada entre la SNR y la PRP era tan grande como lo indican Kaplan y Koprowski (1973). La finalidad de este trabajo es primeramente la de determinar si existe un alto grado de correlación entre las dos pruebas y qué tanto más sensible es la PRP con respecto a SNR. En experiencias anteriores con esta prueba (Bijlenga y Hernández, 1977b) la PRP parece ser más sensible, confiable y segura que la SNR, además de dar los resultados en menor tiempo.

Material y métodos

Se empleó la línea celular 13S C13 desarrollada por Mac Pherson y Stoker (1962). El departamento la adquirió del Instituto Wistar de Filadelfia EE. UU.; la clona tres se preparó en el departamento.

Los sueros utilizados fueron los mismos que se ha indicado en la segunda parte de este artículo (Corzo y Hernández, 1977).

Las cepas de virus rábico empleadas fueron: la V-319 desarrollada por Bijlenga y Hernández (1977a y b) adaptada a cultivos celulares, empleada para este trabajo como cepa homóloga (en PRP); y el virus fijo CVS man-

tenido para pases intracerebrales en ratón y que se utilizó para la SNR. Para los propósitos de esta prueba se preparó un lote de cepa V-319 en cultivos celulares con un título de $10^{8.5}$ unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml) y un lote de CVS en ratones con un título de $10^{-7.3}$ dosis letales 50% para ratón (DL_{50} R/ml).

Se emplearon aproximadamente 500 ratones blancos cepa CD1 de 21 días de edad, los cuales fueron inoculados por vía intracerebral, administrándole a cada uno 0.03 ml de inóculo. Los ratones fueron observados diariamente, considerándose como muertes no específicas las que ocurrieron en los primeros cuatro días después de la inoculación. Todas las muertes ocurridas durante los cinco y los 12 días después de la inoculación fueron confirmadas en su especificidad por inmunofluorescencia (Goldwasser y Kissling, 1958). La PRP y la SNR se efectuaron según técnicas descritas (Sedwick y Wiktor, 1967, Bijlenga y Hernández, 1977b; Johnson, 1973). Los cálculos de los valores de SN se efectuaron según la técnica de Reed y Muench (1938) y los límites de confianza al 95% fueron determinados según la técnica de Pizzi (1950).

Resultados

Los resultados de esta prueba se encuentran resumidos en el Cuadro 1 y en las figuras 1 a 4. El método seguido para dibujar las gráficas ha sido explicado en detalle con anterioridad (Corzo y Hernández, 1977).

La misma división arbitraria entre anticuerpos tempranos y anticuerpos tardíos que ya se ha explicado (Corzo y Hernández, 1977) se siguió para este trabajo.

Discusión

Anticuerpos tardíos. Las figuras 1 y 2 corresponden a la comparación de las dos pruebas (PRP y SNR) utilizando sueros de menos de cuatro semanas después de la vacunación y considerados como anticuerpos tempranos. Podrá notarse en estas dos gráficas que, si bien existe una tendencia a la distribución lineal de los datos no ajustados a una línea de predicción (los datos de comparación, marcados "al azar" en las figuras 1 y 2) la correlación dista mucho de ser "completa". Cabe hacer notar que cuando se usan los datos de la prueba de reducción de placas como base (valor lineal ajustado), la distribución de los datos de la prueba en ratones es sumamente desordenada (Figura 1) lo que no sucede en el mismo grado cuando se invierte esta forma de distribución de los datos (Figura 2). Esta observación, aunada a los márgenes más amplios de los límites de confianza para la prueba en ratones, indica que la prueba de seroneutralización fue menos confiable, en esta serie de pruebas, que la prueba de reducción de placas. La prueba de reducción de placas resultó ser, en promedio, diez veces más sensible que la prueba en ratones en este ensayo efectuado con anticuerpos tempranos (Cuadro 1). La baja confiabilidad de la prueba en

CUADRO 1

Resumen de los resultados de seroneutralización y pruebas de reducción de placas (figuras 1 a 4)

Figura	Virus base	Virus comparación	No. datos > base	Datos base (sin dif.)	No. datos < base
1	* PRP(V-319)	PCR(CVS)	1/24	9/24	14/24
2	* PCR(CVS)	PRP(V-319)	14/24	9/24	1/24
3	** PRP(V-319)	PCR(CVS)	0/38	14/38	24/38
4	** PCR(CVS)	PRP(V-319)	24/38	14/38	0/38

* Anticuerpos tempranos.

** Anticuerpos tardíos.

PCR Prueba clásica en ratones.

PRP Prueba de reducción de placas.

