

24
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

CARACTERIZACION DE UN ANTICUERPO
MONOCLONAL PARA EL DIAGNOSTICO
DE LA RABIA

Tesis Profesional

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

SERGIO ALBERTO JUAREZ HERNANDEZ

DIRECTORES: DR. JOSE ALVARO AGUILAR SETIEN
DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO.**Página****Resumen.**

1. Introducción.	1
1.1. Anticuerpos Monoclonales en Virología.	1
1.2. La Rabia.	2
1.2.1. Generalidades.	2
1.2.2. Propiedades.	3
1.3. Anticuerpos Monoclonales Contra el Virus Rábico.	4
2. Objetivo.	7
3. Materiales y Metodos.	8
3.1. Animales.	8
3.2. Células Híbridas.	8
3.3. Virus Rábico.	9
3.4. Cultivo de Células Híbridas.	9
3.4.1. Obtención de Macrófagos y Timocitos.	9
3.4.2. Reclonación.	10

3.5.	Detección de Anticuerpos por la Prueba de Inmunoensayo Enzimático en papel de Nitrocelulosa (DOT-ELISA).	11
3.5.1.	Sensibilización del papel de Nitrocelulosa.	11
3.5.2.	Detección de Anticuerpos.	11
3.6.	Expansión de las Clonas y Obtención del Líquido de Ascitis.	13
3.7.	Concentración del Virus Rábico.	14
3.7.1.	Determinación de Proteínas Virales.	15
3.8.	Detección del Antígeno Rábico por la Prueba de Inmunofluorescencia (IF).	16
3.9.	Detección del Antígeno Rábico por la Prueba de Inmunoensayo Enzimático doble sandwich (ELISA).	17
3.10.	Determinación del Isotipo por ELISA.	19
4.	Resultados.	21
4.1.	Reclonación.	21
4.2.	Obtención del Líquido de Ascitis.	21
4.3.	Determinación de Proteína Viral.	22
4.4.	Detección del Virus Rábico con la Prueba de Inmunofluorescencia.	22

4.5. Detección del Virus Rábico con la Prueba Inmunoensayo Enzimático doble Sandwich.	23
4.6. Determinación del Isotipo por ELISA.	24
5. Discusión. -	38
6. Conclusiones.	42
7. Bibliografía.	43

LISTA DE FIGURAS.

	Página
1. Obtención del Líquido Ascítico a los 10 días después de la inoculación de las clonas.	20
2. Prueba de DOT-ELISA realizada con los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas. Los discos más oscuros muestran la presencia de anticuerpos.	25
3. Curva patrón de proteínas e interpolación del valor obtenido de la muestra viral ($r^2 = 0.99$).	28
4. Inmunofluorescencia indirecta en impronta de cerebro de ratón infectado con virus rábico cepa CVS, realizada con el Líquido Ascítico de la clona 8-2.	31
5. Inmunofluorescencia indirecta en monoestrato de células BHK-21 infectadas con el virus rábico cepa Acatlán V-319, realizada con el sobrenadante de la clona 8-2.	32
6. Resultados de la prueba de ELISA doble "sandwich" realizada con la cepa Acatlán V-319 y los 6 Líquidos Ascíticos diluidos 1:10, utilizando como anticuerpo primario un suero inmune humano con título 1:200.	34

7. Resultados de la prueba de ELISA realizada 36
utilizando conjugado peroxidasa-anti IgG de
ratón y los Líquidos Ascíticos de las 6 clonas
diluidos 1:10.
8. Resultados de la prueba de ELISA realizada 37
utilizando conjugado peroxidasa-anti IgM de
ratón y los Líquidos Ascíticos de las 6 clonas
diluidos 1:10.

LISTA DE CUADROS

	Página
1. Obtención del Líquido Ascítico de las 6 clonas seleccionadas.	26
2. Densidad óptica obtenida para la construcción de la curva patrón de proteínas y de la muestra viral.	27
3. Intensidad fluorescente mostrada por los 6 AM en improntas de cerebro de ratón infectadas con el virus rábico, cepa CVS.	29
4. Intensidad fluorescente mostrada por los 6 AM en monoestratos celulares BHK-21 infectadas con el virus rábico, cepa Acatlán V-319.	30
5. Densidad óptica obtenida de los sobrenadantes y Líquidos Ascíticos en la prueba de ELISA doble sandwich.	33
6. Densidad óptica que nos muestra que las 6 clonas secretan anticuerpos con isotipo IgG.	35

RESUMEN.

En el presente trabajo se realizó la tipificación de 6 anticuerpos monoclonales (AM) seleccionados a partir de la clonación de hibridomas producidos en un trabajo previo, para lo cual se utilizaron las pruebas de DOT-ELISA, ELISA, ELISA doble Sandwich e Inmunofluorescencia indirecta (IF).

Se efectuaron reclonaciones y se seleccionaron las 6 clonas que dieron una reacción más fuerte con la técnica de DOT-ELISA utilizándose como antígeno la cepa Acatlán V-319 del virus rábico. Obteniéndose títulos de 1:8 000 y 1:128.

Posteriormente estas clonas fueron expandidas e inoculadas en ratones pristanizados para obtener líquido ascítico (abundante en anticuerpos). Para detectar los anticuerpos en el líquido de ascitis se realizó la prueba de IF, utilizando monoestratos de células BHK-21 infectadas con la cepa Acatlán V-319 e improntas de cerebro de ratón infectadas con la cepa CVS. Los 6 AM dieron resultados positivos con ambos antígenos. También se determinó la presencia del antígeno (cepa Acatlán V-319) con el uso de la prueba de ELISA doble sandwich, utilizándose este diferentes concentraciones. Se observó reacción positiva con estos 6 AM a una concentración de 320 ng de proteína viral.

El isotipo de los 6 AM's segregados por las clonas se determinó por medio de la prueba de ELISA empleando los conjugados peroxidasa anti-IgG y peroxidasa anti-IgM de ratón respectivamente, resultando que los 6 AM estudiados presentaron el isotipo IgG.

INTRODUCCION.

1.1. Anticuerpos Monoclonales en Virologia.

La propiedad que tienen los anticuerpos monoclonales (AM) de reconocer un sólo determinante antigénico de entre una mezcla compleja de antígenos, es uno de los hechos más relevantes en el área de la biomedicina (Aguilar y Kretschmer, 1985; Goding, 1980).

Muchos laboratorios de virología de diversos países, han obtenido AM dirigidos contra las proteínas estructurales, internas y externas de diversos virus y contra los antígenos virus inducidos no estructurales; esto hace que los AM sean empleados con frecuencia para algunos de los siguientes propósitos:

1. Mapeo de los sitios antigénicos de las proteínas virales, a fin de examinar las bases moleculares de su variación (Gerhard y Webster, 1978; Wiley et al., 1981).
2. Tipificación y subtipificación de los virus (Russell et al., 1981).
3. Localización y definición de las proteínas virus - inducidas y su expresión celular aún en cantidades muy pequeñas (Rouse y Babiuk, 1978; Castella y Gros, 1982).
4. Aislamiento en forma pura de los diferentes componentes virales y de otros componentes relacionados, tales como el interferón (Parkhouse, 1984; Secher y Burke, 1980).
5. Análisis de la habilidad protectora de los AM dirigidos

contra los diferentes componentes virales, así como la habilidad protectora de las diferentes clases de anticuerpos (Lechwort III y Appleton, 1983).

6. Estandarización en el diagnóstico de enfermedades virales (Cepko et al., 1981).
7. Aislamiento de proteínas virales y sus RNA mensajeros como primer paso para la clonación molecular de los antígenos de interés (Wiktor, 1985).

1.2. Rabia.

1.2.1. Generalidades.

El virus de la rabia es de gran importancia médica, pues produce una enfermedad ampliamente distribuida sobre todo en climas tropicales. Sólo Australia, Islas Británicas, Islandia y algunas otras islas, se han mantenido libres de esta enfermedad (Espmark y Grandien, 1983).

La rabia puede infectar tanto a mamíferos domésticos como salvajes; estos últimos constituyen un reservorio incontrolable. En América del Norte y Europa Occidental, la rabia que afecta a los animales domésticos (perros, gatos, etc.) ha sido erradicada, sin embargo subsiste la rabia de tipo silvestre. En países con menos recursos económicos, no ha sido posible controlar la rabia de tipo doméstico o urbano (Davis et al., 1978; Aguilar et al., 1986).

