

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

**II. Comparación en la prueba de reducción de placas utilizando tres cepas
de virus rábico adaptado a cultivos celulares**

D. CORZO CASTILLEJOS ¹
E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN ²

Resumen

Este trabajo tiene como objeto comparar los resultados de títulos de reducción de placas confrontando los mismos sueros con virus homólogo y dos virus heterólogos a fin de determinar si los títulos de reducción de placas permiten distinguir entre cepas de virus. Se vacunaron 40 bovinos criollos encastados de cebú, adultos (de dos años de edad) seronegativos a rabia al empezar el experimento. A cada animal se le aplicó una dosis ($10^{6.7}$ UFP/dosis) de vacuna antirrábica cepa V-319. Se sangró a los animales a 2, 3, 4 y 8 semanas y a 3 y 6 meses después de la vacunación. La prueba de reducción de placas fue capaz de distinguir entre los diferentes virus. El virus homólogo V-319 arrojó los títulos de reducción de placas más altos en todos los casos. Los títulos obtenidos con CVS adaptado y ERA alto pasaje fueron menores que con V-319 y sin diferencias estadísticamente significativas entre sí.

En el Departamento de Rabia Paralítica (Derriengue) se han observado títulos de reducción de placas ligeramente diferentes al utilizar virus homólogo (V-319) y heterólogo (ERA) (Bijlenga y Hernández, 1977a y b). Con el fin de ampliar el estudio a otro virus, el CVS se procedió a adaptarlo a cultivos celulares (Corzo, Hernández y Bijlenga, 1977). En este estudio se trata de determinar el grado de sensibilidad de la prueba de reducción de placas (PRP) utilizando tres antígenos virales adaptados a cultivos celulares. Por otra parte es probable que la PRP sea capaz de distinguir las diferentes cepas de virus. La capacidad de distinguir cepas entre sí, tiene importancia dado que puede constituir en forma directa un ensayo de identificación de cepas de virus rábico registrados para propósitos de producción de vacunas y en forma indirecta puede indicar el potencial vacunal de nuevas cepas de virus rábico adaptado a cultivos celulares (Wright y Habel, 1948; Hernández B., 1976).

Material y métodos

Se empleó en este estudio la línea celular 13S Cl₃, derivada de BHK-21 (Mac Pherson y Stoker, 1962) y fue proporcionada al departamento de Investigaciones sobre rabia paralítica por el Instituto Wistar de Filadelfia, EUA; la clona 3 fue obtenida en el Departamento (Corzo, Hernández y Bijlenga, 1977).

Los virus empleados fueron tres:

a) Virus cepa V-319 adaptado a cultivos celulares por Bijlenga y Hernández (1977a).

Para este estudio se utilizó en su 13^{er} pase y se preparó un lote especial de virus para el estudio con un título de $10^{8.5}$ UFP/ml.

b) Virus CVS adaptado. Este virus fue adaptado a cultivos celulares por Corzo, Hernández y Bijlenga (1977). Para todo el estudio se preparó un lote con un título de $10^{5.92}$ UFP/ml.

c) Virus cepa ERA alto pasaje. La cepa fue originalmente adaptada y desarrollada como vacuna por Abelseth (1964) y posteriormente adaptada a células BHK-21 por Kaplan *et al.* (1967).*

Recibido para su publicación el 15 de marzo de 1977.

¹ Central Sur 216, Arriaga, Chiapas.

² Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F.

* Koprowski, 1969, comunicación personal.

Los sueros empleados procedían de 40 vacas de dos años de edad, criollas encastadas de cebú, seronegativas a rabia. La seronegatividad de estos animales fue determinada por una serie de tres pruebas de placa efectuadas a cada animal a un mes de intervalo en las cuales no se encontraron anticuerpos contra rabia. Se dividieron los animales en dos lotes de 20 animales cada uno, manteniéndose a uno de ellos en centro de cría y Fomento en Ajuchitlán, Querétaro y los otros 20 localizados en la Unidad Central en la Ciudad de México. Desde el punto de vista de la experimentación se consideraron los dos grupos de animales como un solo lote. Estos animales fueron vacunados con la vacuna antirrábica cepa V-319 y fueron sangrados para la obtención de suero a los siguientes intervalos después de la vacunación: a las dos, tres, cuatro, seis y ocho semanas y a los tres y seis meses.

La prueba de reducción de placas se efectuó según la técnica descrita (Sedwick y Wiktor, 1967).

Las pruebas de seroneutralización se efectuaron por el método de diluciones dobles y cuádruples, mezclándose con cantidades equivalentes de una dilución constante de virus y la mezcla ya incubada por una hora a 36 C fue depositada en las cajas de Petri en cantidad de .05 ml/caja.

La dilución final de cada cepa vírica utilizada para la prueba de reducción de placas fue como sigue:

V-319 - 1:600, CVS adaptado 1:80 y ERA alto pasaje 1:300.

Los títulos de reducción de placas fueron determinados por el método de Reed y Muench (1938) y los límites de confianza al 95% por el método de Pizzi (1950).

Las figuras fueron trazadas empleando los resultados de reducción de placas obtenidos con los diferentes virus, haciendo la separación de sueros tempranos, obtenidos 30 días o menos posvacunalmente y sueros tardíos, de más de 30 días. Cada suero se anota en una columna vertical en el lugar que le corresponde al valor medio del título de reducción de placas del virus que se está utilizando como base. Primeramente, tanto la abscisa como la coordenada contienen las tasas de anticuerpos obtenidos en la prueba de reducción de placa. Se traza una línea recta (línea de

ajuste), que abarque los valores promedio máximo y mínimo de seroneutralización (SN) de los valores por anotar. Después se dibuja sobre la línea el valor medio SN obtenido con el virus que está sirviendo de base en el lugar que le corresponde en la línea de ajuste. Es decir, se hacen coincidir en línea recta los valores medios del virus base, por lo cual se denominan valores lineales ajustados. Todos los valores de SN sobre la línea de ajuste se pueden leer en las dos escalas (la horizontal y la vertical), en tanto que los límites de confianza sólo se deben leer en la escala vertical. Por último, se anota el título de seroneutralización obtenido con uno de los virus de comparación imaginando una línea vertical que pase por el sitio en que se anotó el primer valor. Utilizando ahora solamente la escala vertical. De este modo cada suero tiene anotado en línea vertical hacia arriba o hacia abajo el valor con el que se le compara. Por ejemplo, en la Figura 1 el virus V-319 sirve como base, y los valores de SN obtenidos con este virus, son los anotados sobre la línea de ajuste. El primer valor anotado (el de título de SN más bajo) es de 1.4, que es el logaritmo del título de SN. Inmediatamente arriba de este dato y con un valor medio de 2, está anotado el título de SN obtenido con el mismo suero, pero utilizando virus CVS adaptado para la prueba de reducción de placas. De esta manera cada valor de SN tiene en línea vertical directa el valor comparativo de SN obtenido con otro de los virus utilizados en la prueba.

Resultados

Los resultados de este trabajo se resumen en el Cuadro 1 y en las figuras 1 a 6.

Los anticuerpos producidos por la vacunación se dividen arbitrariamente en dos grupos: los anticuerpos tempranos, señalados en las figuras 1, 2 y 3 corresponden a la respuesta obtenida a 2 y 3 semanas de la vacunación, y los anticuerpos tardíos (figuras 4, 5 y 6) corresponden a períodos posteriores. El número de sueros disponibles en cada uno de los tiempos posvacunales proyectados fue menor al de animales originalmente incluidos en la prueba, debido a muertes inespecíficas, traslado de animales a otros centros de fomento o bien por no estar disponibles en el

momento en que se fue a sangrarlos. Desafortunadamente esta serie de imprevistos redujeron el número de muestras con que se contó, así como la confiabilidad de los resultados.

Discusión

La comparación del virus V-319 (homólogo) con el CVS con anticuerpos tempranos

(Fig. 1) arroja un dato de mayor sensibilidad de la prueba de reducción de placas con el virus homólogo que con el heterólogo. Se puede observar una cosa semejante cuando se compara con el virus V-319 con la cepa ERA (Fig. 2) también con anticuerpos tempranos. Es decir, en los dos casos en que se compara el virus homólogo con un virus heterólogo, el primero es más completamente neutralizado por su antisuero. Cuando se comparan los vi-

CUADRO 1

Resumen de los resultados de reducción de placas utilizando tres cepas de virus rábico adaptadas a cultivos celulares

Figura	Virus base	Virus comparación	Datos más altos que valor ajustado	Datos sin diferencia	Datos más bajos que valor ajustado
1	* V-319	CVS-Adap.	1/13	3/13	9/13
2	* V-319	ERA	0/12	1/12	11/12
3	* CVS-Adap.	ERA	1/12	8/12	3/12
4	** V-319	CVS-Adap.	3/27	12/27	12/27
5	** V-319	ERA	0/20	5/20	15/20
6	** CVS-Adap.	ERA	9/20	10/20	2/20

* Anticuerpos tempranos.

** Anticuerpos tardíos.

El numerador indica el Núm. de muestras que caen en cada categoría y el denominador el número de muestras examinadas.

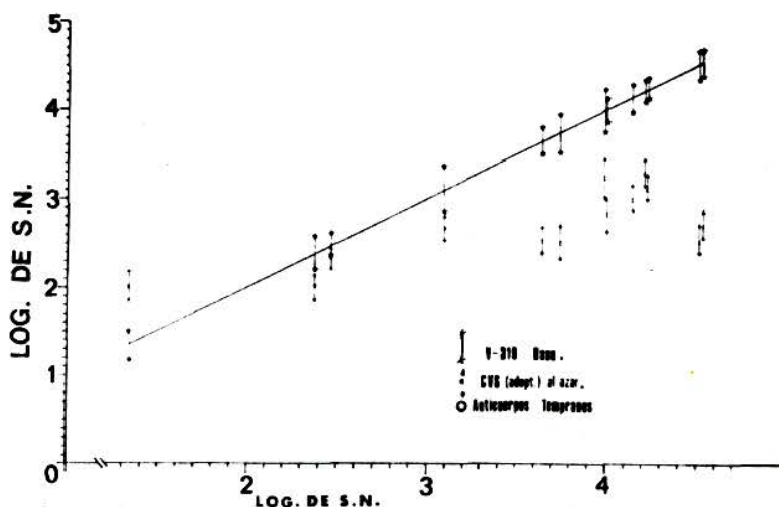


Figura 1. Prueba de reducción de placas utilizando virus V-319 (homólogo) comparándolo con virus CVS adaptado a cultivos celulares. Los valores de seroneutralización observados se anotan con límites de confianza al 95%. El valor lineal ajustado corresponde al virus V-319 y CVS según los valores previamente ajustados. Los sueros empleados en la prueba corresponden a periodos tempranos de inmunización (hasta 30 días). Los datos de las demás figuras están anotados en la misma forma y sólo se explicarán las diferencias entre ellas.

rus heterólogos entre sí, también con anticuerpos tempranos (Fig. 3) se notó que la mayor parte de los datos (8 de 12) cae dentro de la categoría "sin diferencia", lo que indica que los sueros empleados son igualmente ineficientes para neutralizar a ambos virus.

En el caso de la comparación de V-319 contra CVS con anticuerpos tardíos (Fig. 4), los resultados son menos claros. Continúa existiendo la tendencia a observar títulos más altos con el virus homólogo, pero el número de datos sin diferencias significativas es muy alto (12 de 27). Cuando se compara V-319 con ERA con anticuerpos tardíos (Fig. 5) nuevamente se obtuvieron títulos más altos con el virus homólogo.

Por último, cuando se comparan los virus heterólogos entre sí, se obtuvo nuevamente un alto número de datos sin diferencias significativas (10 de 20). Además, las diferencias observadas entre los títulos de seroneutralización obtenidos con los sueros que sí tuvieron diferencias estadísticamente significativas son muy pequeñas, con una o dos excepciones.

La prueba de reducción de placas fue sufi-

cientemente sensible para estudiar posibles diferencias antigénicas entre virus. Las pruebas comparativas de seroneutralización cruzadas que se han hecho en el pasado utilizando ratones, no han revelado diferencias entre cepas de virus de rabia de diferentes orígenes. Según los resultados de este trabajo, es posible que estas diferencias puedan detectarse debido a la mayor sensibilidad y confiabilidad que proporciona la prueba de reducción de placas. Se considera que por medio de estas pruebas será posible efectuar pruebas de identificación de cepas de virus rábico.

Summary

The object of this work was to compare the plaque reduction titers using the same set of sera with a homologous and two heterologous strains of rabies virus in order to see whether the plaque reduction test is capable of distinguishing different strains of rabies virus. 40 two year half zebu heifers, previously tested serum negative to rabies, were vaccinated

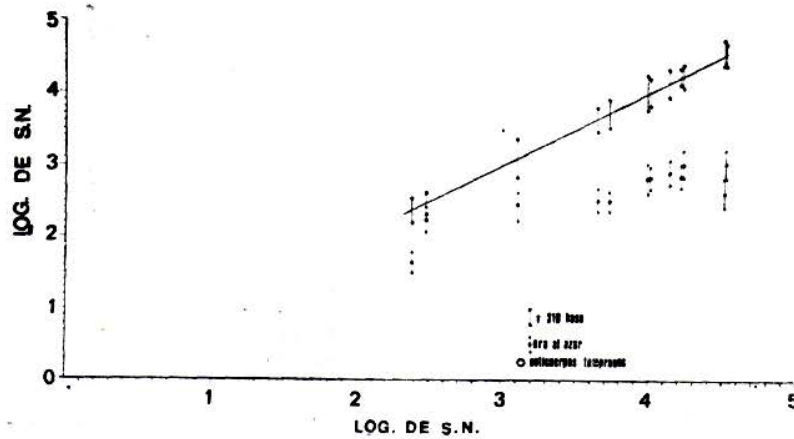


Figura 2. El valor lineal ajustado corresponde al virus V-319 con ERA al azar. Anticuerpos tempranos.

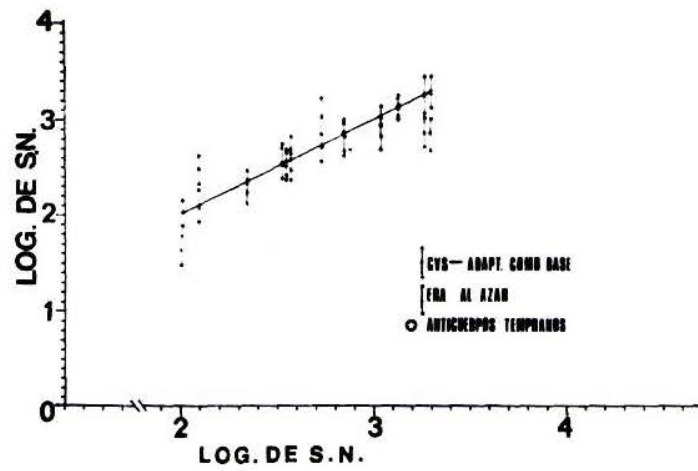


Figura 3. El valor lineal ajustado corresponde al virus CVS adaptado, con ERA al azar. Anticuerpos tempranos.

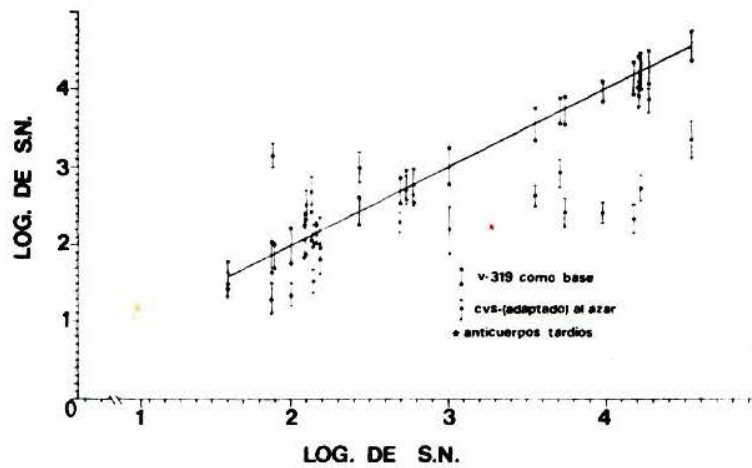


Figura 4. Virus V-319, valor ajustado, con CVS al azar. Anticuerpos tardíos (más de 30 días).

with one dose each ($10^{6.7}$ PFU/ml) of the antirrabic vaccine strain V-319. The animals were bled at 2, 3, 4 and 8 weeks, as well as at 3 and 6 months after vaccination. The plaque reduction test was able to distinguish among viruses. The homologous virus, V-319, gave

the highest plaque reduction titers in all instances. The titers obtained with CVS adapted to tissue culture and high titer ERA were consistently lower than those of V-319 and showed no statistically significant differences among themselves.

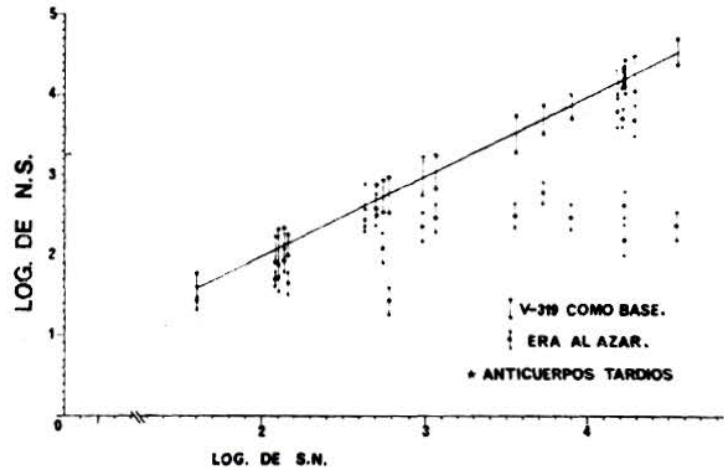


Figura 5. Virus V-319, valor ajustado, con ERA al azar anticuerpos tardíos.

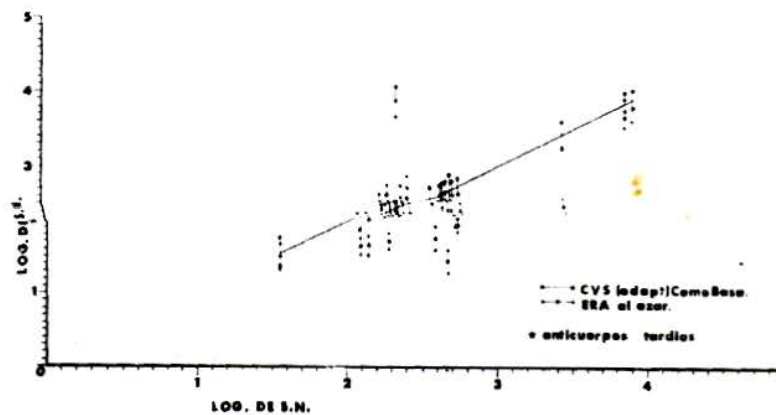


Figura 6. Virus CVS adaptado, valor ajustado, con ERA al azar anticuerpos tardíos.

Literatura citada

- ABELSETH, M.K., 1964, Attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture, *Canad. Vet. J.* 5:279-286.
- 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., 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.*, 32:66-68.
- HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, E.M. 1976, La rabia parasitante bovina: Definición del problema y metodología de control, *Ciencia Veterinaria*, Vol. 1.R. Moreno Chan Editor, Prensa Universitaria pp. 103-130.
- KAPLAN, M.M.; T.J. WIKTOR; R.P. MAES; J.B. CAMPBELL and H. KOPROWSKI, 1967, Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in tissue culture: Construction of a single-cycle growth curve, *J. Virol.*, 1:145-151.
- MACPHERSON, 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*, N° 22 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. and S.T. 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.
- WRIGHT, J.T. and K. HAEEL, 1948, A comparison of antigenicity and certain biological characteristics of 6 substrains of Pasteur fixed rabies Virus, *J. Immunol.*, 60:503-515.