

# PRODUCCION DEL PRIMER LOTE DE CONJUGADO ANTIRRABICO DE ORIGEN CAPRINO EN EL PERU

*Lopez I. Ricardo,<sup>1</sup> Fernandez V. Roque<sup>2</sup>*

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la producción y evaluación del primer lote de conjugado antirrábico de origen caprino producido en el Perú. La globulina antirrábica conjugada con fluoresceína fue preparada en el Laboratorio de Referencia de Rabia y la vacuna utilizada para la inmunización de los animales fue producida en el Laboratorio de Rabia del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú). Para la inmunización se utilizó una vacuna hecha a base de cultivo de células VERO con los adyuvantes de Freundt completo e incompleto. La vacunación se hizo semanalmente por cuatro semanas con descarga de virus vivo a la quinta y dos revacunaciones más posteriormente. El conjugado producido en el laboratorio obtuvo una intensidad 4+ en tinción específica, 3+ en calidad de inclusiones y 1+ de fluorescencia no específica. Sin embargo, el conjugado comercial obtuvo una intensidad más baja (3+) en tinción específica, mayor cantidad de inclusiones (4+) y menos tinción inespecífica (0+).

**Palabra clave:** Rabia, conjugado, antirrábico

## ABSTRACT

The objective of the present study was the production and evaluation of the first batch of caprine anti-rabies conjugate produced in Peru. The anti-rabies globulin conjugated with fluorescein was prepared at the Rabies Reference Laboratory of the Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública of the Instituto Nacional de Salud (INS) and the vaccine employed for animal immunization was produced at the Rabies Laboratory of the Centro Nacional de Producción de Biológicos of the INS in Lima, Perú. A VERO tissue culture vaccine was used for the immunization with Freundt complete and incomplete adjuvants. The vaccination was performed weekly for four weeks, plus a live virus discharge on the fifth week and two additional boosters on the following two weeks. The conjugated produced in the laboratory had a 4+ in specific staining, 3+ in quality of inclusions and 1+ in non specific fluorescence. However, the commercial conjugate had less intensity of specific staining (3+), more quality of inclusions (4+), and less non specific staining (0+).

**Key word:** Rabies, anti-rabies, conjugate.

## INTRODUCCION

Fue en 1958 que Goldwasser y Kissling<sup>1</sup> reportaron el uso de la prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Desde entonces han surgido otras técnicas para el diagnóstico de rabia, además de la inoculación en ratones, como el inmunodiagnóstico enzimático rápido de rabia (RREID) (rapid rabies enzyme immunodiagnosis) y el aislamiento en células de neuroblastoma murino. Sin embargo, la técnica de la inmunofluorescencia directa sigue siendo la prueba más rápida, sensible, específica y de bajo

costo que existe. La inmunofluorescencia directa consiste en la utilización de un anticuerpo marcado con fluoresceína (conjugado) para visualizar el antígeno rábico. Esta reacción se hace visible microscópicamente mediante la excitación de la fluorescencia del conjugado con luz ultravioleta. Este conjugado se ha venido adquiriendo durante muchos años de casas comerciales.

El Instituto Nacional de Salud con la implementación de la Red de Laboratorios Regionales y con otros Laboratorios Regionales de Diagnóstico de Rabia, ya en marcha, pone de manifiesto la necesidad creciente del conjugado antirrábico.

El objetivo del presente trabajo fue la producción de un lote de conjugado antirrábico utilizando hamsters, cabras y conejos.

<sup>1</sup> Médico Veterinario, Dpto. de Virología, Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, A.P. 451, Lima, Perú.  
<sup>2</sup> Médico Veterinario, Dpto. de Producción de Vacunas de Rabia, Centro Nacional de Producción de Biológicos, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

## MATERIALES Y METODOS

La globulina antirrábica conjugada con fluoresceína fue preparada en el Laboratorio Referencial de Rabia utilizando para este estudio diez hamsters, cuatro conejos y una cabra. Los procedimientos a seguir para la hiperinmunización y posterior conjugación fueron muy semejantes a la descrita por Larghi<sup>2</sup> con modificaciones de Kaplan y Koprowski<sup>3</sup> y Meslin et al<sup>5</sup>. La primera modificación fue la de substituir el antígeno inmunizante por una vacuna producida por primera vez en el Centro Nacional de Producción de Biológicos en cultivo de células VERO. La segunda modificación fue en el protocolo de inmunizaciones y la tercera en el uso de adyuvantes. Las fases para la preparación de conjugado fueron: inmunización de animales, sangrías exploratorias, conjugación de las inmunoglobulinas y evaluación del conjugado.