El numerador es el total de muestras que caen en cada categoría; el denominador es el total de muestras examinadas.

ratones observada con anticuerpos tempranos, es también evidente en la prueba efectuada con anticuerpos tardíos (Figuras 3 y 4). Si bien en este caso ningún título de seroneutralización en ratones arrojó un dato superior a la prueba de reducción de placas, como ocurrió con anticuerpos tempranos. Es mayor el porcentaje de datos que no son significativamente diferentes (37%) y el de los que tienen diferencias significativas pequeñas (es decir, existen diferencias significativas pero no altamente significativas). La prueba de reducción de placas también en

este caso es más sensible que la prueba en ratones. La prueba de reducción de placas es en promedio, cinco veces más sensible que la prueba en ratones usando sueros de más de cuatro semanas después de la vacunación, lo cual refuerza los resultados de investigaciones previas (Bijlenga y Hernández, 1977a y b). En estos experimentos la prueba de reducción de placas es más sensible en el caso de anticuerpos tempranos que con los tardíos, lo cual coincide laxamente con lo que informa el comité de expertos en rabia de la Organización Mundial de la Salud (Kaplan y Koprowski,

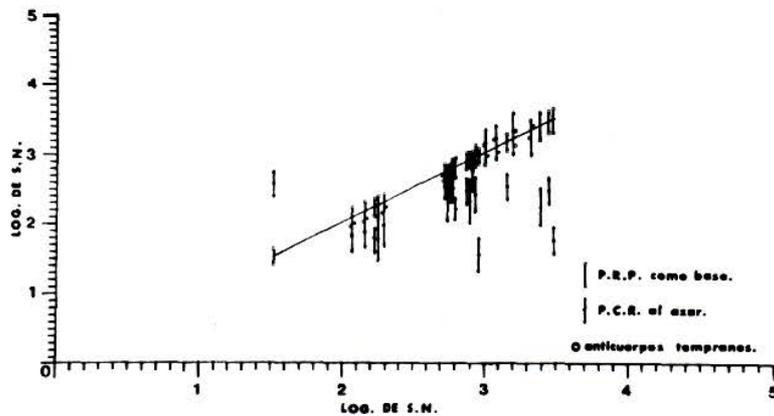


Figura 1. Comparación de la prueba de reducción de placas con la prueba de seroneutralización en ratones. Los valores de seroneutralización observados se anotan con límites de confianza al 95%. El valor lineal ajustado corresponde a la prueba de reducción de placas (PRP) con la prueba en ratones (PCR) al azar. Los sueros empleados en la prueba corresponden a períodos tempranos en la inmunización. En las siguientes gráficas sólo se explican las variaciones incluidas en cada gráfica.

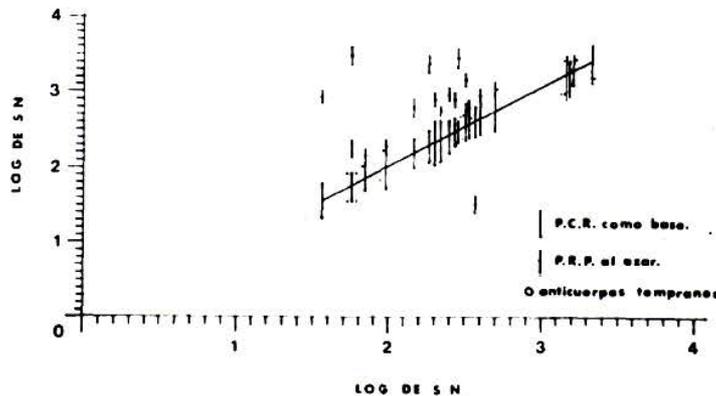


Figura 2. El valor lineal ajustado corresponde a PCR y PRP al azar. Sueros tempranos.

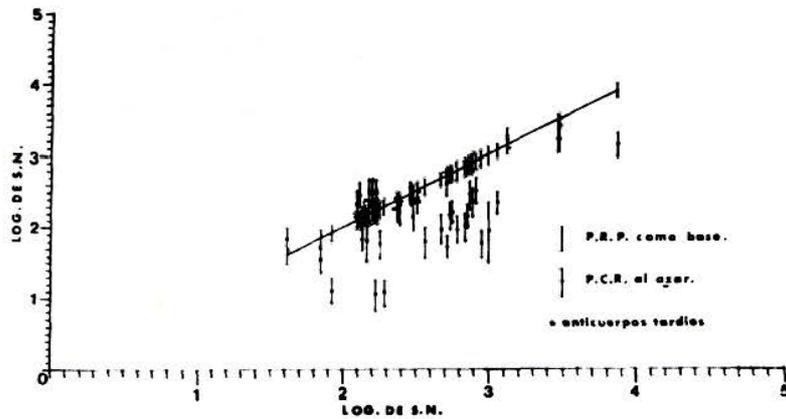


Figura 3. El valor lineal ajustado corresponde a PRP con PCR al azar. Sueros tardíos.

