

LA TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRABICOS

*Ana María Díaz,¹ Edith Arispe,² Carlos Brunel,³
Carlos Cavándoli,⁴ Nora Dellepiane⁵ y
Amaury Miranda³*

INTRODUCCION

La presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de personas o animales que han recibido inmunización antirrábica se relaciona con la protección contra la enfermedad (1). Por ello, su determinación es de gran utilidad para conocer el estado inmune de un huésped susceptible, establecer el diagnóstico de la enfermedad y realizar estudios seroepidemiológicos (2).

Desde que en 1935 se describió la primera prueba serológica para determinar anticuerpos antirrábicos (3) se han elaborado otras que detectan anticuerpos dirigidos a la nucleocápside vírica, tales como las técnicas inmunoquímicas de anticuerpos marcados con fluoresceína (4) y peroxidasa (5), y las de fijación de complemento (6) y precipitación (7). Otros métodos miden los anticuerpos in-

ducidos fundamentalmente por la proteína G (glucoproteína) presente en la envoltura vírica, tales como las pruebas de seroneutralización en ratón (SN) (8), reducción de placas (9), inhibición de campos fluorescentes (ICF) (10) y contra-inmuno-electroforesis (CIE) (11).

En el laboratorio de rabia del Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO), la comparación de sueros de personas que recibieron tratamiento antirrábico posterior a la exposición puso de manifiesto una buena correlación entre los resultados obtenidos con la CIE y con las pruebas de SN (11), inmunofluorescencia indirecta (IFI) (12) e ICF (13).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la reproducibilidad de la técnica de CIE, para lo cual se distribuyeron reactivos estandarizados y sueros codificados en el CEPANZO entre cuatro laboratorios que participaron en el estudio.

¹ Organización Panamericana de la Salud, Centro Panamericano de Zoonosis. Dirección postal: Casilla 3092, 1000 Buenos Aires, Argentina.

² Instituto Nacional de Higiene, Caracas, Venezuela.

³ Centro de Diagnóstico Veterinario Formosa (CEDIVEF), Formosa, Argentina.

⁴ Instituto Pasteur de Buenos Aires, Buenos Aires.

⁵ Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán", Buenos Aires.

MATERIALES Y METODOS

Virus

Para las pruebas de SN se utilizó virus patrón de prueba (challenge virus standard, CVS), preparado en cerebro de ratón en los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América. Para la CIE se empleó el mismo virus, con dos pases sucesivos en cerebros de conejos lactantes (CVS/CCL/2° P) que se realizaron en CEPANZO, cuyo título infectante fue $10^{7.6-7.8}$ en 0,03 ml por vía intracerebral en ratón adulto.

Antígeno

El antígeno se preparó según una técnica descrita previamente (14) que consiste en una suspensión al 40% de tejido nervioso de conejos lactantes infectados con virus CVS/CCL/2° P, en agua destilada suplementada con sacarosa y glicina e inactivada con β -propiolactona 1:3 000. El antígeno se liofilizó durante 24 horas (1 ml/ampolla) en el tubo múltiple (manifold) de un equipo de liofilización. Las ampollas se sellaron a un vacío de 3 a 5 μ .

Suero indicador

Se utilizó suero antirrábico de conejo (160 UI/ml) o de equino (200 UI/ml) elaborados según procedimientos ya descritos (14) y se determinaron las diluciones óptimas para la CIE: 1:16 para el suero de conejo y 1:10 para el de equino.

Sueros problema

Se seleccionaron grupos de 20 sueros de origen humano; 15 pertenecían a personas que habían recibido tratamiento antirrábico con vacuna de cerebro

de ratón lactante (15) y cinco a sujetos que nunca habían sido inmunizados contra la rabia. Los sueros se liofilizaron y se codificaron.

Prueba de seroneutralización

Para esta prueba, que se realizó según procedimientos ya descritos (8), se prepararon diluciones seriadas de los sueros problema en razón 1:5. Se mezclaron volúmenes iguales de cada dilución y de una suspensión de virus CVS que contenía entre 10–100 $DL_{50}/0,03$ ml. Las mezclas se incubaron 90 min a 37 °C, se colocaron en baño de hielo y por vía intracerebral se inoculó 0,03 ml de cada una de ellas en seis ratones adultos. Los animales se mantuvieron en observación durante 14 días y se calculó el título (máxima dilución de suero que protegió al 50% de los ratones inoculados) mediante el método de Reed y Muench.

