

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS**

**NIVELES DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA
RABIA POR EL METODO ANALISIS INMUNOENZIMATICO
EN FASE SOLIDA (ELISA)**

**EN 30 SUEROS DE PACIENTES VACUNADOS CON DOS
ESQUEMAS DISTINTOS DE VACUNACION EN LA
CLINICA ANTIRRABICA DEL CENTRO DE SALUD DE
LA ZONA 1 Y ZONA No. 5, GUATEMALA 1985.**

MARIA LILIAN GUADALUPE DIAZ-DURAN GARCIA

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA	3
REVISION BIBLIOGRAFICA	5
MATERIALES Y METODOS	17
RESULTADOS	21
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	29
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	33
RESUMEN	35
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37

INTRODUCCION

En nuestro medio la rabia no deja de ser un problema serio a la salud, reportándose como promedio 300 casos al año. (3)

De las enfermedades viricas conocidas mundialmente, se sostiene que todas las infecciones causadas por rabia son mortales. (4)

En Guatemala, las medidas preventivas se realizan primordialmente a través de la inmunización activa, empleando vacunas de cerebro de ratón lactante (C.R.L.) aplicadas por dos esquemas de vacunación: el tradicional, que consiste en una dosis de vacunación por 14 días, más un refuerzo a los 10, 20 y 90 días y el reducido que consiste en una dosis de vacunación por 7 días, más un refuerzo a los 10, 20 y 90 días.

El propósito del presente estudio, fue comparar dos métodos inmunológicos: el de inmunofluorescencia utilizado previamente (12), para determinar el título de anticuerpos antirrábicos con el método de análisis inmunoenzimático en fase solida (ELISA), proponiendo una alternativa en el diagnóstico de la inmunidad al virus de la rabia de pacientes vacunados previamente, así como un control en la calidad de la vacunación.

Los resultados, se analizan comparando las titulaciones de sueros obtenidos con ambos métodos de estudio y relacionándolas para verificar en que momento son equiparables.

DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA

La rabia es una enfermedad virica, mortal en el 100%. En Guatemala, la frecuencia es de 300 casos al año como promedio. (3)

Las medidas preventivas, se realizan primordialmente por inmunidad activa, que es un estado de resistencia que adquiere el individuo, como consecuencia del contacto efectivo con antígenos extraños.

Actualmente, se cuenta con métodos de diagnóstico del estado inmune, siendo el más usado la prueba de anticuerpos fluorescentes como lo demuestran estudios previos (12), en donde se obtuvieron resultados positivos en un 100% de pacientes vacunados con 14 dosis de vacunas y refuerzos a los 10, 20 y 90 días.

En el presente estudio, se aplica el método de Análisis Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA) que es sensible y específico, teniendo como principio la capacidad enzimática de conjugarse a antígenos o anticuerpos sin modificar la reactividad de estos y manteniendo la actividad enzimática.

La prueba de Inmunofluorescencia (IF), es aplicada inicialmente en el suero de pacientes que recibieron tratamiento con vacunas de cerebro de ratón lactante, comparando sus resultados obtenidos previamente (12) con los resultados del método de ELISA aplicado a éstos mismos sueros.

De ahí, la importancia de este estudio radica en que por primera vez se aplica en nuestro medio esta técnica de ELISA comparada con la Inmunofluorescencia.

RABIA, HIDROFOBIA, LISA

Definición:

Es una virosis, aguda, infecciosa del sistema nervioso central (1,2,18) puede afectar a todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre. Se caracteriza por una encefalitis, que generalmente termina en la muerte. (18)

Etiología:

El virus pertenece a la familia Rhabdoviridae, tiene forma de bala, con un diámetro cilíndrico de aproximadamente 70nm. y una longitud de 175nm (9). Entre sus propiedades fisicoquímicas tiene una actividad de hemaglutinación específica de 10 unidad de hemaglutinación específica/mg. de proteína. Su composición química es de 33% de lípidos, 3% de carbohidratos, 1% de RNA y 74 % de proteína. Se inactiva por acción de la luz solar, irradiación ultravioleta, formol, alcohol de 50-70%, compuesto de amonio cuaternario en solución de 0.1 a 1%, bicloruro de mercurio y ácidos fuertes. Muere a 56°C. después de una hora y sobrevive a la desecación de estado de congelación y se conserva bien a 4°C. en glicerina, solución salina al 50% o congelado a temperaturas inferiores a -20° centígrados. (1,9,12,18).

Cultivo del virus: Cuando en el laboratorio se tiene una cepa recién aislada se le da el nombre de virus de la calle, esta cepa muestra períodos de incubación variables de 10 días a meses, el virus puede invadir glándulas salivales y S.N.C. Cuando el virus se encuentra en cepas que han sido adaptadas a animales de laboratorio mediante pases intracerebrales seriados se le da el nombre de virus fi-

jo, que posee un período de incubación corto de 4 a 6 días y posee incapacidad para multiplicarse en las glándulas salivales. (1,9,11)

Epidemiología:

El hombre se transforma en huésped al exponerse a la saliva infectada del animal que lo muerde. (18) En E.E.U.U. el número de muertes anuales en la especie humana ha sido menor de 100, calculándose un costo de 1,500 dólares por persona tratada en mayo de 1980.

