

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Detección de anticuerpos antirrábicos en personal de riesgo con el empleo de la técnica de neutralización por reducción del número de placas

Dra. María de los A. Ribas,¹ Lic. Arlene Rebull,² Dra. Gisset Torres,³ Lic. Maylin Álvarez,⁴ Lic. Luis Morier,⁴ Téc. Yahisel Tejero,⁵ Téc. Deneb García⁵ y Téc. Carina Rodríguez⁵

RESUMEN

Se empleó la técnica de neutralización por reducción del número de placas (NRNP) para la detección de anticuerpos antirrábicos en personal de riesgo. Se estudiaron muestras de suero de individuos de alto riesgo y personas con antecedentes de vacunación y sin estos. La técnica de neutralización fue comparada con la prueba biológica en ratón y como resultado del estudio se obtuvo una concordancia de 100 %. Se encontró que el sexo no influye en la respuesta de anticuerpos a este virus, aunque el contacto directo y la cantidad de veces que el individuo ha recibido la vacuna actúan positivamente en la respuesta inmune. La introducción de esta técnica en el laboratorio permite contar con una herramienta útil, en el seguimiento del personal que recibe vacunación preexposición y posexposición al virus rábico.

DeCS: RABIA/ diagnóstico; TEST DE NEUTRALIZACIÓN/ métodos; VACUNA ANTIRRÁBICA.

La rabia sigue siendo una amenaza para la población humana en muchas partes del mundo. Es una enfermedad de etiología viral con una amplia distribución mundial que afecta a los animales de sangre caliente, entre ellos el hombre. Su período de incubación es variable, en dependencia de la especie del animal agresor, el lugar donde se produce la mordedura y la severidad del ataque.^{1,2}

Se transmite generalmente cuando un animal enfermo muerde a uno susceptible, porque el virus está presente en la saliva de los primeros.³

Por causa del índice de mortalidad en extremo elevado de la infección rábica, es muy importante prevenirla antes y después de la exposición al virus.

La inmunización antes de la exposición se precisa en el personal de alto riesgo, como el personal de laboratorio que trabaja con el virus de la rabia, los manipuladores de animales, los médicos veterinarios y otros.⁴

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, por esta razón, su determinación es de gran utilidad para la evaluación del estado inmune del personal de riesgo, de los individuos previamente vacunados por haber sido agredidos por un animal rabioso y para realizar estudios seroepidemiológicos.⁵

Se ha establecido que las personas que trabajan con virus rábico vivo en un laboratorio de diagnóstico,

¹ Médico Especialista en Virología. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Empresa de Productos Biológicos Carlos J. Finlay.

³ Máster en Ciencias. Especialista de I Grado en Virología. IPK.

⁴ Máster en Ciencias. Licenciado en Microbiología. IPK.

⁵ Técnico en Procesos Biológicos. IPK.

investigación o producción, deben realizarse pruebas serológicas cada 6 meses, que permitan determinar la existencia de estos anticuerpos. Todas aquellas no expuestas a riesgo continuo, deben realizarse estos exámenes cada año.⁶

Existen diferentes métodos de diagnóstico para la detección de anticuerpos al virus rábico, entre los que están la prueba biológica (seroneutralización en ratón), la neutralización por reducción del número de placas (NRNP), la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RIFF), la contrainmunolectroforesis, los inmunoensayos enzimáticos, los radioinmunoensayos, la prueba de inmunofluorescencia indirecta, entre otras.⁷⁻¹⁰

Para la detección de anticuerpos en Cuba se ha venido aplicando la prueba biológica durante muchos años, pero no con la frecuencia establecida para la vigilancia al personal de riesgo, por causa de lo engorroso del sistema.

En este trabajo se normaliza la técnica de neutralización por reducción del número de placas, con el propósito de detectar anticuerpos neutralizantes al virus rábico en un grupo de sueros pertenecientes a personal de riesgo.