Prueba de contrainmunolectroforesis

De acuerdo con un procedimiento anterior (11), se recubrieron láminas de vidrio de 75 x 50 mm con 8 ml de agarosa 0,9% en solución amortiguada con veronal sódico 0,05 M, pH = 8,2 y se las mantuvo durante 10 min a 4 °C. En cada una de dos filas paralelas se marcaron a una distancia de 8 mm cinco orificios, de 6 mm de diámetro los de la primera fila y de 3 mm los de la segunda. Las láminas con sus respectivos puentes de papel, y los orificios de mayor tamaño del lado del cátodo, se colocaron luego en la cuba de un equipo de electroforesis.

Se mezclaron e incubaron durante 60 min a 37 °C volúmenes iguales de la dilución óptima de antígeno con diluciones seriadas de suero (razón 1:2) y se colocaron las mezclas en los orificios de 6 mm. Se hizo una corrida electroforética de 45 min a 2 mA por cm de lámina.

Se detuvo el paso de la corriente, se retiró la agarosa de los orificios de 3 mm y se colocó en ellos el suero indicador. Se restableció el paso de la corriente eléctrica y se lo mantuvo con la misma intensidad por 120 min. Transcurrido ese lapso, se identificaron las bandas de precipitación con ayuda de luz incidente. Se consideró como título del suero la mayor dilución que no produjo bandas de precipitación cuya forma, tamaño y ubicación fueran comparables con las del sistema de referencia utilizado en la prueba.

Organización del estudio

En el CEPANZO se prepararon y estandarizaron los reactivos y sueros problema que durante 1984 y 1985 se distribuyeron entre el Instituto Nacional de Higiene de Venezuela (A) y tres laboratorios de la Argentina: Centro de Diagnóstico Veterinario Formosa (CEDIVEF) (B), Instituto Pasteur de Buenos Aires (C) e Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán" (D).

El título de los sueros problema se determinó simultáneamente por SN y CIE en el CEPANZO. Todos los laboratorios titularon el antígeno para CIE frente a la dilución óptima del suero indicador, de acuerdo con las instrucciones enviadas por el CEPANZO. En cada uno de

los laboratorios se titularon los sueros problema por CIE utilizando diluciones seriadas en razón 1:2 y el antígeno en la concentración óptima determinada según sus condiciones de trabajo.

Por último, en el CEPANZO se evaluaron los resultados remitidos por los laboratorios, se calcularon las regresiones lineales y los coeficientes de correlación, y se compararon las pendientes de las rectas ajustadas obtenidas en cada laboratorio.

RESULTADOS

La técnica CIE mostró una sensibilidad del 100%, ya que todos los laboratorios detectaron anticuerpos en los 15 sueros positivos con SN (títulos entre 1:2 y 1:15 625) incluidos en cada grupo. Los laboratorios A, B y D no detectaron anticuerpos en los sueros negativos con SN incluidos como testigos en cada grupo (especificidad 100%). El laboratorio C informó como positivo (1:2) con CIE un suero con resultado negativo con las pruebas de SN del CEPANZO. Por lo tanto, la especificidad en este caso fue del 80%.

En el cuadro 1 se presentan los títulos del antígeno para CIE que se obtuvieron en cada uno de los laboratorios, los que fueron comparables con el logrado en el CEPANZO. Con cualquiera de los dos sueros indicadores que se utili-

CUADRO 1. Títulos del antígeno para la prueba de contrainmunolectroforesis obtenidos en laboratorios de diagnóstico de rabia, expresados como la máxima dilución de antígeno que produce banda de precipitación frente al suero indicador

Suero indicador	Laboratorios				
	A	B	C	D	CEPANZO
Conejo (1:16)	1:22	1:14	—	—	1:18
Equino (1:10)	—	—	1:12	1:14	1:18

DISCUSION

zaron se observaron variaciones de título dentro de los límites esperados.

