

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Determinación de la inmunogenicidad de la
vacuna antirrábica trivalente tipo cerebro de
ratón lactante elaborada en Guatemala y de la
protección que ~~representa~~ ^{representa} a diferentes
biotipos ~~de virus~~ ^{de virus} ~~en el~~ ^{en el} país.



Presentado por
Julio César Rafael Flores Ordóñez
Para optar al título de
Químico Biólogo.

Guatemala, noviembre de 1992.

459538

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

D.L.
06
T(1560)

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Decano: Licda. Clemencia del Pilar Gálvez de Avila.

Secretario: Lic. José Francisco Monterroso Salinas.

Vocal I: Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar.

Vocal II: Licda. Thelma Esperanza Alvarado de Gallardo.

Vocal III: Lic. Miguel Orlando Garza Sagastume.

Vocal IV: Br. Tania Rubí Ramos Castellanos.

Vocal V: Br. Héctor Edmundo Díaz Mejía.

DEDICO ESTA TESIS

A Dios, su hijo Jesucristo y la Santísima Virgen María, por todas sus bendiciones.

A mi patria Guatemala.

A mi padre, Teniente de Infantería Julio César Flores Navas (QEPD).

Y en especial a mi madre, Flor de María Ordóñez v. de Flores, por su amor, dedicación y apoyo constantes.

ACTO QUE DEDICO

A mis tíos, Dora, Vilma, Marco Antonio, Miguel Alberto, Roderico (QEPD) y Rosa.

A mis primos, Dora Evangelina, Carlos, Miguel y María Victoria.

A mis abuelos, Victoria (QEPD), Olga y Roberto.

A mis amigos, Luis Humberto, Mario Antonio, Luis Alberto (QEPD), Sergio y Roberto.

Al coronel de Infantería DEM, Boris R. Porta España, por su amistad y apoyo.

A la familia Arevalo Rosales.

A Xiomara, por ser una persona tan especial.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Servicios de Salud, en especial al Dr. Víctor Daniel España Pinetta, por permitirme realizar el trabajo de tesis en dicha institución.

Al personal del Laboratorio Biológico, Nubia, David, Edgar, Carlos, Anna y en especial a Enrique Arbizú, por su orientación, ayuda y comprensión.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

INDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	2
3.	Antecedentes	3
4.	Justificaciones	24
5.	Objetivos	25
6.	Hipótesis	26
7.	Materiales y Métodos	27
8.	Resultados	30
9.	Discusión de resultados	32
10.	Conclusiones	34
11.	Recomendaciones	35
12.	Referencias	36
13.	Anexos	44
	13.1 (tablas)	45
	13.2 (gráficas)	54

1. RESUMEN

La rabia es una zoonosis viral mortal, causante de encefalitis en los individuos que son susceptibles a ella. Debido a las características de su mecanismo patológico es posible vacunar a las personas que han sido atacadas por animales rabiosos y lograr que produzcan reacciones inmunes suficientemente fuertes como para impedir la infección.

Existen varios tipos de vacunas antirrábicas. En Guatemala se hace uso actualmente de la trivalente tipo cerebro de ratón lactante elaborada en el país, junto con otras que son donadas por diversos organismos internacionales.

La variabilidad propia de los virus y la evidencia de fallos en los esquemas de vacunación, hace pensar en la necesidad de determinar si la vacuna producida en Guatemala es un buen inmunógeno y si es capaz de proteger a los animales de experimentación frente a diferentes biotipos de virus calle propios del país.

Para probarlo se hace uso de la prueba biológica en ratones inoculados con cantidades estandarizadas de virus; se utilizan 4 diferentes virus fijos (CVS, 51-123, 91-122 y DR) y 52 diferentes biotipos de virus calle. Al mismo tiempo se llevan varios controles, los cuales buscan eliminar la posibilidad de que ciertos factores puedan influenciar los resultados.

Al finalizar la prueba, se concluye que la vacuna analizada si es un buen inmunógeno y se recomienda seguir con su utilización en las campañas de vacunación animal y en la profilaxis humana.

2. INTRODUCCION

Las zoonosis son enfermedades que se desarrollan en vertebrados mamíferos; la gravedad del padecimiento depende del tamaño del inóculo, la virulencia intrínseca del microorganismo y la forma de inoculación. [1,2] Dentro de las principales zoonosis se encuentra la rabia, enfermedad conocida y descrita durante muchos años, también llamada hidrofobia, rabia paralítica de bovinos, mal de luna, etc. Es una encefalitis viral mortal, que se transmite generalmente por mordedura. [2-4]

Para la profilaxis rábica, se utilizan vacunas producidas a partir de virus de laboratorio (virus fijos) en diversos tejidos animales; la más utilizada en Guatemala es la trivalente tipo cerebro de ratón lactante (CRL), elaborada en la Dirección General de Servicios de Salud (DGSS).

Los virus fijos inicialmente son virus silvestres (virus calle), que debido al continuo pasaje a través de varios tejidos cambian sus características. Este cambio, junto con la variabilidad propia de los virus, hace pensar en la necesidad de verificar si las vacunas mantienen su poder inmunogénico y si a pesar del tiempo protegen frente a diferentes biotipos de virus calle.

El presente estudio busca determinar si la vacuna antirrábica elaborada en Guatemala cumple con los requisitos de inmunogenicidad mencionados anteriormente. De no ser así, debe de analizarse la posibilidad de introducir modificaciones en la vacuna.

3. ANTECEDENTES

3.1. Historia:

La rabia es una enfermedad conocida desde la más remota antigüedad; griegos y romanos ya habían establecido su transmisión por la saliva de animales rabiosos. [5,6] De amplia distribución, las primeras epizootias datan de la edad media y el primer brote de rabia salvaje se produce en Francia en el año de 1271. Su existencia se detectó en nuestro continente a partir del siglo XVI; en 1768 alcanzó una alta frecuencia en los Estados Unidos de América; en 1803 aparece en Perú como epizootia extendida de norte a sur y en Argentina aparece en perros de la zona del Río de la Plata traída por animales pertenecientes a oficiales ingleses durante la invasión de Buenos Aires (1806). [2,7]

Zinke demuestra que la rabia se transmite por la saliva de animales enfermos (1804). Posteriormente Galtier logra transmitir el agente infeccioso y reproducirlo en conejos (1879). Pasteur, Roux y Chamberland, descubren que el material proveniente del sistema nervioso central (SNC) de animales enfermos es infeccioso y que los períodos de infección se acortan al inocular directamente en forma intracraneal (IC) animales sanos con suspensiones de medulas desecadas de conejo infectadas (1884). Pasteur aísla al agente etiológico de la enfermedad, denominándolo virus calle y mediante pasajes sucesivos en conejos obtiene una cepa de virus con características distintas a la original, denominándola virus fijo, siendo esta la que utilizó para salvarle la vida a un muchacho mordido por un perro rabioso (1885). [8]

Remlinger logra reproducir la enfermedad en conejos mediante el uso de material filtrado procedente de perros y conejos rabiosos, demostrando la característica filtrable del virus (1903). El mismo año, Negri demuestra la existencia de corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos en las células nerviosas de los animales rabiosos, los cuales son patognomónicos de la enfermedad y llevan su nombre. En 1936, Webster y Clow logran propagar el virus en tejidos. [1,2]

La relación entre la rabia y los murciélagos comienza a establecerse cuando Ghilmer Piso y Adrovandi (1658 y 1681 respectivamente), describen los problemas que provocan en los humanos los materiales procedentes de murciélagos. En 1911, Carini comprueba que la enfermedad llamada derrenque de los bovinos se debe al virus rabia que es transmitido por murciélagos hematófagos. Constantine descubre la infección aerógena y sugiere que es una forma por la cual el virus permanece en la población de murciélagos. Posteriormente se demuestra la transmisión por ingestión en animales carnívoros. [9,10]

3.2. Epidemiología y Distribución Geográfica:

El hospedero puede ser mamífero carnívoro, quiróptero y aves (experimentalmente), peces y reptiles no son susceptibles; el humano es huesped accidental. La Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta que mueren 35000 personas por infección rábica y 3.5 millones son vacunadas contra ella anualmente alrededor del mundo. En América Latina, 370000 son mordidas por animales rabiosos y 260000 reciben tratamiento anualmente. La rabia ataca generalmente a hombres y dentro del grupo de riesgo, se encuentran veterinarios, espeleólogos, laboratoristas, etc. [2,11-13]

Se considera que existen dos formas de rabia: la urbana y la selvática. La primera es transmitida por perros y gatos principalmente, mientras que la segunda lo es por animales silvestres. El 90 por ciento de los casos de transmisión de la rabia, es debido a mordeduras, el resto es por penetración viral en heridas abiertas y por transmisión aerógena (aereosoles de saliva y orina) o gástrica (canibalismo). Se ha aislado el virus en perros asintomáticos de Etiopía e India; también se postula que animales nocturnos y trepadores, son reservorios eventuales. Se han encontrado casos de transmisión entre humanos debido a transplantes de córnea, así como transplacentaria y por la leche en animales. Estos mecanismos podrían explicar la prevalencia de la rabia silvestre. [1,2,10,13]

