

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



REPLICADA CENTRAL

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS
CONTRA EL VIRUS RABICO EN PERROS VACUNADOS EN
CAMPANAS ANTIRRABICAS EN LA CIUDAD DE
GUADALAJARA, JALISCO EMPLEANDO LA TECNICA DE
INMUNOELECTROFESIS POR CONTRACORRIENTE

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N:
P.M.V.Z. SARA EUGENIA MORENO GARCIA
P.M.V.Z. GUILLERMO CARRILLO RUEDAS
DIRECTOR DE TESIS:
M.V.Z. DAVID AVILA FIGUEROA
ASESOR DE TESIS:
M.V.Z. ELIZABETH LOZA RUBIO
GUADALAJARA, JAL., NOVIEMBRE 1992

17941/025895
V. S. M. C. I. S.
G. A.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS
CONTRA EL VIRUS RABICO EN PERROS VACUNADOS EN
CAMPAÑAS ANTIRRABICAS EN LA CIUDAD DE GUADALAJARA,
JALISCO EMPLEANDO LA TECNICA DE
INMUNOELECTROFORESIS POR CONTRACORRIENTE

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTAN

P.M.V.Z. SARA EUGENIA MORENO GARCIA
P.M.V.Z. GUILLERMO CARRILLO RUEDAS

DIRECTOR DE TESIS:
M.V.Z. DAVID AVILA FIGUEROA

ASESOR DE TESIS:
M.V.Z. ELIZABETH LOZA RUBIO

GUADALAJARA JAL. NOVIEMBRE DE 1992.

A G R A D E C I M I E N T O S .

A DIOS ...

POR HABERNOS DADO LA VIDA.

AL M.V.Z. DAVID AVILA FIGUEROA
POR BRINDAR SU APOYO COMO DIRECTOR
DE TESIS Y POR LA AMISTAD QUE NOS-
BRINDA, GRACIAS.

AL M.V.Z. ELIZABETH LOZA RUBIO,
POR SU INCALCULABLE CUIDA Y APOYO PARA
LA REALIZACION DE DICHO TRABAJO, QUIEN
SIEMPRE TUVO PALABRAS DE APOYO Y -
ESTIMULO PARA SALIR ADELANTE, A USTED,
... MIL GRACIAS.

CON RESPETO AL H. JURADO,
M.V.Z. JOSE LUIS DE LA TORRE COVARRUBIAS,
M.V.Z. RAUL LEONEL DE CERVANTES MIRBLES,
C.F.B. YOLANDA MARAVILLA.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICATORIAS :

A MIS PADRES:

MA. DEL SOCORRO RUEDAS Y
MACEDONIO CARRILLO A., COMO
EL MAS CELEBRE HOMENAJE, SU
RECUERDO Y GRACIAS POR HABERME
TENIDO CONFIANZA EN DARME LAS
ARMAS PARA LUCHAR EN LA VIDA.

A MI ESPOSA:

ROSA ELENA ZARATE, POR SU
APOYO MORAL, COMPRENSION, -
CON QUIEN COMPARTO EL AMOR
Y LA ALEGRIA. GRACIAS A ESTO
HOY SE HACE REALIDAD UN CAMINO
TRAZADO.

Y COMO MUY ESPECIAL A MIS HIJOS,
ROSA NASYELY CARRILLO Z, ERICK ANTONIO
CARRILLO Z, CON AMOR Y RESPETO Y -
ADMIRACION Y EN QUIENES BRILLARA UNA -
NUEVA ESTRELLA.

A MIS HERMANOS:

POR EL APOYO Y COMPRENSION -
DURANTE MI VIDA. JORGE, MARTHA,
ESTHELA, GRACIELA, JAVIER, -
VICTOR, EMMA, JOSE, CONRADO, -
LAURA, MARIO, HUGO, CARLOS,

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

MI RECONOCIMIENTO Y GRATITUD
AL PERSONAL DEL ANTIRRABICO -
DE ZAPOPAN, QUIENES HICIERO -
POSIBLE LA REALIZACION DE ESTE
TRABAJO.

DE IGUAL MANERA AL PERSONAL
DEL ANTIRRABICO DE GUADALAJARA.

A MI COMPAÑERA DE TESIS, SARA
CON TODO CARINO Y APRECIO, -
QUIEN ME AYUDO MORALMENTE y -
ANIMO QUE ME PROPORCIONO, --
MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIAS:

A mis Padres:

J. Encarnación Moreno y
Refugio García, por su amor,
apoyo y comprensión al soportar
tantas carencias, quienes comprensivos
siempre me impulsaron para lograr mis
objetivos y mis metas.

... A USTEDES CON CARINO.

A mis Hermanos;

Gerardo y Esperanza, por ayudarme y
dar palabras de aliento en la realización
de esta Tesis.

A la Sra. Julia Arguelles,
su hija Guri De Gil y al
Dr. Jorge Del Junco, quienes
sin conocerme siempre tuvieron
una palabra de aliento, esperanza
y motivación para seguir adelante
enseñandome que no importa lo
difícil que sea el camino, siempre
habrá alguien dispuesto a ayudar sin
esperar nada a cambio.

... A USTEDES MUCHAS GRATIAS.

A Antonio,
Quien con su cariño y confianza
siempre tuvo una palabra de
aliento en los momentos mas
dificiles, alientandome a seguir
adelante.

... GRACIAS ANTONIO.

Al Lic. Florentino Salas y a la
Sra. Emma , por brindarme
su apoyo durante todo el trascurso
de la realizaci3n de este trabajo.

... GRACIAS.

A t3 amigo que me alentaste
en todo momento durante el
desarrollo de esta Tesis.

... MIL GRACIAS.

A mi compa3ero de tesis, Memo por
soportarme, ayudarme y comprenderme
por las presiones que se pasan al -
realizar este trabajo de Tesis.

... A TI GRACIAS.

Yo quiero viajar lo m3s lejos posible
Quiero alcanzar la alegr3a que hay en mi alma
y cambiar las limitaciones que conozco
y sentir como crecen mi esp3ritu y mi mente
Quiero vivir, existir, "ser" ,
y oir las verdades que hay dentro de m3.

... SARA.

CUCBA

CONTENIDO

páginas

RESUMEN	i
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
JUSTIFICACION	13
HIPOTESIS	14
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y METODO	16
RESULTADOS	19
DISCUSION	28
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFIA	33

RESUMEN

La rabia se considera como una de las mas graves enfermedades transmisibles de los animales al hombre, de mayor importancia en el pais, la cual se puede prevenir mediante la vacunación de los animales domésticos.

Con el objetivo de determinar los niveles de anticuerpos contra el virus rábico en perros vacunados en las campañas antirrábicas se obtuvieron muestras de sangre de 110 perros de la zona metropolitana de la Cd. de Guadalajara, Jal; y se procesaron mediante la técnica de Inmunolectroforesis por contracorriente (CIE), utilizando diluciones de 1:5, 1:10, y 1:20, esto se comparó contra la técnica de Seroneutralización en ratón para corroborar su resultado.