MÉTODOS

MUESTRAS

Se compararon las técnicas de neutralización por reducción del número de placas (NRNP), y la prueba biológica en ratón con el empleo de 25 muestras de suero de personas consideradas como personal de riesgo a la infección por virus rábico, por laborar directa o indirectamente con este y estar previamente inmunizados con vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante.

Posteriormente se estudiaron por NRNP 78 muestras, 39 de personas vacunadas y 39 de no vacunadas, estas últimas procedían del banco de sangre de 10 de Octubre, en Ciudad de La Habana.

Para el estudio se tomaron 10 cc de sangre venosa, la cual se centrifugó y se extrajo el suero, que se inactivó a 56 °C y se almacenó a menos 20 °C hasta su uso.

TÉCNICAS EMPLEADAS

Seroneutralización en ratón (prueba biológica)

Se utilizó el ensayo de neutralización descrito por Fitzgerald.¹¹ La cepa de virus rábico empleada fue la CVS (virus fijo), cuya dilución de trabajo fue de 80 DL₅₀/0,03 m y los sueros para el estudio fueron diluidos desde 1:5 hasta 1: 625.

Criterio de positividad: se consideraron positivas todas las muestras que presentaron 0,5 UI/mL o más (título 1/70).¹²

Neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

Para realizar esta técnica se empleó la cepa Pasteur, pase 355/16, en células de neuroblastoma, donada por la Unidad de Rabia del Instituto Pasteur, París, Francia, 1998.

Se empleó la técnica descrita por Wiktor.¹³

El título viral obtenido para el estudio fue de $7,6 \times 10^6$ unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL); se realizó el cálculo de la dilución de trabajo del virus (1: 50 000), la cual contenía de 15-20 UFP/ 50 µL.

Para el control de virus se realizaron 3 diluciones: la dilución de trabajo, 1:10 y 1:100, y se incluyó además un control de suero positivo.

Los sueros a estudiar fueron diluidos desde 1:3 hasta 1:6561.

Al calcular el porcentaje de reducción de placas, se consideraron positivas todas aquellas muestras cuyo número de placas fue mayor o igual que 50 %, y que al realizar la conversión a UI/mL presentaron 0,5 UI/mL o más.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS EMPLEADOS

Se utilizaron como sistema estadístico la prueba de Fisher y el análisis de varianza.

RESULTADOS

Se comparó la NRPN y la prueba biológica en ratón, para lo cual se estudiaron 25 muestras de individuos previamente vacunados, encontrándose

que 23 (92 %) presentaron anticuerpos y 2 (8 %) resultaron negativos por ambas técnicas. Posteriormente, se estudiaron por NRNP 78 muestras procedentes de 39 individuos con antecedentes de vacunación y 39 no vacunados, observándose que, en el grupo de los vacunados, 4 (10,26 %) de los sueros analizados, no presentaron anticuerpos neutralizantes al virus, mientras 35 (89,74 %) fueron positivos (tabla 1).

En la tabla 2, de las personas vacunadas, 22 eran del sexo femenino, 1 (4,54 %) negativa de anticuerpos al virus rábico y 21 (95,45 %) positivas. De las 17 correspondientes al sexo masculino 3 (17,65 %) no presentaron anticuerpos, la diferencia entre uno y otro sexos no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Al analizar, en la tabla 3, los resultados del grupo de vacunados en cuanto al tipo de trabajo que desempeñaban, se encontró que de los 26 trabajadores considerados de alto riesgo por laborar en contacto directo con el virus, como son los laboratorios, ya sean de producción, control o de diagnóstico, 2 (7,69 %) resultaron negativos de anticuerpos, los 24 restantes (92,31 %) resultaron positivos ($p > 0,05$).