La rabia es una enzoótia que se extiende por todos los países del mundo, excepto en Nueva Zelanda, Japón, Hawaii, Taiwan, Portugal, España, Noruega, Suecia, Holanda, Irlanda, Inglaterra y Bulgaria. Australia y la Antártida son regiones libres de rabia por naturaleza, ya que el agua parece ser una barrera natural; en climas cálidos son más frecuentes las mordeduras. [7] En América los siguientes países se encuentran casi libres de rabia: Aruba, Bahamas, Curaçao, Jamaica (entre otras islas caribeñas) y Uruguay. [3]

Asia es el continente más afectado; en Irán, India, Tailandia y Filipinas se encuentran frecuentemente casos de rabia humana, al igual que en Africa del Norte. Actualmente se esta reconsiderando la incidencia de rabia entre los murciélagos de Europa, la cual se consideraba casi inexistente. [9]

En América la enfermedad se divide en dos grandes zonas: la primera abarca Canadá y Estados Unidos, en la que predomina la rabia selvática;

perros y gatos representan un 8.9 por ciento del total de infectados, mientras que la fauna silvestre representa un 76.5 por ciento y la humana menos del 0.1 por ciento. En la segunda están el resto de países; perros y gatos representan el 80.6 por ciento del total de los casos, mientras que los silvestres un 1.5 por ciento y los humanos un 1.1 por ciento. Brasil y México representan dos terceras partes de la rabia en la región. [3,6,13-15]

Los perros representan el 94 por ciento de la rabia animal y son transmisores de más del 99 por ciento de los casos en humanos. Se estima que de 0 a 793 perros de cada 100000 están infectados. Estos datos son muy importantes si se considera que según OMS en los países en desarrollo hay una tasa de 1 mascota por cada 8 personas. [11,14]

En América del Sur, la principal forma de transmisión es por murciélagos hematófagos, dentro de los cuales se encuentran muchos portadores (alcanzan hasta un 1 por ciento entre los que no presentan signos anormales y un 9 por ciento entre los que sí los presentan). [2,3,10] OMS reporta más de 44 millones de dólares en pérdidas anuales por la muerte de ganado infectado con rabia transmitida por murciélagos (casi un millón de bovinos en América Latina). [2] En Guatemala, la rabia es una enfermedad de notificación obligatoria. {Anexo 13.1.1}

3.3. Agente Etiológico:

El virus de la rabia pertenece a la familia Rhabdoviridae, género Lyssavirus, junto a los virus de la estomatitis vesicular, la fiebre efímera del ganado vacuno (FEG), virus de invertebrados, etc. [16]

Al microscopio electrónico el virus se observa con un extremo plano y

otro cónico (forma de bala); el virus fijo tiene un tamaño promedio de 180 X 75 nm, pero varía según la cepa y las condiciones de replicación. Posee un borde de espículas superficiales de masa densa que terminan en forma de botón, organizadas en hileras o al azar y ricas en glucoproteína. Consta de un genoma compuesto de ARN monocatenario, monocistrónico, helicoidal, dextrógiro, complementario de la cadena de ARNm y rodeado de una capa proteica. El complejo se encuentra rodeado a su vez, de una envoltura lipoproteica compuesta por una capa bilipídica y proteínas de envoltura. Se han identificado cinco polipéptidos virales: las nucleoproteínas N y NS, la proteína de membrana M, la glicoproteína G (la cual se cree que determina el serotipo) y la polimerasa L. [8,15,17-21]

El virus sobrevive varias semanas a 4°C, tolera temperaturas bajo cero (en ausencia de dióxido de carbono), pudiendo ser estable por años (al igual que en glicerina al 50 %). Resiste la desecación, congelación y descongelación rápidas; la liofilización lo conserva pero la desecación lenta lo destruye. Es estable a pH de 7.4 a 9.0. La estreptomycin, la penicilina y las sulfamidas no le afectan, por lo que se usan para aislarlo a partir de productos contaminados. Se deteriora en suspensiones diluidas, muere por exposición a luz ultravioleta (LUV) o solar directa; es inactivado por la tripsina, solventes lipídicos, etanol, formol, yodo, cloruro de mercurio, fenol, ácidos, bases, amonio cuaternario y β -propiolactona (BPL). [8]

Posee dos antígenos principales: uno interno nucleoprotéico que es grupo específico y otro de superficie que es de composición glicoproteica (responsable de la mayoría de los anticuerpos neutralizantes). [8,20,22] En la glicoproteína se han encontrado hasta 12 antígenos en la cepa CVS-11

y 17 en la ERA; también se encontró un sitio antigénico común a ambas cepas. [17,21-25]

Puede cultivarse en medios tisulares a base de cerebro de embrión de conejo, ratón, rata o pollo, suspendidos en solución Tyrode, suero y plasma. También en cultivos de células renales de perro (BK), gato, cobayo, hamster (BHK), cerdo (ERA), líneas celulares humanas (WI-38, MCR-5) y pulmonares fetales de mono Rhesus (FRHL-2). [26]

3.3.1. Tipos de virus rabia:

Se conocen dos tipos: el virus calle y el virus fijo.

El virus calle, es aquel recientemente aislado a partir de animales infectados. Posee un período de incubación variable (de 5 a 360 días), tiene capacidad de invadir otros tejidos y produce numerosos corpúsculos de Negri. [1,2]

El virus fijo en cambio, comienza siendo un virus calle, que luego es aislado y conservado por medio de pasajes sucesivos en tejido encefálico de animales de laboratorio. Tiene un período de incubación menor (de 5 a 14 días), se multiplica más rápidamente y se encuentra en mayor cantidad en el cerebro (no invade las glándulas salivales). Casi no forma corpúsculos de Negri (siendo estos poco diferenciables) y se hace menos virulento para otros hospederos distintos al que le sirve para su fijación; es muy estable y su regresión al estado de virus calle, es difícil de conseguir. A pesar de las anteriores diferencias, las propiedades antigénicas de ambos son iguales. [2]

La especie virus rabia, abarca varios serotipos. El serotipo CVS

(challenge virus standard), incluye al virus rabia en si. El resto de serotipos {Anexo 13.1.2}, se denominan virus rabia relacionados, debido a que provocan infecciones de características muy parecidas a la rábica.

Dentro del serotipo CVS, se incluyen a todos los virus que se han logrado aislar en el laboratorio. La cepa CVS es derivada de la original de Pasteur; es remitida por los Institutos Nacionales de Salud de EUA con 31 pasajes en cerebros de ratones adultos, mientras que el virus semilla se prepara con otro pasaje adicional. La cepa 51-123 es de origen canino aislada en Chile; el virus es fijado por 121 pasajes en cerebros de ratones adultos mientras que el virus semilla tiene 2 pasajes adicionales. La cepa 91-122 es de origen humano aislada en Chile. El virus es fijado por 119 pasajes en cerebros de ratones adultos, mientras que el virus semilla tiene 2 pasajes adicionales. [27]

Para la producción del virus de trabajo, generalmente se realiza un pasaje adicional a partir del virus semilla, el cual es una modificación del virus recibido originalmente en el laboratorio. [2,27]

3.4. Fisiopatología:

El virus rabia es neurotrópico; penetra al organismo en el sitio de la mordedura y permanece allí durante algún tiempo (0 a 24 horas). Desde el contagio hasta el comienzo de los primeros síntomas en humanos, transcurren de 5 a 45 días, pero en ocasiones hasta 3 meses o un año. La variabilidad del período de incubación depende del área en la que se produjo la mordida, la cantidad de virus inoculado, la susceptibilidad de la especie atacada y la presencia del virus en las glándulas salivales del animal mordedor. [13,28]

El virus se multiplica en el musculo o tejido conjuntivo, de donde se propaga a las células nerviosas periféricas avanzando en forma centripeta por la vía axoplásmica. Avanza con el flujo del líquido intersticial, así como por los husos neuromusculares de los troncos nerviosos hasta alcanzar la raíz dorsal de los nervios periféricos; allí su tránsito es más rápido rumbo al SNC. La colchicina, estocalasina B y viniblastina son químicos que rompen los microtúbulos y cortan el transporte centripeto. [2,29] Fundamentalmente la infección es en las neuronas, pero también se detecta en astrocitos y células de glía; tiene escasa brotación a nivel de la membrana, las partículas que salen quedan atrapadas en la mielina o pasan a células vecinas. Inicialmente afecta al sistema límbico y luego se extiende a todo el cerebro avanzando por los espacios intracelulares. La mayor cantidad se concentra en el asta de Ammón, medula oblonga, cerebelo y en la región lumbar de la medula espinal. [2,28-30]

A partir de este momento comienza su tránsito centrifugo a través de los axones de neuronas contiguas o del líquido intersticial, avanzando a las extremidades inferiores, nervios faciales y glándulas salivales. También puede afectar otros órganos como: miocardio, pulmones, hígado, bazo, glándulas lagrimales, páncreas y células cromafines de las glándulas adrenales. En periodos terminales, se observa infección masiva en las terminaciones olfatorias y papilas gustativas. Por vía aerógena, se propaga inicialmente por la mucosa nasal; pasando al nervio olfativo y de allí al SNC. No se descarta contaminación fetal humana y no se ha identificado en el calostro. [2,24]

3.5. Síntomas y Signos.

3.5.1. En animales:

Los síntomas no son generalizados, ya que dependen del efecto letal que produzca el virus, el estado de salud del animal y la especie infectada.