La rabia es letal en animales superiores incluyendo al hombre, por lo que es importante su control y erradicación. El virus progresa a lo largo de las fibras nerviosas hasta alcanzar el Sistema Nervioso Central, ocasionando una encefalitis grave y mortal. El virus se transmite mediante la saliva, por la mordida de un animal rabioso a uno susceptible. Se cree que los murciélagos infectados, producen un aerosol con sus secreciones contaminadas, permitiendo la penetración del virus por las fibras nerviosas del aparato respiratorio tanto del hombre como de otros animales (Davis *et al.*, 1978).

1.2.2. Propiedades.

Es un virus perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*. Los viriones presentan una forma cilíndrica con una extremidad redondeada y otra plana por lo que recuerda a la forma de un proyectil. Sus dimensiones son de 180 X 70 nm (Davis *et al.*, 1978; Lecocq y Kieny, 1965).

En el virion se identifican 5 proteínas: la proteína **N** (nucleocapside) con PM de 55.5 kilo Daltons (kD) la cual está constituida por 1 800 moléculas proteicas. La proteína **L** (transcriptasa) formada de 30 a 60 moléculas de proteína con un PM de 185 kD. Otra proteína **NS** (transcriptasa no estructural) formada con 950 moléculas de proteína con un PM

de 37.5 kD. Este complejo de proteínas efectúa la transcripción del RNA mensajero, donde las proteínas NS y L actúan como polimerasas mientras que la proteína N sirve como molde para la síntesis del nuevo material genético (Luria et al., 1978; Lecocq y Kieny, 1985; Dietzschold et al., 1979; Wiktor et al., 1973).

La envoltura lipo-proteica contiene 1 500 moléculas de proteína M con un PM de 25.8 kD y 1 800 moléculas de proteína G con un PM de 67 kD. La proteína glicosilada (G) constituye el único antígeno de superficie y por lo tanto induce la formación de anticuerpos, en los 58 aminoácidos carboxiterminales, que es donde reside la variabilidad antigénica de las cepas rábicas (Luria et al., 1978; Dietzschold et al., 1979; Wiktor et al., 1973; Dietzschold et al., 1983; Lecocq y Kieny, 1985).

1.3. Anticuerpos Monoclonales contra el virus Rábico.

La aplicación de la técnica de AM (Köhler y Milstein, 1975), ha dado como resultado, conocer ampliamente las características epidemiológicas del virus, y ha permitido utilizarlos con algunas de las finalidades tales como:

1. El estudio de la variabilidad antigénica del virus, con mutantes producidas tanto "in vitro" como "in vivo" resistentes a la neutralización (Koprowski y Wiktor, 1981; Lafon et al., 1983).

2. La caracterización del sitio de variación de la secuencia de la proteína G que define la patogenicidad del virus (Flamand et al., 1985).
3. La producción de anticuerpos anti-idiotípicos del antígeno rábico, capaces de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes (Reagan et al., 1983).
4. La caracterización de los genes que intervienen en la patogenicidad (Wiktor et al., 1984; Kieny et al., 1984).
5. El diagnóstico y la diferenciación de cepas (Sureau et al., 1983; Wiktor y Koprowski, 1980; Flamand et al., 1980).

En trabajos previos se produjeron y clonaron células híbridas productoras de anticuerpos contra el virus de la rabia (Lara, 1988). Estas células se reclonaron nuevamente y se seleccionaron 6 clonas en el presente trabajo, estudiándose con el fin de elegir una que produjera un AM útil para el diagnóstico de la rabia, para lo cual se utilizaron la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IF) y la prueba de Inmunoensayo Enzimático (ELISA). Estas pruebas son de gran utilidad ya que pueden hacerse en diferentes condiciones. La prueba de IF, por ejemplo se puede realizar en improntas de cortes de tejidos de diferentes especies de animales y del ser humano. La prueba de ELISA se puede realizar de una secreción o macerado de tejidos procedentes de las diferentes especies involucradas con la epidemiología de la enfermedad.

La producción de este tipo de reactivos ofrece la ventaja de una mayor especificidad, por ejemplo en la prueba de IF con anticuerpos policlonales se necesita el uso de material infeccioso para su absorción lo que implica mayor consumo de tiempo. Con los AM la prueba de IF no requiere de la absorción con el material infeccioso si se utiliza. La prueba de ELISA la especificidad del AM permite eliminar reacciones cruzadas con otros antígenos irrelevantes o contaminantes que dan reaccionan falsas positivas con el suero policlonal.

El AM es además un reactivo homogéneo y se puede seleccionar uno de alta afinidad hacia el determinante antigénico en estudio, aumentando con ello la sensibilidad de la prueba empleada, pudiéndose detectar pequeñas cantidades del antígeno. Con este tipo de reactivos, el diagnóstico se hace más eficaz ya que con esto se disminuye la probabilidad de reportar resultados falsos negativos.

OBJETIVO.

Seleccionar de un conjunto de hibridomas una clona productora de anticuerpos util para el diagnóstico de rabia, y caracterizar el anticuerpo producido.

MATERIALES Y METODOS.

3.1. Animales.

Se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa Balb / c singénicos de 20 a 30 g de peso; y de la cepa CD 1 de 15 a 20 g de peso.

3.2. Células Híbridas.

Los hibridomas utilizados provienen de una fusión previa entre esplenocitos de ratón inmunizado con virus rábico cepa Acatlán V-319 y células de mieloma de ratón línea SP / 0 (Lara, 1988).

2
Los híbridos se cultivaron en medio selectivo "HAT", integrado con medio Iscove (Sigma), complementado con 20% de suero fetal bovino (SFB, Sigma), 2% de una mezcla de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT, Sigma), 1.2% de glutamina y antibióticos (Gibco). Estos se congelaron en nitrógeno líquido en una suspensión de SFB y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) hasta el momento de su utilización.

3.3. Virus Rábico.

Se utilizó la cepa Acatlán V-319, la cual se propagó en monoestratos celulares BHK-21, con título de $10^{5.7}$ DL (i.c. ratón de 15 a 20 g de peso y de cepa CD 1), este título fue reportado en un trabajo previo (Lara, 1988).

3.4. Cultivo de Células Híbridas.

3.4.1. Obtención de Macrófagos y Timocitos.

24 horas antes de cultivar los hibridomas se sembraron células alimentadoras (macrófagos y timocitos).

Los timocitos se obtuvieron del timo de un ratón cepa CD 1 de 3 semanas de edad aproximadamente. En condiciones estériles se extrajo el timo y se preparó una suspensión en medio Iscove complementado con 5% de SFB y antibióticos, la viabilidad y el número de células se verificaron con la tinción de azul de tripan.

Los macrófagos se obtuvieron de la cavidad peritoneal de 2 ratones adultos de 20 a 30 g de peso, cepa CD 1. En condiciones estériles se les retiró la piel abdominal y por vía intraperitoneal se les inocularon a cada ratón 5 ml de una solución de sacarosa estéril al 11.3% y 4 C. Después de un pequeño masaje se aspiró la suspensión por la misma vía, se centrifugó a $800 \times g / 10 \text{ min}$ y el sedimento formado se resuspendió en medio Iscove con 20% de SFB y antibióticos.

Nuevamente se verificaron la viabilidad y el número de células con la tinción de azul de tripán.

Los timocitos y macrófagos se mezclaron en una proporción de 10:1 (10 macrófagos y 10 timocitos / ml) los cuales se resuspendieron en medio selectivo "HAT" complementado con 20% de SFB y antibióticos. Estos se distribuyeron en 2 micro placas de 24 pozos cada una (Nunc Intermed), colocando 0.5 ml de esta mezcla en cada pozo. Las placas sembradas se incubaron a 37 C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO₂.

2

3.4.2. Reclonación.

Los híbridos descongelados fueron cultivados en botellas de plástico de 25 cm² de superficie (Nunc Intermed), con medio selectivo "HAT" con 20% de SFB. Después de este periodo, se verificó la viabilidad con la tinción de azul de tripán. Posteriormente se tomaron 50 de estas células, las cuales fueron distribuidas en las 2 micro placas previamente sembradas con los macrófagos y timocitos las cuales se mantuvieron a 37 C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO₂ (Henry et al., 1980).