TABLA 1. NRNP en muestras de individuos vacunados y no vacunados

Grupos estudiados	NRNP				Total
	Positivos		Negativos		
	No.	%	No.	%	
Vacunados	35	89,74	4	10,26	39
No vacunados	0	-	39	100	39

TABLA 2. Anticuerpos neutralizantes en relación con el sexo de las personas vacunadas

Sexo	Total de muestras	Positivos No.	Negativos No.
Masculino	17	14 (82,35)	3 (17,65)
Femenino	22	21 (95,45)	1 (4,54)

TABLA 3. Anticuerpos neutralizantes en relación con el tipo de trabajo realizado por las personas vacunadas

Tipo de trabajo	Total de muestras	Positivos No.	Negativos No.
Laboratorio	26	24 (92,31)	2 (7,69)
Mantenimiento	13	11 (84,62)	2 (15,38)

De los 13 trabajadores que laboraban en mantenimiento, 2 (15,38 %) resultaron negativos en el estudio.

Para realizar el análisis del comportamiento de los anticuerpos en cuanto a veces de aplicada la vacuna, se dividieron las muestras en 3 grupos que fueron los siguientes: el primer grupo estaba compuesto por personas que fueron vacunadas solo una vez, el segundo grupo por los que fueron reinmunizados de 2 a 10 veces y el tercer grupo estuvo comprendido por los vacunados más de 10 veces. Se observó que el menor grupo con anticuerpos detectables correspondió a las personas vacunadas solo en una ocasión y el mayor a aquellos a los que se les había reactivado la vacuna en múltiples ocasiones; por lo que la diferencia entre los 3 grupos resultó estadísticamente significativa ($p < 0,01$) (fig.).

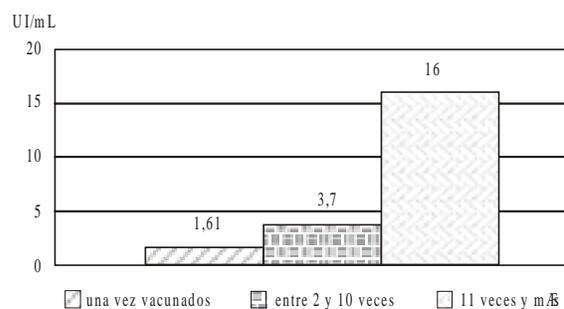


Fig. . Comportamiento de los anticuerpos en cuanto a veces de aplicada la vacuna.

DISCUSIÓN

La técnica de neutralización por reducción del número de placas, ha sido tradicionalmente empleada en el laboratorio del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” en la detección de anticuerpos neutralizantes a diferentes virus. Como su nombre lo indica, permite detectar anticuerpos neutralizantes, que como ya se ha descrito, son la mejor manera de detectar protección frente a la infección.¹⁴

Al analizar los resultados obtenidos en las 4 personas vacunadas que resultaron seronegativas al virus, estas fueron consideradas como no protegidas, porque una de ellas no recibió la dosis de refuerzo, otra no cumplió totalmente con el

esquema de inmunización y las 2 restantes resultaron negativas a pesar de haber recibido la reactivación en 3 ocasiones. Existe un número de personas, que a pesar de haber sido inmunizadas, son seronegativas; son consideradas como individuos que responden mal a la vacunación, lo que ha sido descrito en los trabajos realizados por *Strady* y otros, quien en uno de sus estudios en el año 1998 aplicó una dosis de refuerzo a individuos cuyos títulos eran inferiores a 0,5 UI/mL, los cuales seroconvirtieron inicialmente, pero con títulos bajos; al año de aplicada la reactivación se encontró que eran nuevamente negativos.¹⁵

Son varias las causas de no respuesta frente a la vacunación, dentro de estas están la edad del individuo, su estado inmunológico, la vía de administración de la vacuna, entre otras; aunque algunos autores consideran que es desconocida.¹⁶ Se ha planteado también, que los niveles bajos o la ausencia de anticuerpos al virus rábico no indican que el vacunado no esté protegido, porque tanto la inmunidad humoral y celular desempeñan un papel importante en la protección frente a la exposición al virus rábico.^{17,18}