Los resultados obtenidos por la técnica de CIE indican que el promedio de anticuerpos en los animales muestreados fue de 1:406.5. En cuanto a los resultados obtenidos entre las técnicas de CIE y Seroneutralización (SN) se observó un coeficiente de correlación lineal de $r = 0.60$, el cual se considera adecuado. Se demostró así que los canideos vacunados en las diferentes campañas si presentan buenos niveles de anticuerpos, por lo tanto si estan bien protegidos contra rabia.

La técnica CIE demostró alta sensibilidad y rapidez para el diagnóstico serológico de rabia.

INTRODUCCION.

Desde la antigüedad el perro ha sido considerado como la especie prototípica de la rabia. Una de las primeras referencias de esta enfermedad se encuentra en el código Eschunna Premosaico (que antecede al mejor conocido código de Hamurabi de la antigua Babilonia del siglo III A.C.). Demócrito en el siglo V A. C. describió la enfermedad en los perros al igual que Aristóteles en el siglo III A.C. En el año 100 de nuestra era Celso dio una descripción detallada de la enfermedad, señalando que los seres humanos, lo mismo que los animales inferiores eran susceptibles (5). En México en el año de 1709, se tiene referencia de la primera epizootia de rabia en perros vagabundos. En los años subsiguientes se presentaron varios casos aislados y de tipo epizootico tanto en animales como en humanos (27).

En 1881 Pasteur demostró por primera vez el neurotropismo del virus de la rabia, correspondiendole también el mérito de haber efectuado la aplicación de la vacuna antirrábica en un niño mordido por un lobo rabioso en 1885 (5). En el año de 1888 el Doctor Eduardo Liceaga obtuvo del Químico Luis Pasteur la vacuna antirrábica para su desarrollo, iniciandose su producción y aplicación en personas agredidas y en perros, a nivel del Instituto Antirrábico de la ciudad de México (5, 27). A la fecha, la rabia, se considera un problema de Salud Pública, ya

que es una enfermedad infecciosa, aguda y mortal, que afecta principalmente al sistema nervioso central con una letalidad del 100% clasificada como zoonosis en cuyo determinismo intervienen casi siempre la agresión de un animal enfermo (5, 27)

El virus de la rabia por sus propiedades morfológicas y bioquímicas se clasifica como dentro del grupo de los Rhabdovirus, género Lyssavirus, especie serotipo 1 - virus de la rabia, hospederos afectados todos los animales mamíferos de sangre caliente incluyendo al hombre (6, 19, 20). Mide de 100 a 150 μ de diámetro, el virión en forma de bala contiene el 67% de proteínas, 26% de lípidos, 4% de RNA, 3% de carbohidratos vinculados en forma covalente a los lípidos y proteínas (19, 20). Este virus es frágil ya que se inactiva fácilmente por ebullición, o con la aplicación de desinfectantes como el cloruro mercuríco y el formaldehído, en tejidos autolisados mantiene su viabilidad hasta por 72 horas y aun mas cuando se conserva en glicerina o en congelación a -20 C (6, 19, 20).

Gracias al advenimiento de los anticuerpos monoclonales se ha comprobado la existencia de diversas cepas de virus rábico que varían tanto en sus propiedades biológicas como en la composición antigénica. Con esto se ha logrado clasificar los siguientes serotipos:

Serotipo 1: Cepa prototipo del virus patrón de prueba de CVS.

Serotipo 2: Lagos (Murciélago de africa), serotipo 3: Mokola

CUCBA

(musaraña),

Serotipo 4: Prototipo Duvenhage aislado en el hombre de Africa

(20, 27)

La transmisión se produce principalmente por la mordedura de un animal eliminador del virus por la saliva a otros animales susceptibles incluyendo al hombre (1). Una vez que el virus ha sido depositado en la herida, este se multiplica y posteriormente va a invadir al sistema nervioso central (SNC), la primera evidencia de la multiplicación viral, ocurre en los ganglios espinales que proporcionan inervación al sitio de la inoculación

(3)

No existe indicio de multiplicación neural en los sitios de penetración del virus. Después de un período de latencia de duración variable según la cepa del virus y otros factores, el antígeno viral reaparece como se ha indicado en los ganglios espinales de donde procede la inervación al sitio de inoculación (2). La forma de invasión al SNC y la distribución del virus en el animal varían considerablemente de acuerdo a la vía de entrada de la infección (20). Se ha comprobado que el período previo a la infección neural, el virus se multiplica en los miocitos del lugar en que fue inoculado. El lapso que media entre la inoculación del virus, y la inervación neural, es posiblemente el único período en el que el "tratamiento vacunal" profiláctico posterior a la exposición puede dar resultados satisfactorios (3). Una vez que se da la infección en el SNC, el virus se difunde en

forma centrífuga a las glándulas salivales y a otros órganos por medio de los nervios periféricos, de la misma manera como se produce la progresión centripeta (1), de tal modo que en los casos fatales, el virus puede hallarse tanto en el SNC como en el SNP, como en otros tejidos, glandulas salivales existian titulos viricos mas altos mas altos que en el cerebro y se ha encontrado tambien títulos altos en los pulmones lo que indicara que el agente puede replicarse fuera del SNC. Se ha aislado o detectado virus en diferentes organos y tejidos tales como las glándulas suprarenales, grasa parda (grasa intrerescapular) de los murciélagos, riñones, vejiga, ovario, testículo, glándulas sebáceas, células germinales de los bulbos pilosos, córnea, papilas de la lengua, pared intestinal y otros organos (1). Es importante señalar que siempre que se aisla el virus de las glándulas salivales, se le encontrará también en el SNC (1).

El virus de la rabia, no ha sido aislado de la sangre de las personas infectadas. Dependiendo de la cepa, vía de inoculación y cantidad de virus inoculado, los signos clínicos en perros se presentan en un promedio de 30 días, en la fase prodrómica, los perros manifiestan un cambio de conducta, se esconden en rincones oscuros o muestran una agitación inusitada, dando vueltas intranquilos por la casa. La excitabilidad refleja esta acentuada, sobresaltandose el animal al menor estímulo, se nota anorexia, irritación en la región de la mordedura, estimulación

de las vías genitourinarias y un ligero aumento de la temperatura corporal. Después de 1 a 3 días se intensifican notablemente los signos de excitación, el animal se vuelve peligrosamente agresivo, con tendencia a morder objetos, animales y al hombre, incluyendo a su propio dueño, muchas veces se muerde a sí mismo infligiéndose graves heridas; la salivación es abundante, ya que el animal no deglute la saliva debido a la parálisis de los músculos de deglución y hay una alteración del ladrido por la parálisis parcial de las cuerdas vocales, emitiendo el animal un aullido ronco prolongado (1, 19, 20)