En nuestro medio la rabia constituye un problema prioritario de salud, debido a que su ocurrencia es principalmente urbana, siendo el perro el principal vector. En la capital la rabia humana es del 33%, San Marcos 16.6%, Quetzaltenango 8.3%, Suchitepequez y Sacatepequez 4.1% del total de casos.

En 1983, 1.174 personas fueron mordidas por perros rabiosos y 300 personas como promedio anual fallecen de esta enfermedad. (3)

Anatomía Patológica:

En la necropsia del cerebro es friable, edematoso con congestión vascular, las circonvoluciones son anchas y aplanadas, hay de generación difusa de neuronas y su gravedad se comprueba con la extensión a la sustancia blanca. (10,18)

El signo histológico característico son los Cuerpos de Negri que se observan en todas las neuronas y se encuentran de manera más característica en el asta de amon del lóbulo temporal. (10)

Manifestaciones Clínicas:

En el hombre el período de incubación es de 10 días y hasta 12 meses; depende del virus inoculado al tiempo de la exposición al sitio y la gravedad del desgarró. (12,18)

La enfermedad puede manifestarse en dos formas:

1. Rabia Furiosa:

Se caracteriza por tres estadios o fases:

Fase Prodrómica: Es de inicio gradual, con una duración de 2 - 3 días, se percibe sensación de entumecimiento, hormigueo, prurito, quemazón o frío alrededor de la herida. La estimulación intensa del sistema sensorial general, se manifiesta por hiperestesia de la piel a cambios de temperatura, corrientes de aire e intensa sensibilidad para el ruido y la luz. Hay leve excitación con irritabilidad, inquietud, dilatación de las pupilas, salivación, lagrimeo y sudoración e insomnio o somnolencia y depresión.

Fase de Excitación: Se manifiesta por una sensación de recelo e incluso terror, rigidez de nuca delirio, sacudidas musculares con movimientos convulsivos, espasmo faríngeo con sensación de estrangulamiento e intenso dolor ante cualquier intento de degluciones o líquidos síntoma conocido como hidrofobia que le ha dado el nombre de esta enfermedad.

Son posibles los espasmos de los músculos respiratorios y las crisis convulsivas originan opistótonos, la temperatura suele ser de 39 a 40.5° centígrados.

Los vómitos teñidos de sangre o sialorrea excesiva dan la impresión de espuma. Períodos de irritación y muchas veces de conducta

níaca ó incluso irracional, se intercalan con viveza y aparente normalidad.

Fase Terminal: Se presenta en 1 a 3 días, con parálisis intensa, desaparecen los espasmos con hiporreflexia o arreflexia, coma y muerte. (1,2,9,12,18)

2. Rabia Paralítica:

Se desarrolla en pacientes que han sido mordidos por murciélagos y en pacientes que a pesar de ser vacunados desarrollan la enfermedad.

Se manifiesta por disturbios sensitivos y motores alrededor de la mordida y progresan a una parálisis ascendente aguda con dolor, parestesia, con paraplejía flácida, disturbios espinales y parálisis respiratoria y bulbar. La diferencia entre los dos tipos de rabia, esta dada por la extensión del daño neuronal. En la rabia furiosa afecta al tallo cerebral, los nervios craneales, el sistema límbico y los altos centros. La rabia paralítica, afecta la médula espinal, los cordones espinales y los nervios espinales. (2,18)

Diagnóstico:

Este, regularmente se hace por la historia clínica de la exposición y epidemiología.

Diagnóstico de Laboratorio:

Uno de los mayores cambios en la ciencia de la medicina moderna, es la interpretación de avances básicos en la inmunología e inmunobiología, dentro de las técnicas que serán útiles en la práctica de la medicina clínica. Así, las técnicas que contribuyen al diagnóstico de la rabia son:

1. Histológica:

Consiste en el hallazgo de inclusiones citoplásmicas o cuerpos de negri en las células nerviosas de un paciente o encéfalos de animales infectados en el laboratorio, utilizándose improntas de tejido encefálico (astas de Amon), las que se observan por microscopía para verificar los cuerpos de negri. Los resultados obtenidos, son falsos negativos en un 2%. (4,5,10,12)

2. Aislamiento del Virus:

Este, puede aislarse de la saliva del paciente o se inocula intracerebralmente a ratones lactantes de 3 - 5 semanas de edad, para que puedan ser sacrificados de 1 - 2 por día, a partir del segundo día de inoculados. Sus encéfalos deben ser examinados por inmunofluorescencia o mediante seroneutralización. (10,12)