Podemos dividir la sintomatología rábica en tres fases:

Fase prodromal: presenta depresión, cambios de conducta, alucinaciones, inmovilidad, anorexia, cese de lactancia, aumento de temperatura, confusión, trastornos digestivos, intoxicación o enfermedad infecciosa inicial.

Fase excitativa: caracterizada por la estimulación del SNC, con manifestaciones de agresividad, expresión facial de alerta, ansiedad, tendencia a atacar objetos que se mueven, depresión mental con síndrome de la presión cefálica, signos de irritación, convulsiones, nistagmo y temblor muscular en cara y extremidades. También se estimula el tracto genitourinario produciendo micciones frecuentes, erección del pene y deseo sexual.

Fase paralítica: presenta parálisis progresiva de las partes altas del tracto digestivo, con dificultad de deglutir y masticar (hidrofobia y sialorrea) y se produce el signo de la cola. El diagnóstico clínico, se ve facilitado por el bramido bovino y el ladrido del perro, ya que son extraños debido a la parálisis de las cuerdas vocales. La parálisis avanza rápidamente a todo el cuerpo, el animal adopta posición cubital, se debilita por deshidratación y muere por fallo cardíaco. [1,2].

La rabia también puede darse en dos manifestaciones distintas depen-

diendo del predominio de la fase excitativa o de la paralítica. La rabia furiosa se dá principalmente en perros, se caracteriza por el predominio del período de excitación presentando cambios de conducta y apetito, complejo de ataque agresivo, sialorrea, incoordinación, cambios en la voz, hidrofobia, parálisis general y muerte entre 3 y 4 días. La rabia paralítica o muda se caracteriza por un corto período de excitación y uno largo de parálisis con hidrofobia, pérdida del estado general, ataxia, fotofobia, incoordinación, y muerte; se ve en animales infectados con virus fijo y a veces en infecciones por virus calle. [1,2]

3.5.2. En Humanos:

Es uno de los agentes productores de encefalitis más comunes junto con Herpes simplex, togavirus y enterovirus. El período de incubación es de 2 a 16 semanas (la mayoría oscila entre 2 y 3), pero se acorta en niños. Se conocen 4 fases: prodrómica, sensorial, de excitación y paralítica o depresiva.

La prodrómica dura de 2 a 4 días, presenta dolor y hormigueo en el sitio de inoculación, piel sensible a cambios de temperatura y cualquier malestar general (Anorexia, cefalea, náuseas, vómitos, garganta adolorida y fiebre).

En la fase sensorial se presenta lagrimeo, salivación, sudoración, angustia, cefalea y pequeñas elevaciones de temperatura.

La fase de excitación puede ser predominante o corta, presenta hiperestecia y extrema sensibilidad a luz y sonido, dilatación de pupilas, sialorrea y laringoespasmos incluso a la simple vista de líquidos, por lo

que son rechazados violentamente y se abstiene de deglutir la propia saliva (hidrofobia).

La fase paralítica dura de 2 a 6 días aunque a veces el lapso es mayor; se presentan espasmos de los músculos respiratorios y convulsiones generalizadas que terminan con la muerte (por insuficiencia cardíaca y respiratoria o parálisis generalizada).[1,2]

3.6. Diagnóstico:

Luego del ataque el animal debe de llevarse a la estación de cuarentena más cercana, donde es observado durante 14 días. Si al final el animal no presenta síntomas, es considerado negativo; si muere durante la cuarentena o ya presentaba síntomas a su inicio, es considerado muy sospechoso y debe de sacrificarse. La cabeza se remite al laboratorio en un recipiente cerrado, con hielo machacado. Secciones del SNC pueden llevarse con solución amortiguadora de fosfatos o glicerina al 50 por ciento en suero fisiológico para evitar la refrigeración estricta (pero no es recomendable); los animales pequeños son fijados en formalina al 10 por ciento. Líquido cefalorraquídeo, saliva o hisopos de garganta, se transportan en hielo. Para el análisis de laboratorio se utilizan muestras de cerebro fijado, biopsia cerebral, raspado de córnea, saliva o glándulas salivales submaxilares, así como porciones de material cerebral fresco para cultivos. [1,2] Tradicionalmente el diagnóstico de la rabia se hace por medio de tres distintas pruebas:

Diagnóstico histológico: se buscan los corpúsculos de Negri (patognómicos, pero que no siempre se encuentran), los que se observan claramente en cerebros morfológicamente regulares. Son corpúsculos de inclusión

intracitoplasmáticos bien delimitados que se encuentran generalmente entre el núcleo y el ángulo de la neurona, esféricos, ovales, piriformes o triangulares de ángulos redondos. Son acidófilos, homogéneos (con gránulos internos basófilos dispuestos en forma de roseta), se hacen más evidentes a medida que progresa la enfermedad y se encuentran en el asta de Ammón, tálamo, glándulas salivales submaxilares y células de Purkinje (cerebelo de rumiantes). Pueden confundirse con otros corpúsculos de inclusión, pero un experto puede obtener hasta un 90 por ciento de seguridad diagnóstica. Se tifen con colorantes de Mann, Giemsa, Hematoxilina-eosina, etc., pero la tinción de elección es la de Sellers. Para esta se hacen cortes transversales encefálicos en papel secante o baja lenguas de madera, con la superficie de corte hacia arriba y se presiona contra el portaobjetos. Se sumerge el material secado al aire o fijado en acetona al 20 por ciento en el colorante de 1 a 5 segundos; se enjuaga al chorro y se seca. [31,32]

Immunofluorescencia directa (IFD): se detectan los antígenos virales (viables o no), por medio de anticuerpos unidos a una sustancia fluorescente, pudiendo examinarse materiales recientes, congelados o glicerizados (impresiones de cerebro, córnea, biopsia de piel y saliva); se ven verdes o amarillos al microscopio de fluorescencia. Tiene una sensibilidad del 99 por ciento y una especificidad del 99.8 por ciento. El cerebro se toma con un bajalenguas de madera y se hacen 2 impresiones por portaobjetos (2 portaobjetos mínimo). Se fijan en acetona al 20 por ciento y se mantiene a -10°C , hasta teñirse o se tifen de inmediato. [33,34]

Prueba de inoculación en ratón (biológica): Se usan ratones blancos de tipo albino suizo, si no se consiguen de estos pueden usarse cobayos, conejos u otros tipos de ratones. Deben de ser lactantes de más de 3 días de

nacidos sin importar el sexo y de buena salud. El extracto de trabajo es a base de tejido encefálico o glándulas salivales submaxilares, los cuales se trituran en mortero con solución amortiguadora de fosfatos, salina, leche descremada o albúmina de suero bovino. Se centrifuga 5 min a 2000 rpm, se hace la suspensión al 20 por ciento ó al 10 por ciento si se va a utilizar de inmediato y se inoculan los ratones con 0.03 ml (mayores de 4 días) o 0.01 ml (menores de 4 días). Como solución desinfectante se usa bicloruro de mercurio o agua y jabón. Posteriormente se dejan 15 días para que se presenten los síntomas que son: temblor al sostenerlos por la cola, dorso encurvado, pelo erizado, incoordinación, parálisis, postración y muerte (entre 7 y 9 días). Los síntomas no son diagnósticos, por lo que el cerebro debe de ser analizado. [4,31,35,36]

Los mejores resultados se obtienen con IFD y prueba biológica, pero también pueden utilizarse otras como: inmunofluorescencia indirecta, inhibición focal de fluorescencia, fijación de complemento, índice de neutralización, hemaglutinación pasiva, microscopía electrónica, cultivo tisular, difusión en gel, radioinmunoanálisis, seroneutralización, contraelectroforesis, histopatología y peroxidasa. [2,32,36-38] Debe de hacerse diagnóstico diferencial con otras encefalitis, enfermedades virales de animales, enfermedad del suero y derrames articulares conseudoparálisis. [1,2,6]

3.7. Inmunización y profilaxis:

La vacunana es recomendada en casos de riesgo de contaminación o exposición directa; antes de administrarse el tratamiento, debe de considerar-

se la especie del animal mordedor, la circunstancia de la mordida, el tipo de exposición, el estado de vacunación y la presencia de rabia en la región. {anexo 13.1.3}

3.7.1. Respuesta inmune:

Es poco conocida; debido a la forma en que el virus avanza, se supone que produce una respuesta tardía e ineficaz.