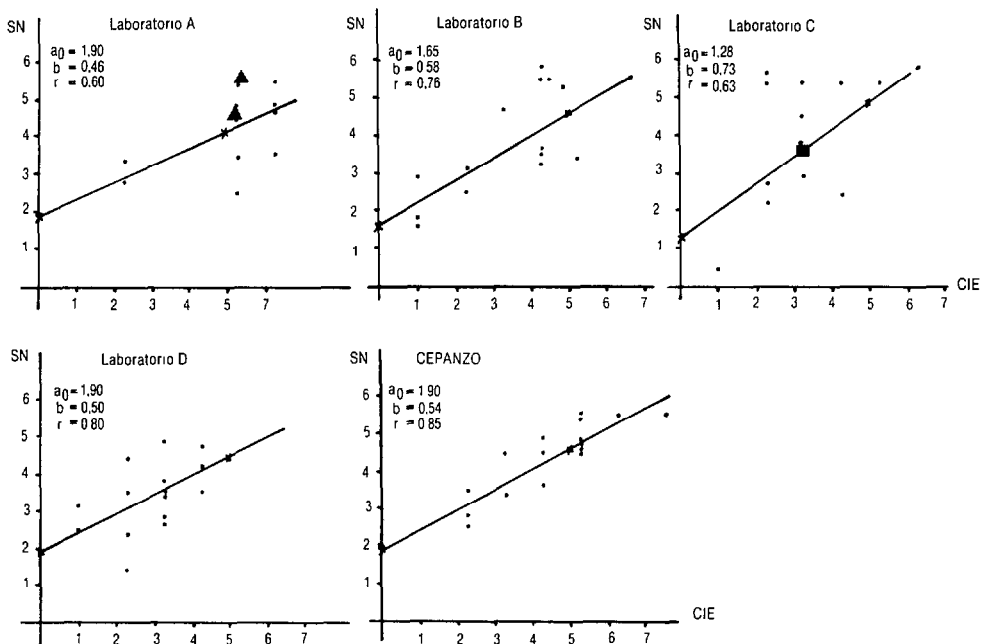
Los gráficos de dispersión 1 a 5 se obtuvieron al relacionar los valores de CIE de cada laboratorio con los resultados de SN del CEPANZO correspondientes a los sueros positivos incluidos en el grupo (figura 1). En el cuadro 2 se muestran los coeficientes de las regresiones correspondientes. No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes b de las rectas ajustadas. Los coeficientes de correlación r oscilaron entre 0,6 y 0,85.

Conviene señalar que el laboratorio C realizó, además, titulaciones por la prueba de SN de todos los sueros problema. Al correlacionar los resultados de CIE y SN, obtuvo una recta de regresión $y = 0,59 + 0,88 x$, y un coeficiente de correlación $r = 0,77$.

Los resultados de este estudio confirman que la CIE es una técnica reproducible y confiable para la titulación de anticuerpos en el suero de personas inmunizadas contra la rabia.

El análisis estadístico de los resultados de los distintos laboratorios mostró que los coeficientes de correlación entre las técnicas de CIE y SN fueron semejantes a los obtenidos en estudios anteriores (11-13). Las diferencias observadas entre los laboratorios A, B y C con relación al D y al CEPANZO podrían atribuirse a una mayor experiencia de estos últimos en la determinación de los puntos finales de la reacción, ya que en los

FIGURA 1. Regresiones lineales de los valores obtenidos con las pruebas de seroneutralización y contraelectroforesis en sueros de personas inmunizadas contra la rabia



▲ 2 puntos superpuestos
■ 3 puntos superpuestos

CUADRO 2. Coeficientes de regresión lineal obtenidos al comparar los resultados de las pruebas de contrainmunolectroforesis y seroneutralización en laboratorios de diagnóstico de rabia

Laboratorio	Coeficientes		
	a_0	b	r
A	1,90	0,46	0,60
B	1,65	0,58	0,76
C	1,28	0,73	0,63
D	1,90	0,50	0,80
CEPANZO	1,90	0,54	0,85

tres primeros la evaluación se realizó muy poco tiempo después de haberse iniciado el uso de la técnica

De los coeficientes de las regresiones lineales, las ordenadas al origen indican que los sueros con títulos neutralizantes de 1:21 a 1:14 o menores podrían no ser detectados por CIE. Desde el punto de vista del control serológico de las personas que reciben tratamiento antirrábico, este hecho podría no ser importante si se tienen en cuenta los excelentes títulos de anticuerpos inducidos por las vacunas modernas en tratamientos preventivos (16, 17) y posteriores a la exposición (18-21), y como respuesta a dosis de refuerzo (22-24).