3. Prueba de Seroneutralización:

Esta, se utiliza cuando los cuerpos de negri no son encontrados. Se identifica el virus mediante su neutralización por el antisuero específico. No es útil para el diagnóstico rápido, pues debe esperar 14 días para su lectura y debe combinarse con la prueba de anticuerpos fluorescentes. (10,12)

4. Prueba de Anticuerpos Fluorescentes:

Es una de las pruebas más exactas en la actualidad, y se utiliza para detectar antígeno-anticuerpo-reacción, empleando como sistema indicador, una sustancia fluorescente observada por microscopía. Esta técnica requiere de equipo especial, por lo que sus costos deben ser considerados. (12)

5. Prueba de Inmunodifusión o técnica de Ouchterlony:

El propósito de esta técnica, es detectar la reacción de antígeno y anticuerpo por precipitación en un medio semisólido. (6, 10, 11, 15, 16)

Se requiere de sueros hiperinmunes y un antígeno purificado, lo cual es de difícil acceso en nuestro medio.

6. Ensayo Inmunoenzimático ELISA:

Este método ha sido fructuoso para detectar antígenos solubles y anticuerpos en líquidos corporales. El principio de estos métodos es la capacidad que tienen algunas enzimas de conjugarse a antígenos o anticuerpos sin modificar la reactividad de estos y manteniéndose la actividad enzimática. Una vez, efectuada la reacción al agregarse el sustrato se generan cambios de coloración en la reacción que puede ser observada visualmente o bien medidos en colorímetros simples. Tiene las ventajas de ser un método de fácil ejecución en el laboratorio, sus reactivos son seguros, usados con equipo simple, además tienen larga vida almacenados, las reacciones pueden ser cuantitativas y su sensibilidad es comparable al radioinmuno ensayo y a la inmunofluorescencia.

Materiales usados y pasos a ser seguidos:

Los antígenos usados para ELISA son solubles, pero pueden ser hechos insolubles por adsorción a la fase sólida.

Fase Sólida: Tanto un antígeno particular como un anticuerpo, se absorbe a la superficie de un pozo o tubo de ensayo. Se han empleado varios materiales como tubos desechables o placas en microtítulos hechos de poliestireno, polipropileno, polivinil o plástico.

La mayoría de antígenos se adhieren a la superficie de poliestireno por absorción física. La cobertura de la superficie parece depender de la calidad de superficie de poliestireno, tiempo, temperatura, PH.

Materiales para adsorción: Para determinar las concentraciones de antígeno o anticuerpo óptimas para la adsorción a la pared de los pozos, es necesario hacer diluciones seriadas, ya que la concentración óptima varía de una sustancia a la otra. En general para proteínas y lipoproteínas la concentración satisfactoria es de 1 a 10 microgramos por mililitro en un buffer de carbonato de sodio PH 6. La adsorción ocurre en una a dos horas a temperatura ambiente, sin embargo es preferible efectuarla a 4° centígrados durante la noche, que parece ser que da más uniformidad a la cobertura.

No hay forma satisfactoria de predecir la concentración adecuada por lo que idealmente deben usarse sueros o conjugados de referencia.

Que los antígenos o los anticuerpos sean útiles para otras pruebas garantiza que puedan emplearse en este método.

Luego de adsorbidas las sustancias, el exceso puede lavarse con buffer fosfato salino-tween 20.

Si los pozos no se emplean de inmediato, deben lavarse con agua destilada, desecarse y almacenarse herméticamente con desecante lo que les garantiza un año de duración.

Lavado: Usualmente son tres; se hacen con fosfato salino tween para evitar adsorción no específica.

Muestra: Las sustancias de peso molecular elevado como los anticuerpos, tienen tendencia a adherirse a la fase sólida en forma

específica. Esto se evita haciendo diluciones de las mismas en fosfato buffer salino tween 20 y determinando una dilución adecuada.

Conjugados: Las enzimas más apropiadas por su estabilidad, costo y facilidad de manejo son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa. Esto tiene como objeto que la enzima se conjugue al anticuerpo o al antígeno sin modificar su reactividad y mantenga su actividad enzimática.

La conjugación se efectúa activando la enzima con glutaraldehído o con peryodato de sodio. Posteriormente se separan los conjugados del exceso de enzima o de anticuerpos por precipitación con sulfato de sodio o por cromatografía. Los conjugados son estables hasta dos años.

Los substratos: Son sustancias cromogénicas, incoloras que por la acción de la enzima adquieren un color fuerte.

Para fosfatasa alcalina se usa para-nitrofenil fosfato y la reacción se detiene con NaOH, produciéndose un color amarillo-verdoso.

Lectura: Se lleva a cabo visualmente, comparando la coloración del pozo que contiene la muestra con la coloración obtenida en el pozo control negativo.

Fotometría: La intensidad de la coloración puede ser medida con un alto grado de precisión, utilizando un colorímetro. Para el substrato de para-nitrofenil fosfato, la lectura se hace a 405 nm.