Los perros rabiosos son propensos a abandonar sus casas y recorrer grandes distancias atacando furiosamente a sus congéneres y a otros animales. En la fase terminal de la enfermedad con frecuencia se puede observar convulsiones generalizadas y luego incoordinación muscular y parálisis de los músculos del tronco y de las extremidades (1, 19, 20), no obstante de los signos clínicos que característicamente se observan existe la forma muda la cual se caracteriza por signos predominantes paralíticos y la fase de excitación es muy corta o a veces ausente. La parálisis empieza por los músculos de la región de la cabeza y cuello el animal tiene dificultad en la deglución y es frecuente que el dueño sospeche que se haya atragantado con un hueso luego sobreviene parálisis de las extremidades,

parálisis general y la muerte. El curso de la enfermedad es de 1 a 11 días (1, 6, 20, 27). Epidemiológicamente se ha clasificado a la rabia en dos tipos:

a) Rabia urbana: En la cual la infección se transmite de perro a perro y del perro al hombre y animales domésticos por mordedura. La rabia en las ciudades y poblados se mantiene mientras haya una importante producción de perros susceptibles. La gran densidad de perros y la alta densidad de reproducción anual de los mismos son factores importantes en las epizootias de la rabia canina (1).

b) Rabia silvestre: se mantiene en la naturaleza en forma similar a la rabia urbana. Dentro de un determinado ecosistema, una o dos especies de mamíferos, especialmente carnívoros y quirópteros se encargan de perpetuar la rabia, los zorros, zorrillos, mapaches, se consideran los principales huéspedes y vectores de la rabia, cabe resaltar que en los quirópteros la rabia sigue la misma pauta que en los mamíferos ya que se ha comprobado que algunos murciélagos pueden eliminar el virus por la saliva por 10 o más días antes de la muerte (1).

En México las mordeduras de perros son responsables del 84.6% de los casos de rabia, 6% por quirópteros, 1.7% por gatos; 0.4% por zorrillos y 7.3% se ignora. Teniendo en cuenta que en casos aislados se ha presentado la enfermedad sin lesión aparente

como en el caso de las lameduras de un animal rabioso (Leoch y Johnson 1940) o al contacto con virus rábico en aerosol (Constantino 1962), (Winkler y cols 1973) (6, 25, 27).

Las lesiones en humanos por mordeduras de perro se presentan generalmente en las regiones anatómicas (25, 27)

- 1.- Miembros superiores 47.8%
- 2.- Miembros inferiores 27.4%
- 3.- Cabeza y cuello 22%

El diagnóstico de la rabia se basa en los síntomas clínicos la situación epizootiológica y el diagnóstico de laboratorio, (Gillespie y Timoney) del cual suele depender la decisión de si conviene o no proceder a un tratamiento largo y doloroso o de si es necesario instituir medidas complejas para la lucha contra una epizootia en una determinada colectividad (10). En la actualidad, el número mayor de pruebas de diagnóstico efectuadas en un laboratorio de microbiología esta constituido por pruebas serológicas, algunas de las cuales detectan anticuerpos dirigidos contra la ribonucleoproteína viral, tales como las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoprecipitación, el radioinmunoensayo y el método inmunoenzimático (ELISA). Otras técnicas que miden anticuerpos: Reducción de placas, anticuerpos fluorescentes, y seroneutralización en ratones, a este grupo se ha sumado la técnica de contrainmunolectroforésis (CIE). A

CUCBA

continuación se describen algunas técnicas para detectar anticuerpos encontrando la prueba de microfocos fluorescentes, tiene la ventaja de requerir menos equipo y por lo tanto, es un poco mas accesible a laboratorios poco equipados siendo además una prueba mas confiable y de buena sensibilidad (19).

Prueba de reducción de microfocos, se utiliza una dilución constante de virus. Esta dilución constante se mezcla con la dilución apropiada de los sueros inactivos por titular, se incuba la mezcla a 37 C durante una hora y se procede a manejar los monoestratos (20). Esta técnica tiene la ventaja sobre otras técnicas in vitro e in vivo de ahorrar tiempo y obtener resultados a muy corto plazo.

La técnica ELISA es un metodo inmunoenzimático para la detección epidemiológica de exposición de varios agentes etiológicos y se pretende estandarizar para aplicarla como técnica de diagnóstico rutinario para la titulación de anticuerpos rábicos (26).

Otra técnica serológica para la titulación de anticuerpos contra rabia es la inmunoelectroforésis por contracorrientes la cual se basa en la unión de antígeno - anticuerpo (11, 12, 13, 14)

Todas estas técnicas de laboratorio sirven para un diagnóstico preciso y confiable para la utilización de vacunas rábicas tanto en los humanos como en los animales domésticos, ayudando asi a un mejor control en cuanto a epidemiología y a

Salud Pública se refiere. Por ello se considera importante que una vacuna antirrábica sea monitoreada para corroborar la protección de dicha vacuna y el hecho de que el perro doméstico y el callejero así como el gato tienen un riesgo de infección rábica variable de región a región, originando así la creación de diversos tipos de vacunas para inmunización, tanto en hombres como en animales; por lo que se han desarrollado gran cantidad de producción de vacunas utilizando la cepa de virus fijo de Pasteur o una semejante, preparada en diferentes tejidos y que se puede clasificar de la siguiente manera:

1.- Vacuna de tejido nervioso de animales adultos:

a) Vacuna simple

b) Vacuna fermi

- De animales recién nacidos

a) vacunas de ratón lactante

2.- Vacunas de aves:

a) de embrión de pato.

b) de embrión de pollo.

3.- vacuna de cultivo celular de animales:

a) células renales de bovino.

b) células renales de hámster ⁽²⁷⁾

- Humanas

a) Diploide

Se han preparado gran numero de vacunas antirrábicas para prevenir la enfermedad, tanto de tipo inactivado como de virus vivo modificado, (VVM) ⁽²⁾. Entre las vacunas a base de virus vivo se encuentran las preparadas en embrión de pollo mediante un pequeño número de pases, (LEP) (low egg passage), o de numerosos pases (HEP) (High egg passage), y la elaborada en riñón de cerdo (Cepa ERA) ⁽⁷⁾. De las vacunas inactivadas se distinguen las elaboradas en tejido nervioso y las elaboradas en tejido celular

(7)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Siempre es de importancia social la presentación de casos de rabia. En México, esta ocupa el primer lugar de incidencia en América Latina ⁽¹⁵⁾. En la zona metropolitana de Guadalajara el diagnóstico de rabia se ha realizado por la técnica de anticuerpos fluorescentes en los laboratorios oficiales ⁽²³⁾. En el año de 1989 los laboratorios trabajaron 386 muestras de casos sospechosos de rabia, de estos 318 correspondieron a caninos y tuvieron 109 casos positivos a rabia, además se remitieron también 68 muestras de gato siendo 5 de ellas positivas. En total de las 386 muestras enviadas 114 fueron positivas a rabia, lo cual dio un total del 29.5% de positividad ⁽²³⁾. En el año de 1990 se enviaron un total de 536 muestras de las cuales 460 corresponden a caninos dando un total de 116 positivas a rabia, en cuanto a muestras de gato se enviaron 76 muestras, con 7 casos positivos. De las 536 muestras enviadas 173 fueron positivas a rabia, que dieron un total de 32.2% de positividad ⁽²³⁾, en 1991 463 muestras de canideos fueron trabajadas, dando un total de 60 positivas, siendo el 12.42% de positividad.