Todo suero con un título menor de 1:2 en la prueba CIE se podrá titular por una prueba de neutralización tal como SN, ICF u otras. Si ello no es factible, se deberá considerar la posibilidad de administrar una dosis de refuerzo, ya que este título puede significar que el suero no tiene anticuerpos neutralizantes o que su título es bajo.

Los valores de las pendientes de las rectas de regresión fueron semejantes a los obtenidos en trabajos anteriores (11-13), y no fue posible demostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Esto confirma que se pue-

den estimar los títulos de anticuerpos seroneutralizantes en función de los obtenidos por CIE. De acuerdo con los datos del cuadro 2, para un suero con título 1:5 por CIE el laboratorio A hubiera estimado un título neutralizante de 1:117, el B de 1:123, el C de 1:117, el D de 1:134 y el CEPANZO de 1:158, todos ellos comparables entre sí.

En trabajos anteriores se ha demostrado que el antígeno para CIE mantiene su estabilidad durante largos períodos de tiempo cuando se lo conserva a 4 °C en forma líquida o a -20 °C liofilizado (13, 14), y que puede ser estandarizado frente a un suero antirrábico hiperinmune de equino o de conejo (14). El comportamiento de los reactivos en los cinco laboratorios permite inferir que se pueden elaborar y distribuir los reactivos de referencia necesarios para la estandarización de aquellos que preparen los laboratorios de diagnóstico.

Este estudio demuestra, por último, que por su reproducibilidad, sensibilidad y especificidad satisfactorias la técnica de CIE puede resultar útil a aquellos laboratorios de diagnóstico de rabia que necesiten realizar controles serológicos rápidos y económicos.

RESUMEN

Se evalúa la reproducibilidad de la técnica de contrainmunolectroforesis (CIE) para la determinación de anticuerpos antirrábicos. En el estudio participaron cuatro laboratorios que utilizaron los mismos reactivos estandarizados y sueros codificados en el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO). Los títulos de los sueros obtenidos en pruebas de seroneutralización en ratón que se realizaron en el CEPANZO se compararon con aquellos obtenidos por CIE en los otros laboratorios. Los resultados

demonstraron que la sensibilidad y especificidad de la técnica fueron adecuadas. Los títulos del antígeno y del suero indicador fueron reproducibles. No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las rectas de regresión. Los coeficientes de correlación oscilaron entre 0,6 y 0,85. Se pudo confirmar que es posible estimar los títulos de anticuerpos neutralizantes en función de los que se obtienen por CIE. Esta técnica puede resultar útil a aquellos laboratorios de diagnóstico de rabia que necesiten realizar controles serológicos rápidos y económicos. □

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Dr. Naúm Marchevsky la revisión de la parte estadística, a la Sra. Graciela Perdomo y al Sr. Oscar Becco su asistencia técnica, y a la Sra. Nelly Bonomini la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

- 1 Organización Mundial de la Salud. *Comité de Expertos de la OMS en Rabia. 7° Informe*. Ginebra, 1984. Serie de Informes Técnicos 709.
- 2 Thomas, J. B. Las pruebas de neutralización de suero de anticuerpos fluorescentes indirecta y de inhibición rápida del foco fluorescente. *In: Baer, G. M. ed. Rabia, epidemiología, diagnóstico, vacunación, prevención y tratamiento en el hombre*. México, La Prensa Médica Mexicana, 1982.
- 3 Webster, C. T. y Dawson, J. R. Early diagnosis of rabies by mouse protection test. *Proc Soc Exp Biol Med* 32:570-573, 1935.