Tratamiento Antirrábico:

Debe ponerse en observación al animal que mordió, durante 10 días.

Las heridas deben lavarse inmediatamente, con agua y jabón. Pue-

de aplicarse alcohol al 40-70%, tintura o soluciones acuosas de yodo o compuestos de amonio cuaternario al 0.1%.

Las heridas no deben suturarse inmediatamente.

Determinar la sensibilidad de suero antirrábico y aplicar alrededor de la herida.

En casos necesarios, deben establecerse el tratamiento antitetánico y antimicrobiano.

Vacunación:

Esta debe iniciarse, después de haber identificado el estado del animal mordedor en el momento de la exposición, después de examinar al paciente, identificando la localización y el estado de la herida.

Los preparados vacunales más frecuentemente utilizados, son las vacunas de cerebro de ratón lactante embrión de pato y células diploides, que se consideran de buena calidad, potencia y antigenicidad, produciendo anticuerpos en el hombre.

Las dosis que se administran, debe hacerse considerando cada caso particular y de acuerdo al preparado vacunal que se puede emplear.

(4) La profilaxis antes o después de la exposición, debe de aportar cifras de anticuerpos efectivos, para impedir la propagación y multiplicación del virus de la rabia. (9)

INMUNOLOGIA:

Del virus de la rabia sólo se conoce un tipo antigénico, que es capaz de causar infección, logrando que se formen anticuerpos -

que también aparecen como resultado de la vacunación. (12,9)

En un estudio realizado en mapaches de la isla Marco Florida, de noviembre de 1971 hasta agosto 1974, donde los mapaches fueron infectados naturalmente, se le efectuó una vigilancia serológica por seroneutralización e inmunofluorescencia se encontró que los anticuerpos pueden persistir por lo menos durante 37 meses. De 297 sueros, 17% fueron positivos por neutralización y de 253 sueros, 25 % fueron positivos por inmunofluorescencia. Esto sugiere que con inmunofluorescencia se pueden detectar por arriba del 41% de los animales que neutralizan el virus de la rabia.

La profilaxis de cloroquina, podría estar asociada con una pobre respuesta de anticuerpos a células diploides, según estudio efectuado en voluntarios del cuerpo de paz del Africa, en donde los que tomaron cloroquina por 7 semanas tuvieron anticuerpos significativamente disminuidos que aquellos que no tomaron cloroquina o que solo tomaron de 1 a 4 semanas. Estudios In Vitro, sugieren que el mecanismo por el cual la cloroquina interfiere con la respuesta de anticuerpos a la vacuna, es estabilizando la membrana lisosomal interfiriendo con el procesamiento de anticuerpo e inhibiendo la respuesta linfocítica del antígeno. (4)

En un hospital rural de misiones en Tailandia, el uso de vacunación con células diploides intradérmica post-exposición se comprobó que la eficacia de la vacunación estimada por la respuesta de anticuerpos inicialmente y después de un año, los niveles de anticuerpos fueron de 13.8 UI/ml en el día 28 y 0.9 UI/ml después de un año. (5)

En pacientes a quienes se les administra tratamiento profiláctico, con vacunas de embrión de pato, se han encontrado anticuerpos en el 80-90% de los vacunados alrededor de un mes después de la tercera dosis. En los casos en que no se detectan anticuerpos, se aplican dosis de refuerzos hasta que exista respuesta. (9)

En Guatemala, únicamente se han realizado dos estudios en pacientes vacunados con preparados de la D.G.S.S. en cerebro de ratón lactante que demuestra que la vacuna es segura, eficaz, dando niveles de protección adecuados.

En un estudio, donde se emplean esquemas tradicionales y reducidos de vacunación, se encontró niveles de anticuerpos seroneutralizantes semejantes en los dos esquemas. (13)

No así en un estudio efectuado por inmunofluorescencia en donde, los niveles de anticuerpos fueron aceptables en el 100% de los pacientes incluidos en el esquema tradicional y 92.5% de niveles aceptables en pacientes vacunados con el esquema reducido y el 7.5% no presentaron anticuerpos. (12)

En la actualidad, no se aplica ninguna de estas pruebas en nuestro medio, por el gasto económico que representa para el paciente y se hacen solo en casos muy necesarios y como control de la calidad de vacunación.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio, se realizó en el laboratorio Multidisciplinario de la Universidad de San Carlos de Guatemala en sueros humanos, obtenidos en 30 pacientes de ambos sexos y distintas edades que asistieron a la clínica antirrábica de los centros de salud de la zona No. 1 y 5 de esta ciudad, durante los meses de Abril a Agosto de 1984.

A todos los pacientes se les confirmó el antecedente de mordedura o contacto con animal, se les administró vacunas de cerebro de ratón lactante, preparadas en la D.G.S.S. y se les determinó por el método de inmunofluorescencia indirecta, niveles de anticuerpos antirrábicos.