Los anticuerpos neutralizantes, aunque no son índice de inmunidad, si protegen en títulos altos; aparecen a los 4 días de la inoculación y ejercen su actividad a nivel tisular. [8,18,24]

El interferón puede tener bastante significancia, pero aun no se ha comprobado. Aparece a las 10 horas de la inoculación y retrasa el avance viral. [8]

El virus tiene efecto inmunosupresor de los linfocitos T citotóxicos, para evitarlo se recomienda vacunar antes de las 24 horas después de la exposición. Las células Killer podrían romper la célula afectada y liberar los viriones, los cuales serían neutralizados por los anticuerpos, pero su efecto no se ha comprobado. La célula T reconoce los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, así como al antígeno viral expresado en la superficie celular. [23,25,36,39,40]

El éxito de la vacunación post-exposición al virus, se basa en el período de latencia entre la inoculación y la invasión neural. Las vacunas administradas parenteralmente estimulan la producción de anticuerpos efectivos para impedir la multiplicación viral, pero dan limitada protección y pueden inducir hipersensibilidad de tipo I o III; las vacunas de virus

atenuados actúan como la infección natural, pero con riesgo de reversión a mayor virulencia. La inmunidad a menudo es breve y necesita de refuerzos. [1,2,12]

3.7.2. Tipos de vacunas:

3.7.2.1. De acuerdo a la naturaleza del virus en el producto final:

Las inactivadas son para uso humano y animal y son las que ofrecen mayores garantías, siempre y cuando se asegure que no hay presencia de virus activos.

Las atenuadas o de virus modificado, son para uso animal y requieren de concentraciones virales viables; se elaboran en embrión de pollo con reducido o alto número de pasajes (LEP = low egg passage y HEP = high egg passage) y en riñón de cerdo. Se ha demostrado que estas vacunas confieren con una sola dosis inmunidad hasta por tres años, mientras que la CRL protege a todos los perros durante un año y al 80 por ciento durante 3. La LEP es menos atenuada y debe administrarse solamente a perros adultos; la HEP es útil para cachorros, gatos y bovinos. [1,2]

3.2.2.2. Según el tipo de tejido:

3.7.2.2.1. Vacunas de tejido encefálico.

Tipo Simple: emulsión al 10 por ciento de cerebro de conejo infectado con virus rabia inactivado con fenol; produce encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), en uno de cada 400 casos (de los que mueren el 20 % y el 30 % sufren de secuelas permanentes), por lo que es totalmente inaceptable. [41]

Tipo Fermi: suspensión acuosa al 5 por ciento de cerebro de cordero o cabra inoculado con virus rabia inactivado con fenol, en una concentración inicial del 1 por ciento; su uso ha sido suspendido debido a evidencias de accidentes post-vacunales. [2]

Encéfalo de rata lactante: ratas de entre 4 y 8 días de nacidas son infectadas con cepa Pasteur de virus rabia, sacrificadas y su material encefálico es inactivado con fenol y diluido hasta obtener una suspensión al 10 por ciento. [2]

Cerebro de ratón lactante (CRL): las substancias cerebrales causantes de EAE, no se encuentran presentes en los elementos no mielinizados de embriones o neonatos, lo cual unido a la rápida multiplicación viral en tejidos inmaduros, disminuye el riesgo de accidentes y produce títulos altos de virus. Para minimizar la presencia de mielina, se centrifuga el material a 20000 rpm durante 10 min. Conocida como vacuna de Fuenzalida-Palacios, es un biológico seguro, estable, fácil de elaborar y de bajo costo. Es una suspensión al 10 por ciento de encéfalo inoculado con virus inactivado con LUV y con fenol (1:1000) y timerosal (1:10000), como preservantes. [42]

Encéfalo de conejo lactante: es una suspensión acuosa al 5 por ciento de material encefálico de conejo inoculado con virus rabia e inactivado con LUV. [2]

Vacuna Pasteur: los conejos inoculados subduralmente con virus rabia son sacrificados, sus medulas son cortadas en 2 o 3 trozos y colocadas en hidróxido de potasio para que se des sequen (a 23°C en estufa). También se ha suspendido su uso. [1,2]

3.7.2.2.2. Vacunas de Embriones de Aves:

Embrión de pollo: las cepas Flury y Kelev son adaptadas y modificadas en embriones de pollo para inmunizar perros. [1,2]

Embrión de pato: el virus es inactivado con BPL y se estabiliza con clorohidrato de cisteína, gelatina, lactosa y fosfato potásico alcalino. Es menos peligrosa, pero tarda en producir anticuerpos. [26,43]

3.7.2.2.3. Vacunas de cultivos tisulares:

El cultivo tisular de virus, permite la elaboración de grandes cantidades de vacuna sin depender de un gran número de animales, trabaja con antígenos más puros, obtiene productos más inocuos, reduce el número de dosis e incentiva la producción de interferon, pero son muy caras debido a la tecnología necesaria para su realización. Actualmente se busca elaborarlas en líneas primarias para disminuir su costo.

Vacuna de células diploides humanas (HDCV): es inactivada con BPL; es altamente inmunógena pero de costo elevado. En 1986, se aprobó la vacuna de uso intradérmico (ID), la que produce títulos altos de anticuerpos y cuyo costo es menor. [43-45]

Vacuna de células diploides de mono Rhesus: permite el crecimiento viral en líneas celulares no humanas al tiempo que produce una buena reacción de anticuerpos. [26,46,47]

3.7.2.3. Otros tipos de vacunas:

Se ha elaborado una vacuna para zorros, mapaches y zorrillos, a partir de la glicoproteína viral de un virus rábico recombinante. Produce altos niveles de anticuerpos e inmunidad prolongada con la ventaja de que puede ser inoculada por vía oral, ID o Subcutánea (SC). [6,48]

El descubrimiento de un segmento antigénico linear, en la glicoproteína de las cepas CVS-11 y ERA, ha dado esperanzas para la realización de una vacuna sintética contra la rabia. Los primeros experimentos al respecto, se realizaron con el péptido 65-24-31D (sintetizado en Escherichia coli), el cual estimuló experimentalmente a linfocitos B y T. [18,19,22, 23,49,50]

En Guatemala, la vacuna usada para la inmunoprofilaxis antirrábica es elaborada en el Laboratorio Biológico de la DGSS. Es una vacuna trivalente de tipo CRL, inactivada con LUV y con fenol y timerosal como preservantes; se produce para inocular humanos y perros. [51]

La rabia de laboratorio ha sido controversial desde la época de Pasteur; el virus vacunal ha sido señalado como causante de reacciones postvacunales. El factor encefalolitogénico, es una proteína básica de la mielina. [41] Se han producido reacciones postvacunales en personas inoculadas con vacuna de embrión de pato, que habían sido inoculadas previamente con vacuna de embrión de pollo y por la HDVC (consistentes en cefalea y dolor en el lugar de la inoculación). [26,52] La vacuna tipo CRL ha presentado casos de complicaciones postvacunales (EAE), ya sea debido a la mielina, contaminación por microorganismos patógenos o producción de metabolitos que funcionan como adyuvantes. La mayoría de accidentes se producen a partir de los 10 días del tratamiento y dependen en gran medida de la dosis. [41,53]

3.7.3. Tratamientos:

Se eligen de acuerdo a las necesidades de cada caso, la inoculación se hace en lugares de abundante concentración grasa.

