

CONCENTRACION DE ANTIGENO DE VIRUS RABICO PRODUCIDO EN CULTIVOS CELULARES COMO APOYO PARA LA TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE) ^a

ELIZABETH LOZA RUBIO ^b

ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN ^c

RESUMEN

El objetivo fue estudiar si con los métodos de precipitación con acetato de zinc, sulfato de sodio y sulfato de amonio era posible concentrar virus rábico producido en cultivo celular, de tal manera que pudiera usarse como antígeno patrón para CIE. Se elaboraron cuatro lotes en la línea celular BHK-21 con la cepa V-319/Acatlán de virus de rabia. Cada lote se dividió en tres partes que se precipitaron con soluciones saturadas de cada sal. Como control negativo se usó sobrenadante de células sin infectar. Se cuantificaron proteínas por el método de Lowry en sobrenadantes y precipitados de cada muestra. La actividad antigénica se valoró con inmunodifusión doble en gel (IDG). Mediante análisis de varianza se determinó que el precipitado con acetato de zinc presentó una mayor actividad, lo cual fue estadísticamente significativo con respecto a las otras muestras ($P < 0.05$). Con base en los resultados se concluye que la sal que mejor funciona para concentrar antígeno de virus rábico es el acetato de zinc lo que permite usarlo como antígeno patrón en IDG y CIE, y se propone aquí como antígeno internacional de referencia para la prueba.

INTRODUCCION

La rabia es una infección aguda del sistema nervioso central que afecta a

todos los animales de sangre caliente incluyendo al hombre (2, 7, 6). Es causada por un virus del grupo Rabdovirus, familia Rhabdoviridae y la especie Lyssavirus (4), del que es virus tipo (8).

Actualmente, el mayor número de pruebas de diagnóstico efectuadas en un laboratorio de microbiología esta constituido por pruebas serológicas (6), como son el método inmunoenzimático ELISA (1), anticuerpos fluorescentes (11), seroneutralización en ratón y últimamente se les ha sumado la contrainmunolectroforesis (CIE) que se basa en la unión de los anticuerpos antirrábicos presentes en diluciones variables de un suero problema con una cantidad constante de antígeno de virus rábico (3).

Tanto para la realización de ésta última, como para otras pruebas serológicas, se requieren grandes cantidades de virus rábico por lo que es conveniente producirlo en cultivo celular y concentrarlo ya que de esta manera presentaría la ventaja de ser un antígeno más puro y con mayores títulos, pues se eliminan proteínas extrañas.

Algunos de los métodos de concentración y purificación de virus producido en cultivo celular que se han utilizado son: ultrafiltración a través de membranas de nitrocelulosa, sistema de ultrafiltración Diaflow, o una combi-

^a Recibido para su publicación el 16 de agosto de 1988.

^b Proyecto Biotecnología en Salud Animal. Centro Nacional de Investigaciones Microbiológicas. INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, C.P. 05110, México, D.F.

^c Experto Nacional de la Red de Epidemiología. Centro Nacional de Investigaciones Microbiológicas. INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, C.P. 05110, México, D.F.

nación de ultrafiltración y centrifugación a alta velocidad (13, 12).

En México el procedimiento de concentración de virus rábico ha sido poco estudiado, por lo que se creyó de interés investigar si con los métodos de precipitación con sales (acetato de zinc, sulfato de amonio y sulfato de sodio) era posible concentrar antígeno de virus rábico producido en cultivos celulares de tal manera que pudiera utilizarse en la técnica de CIE en sustitución del antígeno preparado a partir de cerebros infectados de animales lactantes, así como evaluar los concentrados de virus rábico obtenidos con cada una de las sales mediante inmunodifusión doble en gel (IDG), para su posterior uso como antígeno patrón en la técnica de CIE.

MATERIAL Y METODOS

La investigación fue llevada a cabo en tres fases.

FASE 1. Elaboración del cosechado de virus rábico.

Se elaboraron cuatro lotes de cosechado de virus rábico (87-1-E, 87-2-E, 87-3-E y 87-4-E) en la línea celular BHK-21 con la cepa V-319/Acatlán. Para ello se subcultivaron células hasta obtener monoestratos confluentes en botellas de roller, a los cuales se les infectó y posteriormente se les agregó medio de mantenimiento.

Para la preparación de los cuatro lotes se procedió a estandarizar las condiciones de trabajo empleando los mismos medios, tiempo y temperatura de incubación e infección; así como velocidad de rotación de los cultivos. Cada uno de los lotes que se elaboraron constó de dos botellas control con monoestratos libres de virus.

FASE 2. Concentración del antígeno de virus rábico.

Cada uno de los lotes se dividió en tres partes que se precipitaron con

soluciones saturadas de acetato de zinc 1 M, sulfato de sodio 1 M y sulfato de amonio 1 M respectivamente en proporción 5:1. Las mezclas se mantuvieron en refrigeración (4C + 1C) durante 60 minutos para ayudar a que se precipitaran. Posterior a esto se centrifugaron durante 30 minutos a 2500 g, y a la pastilla formada se le resuspendió con ácido etilendiaminotetra-acético al 15% en un volumen de 1.25% del original. Como control negativo se usó el medio sobrenadante de células sin infectar trabajado en la forma anterior.

Se determinó concentración de proteínas mediante el método de Lowry (10) en sobrenadantes y precipitados del cosechado de virus rábico y en el control negativo (sobrenadante y precipitado de células sin infectar), en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 725 nm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

FASE 3. Evaluación de los antígenos rábicos concentrados. Para probar la actividad antigénica de los concentrados se realizó inmunodifusión doble en gel (IDG), para ello se prepararon placas de agarosa al 0.9%, con el empleo de buffer de Tris, pH 7.8. En estas pruebas se utilizaron sistemas de seis foseas periféricas de 6 mm de diámetro para los antígenos, con un pozo central de 5 mm para el anticuerpo (suero hiperinmune antirrábico de caballo) con una distancia de 5 mm entre foseas. Los antígenos concentrados obtenidos con cada sal fueron ensayados sin diluir (1:0) y a diluciones de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 previa exposición a dodecil sulfato de sodio al 0.1% por ml de antígeno. Las placas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente y se observaron hasta las 48 horas.

Los resultados de concentración de proteína (mg/ml); así como los datos obtenidos (última dilución en donde se presentó línea de precipitación) en IDG se evaluaron a través de análisis de varianza.

CUADRO 1.

CANTIDAD DE PROTEINA DESPUES DE LA CONCENTRACION
(mg/ml)

TRATAMIENTOS

REPETICION	ACETATO DE ZINC		SULFATO DE SODIO		SULFATO DE AMONIO		TESTIGOS ANTES DE CONCENTRAR
	SIN VIRUS	CON VIRUS	SIN VIRUS	CON VIRUS	SIN VIRUS	CON VIRUS	
87-1-E	5.32a	15.16a	2.20b	3.71b	2.54b	2.66b	1.27
87-2-E	4.57a	13.46a	2.69b	3.43b	1.55b	3.90b	1.65
87-3-E	6.74a	19.94a	2.53b	4.72b	1.90b	4.06b	1.38
87-4-E	4.80a	10.30a	2.38b	3.67b	2.25b	3.74b	1.08
PROMEDIO	5.36a	14.60a	2.45b	3.88b	2.06b	3.59b	

VALORES CON DIFERENTE LITERAL SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES ($P < 0.05$)

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se representan los resultados en mg/ml de proteína tanto para las muestras que contenían al virus rábico como para el control negativo; el aumento de proteína en éste último con respecto al testigo antes de concentrar puede explicarse debido a la presencia de proteínas del suero y células en el medio sobrena-

dante; sin embargo en el Cuadro 2 se presentan las diluciones máximas obtenidas mediante IDG que sirvieron para probar la actividad antigénica de los precipitados con las tres sales. Como puede apreciarse en ambos cuadros el concentrado de virus rábico obtenido con la precipitación por acetato de zinc es el que mejores resultados proporciona, esto lo demuestra el análisis de varianza que señala una diferencia

CUADRO 2

TITULACION DEL ANFIGENO CONCENTRADO MEDIANTE IDG

TRATAMIENTOS

REPETICION	ACETATO DE ZINC	SULFATO DE SODIO	SULFATO DE AMONIO
	IDG	IDG	IDG
LOTE-87-1-E	1:8a	1:2b	1:0b
LOTE-87-2-E	1:2a	No líneas b	No líneas b
LOTE 87-3-E	1:4a	1:0b	1:0b
LOTE 87-4-E	1:4a	No líneas b	1:0b
PROMEDIO	1:5.5a	1:0.75b	1:0.75b

VALORES CON DIFERENTE LITERAL SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES ($P < 0.05$)

estadística significativa para los cuatro lotes probados ($P < 0.05$), a diferencia del sulfato de sodio y sulfato de amonio que incluso en algunas ocasiones no presentaron líneas de precipitación ni siquiera en la dilución 1:0 (antígeno concentrado sin diluir), esto puede explicarse porque la IDG aunque es una prueba útil no es muy sensible (10, 2, 5), sin embargo, Mejía (9), evalúa estos mismos antígenos por la técnica de contrainmunolectroforesis (CIE) para usar el que resulte mejor como antígeno patrón en dicha prueba (para así sustituir al antígeno rábico producido a partir de cerebros infectados de ratones lactantes) y concluye que el que resulta superior es el concentrado con acetato de zinc, ya que con las otras dos sales existieron ocasiones en que solamente se presentaron bandas de precipitación en la dilución 1:0 (antígeno concentrado sin diluir) a pesar de que la CIE es más sensible que la IDG.

Por otra parte Velázquez (14) utiliza al antígeno de virus rábico concentrado con acetato de zinc en la prueba de ELISA y lo compara con un antígeno concentrado por ultrafiltración dando mejores resultados el primero por su mayor pureza.

CONCLUSIONES

La sal que mejor funciona para concentrar antígeno de virus rábico es el acetato de zinc, ya que este antígeno demostró ser más específico que los concentrados con sulfato de sodio y sulfato de amonio, y mejor aún que con uno sin concentrar.

Este concentrado puede utilizarse como antígeno patrón en técnicas serológicas para el diagnóstico de rabia como: Inmunodifusión doble en gel, ELISA y contrainmunolectroforesis entre otras; por lo tanto puede sustituir al antígeno preparado en cerebros infectados de animales lactantes. Este reemplazo permite elabo-

rar y estandarizar lotes del tamaño que se desee y así eliminar virus murinos que pueden dar reacciones cruzadas con coriomeningitis linfocitaria y otros agentes del ratón.

SUMMARY

The aim of this study was to determine whether the salting out methods with zinc acetate, ammonium sulphate and sodium sulphate could be used to concentrate rabies virus grown in tissue culture, to be used as antigen in counterimmunoelectrophoresis test. Four batches were produced in BHK-21 cells with V-319/Acatlan strain of rabies virus. Each batch was divided in three parts which were precipitated with saturated solution of each salt. The negative control was supernatant of non infected cells. The protein concentration was determined in supernatant and precipitate of each sample using the Lowry protein assay. The agar gel double diffusion test was used to evaluate concentrated antigens. By using the ANOVA test for statistical evaluation of the results it was determined that the zinc acetate precipitate had the highest activity which was significant ($P < 0.05$) as compared to the other samples. We conclude that the best choice to concentrate rabies virus antigen for the CIE test is zinc acetate, which allows it to use it as a standard antigen and is hereby proposed as an International standard of reference for the test.

LITERATURA CITADA

- 1 ATANASIU, P. y SAVY, V. 1977. Epreve immunoenzymatique pour la detection rapide des anticorps antirabiques. *Ann. Microbiol.* A128: 489.
- 2 DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N. y GINSBERG, H.S., 1979. Tratado de Microbiología. 2ª ed. *Salvat Editores, S.A.* Barcelona, España. p 403.
- 3 DIAZ, A.M. y MYERS, D.M. 1983. Rabies neutralizing antibodies determination by the modified counterimmunoelectrophoresis test and the rapid fluorescent focus inhibition test. *Zbl. Bakt. Hyg.* A 256:1.
- 4 FENNER, D. 1976. Classification et nomenclature des virus. *Annual of Microbiology (Ins. Pasteur)*. 123:323.
- 5 FUDENBERG, H. 1978. Inmunología Clínica. 2ª ed. *El Manual Moderno*. México, D.F. p 463.

6 GILLESPIE, J.H. y TIMONEY, J.F., 1983. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4ª ed. **La Prensa Médica**. México, D.F. p 438.

7 JAWETZ, E., MELNICK, J.L. y ADELBERG, E.A. 1979. Manual de Microbiología Médica. 8ª ed. **El Manual Moderno**. México, D.F. p 463.

8 MATHEUS, R.E.F., 1982. Clasificación and nomenclature of viruses. *Intervirology*. **Karger Medical and Scientific Publishers**. 1:109.

9 MEJIA, S.P., VELAZQUEZ, V. J. y HERNANDEZ, B.E., 1987. Evaluación del antígeno concentrado de virus rábico producido en el cultivo celular por medio de la técnica de contraelectroforesis (CIE). **Memorias. Reunión de Investigación Pecuaria en México**. México, D.F. p 53.

10 MORILLA, G.A. y BAUTISTA, G.C.R., 1986. Manual de Inmunología. 1ª ed. **Diana**. México, D.F., p 69.

11 SMITH, J.S., JAGGER, P.A. y BAER, G.M. 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. **Bull. Wild. Hlth. Org**. 48:535.

12 SCKUMBERG, H.D., WIKTOR, T.J. and KOPROWSKI, H., 1970. Purification of fixed rabies virus and vaccinia virus by adsorption on Kaolin. **J. Immunol**. 2:291.

13 SOKOL, F., SCHLUMBERGER, H.D., WIKTOR, T.J. y KOPROWSKI, H. 1968. Biochemical and biophysical studies of the nucleocapsid and the RNA of rabies virus. **Virology**. 38:651.

14 VELAZQUEZ, V.J.M., MEJIA, S.P. y HERNANDEZ, B.E., 1987. Diagnóstico serológico de la rabia mediante la técnica de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). **Memorias. Reunión de Investigación Pecuaria en México**. México, D.F., p 51.