Estos datos, nos permiten llevar a cabo la aplicación del test de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), en la siguiente forma:

1. Sueros Humanos:

Los sueros de pacientes obtenidos 30 días posteriores a la finalización del tratamiento y evaluados por inmunofluorescencia, se almacenaron en el laboratorio multidisciplinario de la USAC en congelación a una temperatura de -20° centígrados y rotulados bajo la siguiente clasificación:

Grupo No. 1

Suero de pacientes que recibieron 14 dosis de vacunación con refuerzos a los 10, 20, y 90 días. Se rotularon por números correlativos del 1 al 14.

Grupo No. 2

Suero de pacientes que recibieron 7 dosis de vacunación, mas re- fuerzos a los 10, 20 y 90 días.

Se rotularon por números correlativos del 14 al 30.

Grupo No. 3

Suero de 8 pacientes que al ser evaluados por inmunofluorescencia- presentaban títulos de anticuerpos de 1:125 y 1:625.

2. Antígenos:

Se obtiene de vacuna de embrión de pato, que es una vacuna liofilizada preparada con cepa Pitman Moore, de virus rábico en el Instituto Suizo de Sueros y Vacunas de Berna. El virus de esta vacuna se encuentra, inactivado y conserva su antigenicidad. Al momento de emplearlo se diluye en 2cc. de buffer de bicarbonato PH 9.6.

3. Procedimiento:

- Se utilizan placas nuevas de malgeno, utilizando 4 pozos positivos y 1 negativo para control por cada paciente de los grupos No. 1 y No. 2. Para el grupo No. 3, se utilizan 8 pozos positivos y 2 negativos para el grupo control por cada paciente.
- Se colocan en cada uno de los pozos positivos 200 ml. de antígeno y en los pozos negativos para control, únicamente se coloca buffer de bicarbonato PH 9.6.
- Se coloca en refrigeración por 48 horas para evaporación.

d. Se efectuan 3 lavados de todos los pozos, con 0.2 ml. de solución de lavado para cada pozo por 3 veces.

e. Se hacen diluciones de los sueros antirrábicos humanos con buffer de dilución. Obteniéndose diluciones de 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 con los sueros de los 30 pacientes de los grupos 1 y 2. Se colocan 0.05 (1 gota) de suero diluido correlativamente en los pozos positivos y diluciones de 1:80 en los pozos de control negativo.

Para el grupo No. 3 se hacen diluciones desde 1:80 hasta 1:10, 240 y se colocan 1 gota de suero en orden correlativo para los pozos positivos y 1 gota de suero con dilución 1:80 para los pozos de control negativo.

f. Se incuba por una hora a 37° centígrados.

g. Se drena la placa por inversión.

h. Se agrega 0.05 (1 gota) de Anti Ig G conjugada AP a cada uno de los pozos.

i. Se incuba a 37° centígrados por una hora.

j. Se drena por inversión y se lavan los pozos de cada placa veces con solución de lavado.

k. Se agrega 0.1 ml. de substrato (4 nitro-fenil fosfato)

l. Se incuba a temperatura ambiente por 45 minutos.

m. Se agrega solución de fijación NAOH.

Lectura:

Las reacciones se observan visulmente, según los cambios de coloración amarillo verdoso que se presentaron en los pozos de control positivo y ningún cambio en los pozos de control negativo y en los positivos que tenían diluciones altas.

RESULTADOS

RESULTADOS

CUADRO No. 1

TITULACIONES DE ANTICUERPOS CONTRA LA RABIA POR INMUNOFLUORESCENCIA Y ELISA DE PACIENTES VACUNADOS CON ESQUEMA TRADICIONAL

Suero No.	Diluciones Inmunofluorescencia			Diluciones ELISA				
	1:5	1:25	1:125	1:625	1:20	1:40	1:80	1:160
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Pacientes de la clínica antirrábica del Centro de Salud de las zonas No. 1 y 5. Guatemala, Abril-Agosto de 1984.

CUADRO No. 2

TITULACIONES DE ANTICUERPOS CONTRA LA RABIA POR INMUNOFLUORESCENCIA Y ELISA DE PACIENTES VACUNADOS CON ESQUEMA REDUCIDO

Suero No.	Diluciones Inmunofluorescencia				Diluciones ELISA			
	1:5	1:25	1:125	1:625	1:20	1:40	1:80	1:160
15	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Pacientes de la clínica antirrábica del Centro de Salud de las zonas No. 1 y 5. Guatemala, Abril-Agosto de 1984.