Los esquemas reducidos de vacunación con vacuna tipo CRL, han bajado el costo de los tratamientos y aumentado el número de personas que los terminan; se utilizan en casos de arañazos, mordeduras leves, abrasiones ligeras o inmunización previa a la exposición. El esquema clásico se utiliza en casos de mordeduras graves o múltiples, saliva en las mucosas y animales no disponibles para su diagnóstico. [51,54]

3.7.3.1. Tratamiento pre-exposición:

Vacuna CRL (esquema reducido): una dosis SC de 2 ml durante tres días consecutivos; refuerzos a los 10, 20 y 90 días, después de la última dosis diaria. Revacunación anual con una dosis si el riesgo persiste. [51,54]

Vacuna de embrión de pato: tres dosis SC de 1 ml, con intervalos de 1 semana; refuerzo un mes después de la última inoculación diaria y revacunación anual si el riesgo persiste. [26]

HDVC: tres dosis intramusculares (IM), de 1 ml o 0,1 ml ID los días 0, 7, 21 o 28. Revacunación con una dosis de 1 ml IM o de 0.1 ml ID cada dos años si el riesgo persiste. [43,44,45]

3.7.3.2. Tratamiento post-exposición:

Tratamiento local de la herida: lavar la herida reiteradamente y lo antes posible bajo un chorro de agua fuerte, limpiando con agua y jabón, compuestos de amonio cuaternario al 1 por ciento o etanol de entre 40 y 70 por ciento. Debe de cepillarse y limpiarse la herida bajo supervisión médica; no suturar. La infiltración de la herida con suero antirrábico, uso de suero antitetánico y antibacterianos, se hará cuando se considere necesario. [10]

El suero hiperinmunizante se recomienda para toda mordedura en la que no pueda excluirse la rabia, administrándose la mitad SC y el resto infiltrado en la herida. Es neutralizante local del virus y prolonga su tiempo de incubación, permitiendo la formación de anticuerpos. El suero antirrábico equino (SAE), provoca enfermedad del suero hasta en el 46 por ciento de los receptores, pero la inmunoglobulina antirrábica humana (IAH), se encuentra en cantidades limitadas y es muy cara. Actualmente se investigan las posibilidades de la inmunoglobulina antirrábica equina, la cual es más segura que la SAE y más accesible que la IAH. El antisuero inactiva al virus calle y previene la encefalitis, pero no debe de aplicarse después de 72 horas. [55] La administración combinada de suero y vacuna, es el mejor método profiláctico. {anexo 13.1.4}

Vacuna CRL (esquema reducido): una dosis diaria de 2 ml SC durante 7 días; refuerzos a los 10, 20 y 90 días a partir de la última inoculación diaria. [51,54]

Vacuna CRL (esquema clásico): una dosis diaria de 2 ml SC durante 14 días. Refuerzos los días 10 y 20 a partir de la última inoculación diaria. [42,51,54]

Embrión de pato: una dosis diaria de 1 ml SC durante 14 días y refuerzos a los 10, 20 y 90 días a partir de la última inoculación diaria. [26].

HDCV: una dosis de 1 ml IM los días 0, 3, 7, 14 y 28. Un refuerzo el día 90. [43,44,45]

3.7.3.3. Personas vacunadas anteriormente:

Vacuna CRL: 1 dosis de 2 ml SC, con refuerzos a los 4, 10 y 20 días. [51,54]

Embrión de Pato: 1 a 4 dosis según el esquema de vacunación anterior.
[26]

HDCV: Vacunados hace menos de 1 año, refuerzo día 0. Más de un año, según gravedad, días 0, 3 y 7. [43,44,45]

3.7.4. Profilaxis:

Para la rabia urbana, deben de controlarse los animales domésticos por medio de programas de inmunización masiva de perros y gatos con dueño y la eliminación de perros callejeros. Los perros deberán de embosarse durante los brotes y los animales importados, serán sometidos a una cuarentena de 6 meses antes de ingresar al país (en especial si vienen de áreas endémicas); debe de exigirse el certificado de vacunas.

Para controlar la rabia silvestre, debe de vacunarse al ganado con vacunas de las cepas ERA ó V-319/Acatlán, a los 6 meses de edad (los anticuerpos maternos inhiben al virus); la leche de los bovinos sospechosos debe de hervirse antes de tomarse. [56-58] Actualmente se busca disminuir específicamente las poblaciones de murciélagos, con tratamientos tópicos de difenadiona, warfarina o clorofacinona en animales capturados, los cuales contaminan a otros por contacto directo, al llegar a su refugio. [57] Si el animal mordedor es zorra, zorrillo, coyote, mapache o murciélago, debe de darse tratamiento por considerarse como positivos. [8,9]

4. JUSTIFICACION

El humano es contaminado con el virus de la rabia tanto por animales domésticos como silvestres, estos animales son portadores de diferentes biotipos de virus rabia. La vacuna antirrábica es producto de sucesivos pasajes de virus en animales de laboratorio. El virus vacunal es inicialmente un virus calle, pero luego de esa serie de pasajes adquiere características que lo hacen diferente se transforma en un virus fijo. Lo anterior, aunado a la variabilidad propia de los virus, hace pensar que eventualmente los virus que conforman las vacunas pueden sufrir cambios que causen la falla en los esquemas de inmunización. Ya se han reportado casos de animales vacunados, que a pesar de eso, enfermaron de rabia al tener contacto con el virus calle. [58-61]

Debido a esto es necesario determinar si la vacuna trivalente tipo CRL elaborada en la DGSS es un buen inmunógeno al enfrentarla contra los virus fijos a partir de los cuales esta hecha, así como contra el virus fijo del murciélago. Así mismo, se busca determinar si dicha vacuna protege frente a diferentes biotipos de virus calle del país o si se hace conveniente hacerle alguna modificación, debido a un posible cambio sufrido por cualquiera de los biotipos del virus rabia analizados.

5. OBJETIVOS

- 5.1. Determinar si la vacuna antirrábica trivalente tipo CRL de uso humano elaborada en el Laboratorio Biológico de la DGSS es capaz de conferir inmunidad frente a los virus fijos a partir de los cuales esta hecha.
- 5.2. Determinar si la vacuna, protege frente al virus fijo del murciélago (DR).
- 5.3. Determinar si dicha vacuna es capaz de brindar protección frente a diferentes biotipos de virus calle del país.
- 5.4. Determinar en base a los resultados si es conveniente hacer alguna modificación en la vacuna para que pueda inmunizar correctamente sin importar el tipo de virus rabia que se utilice como desafío.

6. HIPOTESIS

La vacuna antirrábica trivalente de uso humano tipo CRL elaborada en la DGSS es un buen inmunógeno al ser enfrentada contra los virus fijos a partir de los cuales esta hecha, así como frente al virus fijo del murciélago.

La vacuna antirrábica trivalente de uso humano tipo CRL elaborada en la DGSS es capaz de brindar protección frente a cualquier biotipo de virus calle del país.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de Trabajo:

Vacuna antirrábica trivalente tipo CRL de uso humano, lotes 91-4 y 92-1, elaborada en la DGSS.

Cepas de virus fijos: CVS, 51-123, 91-122 y DR.

Cepas de virus calle, obtenidas a partir de 50 cerebros positivos a virus rabia, de diferentes especies animales.

7.2. Procedimientos:

Los ratones blancos de entre 3 y 4 semanas de vida, son inoculados con 0.5 ml de vacuna antirrábica trivalente tipo CRL de uso humano, por vía Intraperitoneal (IP), el día 0 y revacunados el día 8 en las mismas condiciones.

Para la determinación de la inmunogenicidad de la vacuna frente a los virus a partir de los cuales esta hecha se inocularan por vía IC a 10 ratones por cada virus fijo, con 0.03 ml de extracto viral (dosis de confrontación ratón), con una concentración de 31.68 dosis letales medias (DL 50), a los 15 días de haberse comenzado el esquema de vacunación. Se dejan en observación durante 14 días.

Para determinar el comportamiento de la vacuna frente a diferentes biotipos de virus calle del país, el día 15 se inoculan IC 0.03 ml de extracto viral de cerebro infectado con virus rabia, a razón de 10 ratones por extracto y se dejan en observación durante 14 días.

En ambos casos, se lleva el control de la sobrevivencia de los ratones en fichas especiales. Los ratones que mueran a las 48 horas de cualquiera de las inoculaciones, son considerados como muertos por traumatismo y no se toman en cuenta para el estudio. Los que mueran posteriormente a dicho período y presenten síntomas característicos, son considerados como muertos por infección rábica.

Los resultados serán confirmados por IFD y tinción de Sellers.

Los virus fijos son los que conforman la vacuna antirrábica trivalente de uso humano (CVS, 51-123 y 91-122), los cuales ya se tienen en el laboratorio. También se inoculará el virus fijo de murciélago (DR), todos en la misma cantidad de ratones que los virus calle.

Los extractos virales, se obtienen de la siguiente forma: se recolectan 50 cerebros confirmados como positivos para el virus rabia, de diferentes especies animales y se congelan hasta su uso. Se maceran individualmente con solución amortiguadora de fosfatos en un mortero para obtener una dilución aproximada de 1:10. Se centrifugan a 2000 rpm o se dejan sedimentar y se diluyen hasta obtener la solución de trabajo (1:100). [4,31-36]

Se llevaran varios controles. Un control de la inocuidad de la vacuna, uno de la posibilidad de la muerte por traumatismo luego de la inoculación IC viral y uno de la inoculación IP, todos en 10 ratones de la misma edad y en las mismas condiciones que los utilizados en la prueba, pero sin vacunar.

Así mismo, se llevaran controles positivos y negativos. El control positivo de la sobrevivencia en la prueba, se hará con 10 ratones vacunados inoculados IC con extracto cerebral de ratones adultos, no infectado con virus rabia. Los controles negativos se llevaran para cada una de las pruebas que se realicen, en 10 ratones no vacunados a los cuales se les inoculará IC el extracto viral respectivo.

7.3. Diseño de Investigación:

El porcentaje de sobrevivencia de los ratones a la inoculación IC de los virus fijos, es considerado como equivalente al porcentaje de protección conferido por la vacuna (inmunogenicidad). Se excluyen del cálculo a todos aquellos ratones que no mueran por infección rábica. Para que una vacuna sea óptima inmunológicamente, debe de proteger al 100 por ciento de los animales de experimentación.