2

3.5. Detección de Anticuerpos por la Prueba de Inmunoensayo Enzimático en papel de Nitrocelulosa (DOT-ELISA).

Después de un periodo de incubación de 10 días posteriores a la clonación, de los pozos en los cuales se observó aumento de hibridomas, se tomó sobrenadante, para determinar la presencia de anticuerpos utilizando la técnica de DOT-ELISA.

3.5.1. Sensibilización del papel de Nitrocelulosa.

Siguiendo la metodología de Lin y Halbert (1983), la suspensión del virus rábico (Acatlán V-319) se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro y de 220 nm de tamaño de poro (Millipore) hasta su saturación. Después se dejaron secar y se cortaron discos de 5 mm de diámetro los cuales se guardaron a ^o-20 C hasta el momento en que se utilizaron.

3.5.2. Detección de Anticuerpos.

Los discos sensibilizados se descongelaron a temperatura ambiente, colocando un disco por cada pozo, con la parte del virus hacia arriba en una micro placa de 96 pozos (Nunc Intermed). Posteriormente se colocaron por cada pozo 0.3 ml del sobrenadante del cultivo de los híbridos. La

micro placa con los sobrenadantes se incubó durante 2 h a 37^o C. Después se realizaron 3 lavados con una solución de TBS-Tween 20 (Sigma) al 0.05% (TBS: solución amortiguadora de trietanolamina que consta de 7.5 g de NaCl, 2.8 ml de trietanolamina, 17 ml de HCl 1N, 0.1 g de MgCl₂ 6 H₂O, 0.02 g de CaCl₂ 2 H₂O y 1 000 ml de H₂O desionizada), en el último lavado se dejó 10 min con la solución de lavado sobre los discos. Después se agregaron 0.05 ml de una solución de conjugado peroxidasa anti-inmunoglobulina G de ratón (Sigma) diluido 1:200 en TBS-Leche descremada Sveltes (Nestlé) al 1%, incubándose durante 1 h a 37^o C. Posteriormente se realizaron nuevamente 3 lavados como se mencionó. Después se agregaron 0.05 ml de solución de sustrato (7.5 mg de diaminobencidina (Sigma), 15 ml de TBS y 0.015 ml de H₂O al 30%), incubándose durante 30 min a temperatura ambiente y protegiendo la placa de la luz. Por último se lavaron los discos 3 veces con TBS y se dejaron secar para su posterior análisis.

Los discos positivos se tiñen de color café los cuales se confrontan con testigos positivos y negativos. De los sobrenadantes que resultaron positivos se eligió únicamente las colonias de híbridos del pozo donde la coloración fue más fuerte para la prueba. Estas células híbridas se sacaron y se reclonaron nuevamente como se describe en el inciso 3.4.2.. El paso de reclonación se repitió en 4 ocasiones más, necesarias para asegurar la selección de una sola clona secretora de anticuerpos únicos y específicos contra el antígeno rábico.

3.6. Expansión de las Clonas y Obtención de Líquido de Ascitis.

De la última reclonación, las clonas seleccionadas se expandieron individualmente en medio "HAT" complementado con 20% de SFB, las cuales se mantuvieron en botellas de plástico para cultivo celular (Nunc Intermed) y el resto de las clonas no seleccionadas pero que resultaron positivas a la prueba de DOT-ELISA, se congelaron y guardaron a -70°C .

Las clonas en expansión al llegar a la cantidad de 10^7 células viables por botella de plástico o más, fueron inoculadas en ratones previamente pristanizados (0.5 ml de Pristán (Sigma) vía intraperitoneal, 30 días antes de la inoculación), esto de acuerdo a lo mencionado por Hoogenraad et al., (1983).

Después de 10 días de haber inoculado las clonas en los ratones pristanizados, se cosechó el líquido de ascitis por vía intraperitoneal, el cual se centrifugó a 800 X g en 10 min. El sedimento formado por las células fue congelado y guardado en nitrógeno líquido, mientras que el sobrenadante correspondiente al líquido de ascitis fue congelado y guardado a -70°C para la determinación y caracterización de los anticuerpos específicos.

En la figura No. 1 se muestra la forma de obtener el líquido de ascitis, en un ratón previamente pristanizado, con 10 días posteriores al inóculo de las células híbridas. El

líquido de ascitis obtenido, junto con las células se guardó, como se menciona anteriormente y el ratón se dejó descansar de 2-3 días para una nueva obtención.

3.7. Concentración del Virus Rábico.

Siguiendo la metodología de Sokol (1976), la concentración del virus rabico, se hizo a partir de la cosecha del virus cultivado en monoestratos celulares BHK-21 infectados con la cepa Acatlán V-319 (Lara, 1988).

El material infeccioso se mezcló con 0.2% de Acetato de Zinc 1M a pH 5.0 dejándose incubar 1 h a 4°C. Después se centrifugó a 1 000 X g durante 40 min. El sedimento formado se resuspendió en una solución de EDTA disódico al 11.7% pH 7.8 ajustado con Tris-base, la mezcla se clarificó y se centrifugó a 1 000 X g durante 40 min. El sobrenadante recolectado se pasó por una columna de Sephadex G-75 equilibrada con amortiguador NT pH 7.8 (0.13 M de NaCl y 0.05 M de Tris-base).

Para que la separación por la columna de Sephadex G-75 fuera eficiente se paso 1/3 del volumen de muestra por el volumen total de Sephadex. Las fracciones recuperadas por la columna (2-5 ml), fueron analizadas en un espectrofotómetro (Beckman Mod. DU-7), ya que las proteínas de superficie del virus rabico absorben a la longitud de onda de 260 nm. La parte recolectada donde se encontró las proteínas del virus

rábico, fue tratado con una mezcla de 10% de $MgSO_4$ 0.04M y 0.02 mg / ml de solución de RNasa durante 40 min a temperatura ambiente, luego se agregó 0.02 mg / ml de solución de DNasa durante 40 min a temperatura ambiente. Por último la mezcla se ultracentrifugó a 49 000 X g durante 90 min a 4 C. El sedimento formado se resuspendió en un pequeño volumen de PBS pH 7.8, que se congeló hasta el momento de ser utilizado.

3.7.1. Determinación de Proteínas Virales.

Para saber la concentración de proteínas de la muestra del antígeno rábico ya concentrado, se realizó su determinación, con la técnica de Lowry-Folin (1951).

Como primer paso se realizó una curva patrón utilizando albúmina bovina fracción IV como estándar al 1%, de ésta se prepararon soluciones con diferentes concentraciones, que fueron de 0.01 a 0.25 ml de éste. Posteriormente se llevó a 0.4 ml con NaCl al 0.85% y se agregaron a cada tubo 2.0 ml del reactivo de Lowry (50 ml de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1M, 0.5 ml de tartrato de sodio-potasio al 2% y 0.5 ml de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ al 1%). Después se dejó incubando 10 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0.2 ml por cada tubo del reactivo de Folin (Merck) diluido 1:3 con H_2O desionizada.

La muestra del virus rábico se diluyó 1:21 con PBS pH 7.8, a la cual se le determinó la cantidad de proteínas, siguiendo los mismos pasos que se mencionan para la curva

patrón, sustituyendo el paso de la muestra estándar por la del virus.

3.8. Detección del Antígeno Rábico por la Prueba de Inmunofluorescencia (IF).

Se realizó en improntas de cerebros de ratones (CD 1) infectados con el antígeno rábico cepa CVS y en monoestratos celulares BHK-21 infectadas con el antígeno rábico cepa Acatlán V-319.

Las improntas de los cerebros macerados se fijaron en portaobjetos libres de grasa y polvo, con acetona fría durante 15 min y se guardaron las muestras después a -70°C hasta el momento de ser utilizadas.

Siguiendo la metodología de Smith *et al.*, (1976), se prepararon las placas con los monoestratos celulares de BHK-21 infectadas con el virus rábico, fijándose como se mencionó anteriormente para las improntas, guardándose estas a -20°C hasta el momento de su utilización.