**Vacuna:** Para la inmunización se utilizó una vacuna hecha a base de cultivo de células VERO y virus Pasteur (PV) producida en el Laboratorio de Rabia del Centro Nacional de Producción de Biológicos. La vacuna utilizada obtuvo valores antigénicos que sobrepasaron las 2,5 UI que es el requerimiento mínimo exigido por la Organización Mundial de la Salud para vacunas en cultivo celulares.

**Adyuvantes:** Se utilizaron los adyuvantes de Freundt completo e incompleto. El adyuvante de Freundt completo se diferencia del incompleto en el contenido de *Mycobacterium tuberculosis*, la concentración del aceite mineral y el monooleato de manide.

**Inmunizaciones:** Para las inmunizaciones se preparon emulsiones a partes iguales de adyuvante de Freundt y vacuna antirrábica. Estas emulsiones fueron inoculadas semanalmente por cuatro semanas. Luego, a la quinta semana se inoculó virus vivo producido en células VERO. Posteriormente, a partir de la sexta semana se procedió a efectuar sangrías exploratorias.

**Sangrías exploratorias:** Se realizaron sangrías exploratorias después de una semana de la última inyección endovenosa y luego semanalmente. La prueba que se utilizó para detectar el nivel de anticuerpos en el suero fue la Inhibición de la Hemoaglutinación (IH).

**Conjugación de las inmunoglobulinas:** La única modificación a la técnica en la conjugación fue el uso de la prueba de Lowry<sup>4</sup> para determinar la concentración de proteínas del suero.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Existen tres criterios para la evaluación de un conjugado: intensidad de la tinción específica, cantidad de inclusiones y presencia de fondo o

tinción inespecífica. Los resultados de la evaluación pareada 30 muestras positivas y 30 negativas coloreadas con un conjugado comercial y el conjugado de origen caprino producido en el INS se muestran en la Tabla 1

**Tabla No 1. Comparación promedio de títulos óptimos del conjugado antirrábico caprino (INS,PERU) con un conjugado comercial\***

VARIABLE	INS	COMERCIAL*
Intensidad específica	4+	3+
Cantidad de inclusiones	3+	4+
Tinción inespecífica	1+	0+

\* SANOFI Diagnostics Pasteur. Este conjugado se reconstituye y se usa en forma directa, sin diluciones.

El conjugado producido en el INS obtuvo una intensidad de la tinción específica más alta, pero con ligeramente menos inclusiones (1+) y más fondo inespecífico que el conjugado comercial. Es preciso recalcar que la tinción inespecífica fue más alta que la del conjugado comercial porque el conjugado producido no fue tratado para eliminar el fondo inespecífico, como lo fue el producido por SANOFI. En conclusión, se ha obtenido un conjugado satisfactorio, pero es aún necesario hacer un tratamiento adicional, sea utilizando polvo de tejidos o Sephadex para eliminar la tinción inespecífica. Además, en la producción del segundo lote se mejorarán detalles de diluciones, precipitaciones y diálisis con las experiencias obtenidas en el primer lote, que mejorarán la visualización de las inclusiones obtenidas con el conjugado de origen caprino producido en el Instituto Nacional de Salud.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Navarro, María Rosa Spedaletti de Sanofi Diagnostics Pasteur, a las biólogas Patricia Garrido, Albina de Fernández, Victoria Gutierrez, Paquita García, Ivonne Torres, al personal de la granja del INS.

## BIBLIOGRAFIA

1. Goldwasser RA, Kissing RE. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc Soc Exp Biol Med 1958 ; 98:219-223.
2. Larghi O. Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Nota técnica # 8. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS-OMS. 1975.
3. Kaplan M, Koprowski H. La Rabia. Técnicas de Laboratorio. 3 ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976.
4. Lowry D, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 1951, 195: 265-275.
5. Meslin F X, Kaplan M, Koprowski H, Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva World Health Organization 1996.