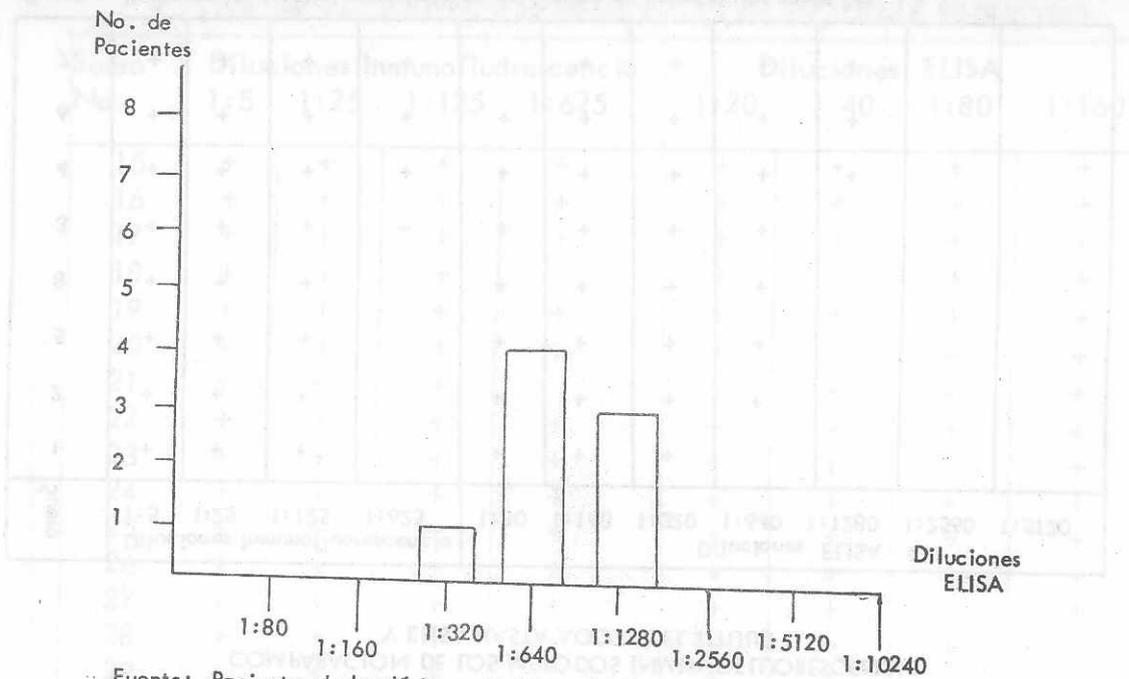
CUADRO No. 3

COMPARACION DE LOS METODOS INMUNOFLUORESCENCIA Y ELISA HASTA AGOTAR EL TITULO

Suero	Diluciones Inmunofluorescencia				Diluciones ELISA						
	1:5	1:25	1:125	1:625	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
1	+	+	+		+	+	+				
2	+	+	+		+	+	+	+			
5	+	+	+		+	+	+	+			
8	+	+	+		+	+	+	+			
3	+	+	+	+	+	+	+	+			
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

Fuente: Pacientes de la clínica antirrábica del Centro de Salud de las zonas No. 1 y 5. Guatemala, Abril-Agosto de 1984.

NIVELES DE ANTICUERPOS POR EL METODO DE ELISA HASTA AGOTAR EL TITULO

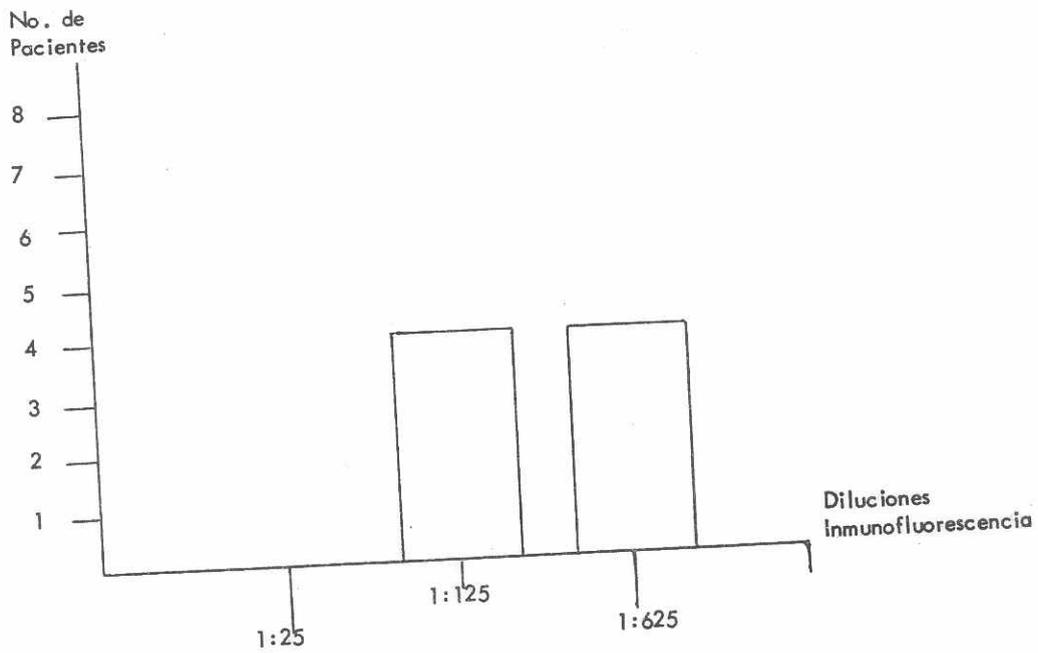


Fuente: Pacientes de la clínica antirrábica del Centro de Salud de las zonas No. 1 y 5. Guatemala, Abril-Agosto de 1984.