De acuerdo a Durham *et al.*, (1986) los anticuerpos monoclonales producidos contra la rabia resultan ser más específicos a pH ligeramente alcalino, por lo que la metodología que se siguió fue considerando esta observación.

Las placas con las improntas ó con los monoestratos celulares BHK-21 utilizados, fueron descongeladas previamente. Posteriormente se cubrió la muestra infectada

con el sobrenadante total, o con el líquido de ascitis total o diluido incubándose durante 30 min a 37 C. En seguida se lavó 4 veces con PBS pH 8.5 (solución amortiguadora de fosfatos; que consta de 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.15 g de Na HPO₂, 0.2 g de KH₂PO₄ y 1 000 ml de H₂O desionizada). Posteriormente se cubrió con 0.05 ml de conjugado anti-inmunoglobulina G de ratón marcada con fluoresceína (Sigma) diluido 1:10 con PBS, el cual se incubó 30 min a 37 C. Por último se lavó 4 veces con PBS pH 8.5 y un último lavado con H₂O. Para su observación, a la muestra se le agregó una gota de glicerina al 50% y encima de esta se colocó un cubreobjetos. Esta se observó en un microscopio con luz ultravioleta (Zeiss).

3.9. Detección del Antígeno Rábico por la Prueba de Inmunoensayo Enzimático doble Sandwich (ELISA).

Esta prueba de ELISA se realizó de acuerdo a lo mencionado por Al Moudallal et al., (1984), utilizando las clonas seleccionadas para determinar la especificidad hacia el virus rabioso.

Se sensibilizó una micro placa de 96 pozos (Nunc Intermed) con 0.1 ml de suero inmune humano (SIH) utilizado como anticuerpo primario, obtenido de una persona inmunizada 120 días antes con vacuna tipo fuenzalida (S.S.A.) y con un título en la prueba de ELISA de 1:200. Este anticuerpo

primario (SIH) fue diluido 1:50 en amortiguador de carbonatos
 pH 9.5 (7 g de Na₂CO₃, 2.8 g de NaHCO₃ llevados a 1 000 ml de
 H₂O desionizada), se incubó 2 h a 37 C, dejándose unos pozos
 libres como controles. En seguida se lavó 5 veces con una
 solución de PBS pH 7.8 con Tween 20 al 0.1% (PBS preparado
 como se menciona en el inciso 3.8.). Después se bloquearon
 todos los pozos con 0.3 ml de una solución de PBS-Gelatina al
 3%, incubándose durante 2 h a 37 C, esto para eliminar
 inespecificidad debido al material de los pozos. A diferentes
 concentraciones del virus, se colocó en cada pozo, 0.1 ml de
 este antígeno y se dejó incubando 2 h a 37 C, diluyendo el
 virus con PBS-Gelatina al 0.5%. Posteriormente se realizaron
 5 lavados con la solución de PBS-Tween 20 mencionada
 anteriormente. En seguida se colocó 0.1 ml del líquido
 ascítico total ó diluido 1:10 ó sobrenadante total de las
 clonas a probar, incubándose toda la noche a temperatura
 ambiente. Al día siguiente se lavó 5 veces con PBS-Tween 20 y
 se colocó 0.1 ml de conjugado peroxidasa polivalente anti-
 ratón (Sigma) diluido 1:700 con PBS-Gelatina 0.5%,
 incubándose 2 h a 37 C. Después se lavó 5 veces con PBS-Tween
 20. Por último se agregaron 0.1 ml a cada pozo del sustrato
 (4 mg orto-fenil, diamino bencidina (Sigma), 10 ml de
 amortiguador de fosfatos-citratos pH 5.0 (24.3 ml de ácido
 cítrico 0.1 M y 25.7 ml de Na₂HPO₄) y 0.01 ml de H₂O al 30%
 (Merck) este último se agregó justo al momento de poner el
 sustrato en la placa), incubándose 20 min a temperatura
 ambiente libre de la luz. La reacción se detuvo con una gota
 de H₂SO₄ 2.5 N por pozo y se hicieron las lecturas a una

longitud de onda de 490 nm en un lector de ELISA (Minireader II).

3.10. Determinación del Isotipo por ELISA.

Para conocer los tipos de anticuerpos secretados por las clonas seleccionadas, se realizó una modificación a la prueba de ELISA descrita por Nicholson y Prestage, (1982) y Thraenhart y Kuwert, (1977).

La prueba se realizó en micro placas de 96 pozos (Nunc Intermed), las cuales se sensibilizaron con 0.1 ml del antígeno rábico a diferentes concentraciones (ver inciso 3.7.1.), dejando unos pozos libres como testigos. Las diluciones del virus se realizaron en solución amortiguadora de carbonatos (ver inciso 3.9.) y posteriormente se realizó la prueba de ELISA como se explicó anteriormente (ver inciso 3.9.).

En esta parte experimental se utilizaron los conjugados anti-ratón peroxidasa anti-inmunoglobulina G (Sigma) y peroxidasa anti-inmunoglobulina M (Sigma) ambos diluidos 1:700 con PBS-Gelatina al 0.5% para cada prueba.



Figura No. 1. Obtención del Líquido Ascítico a los 10 días después de la inoculación de las clonas.

RESULTADOS.

4.1. Reclonación.

De las 2 primeras reclonaciones se seleccionaron las colonias cuyos sobrenadantes proporcionaron una tinción fuerte en la prueba de DOT-ELISA. En la figura No. 2 se muestra una micro placa donde se realizó la prueba de DOT-ELISA, para comprobar la presencia de anticuerpos en los medios de cultivo correspondiente a los hibridomas en cada pozo.

De la tercera reclonación se seleccionaron 2 clonas. Para cada una de estas, se determinó el título de anticuerpos en el medio de cultivo, cada una de estas clonas resultó con títulos de 1:8 000 y 1:128 respectivamente. Posteriormente de estos resultados, en una última reclonación se seleccionaron tres clonas por cada una de las 2 mencionadas, denominándose: 8-2, 8-3 y 8-5 las procedentes de la clona que produjo un título de 1:8 000 y 1-6, 1-10 y 1-11 las procedentes de la clona con título 1:128.

4.2. Obtención del Líquido de Ascitis.

El manejo de pequeños volúmenes con una concentración alta de anticuerpos es una de las ventajas que nos proporciona la obtención del líquido de ascitis.

En el cuadro No. 1, se muestran los volúmenes obtenidos por cada clona, así como la cantidad de células inoculadas en los ratones pristanizados entre 3.5 y 4 meses antes del inóculo de estas.

4.3. Determinación de Proteínas Virales.

300 ml de suspensión viral (obtenido en monoestratos celulares BHK-21), se concentraron hasta un volumen de 2 ml.

En el cuadro No. 2 y la figura No. 3 se observan los resultados de la curva patrón de proteínas, así como el obtenido con una muestra de 0.01 ml de concentrado viral diluido 1:21, obteniéndose 0.995 mg de proteínas por ml de suspensión.

Esta cantidad fue suficiente para la realización de las pruebas de ELISA subsecuentes, utilizadas para determinar el isotipo secretado por las 6 clonas seleccionadas y determinar la presencia del virus rábico en una prueba de ELISA doble sandwich.

4.4. Detección del Virus Rábico con la Prueba de Inmunofluorescencia.

En el cuadro No. 3, se muestran los resultados de las pruebas de IF realizadas con los líquidos ascíticos producidos por las 6 clonas estudiadas. Esta prueba se

realizó sobre improntas de cerebros de ratón infectadas con el virus rábico cepa CVS. Aquí se obtuvieron resultados positivos con los 6 líquidos ascíticos totales y diluidos hasta 1:10.

Los resultados de la prueba de IF realizada con los sobrenadantes de cultivo de las 6 clonas seleccionadas, sobre monoestratos de células BHK-21 infectadas con el virus rábico Acatlán V-319 ó con improntas de cerebro de ratón infectadas con la cepa CVS, son mostradas en los cuadros 3 y 4. También en estos experimentos se obtuvieron resultados positivos, con los sobrenadantes totales, sin embargo las reacciones fueron negativas con diluciones tan bajas, como 1:2.