Otra de las causas de no respuesta a la vacuna es la calidad de estas. La vacuna de cerebro de ratón lactante, que es la que se aplica en Cuba, es menos inmunogénica que las realizadas en cultivo de células, pero se ha reportado, que si bien la vacuna de tejido nervioso produce menor cantidad de anticuerpos neutralizantes que las vacunas modernas, esta ha permitido el control de la rabia urbana en los países donde aún se aplica.^{19,20}

En este estudio se pudo observar que no existe diferencia significativa entre el sexo femenino y masculino en cuanto a la presencia de anticuerpos, lo que ha sido reportado en estudios realizados por *Briggs* y otros.¹⁷

A pesar de que la diferencia en la positividad del grupo de trabajadores del laboratorio y los de mantenimiento no tuvo significación estadística, la positividad fue mayor en el primer grupo por la exposición directa y mantenida de este personal al virus.

Otro aspecto a considerar en el presente trabajo, es cómo influye en el nivel de anticuerpos de cada individuo, la cantidad de veces que han recibido la vacuna. En aquellos que llevan varios años recibiendo esta, el título fue superior, pero la

reinmunización anual ha sido cuestionada por diferentes autores, entre ellos *Smith*, quien plantea que en aquellas personas donde el nivel de anticuerpos se mantiene estable durante años, no es necesario la aplicación de una reactivación cada año, sobre todo, cuando se aplican vacunas de cultivo de células.^{21,22}

Otros consideran que mientras se emplee la vacuna de tejido nervioso es necesaria la aplicación de la reactivación anual por su poca potencia.²³⁻²⁵

Los autores de este trabajo consideran que, por en Cuba existir personas que llevan más de 10 años vacunándose anualmente con la vacuna de tejido nervioso y que tienen altos títulos de anticuerpos antirrábicos, se debía realizar un estudio para conocer si es necesario cambiar el tiempo de la dosis de refuerzo de 1 año a 2 ó 3 años.

La concordancia entre la prueba biológica y la NRNP permite sugerir el empleo de esta última técnica en la determinación de anticuerpos en personal de riesgo, por lo difícil que resulta la reproducibilidad de la prueba en el ratón y por la presencia de factores no controlables como la susceptibilidad y resistencia a la infección.

La introducción de la técnica de neutralización, por reducción del número de placas en la detección de anticuerpos al virus rábico, ha permitido la aplicación por primera vez en el país de la técnica de cultivo de células en la detección de anticuerpos a este virus y permitirá realizar un seguimiento evolutivo más adecuado en el personal de riesgo.

SUMMARY

The neutralization technique by reducing the number of plaques (NRNP) for detecting antirabic antibodies in personnel at risk was used. Serum samples from individuals at high risk and from persons with vaccination antecedents and without them were studied. The neutralization technique was compared with the biological technique in mice and as a result of the study it was obtained a concordance of 100 %. It was found that sex does not influence on the response of the antibodies to this virus, although the direct contact and the number of times that the individual has received the vaccine act positively on the immune response. The introduction of this technique in the laboratory allows to have a useful tool for the follow-up of the personnel receiving the vaccine before and after being exposed to the rabies virus.