26

Gráfica del Cuadro No. 3

NIVELES DE ANTICUERPOS POR EL METODO DE INMUNOFUORESCENCIA HASTA AGOTAR EL TITULO



Fuente: Pacientes de la clínica antirrábica del Centro de Salud de las zonas No. 1 y 5. Guatemala, Abril-Agosto 1984.

27

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio, se evaluó una muestra de 30 sueros de pacientes analizados previamente por inmunofluorescencia (12); comparando sus resultados con Análisis Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA).

En un estudio anterior (9), 46% de pacientes que recibieron 16 dosis de vacunas de embrión de pato tuvieron cifras de anticuerpos neutralizantes de menos de 1:5 después de la vacunación.

En nuestro estudio, los pacientes recibieron 7 y 14 dosis de vacunas de cerebro de ratón lactante, más refuerzos a los 10, 20, y 90 días y las cifras de anticuerpos fueron de 1:5 hasta 1:625 por IF y de 1:20 hasta 1:160 por ELISA, treinta días después de la vacunación (cuadros No. 1 y 2).

Además, se decidió agotar las titulaciones de anticuerpos por el método de ELISA en 8 de los mismos sueros, para verificar en que momento son equiparables a la inmunofluorescencia (cuadro No. 3), encontrándose que la titulación de 1:125 por IF es equiparable a la titulación de 1:640 por ELISA y la titulación de 1:625 por IF es equiparable a 1:1280 por ELISA y finalmente observamos que la titulación más baja para ELISA fué de 1:320 equiparable a 1:125 por IF.

Esto demuestra que ambos métodos son equiparables, aunque las diluciones utilizadas por IF son quintuples en tanto que las diluciones por ELISA son dobles.

Estudios realizados por Dierks y Gough (10), sobre anticuerpos de la rabia, demuestran que el antígeno debe ser purificado. Wiktor en su estudio sobre la inmunofluorescencia, indica que el

rus rábico debe ser marcado con isótopos radiactivos. (10) En nuestro estudio, utilizamos como antígeno la vacuna liofilizada de embrión de pato para el método de análisis inmunoenzimático en fase sólida.

CONCLUSIONES

1. El método de análisis inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), puede ser utilizado en nuestro medio, considerando el título protector de 1:640 ó más.
2. Los niveles de anticuerpos contra la rabia medidos por inmunofluorescencia, son equiparables a los niveles de anticuerpos contra la rabia encontrados por el método de ELISA.
3. La vacuna de embrión de pato, puede ser utilizada como antígeno en el método de ELISA.

CONCLUSIONES

1. El método de análisis inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) puede ser utilizado en nuestro medio, considerando el título protector de 1:640 ó más.
2. Los niveles de anticuerpos contra la rabia medidos por método de inmunofluorescencia, son equiparables a los niveles de anticuerpos contra la rabia encontrados por el método de ELISA.
3. La vacuna de embrión de pollo, puede ser utilizada como anti-

RECOMENDACIONES

1. En casos necesarios, el método de ELISA podrá sustituir la inmunofluorescencia para medir los niveles de anticuerpos contra la rabia.
2. Cuando se aplique el método de ELISA para la dosificación de anticuerpos contra el virus de la rabia, las diluciones de los sueros, deberán hacerse a partir de 1:640.
3. Es necesario contar con recursos económicos y de material apropiados, antes de decidir aplicar estos métodos inmunológicos, para la dosificación de anticuerpos contra la rabia.

RESUMEN

El presente estudio prospectivo, realizado en el laboratorio multidisciplinario de la Universidad de San Carlos de Guatemala, durante los meses de Agosto a Octubre de 1985 en 30 sueros de pacientes previamente inmunizados con vacuna de cerebro de ratón lactante y utilizados en una investigación previa, para la dosificación de anticuerpos antirrábicos por inmunofluorescencia (IF) son analizados ahora por el método Análisis Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

De los 30 sueros estudiados, 14 son obtenidos de pacientes que recibieron tratamiento con el esquema tradicional de vacunación (14 dosis de vacunas más refuerzos a los 10, 20 y 90 días) presentaron títulos de anticuerpos por inmunofluorescencia (IF) 1:625 que comparado con ELISA todas las diluciones fueron positivas hasta 1:160.

Los otros 16 sueros restantes, fueron obtenidos de pacientes que recibieron tratamiento con el esquema reducido de vacunación (7 dosis de vacunas, más refuerzos a los 10, 20 y 90 días), de cuales 10 presentaron títulos de anticuerpos por IF de 1:625 y los restantes presentaron títulos de 1:125. Estos datos, al ser comparados con los resultados obtenidos por ELISA no correspondían, por todos positivos con diluciones hasta de 1:160.