En las figuras No. 4 y 5 se observa como los sobrenadantes reconocen al virus rábico, tanto en las improntas (Figura No. 4), como en los monoestratos celulares (Figura No. 5).

4.5. Detección del Virus Rábico con la Prueba de Inmunoensayo Enzimático doble Sandwich (ELISA).

La detección del antígeno por esta prueba sólo se realizó para la cepa Acatlán V-319, en donde los resultados no fueron tan específicos ni tan reproducibles como lo fueron para la técnica de IF.

En el cuadro No. 5 y en la figura No. 6, se muestra como los líquidos ascíticos diluidos 1:10 no presentan una alta especificidad hacia el antígeno. En esta gráfica puede notarse que al aumentar la cantidad del antígeno rábico, los títulos determinados por los anticuerpos de las clonas seleccionadas va aumentando. Por lo tanto podemos decir que, el antígeno no fue específico hacia el primer anticuerpo (suero inmune de humano), o bien que los anticuerpos de las células seleccionadas no son tan específicas hacia el virus rábico como se esperaba.

Por otro lado los resultados obtenidos con los sobrenadantes de las 6 clonas, en este experimento, fueron totalmente negativos por lo que, la cantidad de anticuerpos presentes en estos es muy baja, tanto que no llegan a formar un complejo antígeno-anticuerpo capaz de detectarse.

4.6. Determinación del Isotipo por ELISA.

El conocimiento de los tipos de anticuerpos secretados por las 6 clonas seleccionadas, se muestran en el cuadro No. 6 y en las figuras No. 7 y 8, en las cuales se aprecia que la IgG (Figura No. 7), predomina sobre la IgM (Figura No. 8).



Figura No. 2. Prueba de DOT-ELISA realizada con los sobrenadantes del cultivo de hibridomas. Los discos más oscuros muestran la presencia de anticuerpos.

Cuadro No. 1

Obtención del Líquido Ascítico
de las 6 clonas seleccionadas.

Clona	No. Células Inoculadas	Días Posteriores a la Pristanización	Líquido Ascítico Colectado (ml)
1-6	34.5×10^6	110	7.0
1-10	21.3×10^6	110	5.2
1-11	30.0×10^6	110	4.4
8-2	48.0×10^6	110	3.4
8-3	40.0×10^6	127	6.0
8-5	32.5×10^6	127	4.9

Cuadro No. 2

Densidad Óptica Obtenida para la Construcción de
la Curva Patrón de Proteínas y de la Muestra
Viral.

D.O. (750 nm)	mg de proteína total (albumina)	mg proteína viral Acatlán V-319 (1:21)
0.0503	0.010	
0.0952	0.020	
0.1463	0.030	
0.2218	0.050	
0.4267	0.100	
0.6485	0.150	
0.8736	0.200	
1.0496	0.250	
0.0329*		0.0047

* Densidad óptica de la muestra viral.

D.O. (750 nm)

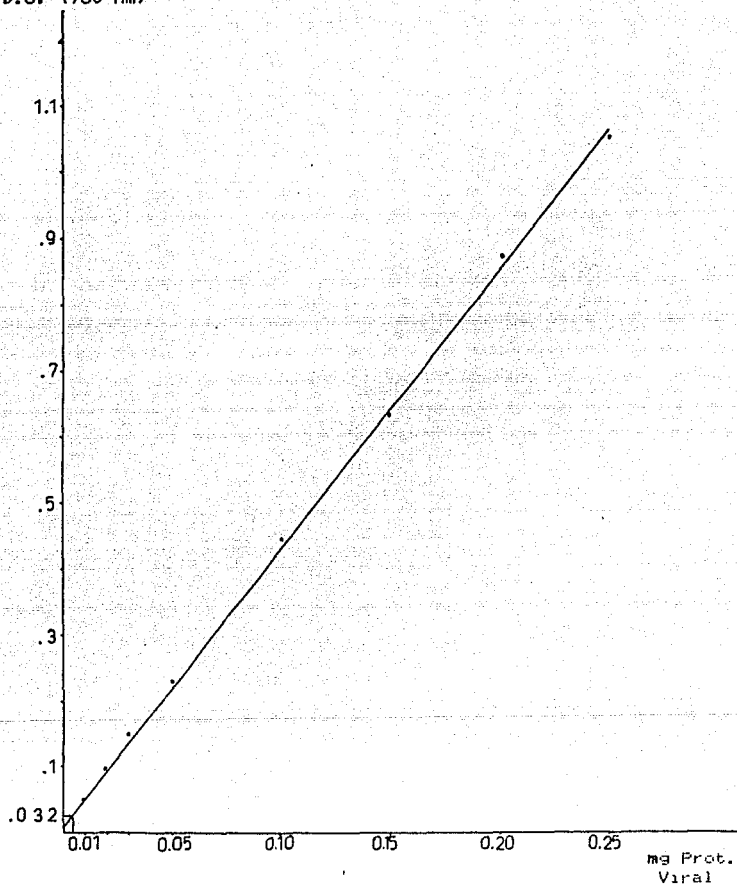


Figura No. 3. Curva Patrón de Proteínas e Interpolación del Valor Obtenido de la Muestra Viral ($r^2 = 0.99$).

Cuadro No. 3

*Intensidad Fluorescente Mostrada por los 6 Anticuerpos
Monoclonales en Implantas de Cerebro de Ratón
Infectadas con Virus Rábico Cepa CVS.*

<i>Clona</i>	<i>Líquido Ascítico (1:10)</i>	<i>Sobrenadante (total)</i>
<i>1-6</i>	<i>++</i>	<i>+</i>
<i>1-10</i>	<i>++</i>	<i>+</i>
<i>1-11</i>	<i>+</i>	<i>+</i>
<i>8-2</i>	<i>++</i>	<i>+</i>
<i>8-3</i>	<i>+++</i>	<i>++</i>
<i>8-5</i>	<i>+++</i>	<i>++</i>

Cuadro No. 4

**Intensidad Fluorescente Mostrada por los 6 Anticuerpos
Monoclonales en Monoestratos Celulares BHK-21
Infectadas con el Virus Rábico, cepa Acatlán V-319.**

Clona	Sobrenadante (total)
1-6	+
1-10	+
1-11	+
8-2	+
8-3	++
8-5	++



Figura No. 4. Inmunofluorescencia indirecta en impronta de cerebro de ratón infectada con virus rábico cepa CVS, realizada con el líquido ascítico de la clona 8-2.



Figura No. 5. Inmunofluorescencia indirecta en monoestrato de células BHK-21 infectadas con virus rábico cepa Acatlán V-319, realizada con el sobrenadante de la clona 8-2.

Cuadro No. 5

Densidades Ópticas Obtenidas con los Sobrenadantes y con los Líquidos Ascíticos en la Prueba de ELISA doble Sandwich.

ng de proteína viral / ml	Clonas Líquidos Ascíticos (1:10)					
	1-6	1-10	1-11	8-2	8-3	8-5
5	0.02	0.00	0.04	0.00	0.01	0.04
20	0.01	0.01	0.06	0.00	0.02	0.04
80	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01	0.05
320	0.02	0.01	0.05	0.02	0.01	0.07

Los resultados con los sobrenadantes de los cultivos de todas las clonas fueron negativos.