- 4 Thomas, J. B., Sikes, R. K. y Ricker, A. S. Evaluation of indirect fluorescent antibody technique for detection of rabies antibodies in human sera. *J Immunol* 91(6):721-723, 1963.
- 5 Atanasiu, P., Dragonas, P., Tsiang, H. y Marbi, A. Immuno-peroxidase nouvelle technique spécifique de mise en évidence de l'antigène rabique intra- et extracellulaire en microscopie optique. *Ann Inst Pasteur Paris* 121:247-250, 1971.
- 6 Kuwert, E. La prueba de fijación de complemento. *In: Kaplan, M. M. y Koprowski, H. eds. La rabia. Técnicas de laboratorio*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. Serie de Monografías 23, pp. 130-141.
- 7 Lépine, P. Técnicas de difusión en gel. *In: Kaplan, M. M. y Koprowski, H. eds. La rabia. Técnicas de laboratorio*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. Serie de Monografías 23, pp. 159-166.
- 8 Atanasiu, P., Bahmanyar, M., Baltazard, M., Fox, J. P., Habel, K., Kaplan, M. M., Kissling, R. E., Komarov, A., Koprowski, H., Lépine, P., Pérez Gallardo, F. y Shaeffer, M. Rabies neutralizing antibodies response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons. *Bull WHO* 14(4):593-611, 1956.
- 9 Wiktor, T. J. Métodos de cultivo celular. *In: Kaplan, M. M. y Koprowski, H. eds. La rabia. Técnicas de laboratorio*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. Serie de Monografías 23, pp. 105-129.
- 10 Smith, J. S., Yager, P. A. y Baer, G. M. Una prueba rápida en cultivo tisular para la determinación de anticuerpos neutralizantes del virus rábico. *In: Kaplan, M. M. y Koprowski, H. eds. La rabia. Técnicas de laboratorio*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. Serie de Monografías 23, pp. 375-379.
- 11 Díaz, A. M. y Myers, D. M. Determination of serum neutralization antibodies to rabies virus by a modified counterimmunoelectrophoresis test. *J Clin Microbiol* 12(2):175-179, 1980.
- 12 Díaz, A. M. y Myers, D. M. Comparison between a modified counterimmunoelectrophoresis test and the indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to rabies virus in human sera. *J Clin Microbiol* 14(4):446-448, 1981.
- 13 Díaz, A. M. Rabies neutralizing antibodies determination by the modified counterimmunoelectrophoresis test and rapid fluorescent focus inhibition test. *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg [A]* 256(1):1-6, 1983.

- 14 Díaz, A. M. O. Técnica de contrainmunolectroforesis para el diagnóstico serológico de la rabia. Ramos Mejía, Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985. Serie de Monografías Científicas y Técnicas 13.
- 15 Fuenzalida, E. y Palacios, R. Un método mejorado para la preparación de la vacuna antirrábica. *Bol Inst Bacteriol Chile* 8(1-4):3-10, 1955.
- 16 Fuenzalida, E. Human pre-exposure rabies immunization with suckling mouse rabies vaccine. *Bull WHO* 46(4):561-563, 1972.
- 17 Hafkin, B., Hattwick, M. A. W., Smith, J. S., Alls, M. E., Yager, P. A., Corey, L., Hoke, Ch. H. y Baer, G. M. A comparison of a WI-38 vaccine and duck embryo vaccine for pre-exposure rabies prophylaxis. *Am J Epidemiol* 107(5):439-443, 1978.
- 18 Held, J. R., Fuenzalida, E., López Adaros, H., Arrossi, J. C., Poles, N. O. R. y Scivetti, A. Inmunización humana con vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. *Bol Of Sanit Panam* 72(6):565-575, 1972.
- 19 Díaz, A. M. O., González-Resigno, G., Fernández Munilla, A., Larghi, O. P., Marchevsky, N. y Arrossi, J. C. Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. Esquemas reducidos de inmunización post-exposición. *Rev Argent Microbiol* 11(1):42-44, 1979.
- 20 Kuwert, E. K., Marcus, I., Werner, J., Iwan, D. y Thraenhart, O. Some experiences with human diploid cell strain (HDCCS) rabies vaccine in pre and post-exposure vaccinated humans. *Dev Biol Stand* 40:79-88, 1978.
- 21 Cox, J. H., Klietmann, W. y Schneider, L. G. Human rabies immunoprophylaxis using HDC (MRC-5) vaccine. *Dev Biol Stand* 40:109-113, 1978.
- 22 Cox, J. H. y Schneider, L. G. Prophylactic immunization of humans against rabies by intradermal inoculation of human diploid cell culture vaccine. *J Clin Microbiol* 3(2):96-101, 1976.
- 23 Nicholson, K. G., Turner, G. S. y Aoki, F. Y. Immunization with a human diploid cell strain of rabies virus vaccine: two years results. *J Infect Dis* 137(6):783-788, 1978.
- 24 Díaz, A. M. O. Pre-exposure rabies immunization of man with suckling mouse brain vaccine. *Am J Epidemiol* 115(2):274-277, 1982.