Cada uno de los 50 extractos cerebrales positivos a virus rabia, de distintas especies animales, es considerado como un diferente biotipo de virus calle e inoculado en ratones previamente vacunados. El porcentaje de sobrevivencia de los ratones, representa la protección vacunal frente a diferentes biotipos de virus calle del país.

Los controles buscan asegurar que la prueba no es afectada por influencias no consideradas; el control negativo, asegura que los extractos virales son capaces de causar la muerte de los animales de experimentación y el control positivo que los animales no mueren a consecuencia del proceso.

7.3.1. Análisis de Resultados:

Se tomarán como resultados positivos (en ambas determinaciones), los ratones que sobrevivan al desafío viral (inoculación IC), tanto de extractos cerebrales positivos a virus calle, como de los virus fijos. Aquellos ratones que mueran debido a dicho desafío, serán considerados como resultados negativos.

8. RESULTADOS

La vacuna antirrábica trivalente tipo CRL de uso humano, probó ser un buen inmunógeno al proteger al total de los ratones sometidos al desafío de los virus fijos (CVS, 50-123, 91-122 y DR), lo que equivale a un 100 por ciento de sobrevivencia. {anexo 13.1.5}

Para comprobar la protección conferida por la vacuna en los animales de experimentación, frente a diferentes biotipos de virus calle del país, se utilizaron 52 extractos cerebrales positivos a virus rabia de diferentes especies animales (caninos, bovinos, felinos y humanos). No se encontró ningún biotipo de virus calle capaz de vencer la inmunidad inducida por la vacuna en los ratones, lo cual equivale a un 100 por ciento de sobrevivencia. {anexo 13.1.6}

Los controles que se llevaron a la par de las pruebas, fueron sometidos a las mismas condiciones de acinamiento que los ratones empleados en las pruebas, alimentados de la misma manera y durante el mismo período de tiempo. {anexo 13.1.7}

Un control positivo (de la sobrevivencia de los ratones), en el cual los 10 ratones vacunados e inoculados IC con material encefálico de ratones adultos sin infección rábica, resistieron la prueba (100 % de sobrevivencia). {anexo 13.1.7}

Un control negativo por cada prueba inoculada (52 de virus calle y 4 de virus fijos); se obtuvo entre estos ratones no vacunados, un 0 por ciento de sobrevivencia, ya que todos murieron entre 7 y 12 días. {anexo 13.1.7}

Se necesitó usar dos lotes distintos de vacuna, debido a sus fechas de vencimiento; no se observaron cambios en las pruebas. A pesar de que cada lote tenía sus controles de potencia e inocuidad comprobada {anexo 13.1.8} se realizó un control de la inocuidad de la vacuna (que no produjese accidentes post-vacunales en los animales de experimentación). Se sometieron 10 ratones a la inoculación IP de vacuna antirrábica trivalente tipo CRL de uso humano lotes 91-4 y 92-1, obteniéndose un 100 por ciento de sobrevivencia. {anexo 13.1.7}

Para controlar la muerte de los animales de experimentación, debido a la punción traumática (tanto IP como IC), se inocularon 10 ratones IP y 10 ratones IC con volúmenes de solución salina estéril, equivalentes a los utilizados en las pruebas (0.5 ml y 0.03 ml respectivamente). También en este caso, se obtuvo un 100 por ciento de sobrevivencia. {anexo 13.1.7} A pesar de esto, durante el proceso se encontraron varios casos de ratones muertos a consecuencia de punciones traumáticas. {anexos 13.2.1 y 13.2.2}

Otra causa de muerte encontrada en la prueba, fué el canibalismo, el cual se dió en mayor porcentaje que en el caso del traumatismo. {anexo 13.2.2}

Durante las pruebas, se encontraron algunos casos de ratones muertos por infección rábica (comprobada por tinción de Selles e IFD). Al suceder esto, se procedió a repetir la prueba entera en la cual había muerto el ratón, obteniéndose al final el 100 por ciento de sobrevivencia.

7. DISCUSION DE RESULTADOS

La sobrevivencia de todos los ratones vacunados enfrentados al desafio viral, tanto de virus fijos como de virus calle, demuestra la capacidad que posee la vacuna para producir una respuesta inmunológica adecuada en ellos. El uso de dos lotes distintos de vacuna, no tubo significado alguno sobre los resultados.

Los diferentes tipos de controles que se llevaron a cabo durante la realización de las pruebas, demostraron que los factores regulados por ellos no fueron capaces de producir cambios en los resultados (falsos positivos o negativos); encontrándose un 100 por ciento de sobrevivencia y un 100 por ciento de mortalidad, dependiendo del control.

No se encontraron muertes debidas al proceso de la prueba en si o a accidentes post-vacunales; tampoco se encontraron muertes debidas al traumatismo post-inoculación IP o IC en los controles, aunque si se encontraron algunas durante las pruebas.

El hecho de que todos los ratones de los controles negativos murieran, implica que todos los virus analizados eran capaces de producir la infección rábica en los animales de experimentación.

La muerte confirmada de algunos animales de experimentación por infección rábica, se debió probablemente a factores mecánicos como la inoculación excesiva de las DL 50. Así mismo no hay que olvidar que los ratones de entre 3 y 4 semanas de vida, se encuentran en una etapa crítica de su desarrollo, por lo que factores como la mala nutrición, los problemas del crecimiento e inmunológicos propios de cada individuo, pueden hacerlos más

susceptibles a la infección rábica. Dichos problemas pueden ser a su vez, consecuencia de una mala formulación del concentrado con el que se alimenta a los ratones, lo cual también puede producir canibalismo, ya que los ratones buscan suplementar los nutrientes que les hacen falta. El canibalismo y las mutilaciones son frecuentes en los casos de acinamiento exclusivo de machos, durante períodos prolongados en la misma jaula.

Las muertes debidas al canibalismo y al traumatismo, son mínimas en comparación con la cantidad de ratones inoculados, además en ninguno de los casos afectó significativamente a la cantidad de ratones sometidos a las pruebas.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. La vacuna antirrábica trivalente tipo CRL de uso humano, elaborada en Guatemala, si es capaz de producir una respuesta inmune en los animales de experimentación enfrentados al desafío de los virus fijos CVS, 51-123, 91-122 y DR.
- 10.2. La vacuna también es capaz de proteger a los individuos frente al desafío de diferentes biotipos de virus calle del país.
- 10.3. No se encontró ningún biotipo de virus calle que pudiese, eventualmente, ser incluido en la formulación de la vacuna.
- 10.4. La muerte de algunos animales de experimentación durante la prueba, por infección rábica, se debió a las características propias de cada individuo (nutricionales, del crecimiento o inmunológicas) o a factores mecánicos (exceso de DL 50 inoculadas).
- 10.5. En los casos en los que se presentaron dichas muertes, se procedió a repetir la prueba, obteniéndose entonces el resultado esperado (100 % de sobrevivencia).
- 10.6. La muerte de cualquier ratón durante el proceso por traumatismo o canibalismo no afectaron directamente al resultado de los análisis.
- 10.7. Los controles que se llevaron a cabo durante las pruebas, demostraron que dichos factores no influyeron en el resultado de los análisis.

11. RECOMENDACIONES

Seguir utilizando la vacuna antirrábica trivalente tipo CRL elaborada en Guatemala, tanto para uso humano como animal, en las diferentes campañas de vacunación animal y en la profilaxis humana.

De considerarse necesario, puede hacerse la continuación del presente estudio, investigando los diferentes biotipos de virus calle, dividiendo al país en áreas y abarcando cantidades estadísticamente significativas de un mayor número de especies de animales susceptibles, aprovechando al mismo tiempo para inferir el estado de la rabia urbana y silvestre.

Para realizar cualquier estudio relacionado con la vacunación antirrábica, es necesario tomar en cuenta que existen varios factores que pueden contribuir al fallo de los esquemas de vacunación, como lo son la forma en que se manipula la vacuna, el que los pacientes terminen los tratamientos, las características propias de la especie estudiada y de los individuos en sí (inmunológicas, nutricionales y del crecimiento).

No deben de acinarse gran cantidad de machos en la misma jaula durante mucho tiempo, debido a que esto aumenta los casos de canibalismo y mutilaciones.

Debe de controlarse periódicamente la calidad del concentrado con el que se alimenta a los ratones, para que satisfaga sus requerimientos nutricionales.