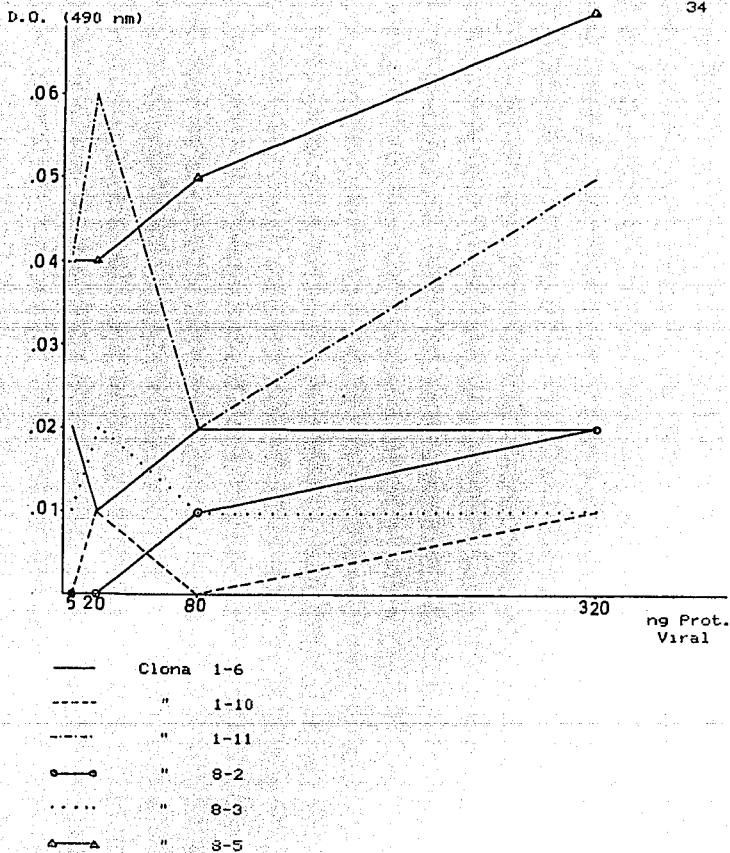


Figura No. 6. Resultados de la Prueba de ELISA doble "sandwich" realizado con la cepa Acatlán V-319 y los 6 Líquidos Ascíticos (1:10), utilizando como anticuerpo primario un suero inmune humano con título 1:200.

Cuadro No. 6

Densidad Optica que nos Muestra que las 6 Clonas Secretan
Anticuerpos con Isotipo IgG.

ng proteina viral / ml.	Isotipo	Clona Liquido Ascitico (1:10)					
		1-6	1-10	1-11	8-2	8-3	8-5
5	IgG	0.49	0.43	0.22	0.06	0.24	0.65
	IgM	0.11	0.13	0.16	0.09	0.13	0.16
20	IgG	0.64	0.60	0.44	0.28	0.53	1.04
	IgM	0.12	0.09	0.10	0.11	0.11	0.14
80	IgG	0.73	0.83	0.78	0.65	0.77	1.31
	IgM	0.08	0.10	0.14	0.13	0.14	0.15
320	IgG	1.43	1.45	1.42	1.05	1.62	1.56
	IgM	0.13	0.16	0.22	0.28	0.18	0.26

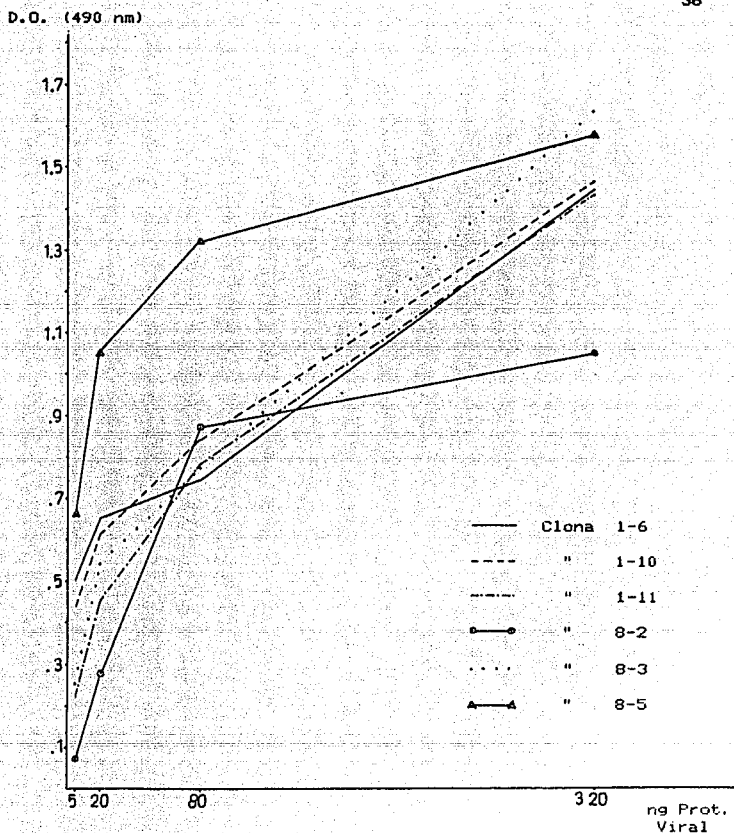
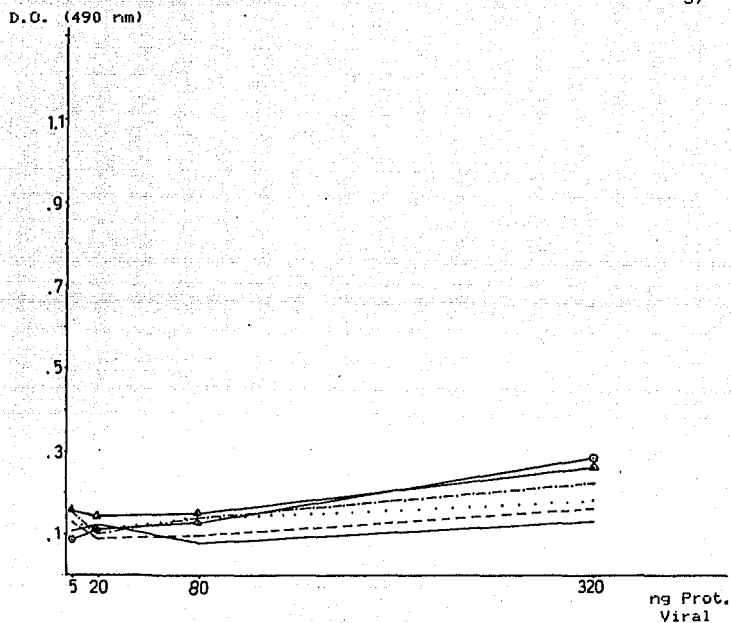


Figura No. 7. Resultados de la prueba de ELISA realizada, utilizando conjugado peroxidasa, anti IgG de ratón y los Líquidos Ascíticos de las 6 clonas diluidos 1:10.



- Clona 1-6
- - - " 1-10
- · - · " 1-11
- — ○ " 8-2
- · · " 8-3
- ▲ — △ " 8-5

Figura No. 8. Resultados de la prueba de ELISA realizada, utilizando conjugado peroxidasa, anti IgM de ratón y los Líquidos Ascíticos de las 6

DISCUSION.

La obtención de reactivos de diagnóstico es de primordial importancia tanto en el área de la medicina humana como en la animal, por lo que los AM al ser reactivos sumamente puros, constituyen excelentes herramientas, tanto en la comprensión de ciertos mecanismos, como en la prevención de ciertas enfermedades (Lechwort III y Appleton, 1983; Zurawski et al., 1978).

En el caso del virus de la rabia, que es una de las enfermedades más antiguas en estudio y que hasta la actualidad no ha podido ser controlada, juega uno de los papeles más importantes en la salud mundial. En países industrializados donde se pensaba ya controlada tanto en áreas urbanas como silvestres, ha resurgido durante los últimos años (Aguilar et al., 1986; Sureau et al., 1983; Steek y Wandeler, 1980).

La aparición de otras cepas emparentadas con el virus de la rabia, ha preocupado a muchos investigadores, por lo que el estudio de la epidemiología así como de sus propiedades inmuno-patológicas, continúa siendo un campo amplio de trabajo (Wiktor, 1985; Shope et al., 1985).

El uso de AM en el estudio de las propiedades del virus de la rabia, así como en su diagnóstico, tiene gran prevalencia, ya que el uso de sueros policlonales no ofrece las mismas ventajas que los AM tanto en rapidez como en la diferenciación de cepas del virus rábico. Aún con las diferentes técnicas utilizadas como IF, ELISA, RIA,

Inmunoelectroforesis, etc. no se ha logrado obtener una prueba en donde los resultados sean totalmente confiables (Gardner, 1977; Diamond *et al.*, 1982; Kenneth y Herrmann, 1982; Sethi *et al.*, 1980).

En México la comprensión de los problemas epidemiológico-inmunológicos de la rabia son importantes, ya que la utilización extensiva de reactivos de diagnóstico (AM), nos permitiría sentar bases de control más adecuado de la enfermedad, en las diferentes áreas en las que se presenta.