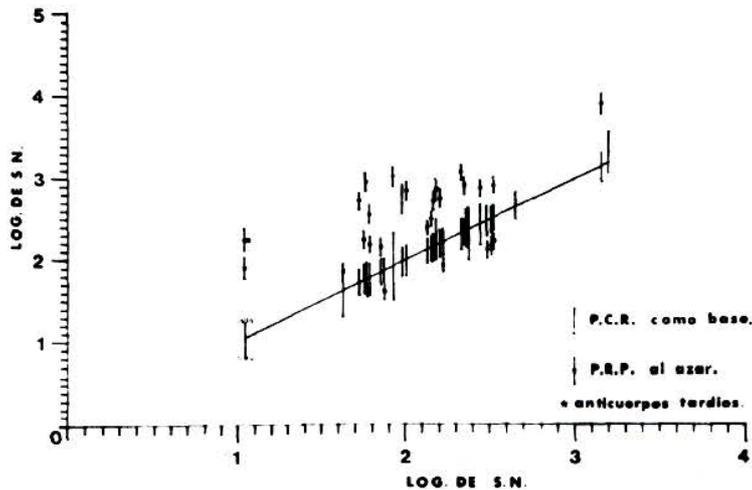


Figura 4. El valor lineal ajustado corresponde a PCR con PRP al azar. Sueros tardíos.

1973). Sin embargo, la diferencia en sensibilidad observada es menor a la que ellos consignan. Esta discrepancia en los resultados podría deberse a las cepas de virus utilizadas en cada serie de experimentos. Podrá notarse que el experimento fue conducido de manera de exagerar las diferencias en las pruebas. La PRP fue efectuada con virus cepa V-319 o sea con el virus homólogo, que según se ha visto arroja los datos más altos de PRP (Corzo y Hernández, 1977). La idea era exagerar las diferencias entre PRP y SNR al sumarse las diferencias producidas por la dife-

rencia de cepas (V-319 contra CVS) con la diferencia de sensibilidad de las pruebas (PRP contra SNR). Aun así las diferencias observadas en este trabajo son considerablemente menores que las notificadas por otros autores (Kaplan y Koprowski, 1973).

Una posible explicación a la gran discrepancia observada con los anticuerpos tempranos sería que 30 días es demasiado tiempo para suponer que todavía queden anticuerpos tempranos en tanto que Kaplan y Koprowski (1973) hayan utilizado suero entre una y dos semanas en esta prueba.

Summary

The sera used in this test were obtained from 40 two year half zebu heifers, serum negative to rabies at the start of the test. Each was vaccinated with one dose ($10^{6.7}$ PFU) of antirabies vaccine strain V-319. The animals were bled at 2, 3, 4 and 8 weeks post-vaccination, as well as 3 and 6 months. The plaque reduction test and the serum neutralization test in mice were conducted using the same

sera in order to compare the relative sensitivity of the two tests in detecting early (less than 30 days) and late (over 30 days) antibodies. It was observed that the plaque reduction test is 10 times more sensitive than the mouse test in detecting early antibodies and five times more sensitive than the mouse test with late antibodies. The plaque test proved more sensitive and reliable than the mouse test.

Literatura citada

- BIJLENGA, G. and E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, 1977a, Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies isolate (V-319) from a vampire bat (*Desmodus rotundus*), *Br. vet. j.* (in press).
- BIJLENGA, G. and E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, 1977b, Testing of the vaccine potential of a plaque purified rabies virus strain V-319, derived from a vampire bat (*Desmodus rotundus*) in México. *Br. vet. j.* (in press).
- CORZO CASTILLEJOS, D., y E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, 1977, Comparación de la sensibilidad de las pruebas de seroneutralización con diferentes cepas del virus de la rabia. II Comparación de la prueba de reducción de placas utilizando tres cepas de virus rábico adaptado a cultivos celulares, *Téc. Pec. Méx.*, 32:
- CORZO CASTILLEJOS, D.; E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, y G. BIJLENGA, 1977, Comparación de la sensibilidad de las pruebas de seroneutralización con diferentes cepas de virus de la rabia. I Adaptación del virus CVS a cultivos celulares, *Téc. Pec. Méx.*, 32:
- GOLDWASSER, R.A. and R.E. KISSLING, 1958, Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98:219-223.
- JOHNSON, H.N., 1973, The virus neutralization index test in mice, chapter 8, in *Laboratory Techniques in Rabies*, World Health Organization, Monograph series N° 23. 3rd Ed. P. 94-97, Geneva, Switzerland.
- KAPLAN, M.M. and H. KOPROWSKI, 1973, Sixth report on the expert committee on rabies, *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.
- MAC PHERSON, I. and M. STOKER, 1962, Polyoma transformation of hamster cell clones and investigation of genetic factors affecting cell competence, *Virology*, 16:147-151.
- PIZZI, M., 1950, Sampling variation of the fifty per cent end point, determined by the Reed and Muench (Behrens) method, *Human Biology*, 22 No. 3:152-289.
- REED, J.L. and H. MUENCH, 1938, A simple method of estimating fifty per cent end points, *Am. J. Hyg.*, 27:493-497.
- SEDWICK, W.D., T.S. WIKTOR, 1967, Reproducible plaquing system for rabies, Lymphocytic choriomeningitis virus (LCM) and other RNA viruses in BHK-21, 13S agarose suspensions, *J. Virol.*, 1: 1224-1226.