12. REFERENCIAS

1. Comité de Expertos de la OMS sobre Rabia. Séptimo reporte. Francia: OMS/OPS, Doc. Tec. # 704, 1984. 116p.
2. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Ginebra: OPS/OMS, Doc. Tec. 503, 1986. XXIV+989p. (p.502-526).
3. Acha PN, Arambaulo PV III. Rabies in the tropics; history and current status. p.343-359 (in: Kwert E, ed. Rabies in the tropics. Berlin: Spring-Verlag, 1985.).
4. Jackson AC. Biological basis of rabies virus neurovirulence in mice; comparative pathogenesis study using the immunoperoxidase technique. J. Virology. 1991;65(1):537-540.
5. Souza MM. La rabia. ICN Virología; órgano de divulgación científica. 1980;7:1-2.
6. Debbie JG. La rabia: un viejo enemigo que podemos derrotar. Rev. Internac. Desa. Sanit., OMS. 1988;9(4):550-556.
7. Baer BM. El papel de los animales salvajes en la rabia urbana. p.117-120. (En: Salud animal en las Américas, 1983; documento de la III reunión interamericana de la salud animal, a nivel ministerial. Washington D.C.: OPS/OMS, Doc. Tec. 476, 1984. IX+158p.).
8. Congreso Argentino de Virología. Adelantos en la inmunoprofilaxis de la rabia en el humano. Memorias. 1983; 8p.
9. Grauballe PC, et al. Bat rabies in Denmark. Lancet. 1987;1(8529): 379-380.

10. Acha FN. Epidemiología de la rabia bovina paralítica transmitida por Quirópteros. Bol. Of. Sanit. Panam. 1968;Mayo:411-424.
11. Bogel K, Meslin FX. Datos epidemiológicos y económicos de la rabia. Bol. OMS. 1990;68(3):281-292.
12. Porras C, et al. Recovery from rabies in Man. Ann. Int. Med. 1976;85(1):44-48.
13. Szyres L, Arrossi JC, Marchevsky N. Rabia urbana: el problema de las lesiones por mordedura de perro. Bol. OSP. 1982;92(4):310-327.
14. Schneider LG, Bogel K. Situación de la rabia humana y la canina y su estado de control en el mundo. p.99-116. (En: Salud animal en las Américas, 1983; documento de la III reunión interamericana de la salud animal, a nivel ministerial. Washington D.C.: OPS/OMS, Doc. Tec. 476, 1984. IX+158p.).
15. Fernandez MV, Moro M. El cometido de la OPS en la eliminación de la rabia urbana en las Américas para el año 1990. p.143-149. (En: Salud animal en las Américas, 1983; documento de la III reunión interamericana de la salud animal, a nivel ministerial. Washington D.C.: OPS/OMS, Doc. Tec. 476, 1984. IX+158p.).
16. Bourhy H, et al. Complete cloning and molecular organization of rabies related virus, Mokola virus. J. Gen. Virol. 1989;70:2063-2074.
17. Benmansour A, et al. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. J. Virol. 1991;65(8):4198-4203.

18. Lafon M, Lafage M. Antiviral activity of monoclonal antibodies specific for the internal protein N and NS of Rabies Virus. *J. Gen. Virol.* 1987;68:3113-3123.
19. Lafon M, et al. Human monoclonal antibodies specific for the Rabies Virus glycoprotein and N protein. *J. Gen. Virol.* 1990; 71:1689-1696.
20. Lodmell DL, et al. Raccoon profilaxis virus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *J. Virol.* 1991;65(6):3400-3405.
21. Jackson A, Wunner WH. Detection of rabies virus genomic ARN and ARNm in mouse, and human brain by using in situ hybridization. *J. Virol.* 1991;65(6):2839-2844.
22. Bunschoten H, et al. Characterization of a new neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the Rabies Virus glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 1989;70:291-298.
23. Dietzschold B, et al. Structural and Immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the Rabies Virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J. Virol.* Aug. 1990;64(8):3804-3809.
24. Lodmell DL, Ewalt LC. Immune sera and antiglycoprotein monoclonal antibodies inhibit in vitro cell-to-cell spread of pathogenic rabies viruses. *J. Virol.* Oct. 1988;61(10):3314-3318.
25. Bunschoten H, et al. Rabies Virus-specific human T cell clones provide help for an in vitro antibody response against neutralizing antibody inducing determinants of the viral glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 1989;70:1513-1521.

26. Burgoyne GH, et al. Rhesus Diploid Rabies Vaccine (adsorbed): a new rabies vaccine using FRhL-2 cell. J. Inf. Dis. 1985;152(1): 204-210.
27. Dellepiame NI. Estudio de las cepas de Virus Rabico utilizadas en la preparaci3n de la vacuna de cerebro de rat3n lactante (tipo Fuenzalida-Palacios). Argentina: Universidad de Buenos Aires (tesis de graduaci3n en Doctor en Ciencias Biol3gicas). 1984. 121p.
28. Shankar V, Dietzschold B, Koprowski H. Direct entry of rabies into the Central Nervous System without local replication. J. Virology. 1991;65(5):2736-2738.
29. Tsiang H, Ceccaldi PE, Lycke E. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. J. Gen. Virol. 1991;72(5):1191-1194.
30. Tsiang H, et al. The anterograde transport of Rabies Virus in rat sensory dorsal root ganglia neurons. J. Gen. Virol. 1989;70:2075-2085.
31. Tierkel ES. Investigaci3n microsc3pica r3pida de corp3sculos de Negri y preparaci3n de muestras para las pruebas biol3gicas. p.42-57. (En: Kaplan MM, Koprowski H, comps. La rabia. 3 ed. Ginebra: OMS, Serie de Monografias # 23, 1976. 389p.).
32. L3pine F. Diagn3stico histopatol3gico de la rabia. p.58-74. (En: Kaplan MM, Koprowski H, comps. La rabia. 3 ed. Ginebra: OMS, Serie de Monografias # 23, 1976. 389p.).
33. Larghi DP. Rabia; prueba de Anticuerpos Fluorescentes. Centro Panamericano de Zoonosis: OPS/OMS, Doc. Tec. 8, rev. 2, 1975. 25p.

34. Dean DJ, Agelseth MH. Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para la rabia. p.75-87. (En: Kaplan MM, Koprowski H, comps. La rabia. 3 ed. Ginebra: OMS, Serie de Monografías # 23, 1976. 389p.).
35. Koprowski H. Prueba de Inoculación al ratón. p.88-97. (En: Kaplan MM, Koprowski H, comps. La rabia. 3 ed. Ginebra: OMS, Serie de Monografías # 23, 1976. 389p.).
36. Johnson HN. Índice de neutralización. p. 98-101. (En: Kaplan MM, Koprowski H, comps. La rabia. 3 ed. Ginebra: OMS, Serie de Monografías # 23, 1976. 389p.).
37. Chang DE. Comparación de los niveles de anticuerpos antirrábicos, detectados por la técnica de Contraimmunoelectroforesis (CIE), en perros inmunizados con vacunas de cerebro de ratón lactante (CRL): 2% normal y 1 % adsorbida con hidróxido de aluminio. Guatemala: USAC (tesis de graduación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia), 1989. 154p.
38. Gardisa. Mesa redonda: situación actual de la rabia en Guatemala. (En: Memorias del Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Guatemala: USAC, 1984. 60p.).
39. Celis E, et al. Recognition of rabies and rabies related virus by T cell derived from human vaccine recipients. J. Virol. 1988;62(9):3128-3134.
40. Perry LL, Lodmell DL. Role of CD4+ and CD8+ T cell in murine resistance to street rabies virus. J. Virol. 1991;65(7):3429-3434.

41. Hemachudha T, et al. Myelin basic protein as an encephalitogen in encephalomyelitis and polyneuritis following rabies vaccination. *N. Engl. J. Med.* 1989;316(7):364-372.
42. Fuenzalida E. Vacuna de encéfalo de ratón lactante. p.229-233. (En: Kaplan MM, Koprowski H, comps. *La rabia*. 3 ed. Ginebra: OMS, Serie de Monografías # 23, 1976. 389p.).
43. Keneth W, et al. Pre-exposure immunization with intradermal human diploid cell rabies vaccine; risk and benefits of primary and booster vaccination. *JAMA.* 1987;257(8):1059-1063.
44. Fisbein D. Rabies pre-exposure prophylaxis with human diploid cell rabies vaccine: a dose response study. *J. Infec. Dis.* 1987; 156(1):50-55.
45. MMWR/CDC. Rabies prevention: supplementary statement on the intradermal route. *JAMA.* 1987;257(8):1037.
46. Berlin BS, et al. Rhesus diploid rabies vaccine (adsorbed), a new rabies vaccine; I-results of initial clinical studies of pre-exposure vaccination. *JAMA.* 1982;247:1726-1728.
47. Berlin BS, et al. Rhesus diploid rabies vaccine (adsorbed), a new rabies vaccine; II-results of clinical studies simulating prophylactic therapy for rabies exposure. *JAMA.* 1983;249:2663-2665.
48. Brochies BM, et al. Interaction between rabies infection and oral administration of vaccinia-rabies recombinated virus to foxes (*Vulpes vulpes*). *J. Gen. Virol.* 1989;70:1601-1604.
49. Lerocq JF, et al. New rabies vaccines; recombinant ADN approaches. (In: Koprowski H, Platkin SA, eds. *World's debt to Pasteur*. New York: The Wistar Symposium Series, Vols. 3, Vol. 3, 1985.).