Las diluciones de los sueros por el método de ELISA se amplificó más; escogiendo 8 sueros con titulaciones por IF de 1:125 y 1:625 que al ser comparadas con las titulaciones obtenidas por ELISA corresponden en las siguientes diluciones: 1:125 por IF con 1:625 por ELISA y 1:625 por IF con 1:1280 por ELISA. Concluyendo el método de ELISA es equiparable con la inmunofluorescencia

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Acha, P.N. La rabia. En su: **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington, OPS, 1977. 459p. (pp. 342-362)
2. Arriola, R. y J. R. **Rabia humana; reporte de casos clínicos en el Hospital General San Juan de Dios**. Tesis (Medicina y Cirujano)-Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas, Guatemala, 1981. 52p.
3. Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia Guatemala 1984. **Mesa Redonda situación actual de la rabia en Guatemala**. Guatemala del 23-26 de septiembre de 1984. Guatemala, Gardisa, 1984. 60p.
4. Cox, H. Rabies; laboratory diagnosis and postexposure treatment. **Am J Clin Pathol** 1972 Jun 6; 57(13):794-800.
5. Emmons, R.W. et al. Rabies diagnosis and rabies vaccination. **N Engl J Med** 1979 Aug 9; 301(6):331-332
6. Glück, R.W. et al. Confirmation of need for rabies immunoglobulin as well as post-exposure vaccine. **Lancet** 1979 Nov 24; 2(8413):1216-1217
7. Gutenkunst, D.E. et al. Cellular immunity shown in rabies virus-infected pigs by leukocyte migration-inhibition procedure. **Am J Vet Res** 1979 Jan 7; 40(1):61-65
8. Herbert, W.J. Identificación y medición de la respuesta humoral. En su: **Inmunología Veterinaria**. Zaragoza, Acribia, 1972. 362p. (pp. 125-131)

9. Jawetz, E.M. et al. La rabia. En su: **Manual de Microbiología médica**. 7.ed. México, Manual Moderno, 1977. 658p. (pp. 468-475)
10. Kaplan, M. y H.K. La rabia. En su: **Técnicas de Laboratorio**. 6.ed. Ginebra, OMS, 1976. 460p. (pp. 159-166)
11. Kubes, V. El método de precipitación en gelosa y el diagnóstico de la rabia. **Bol Of Sanit Panam** 1965 Oct; 59(4): 298-310
12. Morales, S. y J.S. **Dosificación de anticuerpos neutralizantes antirrábicos**. Tesis (Médico y Cirujano)-Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1985. 38p.
13. Palomo, C.L. **Inmunoprofilaxia antirrábica humana; con vacuna de cerebro de ratón lactante (C.R.L.) usando esquemas reducidos de vacunación**. Tesis (Químico Biólogo) - Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 1982. 52p.
14. Phillips, H.J. et al. Immunochemical study of a bacterial DNA. **J Am Chem Soc** 1958 Jun 16; 5(80):2710-2714
15. Stites, D.P. et al. Clinical laboratory methods for detection of antigens & antibodies. In their: **Immunology principles**. 5th.ed. California, Lange, 1984. 803p. (pp. 312-317)
16. Tizard, I.R. Reacciones de precipitación. En su: **Inmunología Veterinaria**. México, Interamericana, 1984. 340p. (pp. 148-157)

17. Villarejos, V.M. et al. Evaluation of the specificity of an immunoprecipitin test for non A non B hepatitis. **J Infect Dis** 1983 Apr 15; 147(4):702-709
18. Wyngarden, M. and H.S. Rabies. In their: **Cecil text book of medicine**. 6th,ed, Philadelphia, Saunders, 1982. 2492p. (pp. 2097-2100)
19. Zinsser, R. Methods of detecting and quatitating antique antibody reactions. In their: **Microbiology**. 16th.ed. New York, McGraw-Hill, 1976. 1223p. (pp. 285-287)

Bo Bo
E. S. S. S.

Universidad de San Carlos de Guatemala
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
OPCA - UNIDAD DE DOCUMENTACION

CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LAS CIENCIAS
DE LA SALUD
(C I C S)

CONFORME:

M. Rodríguez

Dr.

ASESOR.

SATISFECHO:

Carmen Villegas de Torres
Dr.
Dra. Carmen Villegas de Torres
REVISOR
MÉDICO CIRUJANO
Colegiado 5177

APROBADO:

[Signature]

DIRECTOR DEL CICS

IMPRESO:

[Signature]
Dr. Mario René Moreno Cantón
DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
U S A C .

Guatemala, 25 de octubre

Los conceptos expresados en este trabajo
son responsabilidad únicamente del Autor.
(Reglamento de Tesis, Artículo 44).