En el presente trabajo la caracterización de los anticuerpos producidos por las 6 clonas seleccionadas, así como la especificidad hacia el antígeno rábico, fue uno de los primeros pasos para obtener un reactivo, que sirva como base para el diagnóstico de la rabia.

Durante la selección de estas 6 clonas por las técnicas de DOT-ELISA e IF, se observaron algunas variaciones con respecto a dichas técnicas, ya que jugaron un papel importante para la detección de los anticuerpos secretados por las células. Para la prueba de DOT-ELISA los tiempos de incubación fueron los más importantes ya que de estos depende que la prueba resulte confiable (Voller *et al.*, 1976). En el caso de la prueba de IF, el pH (ligeramente alcalino) del amortiguador de lavado y como diluyente para el conjugado, fue importante debido a las características fisicoquímicas del antígeno rábico sobre las improntas y monoestratos celulares, esto con el fin de obtener una mejor resolución en el momento de ser observadas al microscopio, como se aprecia en las figuras No. 4 y 5 (White *et al.*, 1963; Durham *et al.*,

1986; Dietzschold et al., 1987).

Los volúmenes de líquidos ascíticos obtenidos de las 6 clonas seleccionadas (Cuadro No. 1), no fue el esperado de acuerdo a lo descrito por Hoogenraad et al., (1983), ya que este menciona volúmenes obtenidos de hasta 55 ml de líquido ascítico por ratón, con 30 días previamente pristanizados. En este trabajo la pronta formación de los tumores ocasionados por las células inoculadas, fue letal para los ratones ya que el uso del pristán y el tiempo presente en estos (más de 110 días), favoreció la rápida formación de los tumores, obteniéndose de esta forma, aproximadamente el 10% del volumen esperado. Con base en estos resultados, es conveniente tomar en cuenta tanto la cantidad de células inoculadas como el periodo de los ratones con el pristán, para que de esta manera se obtengan una cantidad satisfactoria de líquido ascítico por ratón, sin la utilización de varios de estos animales.

La obtención del líquido de ascitis fue importante, debido a la gran cantidad de anticuerpos contenidos en estos, comparados con los presentes en los sobrenadantes (Hoogenraad et al., 1983). También se observó la capacidad de los líquidos de ascitis de reconocer más específicamente al virus rábico debido a la cantidad presente en estos, comparados con los obtenidos de los sobrenadantes. Esto se demostró tanto con la prueba de IF como la de ELISA, donde la prueba de IF (Figuras No. 4 y 5), verifican la presencia del virus rábico utilizando ambos anticuerpos (sobrenadante y líquido de

ascitis). Mientras que en los Cuadros 3 y 4 se observan los diferentes comportamientos tanto de líquido ascítico como sobrenadante ante las 2 cepas rábicas utilizadas.

Con respecto a la prueba de ELISA en la figura No. 6, se aprecia la poca afinidad de los anticuerpos (líquido ascítico) hacia el antígeno rábico, en comparación con los sobrenadantes donde fue totalmente negativo, confirmando lo antes mencionado de que el líquido ascítico contiene una mayor cantidad de anticuerpos que los sobrenadantes.

El conocimiento de los tipos de anticuerpos que están reconociendo al antígeno rábico, fue otro de los pasos importantes, ya que con esto podemos saber sobre las propiedades inmuno-químicas del antígeno reconocido. En la figura No. 7, se muestra como los anticuerpos IgG son los que están reconociendo al virus rábico, demostrándose con la prueba de ELISA, que los resultados fueron muy superiores a los encontrados para IgM (Figura No. 8). También con esta prueba se confirma la especificidad hacia el virus rábico, debido a que el aumento proporcional del virus origina títulos mayores con respecto a la presencia del virus.

Como se aprecia en el cuadro No. 6 y en las figuras 7 y 8, la presencia mínima de IgM es debida a que los líquidos ascíticos son producidos en los ratones, donde se crean algunos anticuerpos irrelevantes e inespecíficos de esta clase. Al contrario con los sobrenadantes, los cuales se encuentran libres de anticuerpos contaminantes, pero debido a la baja concentración de AN, no pudieron ser utilizados para la determinación de los isotipos

CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos podemos concluir que los 6 AM, son capaces de reconocer a las 2 cepas de virus rábico utilizadas: Acatlán V-319 y CVS.

De estos 6 AM el denominado como el 8-5, ofrece un mejor reconocimiento hacia los antígenos rábicos antes mencionados. Por lo tanto este AM (8-5), podría utilizarse como un reactivo útil para el diagnóstico de ambas cepas.

El pH fue determinante en la prueba de IF para la selección de estos AM ya que nos proporcionó resultados más reproducibles y confiables a un pH alcalino.

En la prueba de ELISA los periodos de incubación fueron importantes, por que de estos dependió que esta prueba diera resultados positivos.

Las 6 clonas seleccionadas produjeron anticuerpos con el isotipo IgG.

La concentración de los AM en los sobrenadantes es muy baja, esto y el hecho de que el mantenimiento de los ratones es más barato que el cultivo de las clonas, hace que la producción de líquido ascítico sea el mejor método de obtención de los AM.

A pesar de que el proceso de producción de una clona secretora de anticuerpos es costoso, una vez obtenida su propagación, en ratones puede ser más económica que la obtención de un suero policlonal.

El AM caracterizado y seleccionado como el mejor reactivo para el diagnóstico de la rabia se puede comercializar con este fin.

BIBLIOGRAFIA.

- Aguilar S. A., Kretschmer S. R. (1985). Anticuerpos Monoclonales en Enfermedades de Origen Viral. Salud Publica Mexicana. 27; 251-259.
- Aguilar S.A., Pastoret P.P., Oros C.D., Kretschmer R. (1986). Anticuerpos Monoclonales en Rabia. En: Avances en el uso de Vacunas 1985-1985. Ed. Garza R.J., Franco D.G.G. Gerencia General de Biológicos y Reactivos Secretaria de Salud. México.
- Al Moudallal Z., Altschuh D., Briand J.P., Van Regenmortel M.H.V. (1984). Comparative Sensitivity of Different ELISA Procedures for Detection Monoclonal Antibodies. J. Immunol. Methods. 68; 35-43.
- Castella P., Gros P. (1982). Les Anticorps Armes. La Recherche. 13; 240-242.
- Cepko C. L., Changelian P. S., Sharp P. A. (1981). Immunoprecipitation with two Dimensional Pools as an Hybridoma Screening Technique: Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Adenovirus 2 Protein. Virology. 110; 385-401.
- Davis B.D., Dulbecco R., Elissen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B. Jr. Mc Carthy H. (1976). Tratado de Microbiologia. Salvat Ed. 2a ed. España; 1391-1400.
- Diamond B. M. D., Matthew D., Scharff M. D. (1982). Monoclonal Antibodies. JAMA. 248; 3165-3169.
- Dietzschold B., Cox J.H., Schneider L.G. (1979). Rabies Virus Strains: A Comparison Study by Polypeptide Analysis of Vaccine Strains with Different Pathogenic Patterns. Virology. 98; 63-75.

- Dietzschold B., Wiktor T.J., Wunner W.N., Varrichio A. (1983). Chemical and Immunological Analysis of the Rabies Soluble Glycoprotein. *Virology*. 124; 330-337.
- Dietzschold B., Tollis M., Lafon M., Wunner W., Koprowski H. (1987). Mechanisms of Rabies Virus Neutralization by Glycoprotein-Specific Monoclonal Antibodies. *Virology*. 161: 29-36.
- Durham T.M., Smith J.S., Reid F.L., Hale-Smith Ch. T., Fears M. B. (1986). Stability of Immunofluorescence Reactions Produced by Polyclonal and Monoclonal Antibody Conjugates for Rabies Virus. *J. Clin. Microbiology*. 24: 301-303.
- Espmark A., Grandien M. (1983). Other Viruses. In: *Textbook of Medical Virology*. Ed. Licke E., Norrby E. Buttenworths and Co. England; 336-337.
- Flamand A., Wiktor T. J., Koprowski H. (1980). Use of Hybridoma Monoclonal Antibodies in the Detection of Antigenic Differences Between Rabies and Rabies Related Virus. I. The Nucleocapside Protein. *J. Gen. Virology*. 48: 105-109.
- Flamand A., Coulon P., Dialo A., Lafay F. (1985). La Rage: Effect sur la Virulence de Mutations Localisee dans le Site III de la Glycoproteine. *Sumaries of Communications. Symposium on Vaccines and Vaccinations. Institute Pasteur, Paris.*
- Gardner P. S. (1977). Rapid Virus Diagnosis. *J. Gen. Virology*. 36; 1-29.
- Gerhard W., Webster R. G. (1978). Antigenic Drift in Influenza A Viruses. I: Selection and Characterization of Antigenic Variants of A/PR/8/34(HON1) Influenza Virus with Monoclonal Antibodies. *J. Exp. Medical*. 148; 383-392.

