

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS REACTIVOS QUE SE UTILIZAN EN LA TÉCNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFESIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIRRÁBICOS

A. M. DÍAZ (1), A. ALBAS (2), E. J. G. VALENTINI (2) & G. PERDOMO (1)

RESUMEN

En este estudio se comprobó que el Instituto Butantan produce antígenos y sueros indicadores que se pueden utilizar con éxito en la prueba de contrainmunolectroforesis para titular anticuerpos antirrábicos en personas inmunizadas.

No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de las pruebas de estandarización realizadas en el Instituto Butantan y las pruebas de control de referencia llevadas a cabo en el Centro Panamericano de Zoonosis.

Se propone que el Instituto Butantan produzca y distribuya a nivel nacional los reactivos para que los laboratorios de diagnóstico apliquen la técnica de contrainmunolectroforesis para la determinación de anticuerpos antirrábicos.

UNITERMOS: Rabia; Serología, Contrainmunolectroforesis.

INTRODUCCION

La presencia de anticuerpos neutralizantes en personas que han recibido tratamiento antirrábico pré-o posexposición se considera un buen indicador de la eficacia de la vacuna utilizada¹⁰.

La determinación de los anticuerpos séricos se puede realizar utilizando diversas pruebas serológicas^{1, 6, 8, 11}, muchas de las cuales exigen disponer de equipos especiales y personal adiestrado.

La técnica de contrainmunolectroforesis (CIE)² se utiliza en el diagnóstico serológico de enfermedades virales. Por su reproducibilidad, sensibilidad y especificidad, el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) la utiliza rutina-

riamente en la determinación de anticuerpos antirrábicos en sueros de personas y animales que han recibido inmunización antirrábica⁴.

La técnica de CIE es particularmente útil en aquellos laboratorios de diagnóstico que deben realizar controles serológicos rápidos y económicos⁵, ya sea para decidir si se debe iniciar un tratamiento o interrumpirlo en caso de que se presenten reacciones adversas asociadas a la vacunación.

El éxito de la aplicación de la técnica de CIE, como de otras técnicas rápidas para diagnóstico de infecciones víricas, depende de la disponibilidad de antígenos y antisueros de calidad

(1) Centro Panamericano de Zoonosis. Casilla 3092, Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina.

(2) Instituto Butantan. Caixa Postal 65. CEP 05504 São Paulo, SP, Brasil.

comprobada⁹. Por esta razón es necesario contar con reactivos patrones producidos por centros de referencia para la estandarización de los reactivos elaborados por los laboratorios de diagnóstico.

El objetivo de este estudio en colaboración entre CEPANZO y el Instituto Butantan fue evaluar la calidad de los antígenos y sueros indicadores producidos por este último para la determinación de anticuerpos antirrábicos en sueros de origen humano, mediante la técnica de CIE.

MATERIALES Y METODOS

Antígenos

Los distintos lotes de antígeno se prepararon con virus CVS/CCL/2 (Challenge virus standard, CVS) con dos pases sucesivos en cerebros de conejos lactantes, cuyo título fue de $10^{7.6-7.8}$ en 0.03 ml por vía intracerebral en ratón adulto. Estos lotes se prepararon como una suspensión al 40% en agua destilada suplementada con sacarosa y glicina e inactivada con Beta-propiolactona 1:3000⁴.

El Instituto Butantan elabora los antígenos de trabajo mediante la técnica arriba mencionada, le agrega conservadores y luego los distribuye, en frascos pequeños herméticamente cerrados, que se mantienen a 4°C.

Los antígenos estándares producidos en el CEPANZO, se liofilizan durante 24 horas (1 ml/ ampolla) en el tubo múltiple (manifold) de un equipo de liofilización, las ampollas se sellan a un vacío de 3 a 5 micras.

Titulación del antígeno

El título del antígeno de trabajo se determina frente a un suero antirrábico de referencia producido en conejos o equinos⁴. Se preparan diluciones de antígeno 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18 en solución salina amortiguada. Se incuban a 37°C durante 60 minutos.

Se cubren dos láminas portaobjetos de 75 x 50 mm con 9 ml de agarosa al 0.9% en solución amortiguada con veronal sódico 0.05 M, pH 8.2 y se mantienen durante 10 minutos a 4°C. En

cada una de dos filas paralelas se marcan, a una distancia de 8 mm, cuatro orificios, de 6 mm de diámetro los de la primera fila y de 3 mm los de la segunda.

Las láminas con los orificios de mayor tamaño del lado de cátodo se colocan en la cuba de un equipo de electroforesis con solución amortiguada de veronal sódico 0.05 M, pH 8.2.

Se retira la agarosa de los orificios de 6 mm y se cargan cuidadosamente con cada una de las diluciones del antígeno previamente incubadas a 37°C, usando micropipetas o pipetas Pasteur y propipetas.

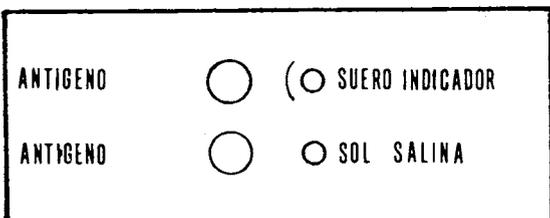
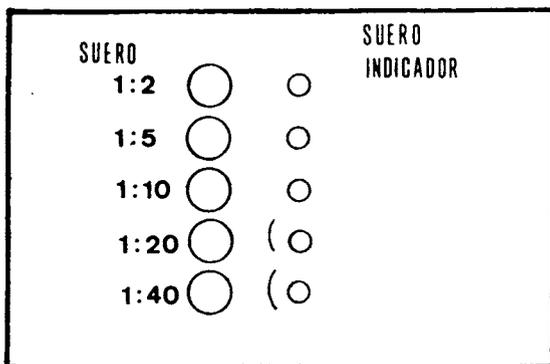
Se procede de la misma manera con una lámina de vidrio de 75 x 25 mm recubierta de agarosa (3 ml), en la que se marcan dos hileras de dos orificios cada una. Después de retirar la agarosa de los orificios de 6 mm se carga cuidadosamente la dilución de antígeno de referencia que indique el laboratorio productor (lámina control).

Se colocan los puentes de papel de filtro en los extremos de las láminas y se aplica una diferencia de potencial de 2 mA/cm de lámina, durante 45 minutos. Se interrumpe la corriente, se retira la agarosa de los orificios de 3 mm de todas las láminas, y se cargan las láminas de titulación de antígeno y el orificio superior de la lámina control (control positivo) con el suero estándar diluido (según indique el productor). En el orificio inferior se coloca solución salina amortiguada pH 7.2 (control negativo).

Se continúa la electroforesis por un período adicional de 120 minutos a 2 mA/cm de lámina. Para evitar el recalentamiento del gel se humedecen periódicamente los puentes de papel de filtro.

Al finalizar la corrida, se leen las láminas con la ayuda de luz incidente.

El título del antígeno es la dilución óptima que produce bandas nítidas cuya forma y ubicación son comparables con las que produce el sistema antígeno-anticuerpo estándar de la lámina control.



La forma, tamaño y ubicación de las bandas pueden observarse en la figura 1.

SUERO INDICADOR

El Instituto Butantan produce sueros indicadores de trabajo en conejos según procedimientos ya descritos⁴ y los mantiene congelados a -20°C.

El CEPANZO utiliza la misma técnica de producción y elabora sueros indicadores de referencia liofilizados, con una actividad que oscila entre 160 y 200 UI/ml.

Titulación de suero indicador

Para titular un suero indicador se deben preparar diluciones 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18 en solución salina amortiguada pH 7.2. Se prepara la dilución óptima del suero de referencia según lo indicado por el laboratorio de referencia que los produce. Se recubren dos láminas de vidrio 75 x 50 mm con agarosa y una lámina control 75 x 25 mm como se indicó arriba.

Se retira el agar de los orificios de 6 mm de las tres láminas, se carga la dilución óptima del antígeno de referencia con micropipetas o con pipetas Pasteur. Se colocan los puentes de

papel de filtro y se aplica una diferencia de potencial de 2 mA/cm de lámina durante 45 minutos.

Luego se corta el paso de la corriente eléctrica; se retira la agarosa de los orificios de 3 mm de las láminas de 75 x 50 mm y se colocan las distintas diluciones del suero indicador en cada uno de ellos. Se retira la agarosa de los orificios pequeños de la lámina control y se carga el superior con la dilución del suero de referencia y el inferior con solución salina amortiguada (lámina control).

Se continúa la electroforesis durante 120 minutos adicionales (2 mA/cm de lámina). Se deben humedecer periódicamente los puentes de papel de filtro.

El título del suero indicador es la dilución óptima que produce una banda similar a la del sistema **antígeno patrón-suero de referencia** de la lámina control.

Prueba de contraelectroforesis

Las pruebas de CIE se realizaron según la técnica descrita por DÍAZ y MYERS⁶. Brevemente, se prepararon láminas de vidrio recubiertas con agarosa, se marcaron dos filas de cinco orificios y luego las placas se colocaron en la cuba de un equipo de electroforesis de acuerdo con lo arriba descrito.

Se mezclaron e incubaron durante 60 minutos 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 minutos a 2 mA/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 mantuvo ésta con la misma intensidad durante 120 minutos. Transcurrido ese lapso, se identificaron las bandas de precipitación con la ayuda de luz incidente. Se consideró como título del suero la mayor dilución que no produjo bandas de precipitación.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se presentan los títulos de 6 lotes de antígenos elaborados por el Instituto Butantan entre 1987 y 1989. Estos fueron comparables a los obtenidos en las pruebas de control de referencia realizadas en el CEPANZO. El análisis de correlación mostró un coeficiente $r = 0.9559$, $S_x = 0.34$. No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre los títulos calculados en CEPANZO y en el Instituto Butantan ($t = 1.290$, $t_4 = 4.6$ $p < 0.01$)

En el cuadro 2 se observan los títulos obtenidos con 6 lotes de sueros indicadores cuando fueron evaluados en el Instituto Butantan y en los controles de referencia en el CEPANZO. Se

CUADRO 1

Antígenos para la prueba de contrainmunolectroforesis producidos por el Instituto Butantan. Control de calidad de referencia realizado por el Centro Panamericano de Zoonosis.

Lote #	Fecha de Producción	Determinación de títulos*	
		Instituto Butantan	CEPANZO
8	30-07-87	1:16	1:18
9	10-08-87	1:10	1:18
10	12-01-87	1:2	1:2
11	24-03-88	1:16	1:16
12	06-10-89	1:12	1:10
13	22-05-89	1:6	1:6

*Títulos: expresados como la máxima dilución de antígeno que produce banda de precipitación frente al suero indicador.

$y = 0.0029 + 1.0384 x$; Coeficiente de correlación: $r = 0.9559$; $S_x = 0.34$.

CUADRO 2

Sueros antirrábicos indicadores para la prueba de contrainmunolectroforesis producidos por el Instituto Butantan. Control de calidad de referencia realizado por el Centro Panamericano de Zoonosis.

Lote #	Fecha de Producción	Determinación de títulos*	
		Instituto Butantan	CEPANZO
1	17-03-87	1:4	1:6
4B	14-06-89	1:4	1:4
5B	14-06-89	1:6	1:6
6B	14-06-89	1:2	1:2
7B	14-06-89	1:6	1:6
9B	27-12-89	1:12	1:14

*Títulos: máxima dilución de suero indicador que produce banda frente a la dilución óptima de antígeno de referencia.

$y = 0.007 + 1050 x$; Coeficiente de correlación: $r = 0.9680$; $S_x = 0.25$.

obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0.9680$, $S_x = 0.25$. No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre los títulos calculados en el CEPANZO y en el Instituto Butantan ($t = 1.581$, $t_4 = 4.6$ $p < 0.01$).

Con excepción del antígeno lote 10, (título 1:2), la calidad y consistencia de la producción de antígenos y antisueros de trabajo fue adecuada.

En el cuadro 3 se muestran los títulos de anticuerpos antirrábicos presentes en sueros humanos cuando se titularon con antígeno lote 9 producido por el Instituto Butantan y antígeno de referencia lote 43 elaborado por el CEPANZO.

Los parámetros de la regresión lineal fueron $y = 0.220 + 1.171x$, coeficiente de correlación $r = 0.9313$, $S_x = 0.65$.

No se observaron resultados falsos positivos en el grupo de sueros negativos (# 15 al 20). La especificidad y la sensibilidad fueron adecuadas.

CUADRO 3

Titulación de anticuerpos antirrábicos en 20 sueros humanos mediante la técnica de CIE. Control de calidad de referencia realizado por el Centro Panamericano de Zoonosis.

Suero #	Determinación de títulos*	
	Instituto Butantan (Antígeno Lote 9)	CEPANZO (Antígeno Lote 43)
1	1:5	1:2
2	1:2	1:2
3	1:2	1:2
4	1:5	1:5
5	1:40	1:80
6	1:80	1:40
7	1:160	1:160
8	1:20	1:40
9	1:20	1:5
10	1:160	1:640
11	1:10	1:5
12	1:20	1:20
13	1:80	1:160
14	1:5	1:5
15	< 1:2	< 1:2
16	< 1:2	< 1:2
17	< 1:2	< 1:2
18	< 1:2	< 1:2
19	< 1:2	< 1:2
20	< 1:2	< 1:2

*Títulos: máxima dilución de suero que no produce banda de precipitación.

$y = 0.220 + 1.171 x$; Coeficiente de correlación: $r = 0.9313$; $S_x = 0.65$.

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio confirman que el Instituto Butantan produce antígenos y sueros indicadores que se pueden utilizar con éxito en la determinación de anticuerpos antirrábicos por la técnica de CIE.

El título promedio de los lotes de antígenos producidos por el Instituto Butantan entre 1987 y 1989 fue comparable con los títulos promedios de los 41 lotes de antígeno de trabajo ($\bar{x} = 18.2$, $S_x = 8.2$) y los 10 lotes de referencia ($\bar{x} = 18.5$, $S_x = 7.4$) que el CEPANZO elaboró y distribuyó a los laboratorios de diagnóstico de América Latina y el Caribe en los últimos 6 años.

En relación con los sueros patrones, el CEPANZO ha producido 3 lotes de sueros indicadores liofilizados, cuyos títulos oscilaron entre 1:6 y 1:18; cuando se usaron en titulaciones paralelas con los antígenos del Instituto Butantan mostraron la misma reactividad.

La titulación de referencia de un grupo de sueros codificados que se procesaron en forma independiente con antígenos y sueros producidos en cada uno de los laboratorios participantes demostró una excelente correlación ($r = 0.9313$). La recta de regresión fue mejor que las que se obtuvieron cuando se comparó la técnica de CIE con otras pruebas serológicas^{3, 6, 7}.

En este estudio se tuvieron en cuenta las recomendaciones que sobre "Reactivos: Patrones e Inspección de la Calidad", fueron elaboradas por un grupo de científicos de la OMS en su informe "Técnicas Rápidas de Laboratorio para el Diagnóstico de Infecciones Víricas"⁹. En el punto 7.1.2 ellos consideran que:

"1) Debe fomentarse la producción de reactivos sometidos a muy estricta inspección de la calidad y deben establecerse centros de referencia para probarlos.

2) Debe suministrarse reactivos de referencia a los laboratorios que produzcan reactivos de trabajo, de manera que estos puedan ser normalizados.

3) Debe facilitarse la información sobre técnicas uniformes que se han empleado para esta-

blecer las características de los reactivos de trabajo.

4) Siempre que se necesitan, deben suministrarse los conjuntos de muestras que permitan evaluar la sensibilidad y la especificidad de los reactivos y los procedimientos de prueba.

5) Debe prestarse asistencia internacional en todo el mundo para la distribución de reactivos de trabajo".

Teniendo en cuenta la situación epidemiológica de la rabia en Brasil, que exigirá con mayor frecuencia la administración de tratamientos antirrábicos más racionales y oportunos para evitar sobredosificación y el hecho de que por lo menos cuatro laboratorios de diagnóstico cuentan con personal adiestrado y el equipo necesario para realizar controles serológicos por la técnica de CIE, consideramos de la mayor utilidad que el Instituto Butantan pueda incorporar a sus servicios la distribución, a nivel nacional, de antígenos y sueros indicadores de trabajo. Además, podría proporcionar asesoramiento y formación de recursos humanos en la aplicación de la técnica de CIE en aquellos laboratorios que necesitan realizar controles serológicos rápidos.

SUMMARY

Evaluation of the quality of the reagents employed in the counterimmunoelectrophoresis technique for the determination of rabies antibodies.

This study demonstrated that the antigens and indicator sera produced by the Butantan Institute may be employed with success in the counterimmunoelectrophoresis technique for the titration of rabies antibodies in sera from immunized individuals.

No statistically significant differences were demonstrated between the results obtained in the standardization tests carried out at the Butantan Institute and the reference control tests performed at the Pan American Zoonoses Center.

It is proposed that the Butantan Institute be in charge of the production and distribution of these reagents at the national level.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATANASIU, P.; BAHMANYAR, M.; BALTAZARD, M.; FOX, J. P.; HABEL, K.; KAPLAN, M. M.; KISSLING, R. E.; KOMAROV, A.; KOPROWSKI, H.; LEPINE, P.; PEREZ GALLARDO, F. & SHAEFFER, M. — Rabies neutralizing antibodies response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 14: 593-611, 1956.
2. CROWLE, L. V. — *Immunodiffusion*. 2nd. ed. New York, Academic Press, 1973.
3. DIAZ, A. M. — Rabies neutralizing antibodies determination by the modified counterimmunoelectrophoresis test and rapid fluorescent focus inhibition test. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. (A)*, 256: 1-6, 1983.
4. DIAZ, A. M. — Técnica de contrainmunolectroforesis para el diagnóstico serológico de la rabia. Ramos Mejia, Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985. (Serie de Monografías Científicas y Técnicas 13).
5. DIAZ, A. M.; ARISPE, E.; BRUNEL, C.; CAVANDOLI, C.; DELLEPIANE, N. & MIRANDA, A. — La Técnica de contrainmunolectroforesis para la determinación de anticuerpos antirrábicos. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 101: 255-261, 1986.
6. DIAZ, A. M. & MYERS, D. M. — Determination of serum neutralization antibodies to rabies virus by a modified counterimmunoelectrophoresis test. *J. clin. Microbiol.*, 12: 175-179, 1980.
7. DIAZ, A. M. & MYERS, D. M. — Evaluation of hyperimmune rabies sera by the counterimmunoelectrophoresis test. *J. biol. Stand.*, 12: 61-65, 1984.
8. MANNEN, K.; MIFUEN, K.; REID-SANDEN, F.; SMITH, J.; YAGER, P.; SUMNER, J.; FISHBEIN, D.; TONG, T. & BAER, G. — Microneutralization test for rabies virus based on an enzyme immunoassay. *J. clin. Microbiol.*, 25: 2440-2442, 1987.
9. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Grupo de científicos de la OMS. Técnicas rápidas de laboratorio para el diagnóstico de infecciones víricas. Ginebra, 1981. (Serie de informes técnicos, no. 661).
10. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité de Expertos en la OMS en Rabia. 7º Informe. Ginebra, 1984. (Serie de informes técnicos, no. 709).
11. SMITH, J. S.; YAGER, P. A. & BAER, G. M. — Una prueba rápida en cultivo tisular para la determinación de anticuerpos neutralizantes del virus rábico. In: KAPLAN, M. M. & KOPROWSKI, H., ed. *La rabia: técnicas de laboratorio*. Ginebra, Organización Mundial de La Salud, 1976. p. 375-379. (Serie de Monografías, no. 23).

Recebido para publicação em 01/6/1990.

Aceito para publicação em 10/12/1990.