Debido a que la rabia continúa siendo un problema en el contexto Salud Pública del mexicano sobre todo lo que se refiere a la prevención de la misma. Cada día es más importante contar

con productos biológicos que contengan antígenos lo mas puros posibles y que generen una buena respuesta inmunológica, que sea ademas duradera y específica (12, 18). Por ello se considera importante asegurarse que en las campañas de vacunación sean monitoreados los animales, para corroborar la protección conferida (9, 10, 13).

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

JUSTIFICACION

En México es de importancia social la presentación de casos de rabia en diferentes especies (19). A la fecha la rabia es un problema de Salud Pública, en virtud de ciertas características especiales del padecimiento, ya que se trata una enfermedad infecciosa transmisible de curso agudo y mortal, con una letalidad del 100%, clasificada como zoonosis en cuya presentación interviene casi siempre la agresión de un animal enfermo (27). Aunque en el país se han implementado campañas de vacunación antirrábicas aun se han presentado casos de rabia canina a pesar de los altos índices de perros vacunados año con año. En el caso de la ciudad de Guadalajara que cuenta con una población de canidea de 371,428 y en la que se ha logrado vacunar 94,550 perros en 1989, 50,326 en 1990 y 40,355 en 1991, pese a esto se presentan casos de rabia en humanos (esporádicos) (4), debido a esto existe la necesidad de obtener el perfil inmunológico de los canideos vacunados en las campañas antirrábicas realizadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en los años de 1989, 1990 y 1991 con el fin de obtener datos reales acerca de la inmunidad adquirida mediante las vacunaciones durante dichas campañas (4).

HIPOTESIS

Existen varias pruebas serológicas para determinar los niveles de anticuerpos contra el virus rábico, una de ellas es la de inmunolectroforesis por contracorriente, la cual a probado dar buenos resultados en la titulación de anticuerpos rábicos en humanos, bovinos y ovinos (8, 17) entonces es factible que también se puedan determinar los niveles de anticuerpos en perros, además los animales vacunados durante las campañas de vacunación antirrábica efectuadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara tienen niveles de anticuerpos mínimos de 1:93.

OBJETIVOS

General:

Determinar y titular, los niveles de anticuerpos contra el virus rabico en perros vacunados en las campañas antirrábicas, realizadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara.

Particular:

Evaluar la técnica de inmunolectroforésis por contracorriente en sueros de caninos, para la obtención de niveles de anticuerpos contra el virus rábico.

MATERIAL Y METODO

En el presente estudio se obtuvieron sueros de 110 perros de la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco; que hubieran sido vacunados en las campañas antirrábicas de los años 1989, 1990 y 1991 por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la cual se utilizó vacuna liofilizada cepa Roxane. Estos perros se muestrearon al azar y dichas muestras se obtuvieron mediante la punción de la vena radial para la cual se utilizaron tubos Vacutainer sin anticoagulante con aguja del numero 22 X 32, se recolectaron 5 cc de sangre, posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero, el cual se congeló a - 20 C para su posterior procesamiento en el laboratorio del Proyecto de Rabia del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología (CENID), en Palo Alto, Mexico D.F. dependiente del INIFAP - SARH.

Para la detección y titulación de anticuerpos contra el virus rábico se siguió la técnica de inmunolectroforesis por contracorriente CIE, descrita por Mejía y Loza ⁽¹⁶⁾ y Loza y cols ⁽¹³⁾, la cual se basa en la unión de antígeno - anticuerpo, el antígeno preparado en cultivo celular, se concentro con una sal neutra al cual se le agrega SDS (Dodecil sulfato de Sodio) al 0.2% cada suero problema fue dividido empleando diluciones dobles seriadas y a cada una de estas diluciones se le adicionó una cantidad constante de antígeno.

La mezcla suero virus se incubó a 37 C durante 60 minutos, para favorecer la neutralización del antígeno rábico. Para la titulación de los sueros se usaron placas de vidrio de 75 X 50 mm, los cuales se cubrieron con 17 ml de agarosa al 0.9%. Una vez gelificada la agarosa se hicieron 2 hileras de 6 pozos paralelos de 6 y 3 mm de diámetro con 5 mm de separación entre cada hilera. La mezcla del suero hiperinmune (suero indicador, "Vielicon")⁽¹⁴⁾, fue colocado en los pozos de 6 mm y precorrido en una cámara electroforética durante 25 minutos, enseguida se llenaron los pozos de 3 mm con antígeno y se continuó la electroforésis por 60 minutos^(11, 12, 13, 14)

Los resultados obtenidos de acuerdo a una reacción positiva que se manifiesta por la ausencia de precipitación, ya que las inmunoglobulinas contra rabia presentes en el suero problema neutralizaron al antígeno y este no reacciona con el suero hiperinmune. Una reacción negativa se manifestó por la presencia de una fina y clara línea de precipitación entre ambos pozos es decir que el suero careció de inmunoglobulinas para actuar con el antígeno y este al verse libre, reaccionó con el suero hiperinmune⁽²²⁾

Para verificar la correlación de los títulos de anticuerpos corridos por esta técnica y la tradicional de seroneutralización se procesaron 40 de estos sueros siguiendo los pasos establecidos

por Kaplan y Koprowski (10), en los que se utilizaron ratones blancos cepa CD - 1, clínicamente sanos de 21 días de edad. Los resultados obtenidos se presentan en gráficas y cuadros utilizando el método de correlación lineal.

CUICBA



BIBLIOTECA CENTRAL

RESULTADOS

De los 110 sueros trabajados por la técnica de Inmunolectroforesis por contracorriente (CIE), los resultados obtenidos en las diluciones de 1:5, 1:10 y 1:20 mostraron títulos de anticuerpos que van de 1:93 a 1:549 con un promedio de 1:229 (cuadro 1), en los 40 sueros trabajados por seroneutralización en ratón (SN) se realizaron diluciones de 1:5, 1:25, 1:125 y 1:625, observándose que el valor mínimo de anticuerpos fué de 1:62 y el máximo de 1:742 con un promedio de 1:725 (Cuadro 2 y 3). En cuanto al número de animales muestreados por sexo se encontró que los machos representan el 62.727% con un promedio de títulos de anticuerpos de 1:410.5, en cuanto a hembras siendo estas el 37.272% las que mostraron un promedio en el título de anticuerpos de 1:399.4 (Gráfica # 1), de acuerdo a los grupos de edades el porcentaje de la población en los perros de 1 año representan el 15.454%; 2 años 21.818%; 3 años 18.181%; 4 años 23.636%; 5 años 10%; 6 años 5.454%; 7 años 2.727%; 8 años 1.818% y los de 9 años 0.909%. (Gráfica # 2) y sus títulos promedios de anticuerpos por grupos de edad mostraron en los de 1 año el 1:368.7; 2 años 1:344.7; 3 años 1:386.9; 4 años 1:459.4; 5 años 1:449.3; 6 años 1:442.3; 7 años 1:442.3; 8 años 1:389 y los de 9 años 1:549. (Gráfica #3).

La variabilidad de los títulos de anticuerpos con relación al número de vacunas no fue significativa ya que los niveles

promedios de anticuerpos fueron en los de 2 vac. 1:366.09; 3 vac. 1: 444.48; 4 vac. 1:442.33; 5 vac. 1:393.8; 6 vac. 1:389 y los de 7 vacunas 1:549, (Gráfica #3), de acuerdo al porcentaje poblacional según el número de vacunas se obtuvo lo siguiente: los de 2 vacunas representan el 50%; 3 vacunas 28.181%; 4 vacunas 13.636%; 5 vacunas 4.545%; 6 vacunas 1.818%; 7 vacunas 1.818% (Gráfica #4).

Por otro lado de los 110 perros muestreados el 9.09% no mostraron títulos de anticuerpos.

Cuadro # 1

Titulos de anticuerpos obtenidos por CIE

No de muestr	Sexo	Edad	Numero de vacunas	Titulo CIE		No de muestra	Sexo	Edad	Numero de vacunas	Titulo CIE
1	M	48	3	93		56	H	36	3	549
2	M	36	2	93		57	H	106	7	549
3	M	48	3	549		58	H	24	2	93
4	M	12	2	549		59	H	36	3	549
5	M	12	2	549		60	M	36	3	549
6	M	60	5	93		61	M	48	4	549
7	H	48	3	549		62	M	60	4	549
8	M	12	2	-		63	M	84	7	549
9	M	12	2	-		64	H	48	3	549
10	M	60	4	229		65	M	72	6	549
11	M	48	2	549		66	H	96	6	229
12	M	12	2	-		67	M	24	2	549
13	M	48	4	229		68	M	60	4	229
14	H	36	2	549		69	M	36	2	549
15	M	48	3	93		70	M	48	3	93
16	H	24	3	549		71	H	12	2	549
17	M	12	2	549		72	M	12	2	229
18	H	12	2	549		73	M	48	3	549
19	M	12	2	549		74	M	36	2	549
20	M	24	2	229		75	M	24	2	549
21	M	48	2	549		76	M	24	2	229
22	H	36	2	549		77	M	36	3	549
23	H	24	2	229		78	H	48	3	549
24	H	48	3	549		79	H	48	4	549
25	M	84	4	549		80	H	24	2	229
26	M	24	2	-		81	H	36	2	549
27	H	72	5	229		82	M	48	3	229
28	H	50	3	549		83	H	48	2	549
29	H	60	2	549		84	M	72	4	229
30	M	24	2	-		85	M	36	2	549
31	M	84	3	229		86	M	48	3	549
32	M	24	2	-		87	M	60	4	549
33	M	12	2	-		88	M	36	2	93
34	H	36	2	-		89	M	60	3	549
35	H	36	2	-		90	M	60	3	549
36	H	72	4	549		91	M	24	2	549
37	H	48	3	549		92	M	48	3	549
38	M	60	4	549		93	H	36	3	93
39	H	48	3	549		94	M	24	2	229
40	M	24	2	229		95	M	24	2	549
41	M	48	3	549		96	M	12	2	549
42	H	12	2	-		97	H	36	3	93
43	M	12	2	549		98	M	48	4	549
44	H	24	2	549		99	H	60	4	549
45	M	24	2	549		100	H	72	5	549
46	M	24	2	549		101	H	36	3	229
47	H	48	3	549		102	H	24	2	549
48	M	36	3	549		103	M	24	2	549
49	M	96	7	549		104	M	12	2	549
50	H	24	2	229		105	M	12	2	549
51	M	12	2	549		106	H	72	5	549
52	M	48	4	549		107	M	48	3	549
53	M	24	2	549		108	M	36	2	549
54	H	24	2	229		109	M	36	3	549
55	H	24	2	549		110	M	48	4	229

Cuadro # 2

Titulos de anticuerpos por SN/CIE y SN

No de muestra	Sexo	Edad	Numero de vacunas	Titulo SN/CIE	Titulo SN	No de muestras	Sexo	Edad	Numero de vacunas	Titulo SN/CIE	Titulo SN
1	M	60	5	229	1549	21	M	24	2	549	625
2	M	12	2	549	625	22	H	36	2	549	1549
3	M	48	3	549	281	23	H	46	3	549	281
4	M	24	2	93	67	24	M	48	2	549	285
5	M	12	2	93	67	25	M	72	4	549	625
6	H	48	4	549	625	26	M	48	4	549	625
7	H	60	2	93	67	27	M	12	2	93	56
8	M	24	2	229	625	28	H	12	2	549	478
9	M	12	2	549	204	29	H	36	2	549	625
10	M	24	2	93	70	30	H	48	4	549	707
11	M	48	4	549	1905	31	M	12	2	549	338
12	M	84	5	229	166	32	H	12	2	549	147
13	M	36	3	549	281	33	M	48	3	229	1380
14	M	34	5	93	77	34	H	48	3	549	5012
15	H	12	2	549	1112	35	M	36	2	549	186
16	M	36	3	229	316	36	H	12	2	549	625
17	M	60	3	229	416	37	M	24	2	549	625
18	H	36	3	229	625	38	M	36	3	549	625
19	H	36	2	549	102	39	H	12	2	549	261
20	H	48	2	549	625	40	M	24	2	549	625
											25471

$SN = 25471/40 = 1:636.7$ promedio de titulo de anticuerpos encontrados

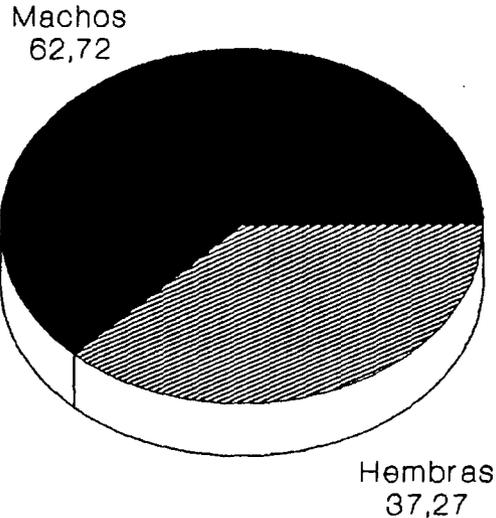
Cuadro # 3

Promedio de los titulos encontrados por ambas pruebas

Numero de Suero	Dilucion CIE	X Titulo SN	Titulo SN base CIE
5	5	62	93
7	10	725	229
27	20	742	549

Grafica # 1

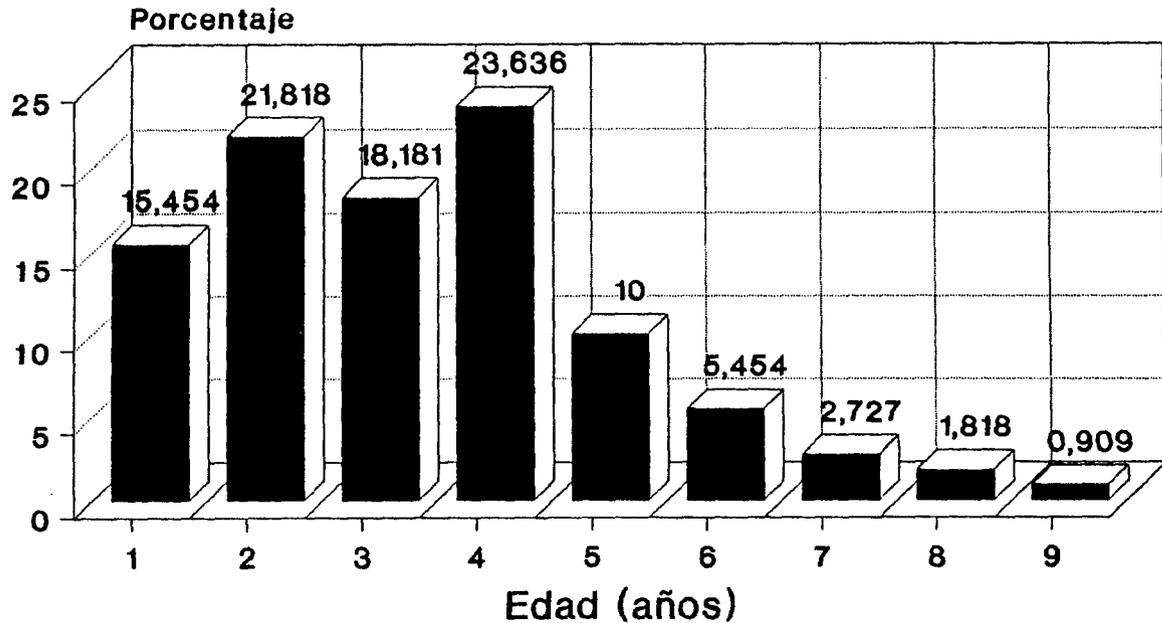
Distribucion y promedio de los titulos de anticuerpos de acuerdo al sexo



Titulo de anticuerpos:
Machos 1:410.5
Hembras 1:399.4

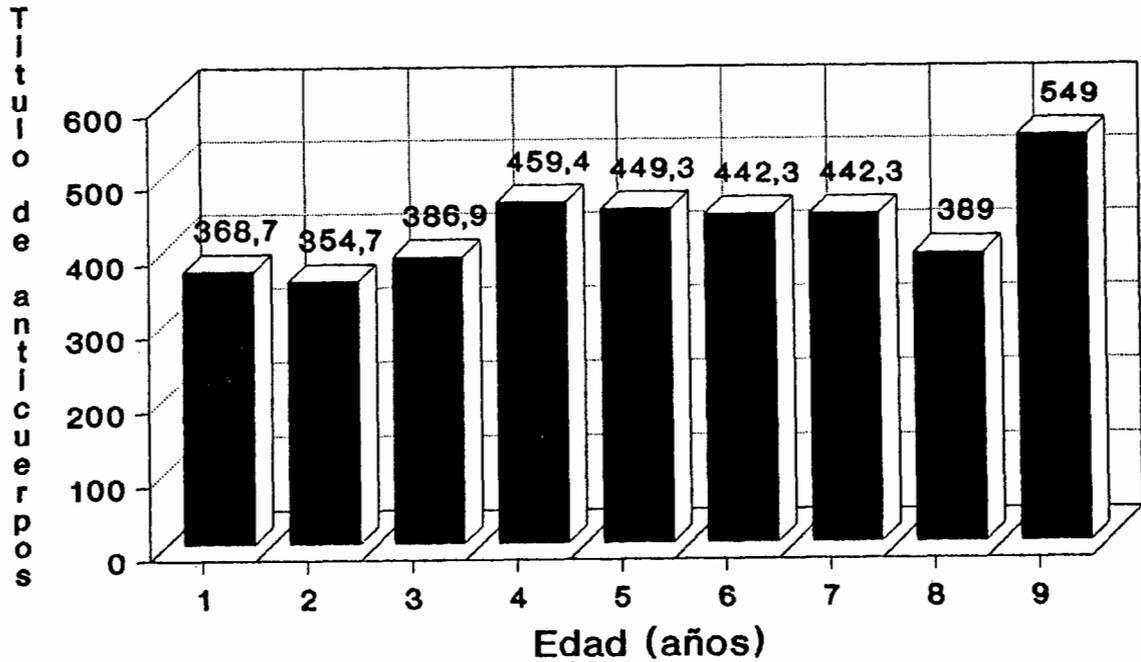
Grafica # 2

Promedio del numero de animales muestreados por grupo de edad



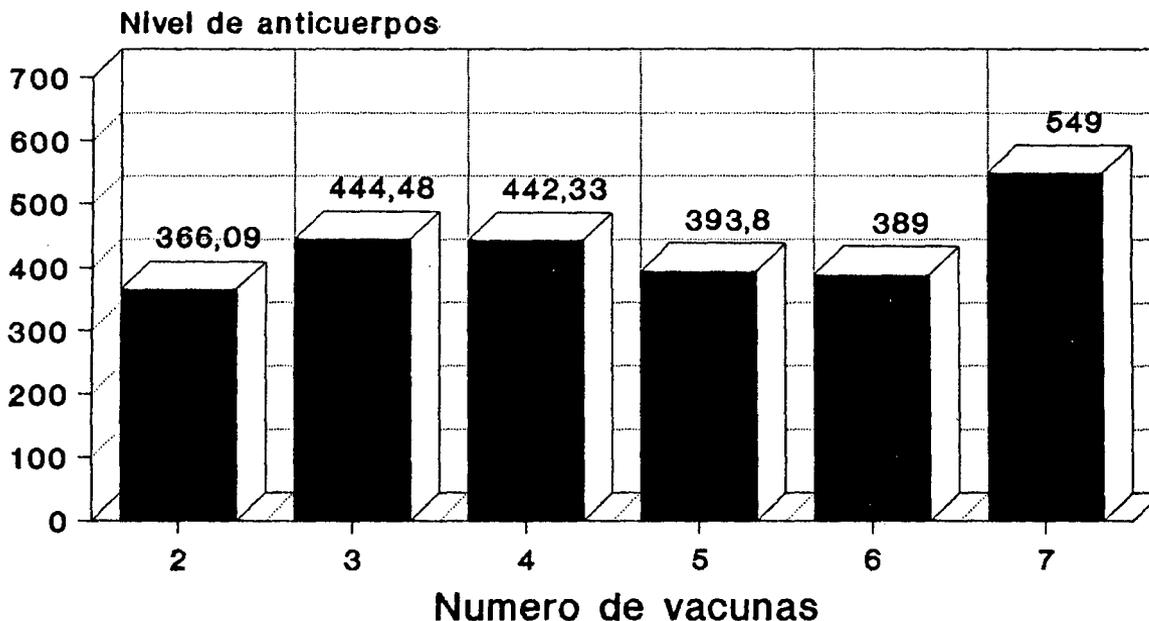
Grafica # 3

Distribucion de titulos de anticuerpos de acuerdo a la edad de los canideos



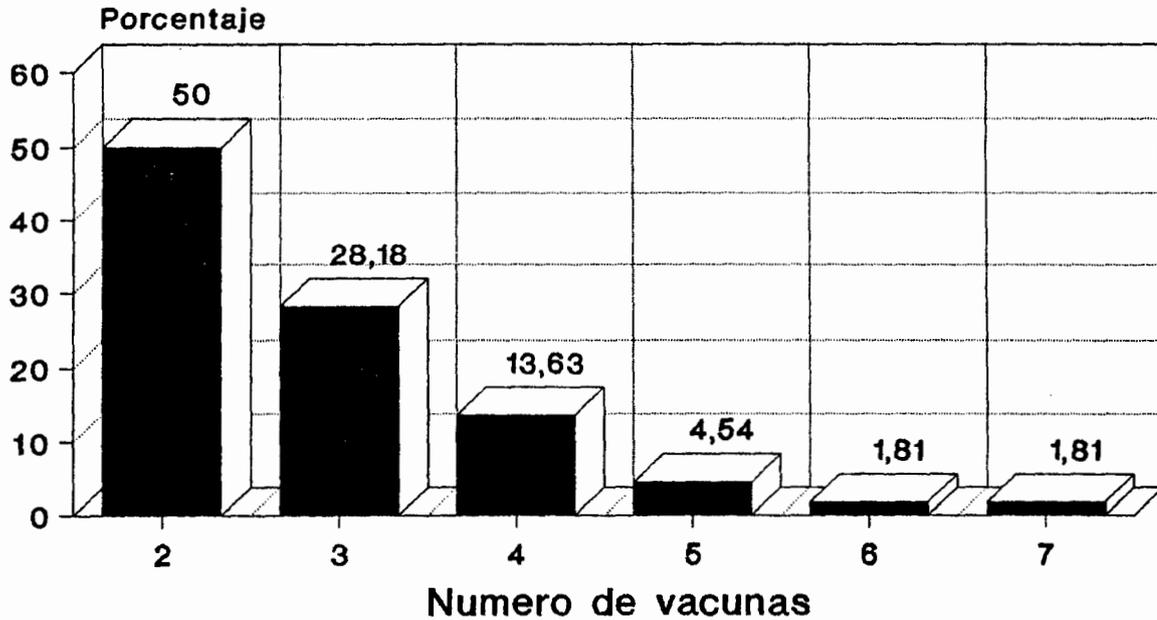
Grafica # 4

Promedio de niveles de anticuerpos de acuerdo al numero de vacunas aplicadas



Grafica # 5

Distribucion de los porcentajes segun numero de vacunas



CUCBA



DISCUSION

Los 110 sueros trabajados de perros vacunados en las campañas antirrábicas realizadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en los años de 1989, 1990 y 1991, se trabajaron mediante la técnica de inmunoelectroforesis por contracorriente en la cual se hizo la comparación de los controles trabajados con la técnica de seroneutralización (SN) en raton indicando buena especificidad (13, 17)

Para ello fue necesario determinar la línea de regresión, del los Log_{10} de los títulos obtenidos por ambos métodos. La ecuación de la regresión lineal de estos valores fue:

$$Y = 1.55 + 0.55 (X)$$

La pendiente $b = 0.55$ puede ser interpretada como el incremento en el Log_{10} del título CIE. Para obtener el valor estimativo del título de Seroneutralización en base a los resultados obtenidos por CIE, debe ser usada la siguiente conversión:

$$\text{Log}_{10} \text{ Título SN} = 1.55 + 0.55 \text{ Log}_{10} \text{ título de CIE}$$

En este trabajo se estudiaron 110 muestras de cánidos, las cuales fueron corridas todos los sueros por la técnica de

Inmunolectroforesis por contracorriente, trabajandose únicamente 110 sueros debido a que en este momento se contaba con reactivos para trabajar dicha cantidad de sueros.

De los 110 sueros trabajados por CIE se tomaron 40 sueros al azar para correrlos por la técnica de seroneutralización, siendo dicha cantidad de sueros la aceptada por la OPS. (Información directa). Esto para estandarizar la prueba de inmunolectroforésis por contracorriente, con el fin de detectar anticuerpos antirrábicos en la especie canina.

Para la realización de esta prueba (CIE) se utilizó Vielicon 1:4 el cual es un antígeno de cultivo celular concentrado que presenta la ventaja de eliminar reacciones cruzadas con virus murinos, de ser específico, con título alto, siendo estas las ventajas que tiene el utilizar Vielicon ⁽¹⁴⁾, en lugar del CVS que utilizan otros autores ^(11, 12, 21)

Los resultados obtenidos con las dos técnicas evaluadas muestran que fue posible determinar la presencia de inmunoglobulinas séricas en los cánidos vacunados contra la rabia dando un coeficiente de correlación de $r = 0.60$, Rodríguez Miranda ⁽²¹⁾, demostró en un estudio realizado en cuyos vacunados contra rabia la presencia de anticuerpos, obteniendo una

correlación lineal de $r = 0.88$, encontramos a Díaz y Myers que estudiaron sueros de humanos en donde obtuvieron una correlación lineal de $r = 0.59$ ⁽⁸⁾, así mismo Mejía y Loza ⁽¹⁶⁾ estandarizaron la prueba de CIE en sueros ovinos inmunizados contra rabia, en donde su correlación lineal obtenida fue de $r = 0.85$ y en bovinos con una correlación de $r = 0.80$ ⁽¹³⁾.