SUMMARY

COUNTERIMMUNOELECTROPHORESIS AS A TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF RABIES ANTIBODIES

The reproducibility of counterimmunoelectrophoresis (CIE) in the detection of rabies antibodies is evaluated. The study was a joint effort of four laboratories using the reagents standardized and sera coded in the Pan American Zoonoses Center

(CEPANZO). Serum titers obtained in seroneutralization tests performed in mice at CEPANZO were compared with those obtained by CIE in other laboratories. The results showed that the technique was of adequate sensitivity and specificity. The antigen and indicator serum titers were reproducible. No statistically significant differences could be shown between the slopes of the regression lines. The correlation coefficients ranged between 0,6 and 0,85. It was confirmed that the titers of neutralizing antibodies can be estimated from those obtained by CIE. This technique can prove useful in rabies diagnosis laboratories that need to perform quick and inexpensive serologic tests.

RESUMO

A TÉCNICA DE CONTRA- IMUNOELETROFORESE PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RÁBICOS

Avalia-se a reprodutibilidade da técnica de contra-imunoeletroforese (CIE) para a determinação de anticorpos anti-rábios. Participaram do estudo quatro laboratórios que utilizaram os mesmos reagentes padronizados e soros codificados no Centro Pan-Americano de Zoonose (CEPANZO). Os títulos dos soros obtidos em testes de seroneutralização em ratos realizados no CEPANZO foram comparados com os obtidos por CIE nos outros laboratórios. Os resultados demonstraram que a sensibilidade e especificidade da técnica eram adequadas. Os títulos do antígeno e do soro indicador eram reproduzíveis. Não foi possível demonstrar diferenças estatisticamente significativas entre as declividades das retas de regressão. Os coeficientes de correlação oscilaram entre 0,6 e 0,85. Confirmou-se que é possível estimar os títulos de anticorpos neutralizantes em função dos obtidos por CIE. Essa técnica pode ser útil para os laboratórios de diagnóstico de raiva que necessitem realizar controles serológicos rápidos e econômicos.

RÉSUMÉ

LA TECHNIQUE DE CONTRE- IMMUNOÉLECTROPHORÈSE POUR LA DÉTERMINATION D'ANTICORPS CONTRE LA RAGE

On évalue la reproductibilité de la technique de contre-immunoelectrophorese (CIE) pour la détermination d'anticorps contre la rage. L'étude a attiré la participation de quatre laboratoires qui ont utilisé les mêmes réactifs normalisés et des sérums soumis au contrôle du Centre panaméricain de Zoonoses (CEPANZO). Les titres des sérums obtenus par des épreuves de seroneutralisation sur des rats effectuées au CEPANZO ont été comparés à ceux obtenus par CIE dans les autres laboratoires. Les résultats ont démontré que la sensibilité et la spécificité de la technique ont été adéquates. Les titres de l'antigène et du sérum indicateur ont été reproductibles. On n'a pas pu trouver de différences importantes au plan statistique entre les pentes des droites de régression. Les coefficients de corrélation sont allés de 0,6 à 0,85. On a pu confirmer qu'il est possible d'estimer les titres d'anticorps neutralisants en fonction de ceux que l'on obtient par CIE. Cette technique peut s'avérer utile pour les laboratoires de diagnostic de la rage qui ont besoin d'effectuer des contrôles sérologiques rapides et économiques.