- **Goding J. W. (1980). Antibody Production by Hybridomas. J. Immunol. Methods. 39; 295-308.**
- **Henry C., Marbrook J., Vann C.D., Kodlin D., Wofsy C. (1980). Limiting Dilution Analysis. In: Selected Methods in Cellular Immunology. Ed. Mishell B.B., Shigii S.M. Freeman San Francisco Ca. USA; 138-152.**
- **Hoogenraad N., Helman T., Hoogenraad J. (1983). The Effect of pre-injection of Mice with pristane on Ascites Tumour Formation and Monoclonal Antibody Production. J. Immunol. Methods. 61; 317-320.**
- **Kenneth L., Herrmann M.D. (1982). Newer Developments in Rapid Viral-Disease Diagnosis. Laboratory Management. 63-69**
- **Kieny M.D., Lathe R., Drillien R., Spehner D., Skori S., Schmitt D., Wiktor T.J., Koprowski H. (1984). Expression of rabies Virus Glycoprotein from a Recombinant Vaccinia Virus. Nature. 312; 163-166.**
- **Köhler G., Milstein C. (1975). Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. Nature. 256; 495-497.**
- **Koprowski H., Wiktor T. (1981). Monoclonal antibodies Against Rabies Virus. In: Monoclonal Antibodies Hybridomas. A new Dimension in Biological Analysis. Ed. Kennet R.H., Mc Kearn T.J., Bechtol K.B. Plenum Press New York-London; 335-351.**
- **Lafon M., Wiktor T.J., Mac Farlan R.I. (1983). Antigenic Sites on the CVS Rabies Virus Glycoprotein: Analysis with Monoclonal Antibodies. J. Gen. Virology. 64; 843.**

- Lara S.A. (1988). *Enriquecimiento de Clonas Productoras de Anticuerpos Contra el Virus de la Rabia Mediante Transferencia Adoptiva Intraesplénica*. Tesis Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAH.

- Lechworth III G.J., Appleton J.A. (1983). *Passive Protection of Mice and Sheep Against Blue Tongue Virus by a Neutralization Monoclonal Antibody*. *Infect. Immunology*. 39; 203-212.

- Lecocq J.P., Kieny M.P. (1985). *La Biologie Moléculaire du Virus Rabique*. *Ann. Med. Veterinary*. 129; 249-261.

- Lin K., Halbert T. (1983). *Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay: A Microtechnique for the Rapid a Diagnosing of Visceral Leishmaniasis*. *J. Immunol. Methods*. 64, 205-214.

- Lowry D.H., Rusebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. *J. Biol. Chemistry*. 193; 265-275.

- Luria S.E., Darnell J.E., Baltimore D., Campbell A. (1978). *Animal Virus Multiplication: The RNA Viruses*. In: *General Virology*. Ed. John W. and Sons. 3a. ed. USA. 327-338.

- Nicholson K.G., Prestage H. (1982). *Enzyme Linked Immunosorbent Assay: A Rapid Reproducible Test for the Measurement of Rabies Antibody*. *J. Med. Virology*. 9; 43-49.

- Parkhouse R.M.E. (1984). *Immunopurification*. *British Med. Bull.* 40; 1-4.

- Reagan K.J., Wunner W.H., Wiktor T.J., Koprowski H. (1983). *Anti-Idiotypic Antibodies Induce Neutralizing Antibodies to Rabies Virus Glycoprotein*. *J. Virology*. 48; 660.

- Rouse B.T., Babiuk L.A. (1978). Mechanism of Recovery from Herpes Virus Infection. A Review. *Can. Comp. Med.* 42; 414-428.
- Rusell W.C., Patel G., Precious B., Sharp I., Gardner P.S. (1981). Monoclonal Antibodies Against Adenovirus Type 5: Preparation and Preliminary Characterization. *J. Gen. Virology.* 56; 711-720.
- Secher D.S., Burke D.C. (1980). A Monoclonal Antibody for Large Scale Purification of Human Leucocyte Interferon. *Nature.* 285; 446-450.
- Sethi K.K., Endo T., Brandis H. (1980). Hybridomas Secreting Monoclonal Antibody with Specificity for *Toxoplasma Gondii*. *J. Parasitology.* 66; 192-196.
- Shope R.E., Tiguar G.H., Burrage T.G. (1985). Advances in Rabies Virus Research. In: *Veterinary Viral Disease. Their Significance in South East Asia and the Western Pacific.* Ed. Della-Porta. Academic Press Inc. Australia. 361-373.
- Smith J.S., Yager P.A. Baer G.M. (1976). Una Prueba Rápida en Cultivo Tisular para la Determinación de Anticuerpos Neutralizantes del Virus Rábico. *La Rabia Técnicas de Laboratorio.* Ed. Kaplan M.M., Koprowski H. Organización Mundial de la Salud. 375-379.
- Sokol F. (1976). Purificación del Virus Rábico y Aislamiento de sus Componentes. *La Rabia Técnicas de Laboratorio.* Ed. Kaplan M.M., Koprowski H. Organización Mundial de la Salud. 175-189.
- Steek F., Wandeler A.L. (1980). The Epidemiology of Fox Rabies In Europe. *Epidem. Rev.* 2; 71-96.

- Sureau P., Rollin P., Wiktor T. (1983). *Epidemiologic Analysis of Antigenic Variations of Street Rabies Virus: Detection by Monoclonal Antibodies*. *Am. J. Epidemiology*. 117; 605-609.
- Thraenhart O., Kuwert E.K. (1977). *Enzyme Immunoassay for Demonstration of Virus Antibodies after Immunisation*. *The Lancet*. 20; 399-400.
- Voller A., Bidwell D., Bartlett A. (1976). *Microplate Enzyme Immunoassays for the Immunodiagnosis of Virus Infections*. *Manual of Clinical Immunology*. Ed. Rose N.R., Friedman H. American Society for Microbiology. Washington USA; 506-512.
- White J., Kielian M., Helenius A. (1983). *Membrane Fusion Proteins of Enveloped Viruses*. *Q. Rev. Biophys.* 16; 151-195.
- Wiktor T.J. (1985). *Monoclonal Antibodies in Rabies Virus Research*. *Veterinary Viral Diseases. Their Significance in South-East Asia and the Western Pacific*. Ed. Della-Porta. Academic Press. Australia; 374-381.
- Wiktor T.J., Koprowski H. (1980). *Antigenic Variants of Rabies Virus*. *J. Exp. Medical*. 152; 92-112.
- Wiktor T.J., Gyorgy E., Schlumberger H.D., Sokol F., Koprowski H. (1973). *Antigenic Properties of Rabies Virus Components*. *The Journal of Immunology*. 110; 269-276.
- Wiktor T.J., MacFarlan R.I., Reagan K.J., Dietzschold B., Curtis P.J., Wunner W.H., Kieny M.P., Lathe R., Lecocq J.P., Mackett M., Moss B., Koprowski H. (1984). *Protection from Rabies by a Vaccinia Virus Recombinant Containing the Rabies Virus Glycoprotein Gene*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81; 7194-7198.

- Wiley D.D., Webster R.G., Wilson I.A., Skehel J.J. (1981). Structural Identification of the Antibody Binding Sites of Hong-Kong Influenza Haemagglutinin and their Involvement in Antigenic Variation. *Nature*. 289; 372-378.

- Zurawski V.R., Haber E., Black P.H. (1978). Production of Antibody to Tetanus Toxoid by Continuous Human Lymphoblastoid Cell Lines. *Science*. 199; 1439-1441.