En cuanto a los resultados obtenidos de acuerdo al sexo, se observó que el número de machos muestreados es mayor y su promedio del título de anticuerpos fue 1:410.5, las hembras mostraron un título promedio 1:399.4 lo cual indica que el sexo no es un factor importante en el promedio de títulos de anticuerpos obtenidos ya que son similares. En el caso de los resultados arrojados por los grupos de edad indican que los promedios de los títulos de anticuerpos encontrados en los perros de 1 a 3 años son similares, de igual modo en los grupos de 4 a 9 años de edad hubo similitud, esto explica que de alguna manera los animales podrían haber estado en contacto con el virus de campo de rabia ^(16, 24) según el porcentaje de la población muestreada se observó que el rango mayor de edades de los perros es de 1 - 5 años. En los títulos de anticuerpos de acuerdo al número de vacunas mostró que no existe variación significativa, un estudio similar reporta que los animales presentan niveles de anticuerpos semejantes con 3 aplicaciones de vacuna ⁽¹⁶⁾.

Del total de la población muestreada el 9.09% no presentó títulos de anticuerpos esto debido quizá a que se desconocen antecedentes nosológicos, manejo y principalmente a que su última aplicación de vacuna se realizó hace un año (24)

CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la técnica de Inmunolectroforesis por contracorriente (CIE) es apropiada para la determinación de inmunoglobulinas contra rabia ya que muestra una estrecha correlación con la prueba de Seroneutralización (SN) la cual se comprobó al obtener un coeficiente de correlación lineal de $r = 0.60$.
- 2.- La técnica de CIE por su alta sensibilidad puede servir como tamiz en el diagnóstico serológico de rabia, además de que es rápida y económica.
- 3.- En la población muestreada el promedio en los títulos de anticuerpos fue de 1: 406.5, lo cual indica que los perros vacunados contra rabia en las campañas antirrábicas realizadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia si están protegidos.
- 4.- La variación en promedios de anticuerpos no fue significativa en cuanto a sexo, edad y número de vacunas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acha N. P., Boris S.: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS. 2da edición, 1981, pp 342 - 361.
- 2.- Aguirre V.A., Vargas M.G., Martínez B.J.: Inoculación y antigenicidad de una cepa de virus rábico de calle de origen canino inoculado en felinos por vía oral e intramuscular. Memorias reunión V Nacional de Investigaciones Pecuarias. 1989, pp 55
- 3.- Aguirre V.A., Vargas M.G., Martínez B.J. Distribución y caracterización de lesiones en SNC y su relación con signos clínicos en perros positivos a rabia por inmunofluorescencia, Memorias de la reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Laboratorio de Diagnóstico de la FMVZ Universidad de Tamaulipas (1989) pp 79.
- 4.- Archivos Administrativos Campañas antirrábicas anuales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara. 1991.

- 5.- Batalla C. H., Noguez C.C. Rabia . Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. 1990.
- 6.- Bear G.M. y cols: Rabia. Edición Científica, La Prensa Mexicana 1982.
- 7.- Cuevas R.S., Hernandez B.E., Sierra R.N., de la Paz V. O., Labrandero I.E. Primera etapa de la evaluación de una vacuna antirrábica inactivada con coadyuvante propio para perros. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. INIFAP - CENID - Microbiología. 1989. pp 80.
- 8.- Díaz A.M., Myers D.M. 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. 1981.
- 9.- Hernández E.M., Bijlenga D.G. La prueba de microfocos fluorescentes: una nueva técnica in vitro para titulación y seroneutralización del virus rábico. Reunión de Investigaciones Pecuarias en México. 1973. pp 41 - 45
- 10.- Kaplan M.M., Kaprowski H. Rabia, Técnica de laboratorio. 3era Edición. Suiza 1976.

CUCBA

- 11.- Loza R.E. , Hernández B.E. Concentración de antígenos de virus rábico producido en cultivo celular como apoyo para la técnica de contraimmunoelectroforesis. Técnica Pecuaria en México 1989. pp 267 - 271.
- 12.- Loza R.E., Hernández B.E., Mejia S.P. Prueba de NHI como método para evaluar la inmunogenicidad de una vacuna antirrábica concentrada. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 1990. pp 81.
- 13.- Loza R.E., Hernández B.E. Concentración de antígenos de virus rábico producido en cultivo celular como apoyo para la técnica de contraimmunoelectroforésis. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 1987. pp 54.
- 14.- Loza R.E., Mejia S.P. Vielocon con un antígeno de virus rábico concentrado para la técnica de inmunoelectroforésis por contracorriente. Boletín informativo. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.
- 15.- Martínez B.J., Vargas M.G., Noguel P.A., César S.A., Reyes H.A. Avance de técnicas comparativas para el diagnóstico de la rabia y su incidencia en el estado de Tamaulipas. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 1989. pp 49.

- 16.- Martin P.M. Evaluación de los niveles de anticuerpos específicos contra el virus del Distemper canino, después de la aplicación de 3 diferentes vacunas. Tesis Licenciatura. 1992

- 17.- Mejía S.P., Loza R.E. Titulación de anticuerpos antirrábicos de sueros ovinos mediante las técnicas de inmunoelectroforésis y seroneutralización. Técnica Pecuaria en México. Septiembre - Diciembre 1991. Vol 29. No 3. pp 165 - 168.

- 18.- Mejía S.P., Velazquez V.J., Hernández B.E. Evaluación del antígeno concentrado del virus rábico producido en el cultivo celular por medio de la técnica de contrainmunolectroforésis (CIE). Memorias Reunión de Investigación Pecuaria. 1989. pp 53.

- 19.- Merchant I.A., Packer R.A. Bacteriología y Virología Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1982. pp 764 - 771.

- 20.- Mohanty S.B., Dutta S.H. Virología Veterinaria. Nueva Editorial Internacional. 1984. pp 238 - 241.

- 21.- Pérez H., González, D., Fernández M. Técnicas Pecuarias en México. Julio - Diciembre 1981. pp 76 - 99.
- 22.- Rodríguez M.J.A. Determinación de anticuerpos contra rabia en sueros de animales vacunados y desafiados (Prueba de Potencia), mediante la prueba de inmunolectroforésis modificada, Tesis Licenciatura. UNAM. México. 1984.
- 23.- Secretaria de Salud y Bienestar Social. Laboratorio Estatal de Salud Pública. Jurisdicción X. 1981.
- 24.- Tizard I. Inmunología Veterinaria. 2da Edición. Editorial Interamericana. México. 1987
- 25.- Vargas G.R., León M.M.E. Epidemiología de las mordeduras de perros en el área urbana del Valle de México. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública F.M.V.Z. Ciudad Universitaria. D.F. IMSS. México D.F. 1989. pp 50.
- 26.- Velázquez V.J., Mejía S.P., Hernández B.E. Diagnóstico serológico de rabia mediante la técnica de ELISA. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 1987. pp 51, 52.

27.- Vilchis L.H. Fundamentos y criterios para la aplicación de esquemas antirrábicos pre - exposición. Simposium, La atención Médica de las personas involucradas en un incidente de rabia. 1987.