Subject headings: RABIES/ diagnosis; NEUTRALIZATION TESTS/ methods; RABIE VACCINE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rotivel Y, Goudal M, Wirth S, Tsiang H. Rabies is a risk for traveling children. *Arch. Pediatr* 1998;5:561-7.
2. Schneider MC, Burgoa C, Aron J, Muñoz B, Velazco SR, Uieda W. Potential force of infection of human rabies transmitted by vampire bats in the Amazonian region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:680-4.
3. Aubert M, Blancou J, Barrat J, Artois M. Transmission and pathogenesis of two rabies isolates from the red fox at 10 year interval. *Ann Rech Vet* 1991;22:77-93.
4. Dupuy JM, Freidel L: Lag between discovery and production of new vaccines for the developing world. *Lancet* 1990;336:733-6.
5. Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en rabia. Séptimo Informe del Comité de Expertos de la OMS en rabia. Ginebra:OMS; 1984. (Serie de Informes Técnicos; 709).
6. World Health Organization. Expert committee on rabies. Eight report. Geneva; WHO; 1992 (Tech Rep Ser;824).
7. Reunión de consulta de expertos sobre las bases, técnicas para el reconocimiento de áreas libres de rabia y requisitos de cuarentena animal. Ginebra.OMS; 1994.
8. Hostnik P. The modification of fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test for the detection of antibodies to rabies virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47(6):423-7.
9. Bordignon J, Comu F, Ferreira SC, Caporale GM, Lima Philo J, Zanetti C. Calculating rabies virus neutralizing antibodies titers by flow cytometry. *Re Inst Med Trop Sao Paulo*, 2002;44(3):151-4.
10. Fournier-Carvana J, Poinier B, Haond G, Jallet C, Fuchon F, Tordo N, Perrin P. Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method. *Biologicals* 2003; 31(1):9-16.
11. Fitzgerald EA. Potency test for antirabies serum and immunoglobulin. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, edit. *Laboratory techniques in rabies*, 4ª.ed. Geneva: WHO; 1996, p. 417-422.
12. Smith JS. Rabies virus. In: Murray RP, edit. *Manual of Clinical Microbiology*. 6ª Ed. Washington DC: ASM Press; 1995.p.997-1003.
13. Wiktor TJ. Métodos de cultivo tisular. En: Kaplan MM, Koprowski H, editores. *La rabia. Técnicas de laboratorio*. 3ª.Ed. Ginebra: OMS; 1976. p. 105-29.
14. Vallega WM, Forrester FT. Laboratory methods for detecting rabies. Atlanta CDC; 1991.
15. Strady A, Lang J, Lienard M, Blondeau C, Jaussaud R, Plotkin S. Antibody persistence following preexposure regimens of cell-culture rabies vaccines. 10 years follow-up and proposal for a new booster policy. *J Infect Dis* 1998;177:1290-5.
16. Vodopija R, Lafont M, Baklaic M, Svjetlicic I. Persistence of humoral immunity to rabies 1100 days after immunization and effect of a single booster dose of rabies vaccine. *Vaccine* 1997;15:571-5.
17. Briggs D. Rabies, post-exposure prophylaxis. [citado 28 de mayo 1998]. Disponible en: URL:<http://www.healthnet.org/programs/promed.html>.
18. Harrington K. Rabies, post –exposure prophylaxis. [Citado 28 de mayo 1998] Disponible en: URL:<http://www.healthnet.org/programs/promed.html>.
19. Lodmell DL, Ewalt LC. Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with different combinations of DNA, inactivated virus, or recombinant vaccinia virus vaccines. *Vaccine* 2000;18(22):2394-8.
20. Moura W. Rabies vaccination, boosters. [cita del 27 de agosto 1998]. Disponible en: URL:<http://www.healthnet.org/programs/promed.html>.
21. Wilde H. Rabies booster vaccinations in high risk exposure subjects. [Citado 27 de agosto 1998]. Disponible en: URL:<http://www.healthnet.org/programs/promed.html>.
22. Tantawichien T, Supit C, Khawplod P, Sitprijia V. Three year experience with 4-site intradermal booster vaccination with rabies vaccine for postexposure prophylaxis. *Clin Infect Dis* 2001;33(12):2085-7.
23. Khawplod P, Wilde H, Yenmuang W, Benjavongkulchai M, Chomchey P. Immune response to tissue culture rabies vaccine in subjects who had previous postexposure treatment with Semple or suckling mouse brain vaccine. *Vaccine* 1996;14:1549-52.
24. Jackson AC. Rabies. *Curr. Treat Options Neurol* 2000;2(4):369-74.
25. Albas A, Nogueira R, Fontolan O, Albas K, Bremes N. Effect of freezing on immunogenicity of the rabies vaccine produced in suckling mouse brain. *Re Soc Bras Med Trop* 2001;34(1):49-52.

Recibido: 27 de marzo de 2003. Aprobado: 15 de abril de 2003.
 Dra. *María de los A. Ribas*. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu