

# TITULACION DE ANTICUERPOS ANTIRRABICOS DE SUEROS OVINOS MEDIANTE LAS TECNICAS DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS Y SERONEUTRALIZACION

Pedro Mejía Sánchez <sup>a</sup>

Elizabeth Loza Rubio <sup>a</sup>

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de conrainmunolectroforesis, para que sirva como ayuda a la prueba de rutina (seroneutralización), con el fin de detectar anticuerpos antirrábicos en la especie ovina. Se colectaron 42 sueros ovinos inmunizados contra la rabia, los cuales se titularon mediante las pruebas de seroneutralización y conrainmunolectroforesis. Los resultados de ambas técnicas se evaluaron mediante correlación lineal. Dada la correlación obtenida de 0.85, se concluye que el identificar anticuerpos antirrábicos por medio de la técnica de conrainmunolectroforesis, por ser una técnica sensible, rápida y económica, nos sirve como complemento y es una alternativa a la prueba de seroneutralización.

Téc. Pec. Méx. Vol. 29 No. 3 (1991)

La rabia es un padecimiento que sigue teniendo importancia en México, así como en muchos otros países, desde el punto de vista de la salud pública y además por su repercusión económica <sup>18</sup>. Se identificó como una enfermedad infecciosa aguda, transmisible, de etiología viral y con afinidad al sistema nervioso <sup>7,9,10</sup>. El virus de la rabia tiene un grupo amplio de huéspedes, todos los animales de sangre caliente, incluyendo al ser humano <sup>3,6,17</sup>. Entre ellos se encuentran los ovinos que presentan signos semejantes a los demás animales: Cambios de la depresión a la agresividad <sup>2,8</sup>, anorexia, disfagia, hiperestesis, se apartan de la manada, mirada fija, actitud de alerta, pelo erizado, aleteo auricular, atonía ruminal, constante movimiento de cabeza, trismos, nistagmus, actitud de temor, corren sin dirección, espasmos musculares, dificultad para caminar, incoordinación motora, postración, salivación, convulsiones, dificultad respiratoria, bramidos en ocasiones, parálisis y muer-

te <sup>2,7,8,10</sup>. Dentro de las preocupaciones de las autoridades de salud está la posibilidad de reducir el esquema de vacunación y el de desarrollar técnicas para el control y estudio de esta enfermedad.

La técnica de conrainmunolectroforesis (CIE), detecta anticuerpos dirigidos contra la glucoproteína presente en la envoltura viral. A la fecha ha sido de mucha importancia para la titulación de sueros de otras especies animales incluyendo al hombre <sup>4,5,14,15,16</sup>. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una prueba de laboratorio (CIE), que sirva como ayuda a la técnica de rutina (seroneutralización en ratón), para detectar anticuerpos antirrábicos en la especie ovina.

Se colectaron 42 sueros de ovinos inmunizados contra rabia, con una vacuna comercial inactivada, cepa Acatlán V-319. Estos se titularon por seroneutralización en ratón (SN), mediante el método descrito por Atanasiu <sup>1,11</sup> y por conrainmunolectroforesis (CIE). Para CIE, se realizaron diluciones seriadas de los sueros ovinos, de 1:2 hasta 1:32, agregando una cantidad constante de antígeno de virus rábico (producido en cultivo celular y concentrado mediante

<sup>a</sup> Proyecto de Biotecnología en Salud Animal. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología. INIFAP-SARH. Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa. C.P. 05110, México, D.F.

precipitación con acetato de zinc) <sup>12,13</sup>, a cada dilución. Esta cantidad constante de virus rábico se estableció mediante una previa titulación con anticuerpos del suero indicador en unidades de volumen (ml). Se incubaron durante 60 minutos a 37 C y se colocaron en placas de agarosa al 1% en buffer de Tris pH 8.0, con horadaciones de 3 mm de diámetro para las diluciones de suero más antígeno y de 6 mm para el suero indicador (suero hiperinmune). Este último, se precorre 25 minutos sin las diluciones preparadas, posteriormente se agregan las diluciones de los sueros y se continua la corrida electroforética por un período de 45 minutos. Se colocan controles positivo y negativo con sueros y antígeno ya titulados, en el caso del control negativo se utiliza solución salina en lugar del antígeno.

La lectura se manifiesta mediante la aparición de bandas de precipitación. Debido a que se hacen diluciones del suero problema, aparecerán bandas de precipitación en el momento que la concentración de anticuerpos del suero problema sea menor que la del antígeno rábico. Por lo tanto, éste antígeno quedará libre y reaccionará con anticuerpos del suero indicador. Si no exist

ten bandas de precipitación en la muestra, indica que la cantidad de anticuerpos es mayor que las diluciones que se están trabajando.

Para establecer una comparación entre ambas técnicas, los resultados se sometieron a correlación lineal simple. Estos resultados se presentan en el Cuadro 1, en la primera columna se observa el número de sueros, en la segunda los títulos arrojados por SN, en la siguiente columna los títulos que se obtuvieron por CIE y la última columna, señala los títulos de SN estimados en base a CIE, los cuales se obtuvieron en función de una relación lineal teórica entre los logaritmos de las inversas de los títulos, la ordenada en el origen "a" y la pendiente "b".

$$\text{Título SN (estimado)} = a + b (\text{título de CIE})$$

En la gráfica 1, se muestran los títulos de SN y de CIE antes y después de la correlación que fué de 0.85.

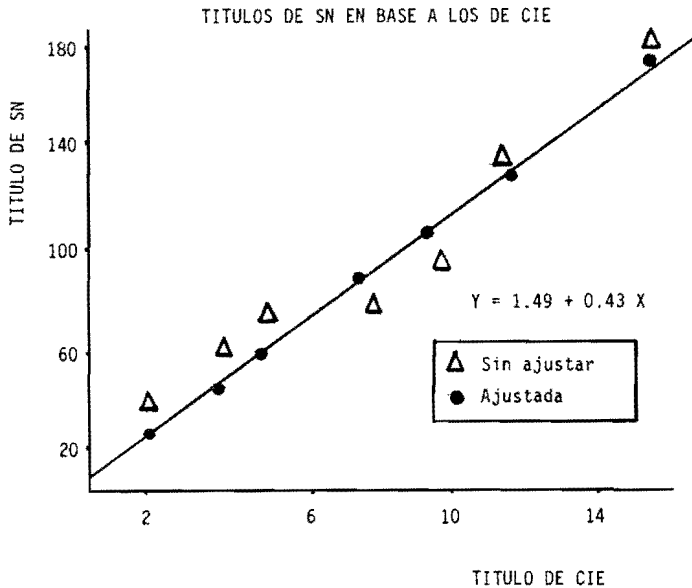
La aplicación de la técnica de CIE, que se basa en la unión de anticuerpos antirrábicos presentes en diluciones variables de un suero problema con una cantidad constante de antígeno (virus rábico inactivado) y

CUADRO 1. TITULOS DE SERONEUTRALIZACION ESTIMADOS CALCULADOS A BASE DE LOS RESULTADOS DE CIE.

NUMERO DE SUEROS	TITULO SN	TITULO CIE	TITULO SN EN BASE A CIE
4	32	2	22
5	48	4	43
4	64	5	54
6	80	8	87
9	100	10	109
8	125	12	131
6	175	16	175

Total 42 sueros.

GRAFICA 1



un suero antirrábico hiperinmune, ha permitido detectar anticuerpos en la especie ovina. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados por investigadores extranjeros, con una correlación de 0.70<sup>4,7</sup>, así como nacionales, con una correlación de 0.80, estos últimos modificaron la técnica de la Organización Mundial de la Salud<sup>4</sup>, sustituyendo el buffer de Veronal (que es un producto de importación), por el buffer de Tris<sup>14</sup> y el antígeno proveniente de cerebros de animales lactantes (CVSO por un antígeno de virus rábico Cepa V-319/Acatlán), producido en cultivo celular y concentrado con acetato de zinc, que presenta las ventajas de ser específico, con título alto y no presenta reacciones cruzadas<sup>12,13</sup>. Se han realizado titulaciones en sueros de humanos<sup>16</sup> y bovinos<sup>14</sup>, las diferencias básicas que existen en lo que se refiere a CIE entre bovinos y ovinos es que, la corrida electroforética

requiere más tiempo (45 minutos), en estos últimos. La correlación que se obtuvo de 0.85 indica que existe una buena relación entre ambas pruebas, ya que la técnica original señala que un coeficiente igual o mayor 0.70, indica una asociación aceptable. Por lo tanto, la técnica de CIE, funciona como una prueba más para el diagnóstico serológico de rabia en sueros de la especie ovina, por lo que puede servir como apoyo a la técnica de SN, principalmente cuando se necesita una titulación más rápida, ya que la técnica se realiza aproximadamente en 3 horas (incluyendo el período de incubación de suero más antígeno), además se pueden titular varios sueros en la misma placa.

#### SUMMARY

The aim was to implement counterimmunoelectrophoresis (CIE) test, as a help from serum neutralization

test. 42 serum from ovines vaccinated against rabies, were tested by CIE. Results in both techniques were evaluated by lineal correlation, this was 0.85. Therefore, was concluded that CIE could be an alternative technique, because is sensible, fast and economical.

## LITERATURA CITADA

1. ATANASIU, P., 1976. Técnicas de laboratorio aplicadas a la rabia. *Organización Mundial de la Salud*.
2. BATALLA, C.D., MENDEZ, B.J.J., GONZALEZ, S.D., GARCIA, F., OROS, C.D. Prueba de inocuidad y antigenicidad de la vacuna antirrábica Acatlán V-319 en borregos y cabras. *Memorias de la XV Reunión del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*. México, D.F. p 593.
3. DAVIS, D.V., DULBECCO, R., ELISEN, H.N., GINSBERG, H.S., 1982. Tratado de Microbiología. 2a. ed. *Salvat Editores*. S.A., Barcelona, España. p 403.
4. DIAZ, A.M. and MYERS, D.M., 1980. Determination of serum neutralization antibodies to rabies virus by a modified counterimmunoelectrophoresis test. *J. Clin. Microbiol.* 12:175.
5. DIAZ, A.M. and MYERS, D.M., 1981. Comparison between a modified counterimmunoelectrophoresis test and the indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to rabies virus in human serum. *J. Clin. Microbiol.* 14:446.
6. FUNDENBERG, H., 1982. Inmunología Clínica. 2a. ed. *El Manual Moderno*. p 463.
7. GILLESPIE, J.H. y TIMONEY, J.F., 1983. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4a. ed. *La Prensa Médica*. p 438.
8. HERNANDEZ, B.O., HERNANDEZ, J.P., HERNANDEZ, B.E., ROLDAN, C.M., 1981. Aislamiento y titulación de virus rábico de calle en borrego pelibuey. *Memorias de la XV Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*. México. D.F. p 507.
9. HUMMELER, K. and KOPROWSKI, H. 1969. Investigating the rabies virus. *Nature* 221:419.
10. JAETZ, E. 1979. Microbiología Médica. 8a. ed. *El Manual Moderno*, S.A. México, D.F. p 463.
11. KAPLAN, M. and KOPROWSKI, H., 1976. La rabia. Técnicas de laboratorio. *Organización Mundial de la Salud*. Suiza.
12. LOZA, R.E. y HERNANDEZ, B.E., 1988. Concentración de antígeno de virus rábico producido en cultivo celular como apoyo para la técnica de contraimmunoelectroforesis (CIE). *Memorias de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. La Habana, Cuba. p 188.
13. LOZA, R.E. y HERNANDEZ, B.E., 1988. Concentración de antígeno de virus rábico producido en cultivo celular como apoyo para la técnica de contraimmunoelectroforesis (CIE). *Téc. Pec. Méx.* 26:3 p 267.
14. LOZA, R.E., MEJIA, S.P. y WEIMERSHEIMER, R.J.E., 1988. Comparación entre la prueba de seroneutralización en ratón y contraimmunoelectroforesis para la detección de anticuerpos antirrábicos en sueros bovinos. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México*. p 48.
15. MEJIA, S.P., VELAZQUEZ, V.J.M. y HERNANDEZ, B.E., 1988. Comparación entre la prueba de seroneutralización en ratón (SN) y la técnica de contraimmunoelectroforesis (CIE) para el diagnóstico serológico de rabia. *Memorias del XIX Congreso Nacional de Microbiología*. Monterrey, Nuevo León. p 85.
16. MEJIA, S.P., VELAZQUEZ, V.J.M. y HERNANDEZ, B.E., 1989. Implementación de la técnica de contraimmunoelectroforesis (CIE) para el diagnóstico serológico de rabia en sueros humanos. *Memorias del XX Congreso nacional de Microbiología*. Morelia, Michoacán. p 47.
17. WIKTOR, P., 1973. Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.* 110:269.
18. VI Reunión Interpaíses sobre control de la rabia. 1988. Secretaría de Salud, DPS. México, D.F.