50. Yelverton E, et al. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in Escherichia coli. Science. 1983;219:614-620.
51. Palomo LF. Inmunoprofilaxis antirrábica humana con vacuna de cerebro de ratón lactante (CRL), usando esquemas reducidos de vacunación. Guatemala: USAC (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1982. 52p.
52. Bernard KW, et al. Neuroparalytic illness and human diploid cell rabies vaccine. JAMA. 1982;248:3136-3138.
53. Larghe OP, et al. Laboratory investigations on neuroparalytic accidents associated to suckling mouse brain rabies vaccine (SMB); III-preservation of vaccine potency after elimination of murine brain myelin by centrifugation. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur). 1976;127:567-572.
54. Diaz AMO, et al. Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante; esquemas reducidos de inmunización post-exposición. Rev. Arg. Microbiol. 1979;11(1):42-44.
55. Wilde H, et al. Purified equine rabies immunoglobuline: a safe affordable alternative to human rabies immunoglobuline. Bol. WHO. 1991;68(3):731-736.
56. Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). Recommendations of the Public Health Service, ACIP: rabies prevention. MMWR. 1984;33:393-408.
57. Gaumgarten EH. Vacuna antirrábica de origen de murciélago vampiro cepa V319/Acatlan para proteger al ganado bovino contra la rabia parásitante en México. México: OPS/OMS, Doc. tec., 186:1-5.

58. MMWR/CDC. An Imported case of rabies in an Immunized dog. JAMA. 1987;257(11):454-455.
59. Kappas K. Canine rabies in the United States, 1971-1973: study of reported cases with reference to vaccination history. Am. J. Epidemiol. 1976;103:242-249.
60. Ruiz H. Rabia en caninos vacunados con virus vivo modificado, cepa Flury. Vet. Mex. 1978;9:73-75.
61. Clark KA, et al. Rabies vaccination: field observations during epizootics in dogs. Mod. Vet. Pract. 1981;Dec:907-911.
62. DGSS, División de Vigilancia y Control de Enfermedades. Comentario de las enfermedades de Notificación obligatoria a nivel nacional, año 1990. Bol. Epidemiol. Nac. 1991;3(V-XIII):23-32.
63. DGSS, Departamento de Zoonosis, PRODESA-DIGESEPE. Informe estadístico. Guatemala: DGSS, 1991.
64. DGSS, Departamento de Zoonosis. Protocolos del Laboratorio de Producción de Vacuna Antirrábica, año 1991. Guatemala: DGSS, 1991.
65. DGSS, Departamento de Zoonosis. Protocolos del Laboratorio de Producción de Vacuna Antirrábica, año 1992. Guatemala: DGSS, 1992.

13. ANEXOS

Anexos 13.1: Tablas.

- 13.1.1: Algunos datos epidemiológicos de la rabia en Guatemala.
- 13.1.2: Taxonomía del virus rabia.
- 13.1.3: Tipo de atención recomendada para el paciente, dependiendo de la clase de lesión.
- 13.1.4: Dosis de Vacuna tipo CRL y de antisueros usadas normalmente en Guatemala (recomendadas por DGSS).
- 13.1.5 Resultado del análisis al que fueron sometidos los ratones, frente a 4 virus fijos diferentes.
- 13.1.6 Resultado del análisis de los 52 extractos cerebrales, positivos a virus rabia.
- 13.1.7 Controles llevados a cabo durante el análisis.
- 13.1.8 Características de los lotes de vacuna antirábica trivalente tipo CRL de uso humano, 91-4 y 92-1, usados en las pruebas.

Anexos 13.2: Gráficas.

- 13.2.1: Comparación entre el número total de ratones inoculados y el número de ratones muertos por traumatismo, canibalismo y los confirmados como positivos.
- 13.2.2: Comparación entre el porcentaje de ratones muertos por traumatismo, canibalismo y los confirmados como positivos.

ANEXO 13.1.1

Tabla # 1

Algunos datos epidemiológicos de la rabia en Guatemala.

casos de rabia	humana		animal				
	por mordida	reacción postvacu- nal	perros	gatos	bovinos	silvestres	otros
1970-1980	42	3*	2445**	88	123***	19	12
1981-1990	75	sd****	2875	108	254	sd	45

* = En 1969, se presentó la primera reacción postvacunal, luego de aplicaciones de vacuna tipo CRL (introducida en 1968 al país).

** = Durante este período, se vacunaron 614110 perros.

*** = En el año de 1964, Guatemala sufrió pérdidas por \$ 168000.

**** = Sin datos.

Tomado de [62,63].

ANEXO 13.1.2

Tabla # 2

Taxonomía del virus rabia:

Familia	Rhabdoviridae
Género	Lyssavirus
Especie	Virus rábico (especie tipo).
Serotipos:	
1 (CVS)	Cepa prototipo de los virus rábicos.
2 (LBV) *	Lagos bat virus, aislado de murciélagos frugívoros de Nigeria, República Centroafricana y Sudáfrica.
3 (MOK) **	Virus Mokola, aislado de musarañas, perros, gatos y humanos.
4 (DUV)	Virus Duvenhage, aislado de un hombre mordido por un murciélago en Sudáfrica.
5 (KON) ***	Virus Kotonkan, aislado en Nigeria.
6 (OBOD) ****	Virus Obodhiang, aislado de mosquitos en Sudán.

* = Actualmente, se discute sobre si los dos primeros y el virus DBV (recientemente aislado en Dinamarca), deben de unirse a otro serotipo o continuar como se indica en la tabla.

** = MOK y LBV producen cuerpos de Negri.

*** = KON produce una enfermedad equivalente a la FEG.

**** = OBOD y KON, son los únicos que pueden infectar a los artrópodos.

Tomado de [16,39].

ANEXO 13.1.3

Tabla # 3

Tipo de atención recomendada para el paciente, dependiendo de la clase de lesión.

tipo de exposición	estado del animal		atención recomendada	
	al atacar	10 días de observación	herida	inmunización
Contacto sin lesión o indirecto	saludable	saludable	limpieza	-----
	sospechoso	rabioso	limpieza	-----
Derrame tipo I, * arañazos o mordidas ligeras **	saludable	saludable	limpieza	-----
		rabioso	limpieza	vacunación
	sospechoso	saludable	limpieza	vacunación
Derrame tipo II,*** mordidas graves****	sospechoso	saludable	limpieza	vacunación
		rabioso	limpieza	vacunación + antisuero
	rabioso no disponible para su observación	-----	limpieza	vacunación + antisuero Consultar autoridades

* = saliva en la piel.
 ** = en áreas cubiertas
 *** = saliva en mucosas.
 **** = en cabeza, cuello, cara.

Las estadísticas están basadas en el tiempo de observación para gatos y perros. Si el animal es doméstico y no desarrolla rabia, puede suspenderse el tratamiento.

Tomado de [1,2,36]

ANEXO 13.1.4

Tabla # 4

Dosis de Vacuna tipo CRL y de antisueros, usadas normalmente en Guatemala (recomendadas por DGSS).

inmunización	esquema de vacuna ó antisuero a usar	vía de administración	dosis recomendada
Activa	reducido (pre-exposición).	SC.	1 dosis diaria por 3 días + 3 refuerzos (días 10, 20 y 90).*
	reducido (post-exposición).	SC.	1 dosis diaria por 7 días + 3 refuerzos (días 10, 20 y 90).*
	clásico (post-exposición).	SC.	1 dosis diaria por 14 días + 2 refuerzos (días 10 y 20).*
Pasiva	IAH	50% SC. y el resto en la herida. **	1 dosis única de 20 UI/Kg, al inicio del tratamiento.
	SAE	50% SC. y el resto en la herida. **	1 dosis única de 40 UI/Kg, al inicio del tratamiento.

*= contando a partir del último día de inoculación diaria.

**= No inocular en el mismo sitio, la vacuna y el suero.

Tomado de [1,2,51].

ANEXO 13.1.5

Tabla # 5:

Resultado del análisis al que fueron sometidos los ratones, frente a 4 virus fijos diferentes.

muestra número	código	tipo de virus fijos	número de ratones inoculados	ratones vivos	ratones muertos *	porcentaje de sobrevivencia**
1	F-1	CVS	10	10	0	100
2	F-2	51-123	10	9	0	100
3	F-3	91-122	9	8	0	100
4	F-4	DR	9	9	0	100

* = Las muertes de ratones por traumatismo o canibalismo, no se tomaron en cuenta.

** = Para sacarlo, se consideraron únicamente a aquellos ratones muertos por infección rábica, al finalizar todas las pruebas.

ANEXO 13.1.6

Tabla # 6:

Resultado del análisis de los 52 extractos cerebrales, positivos a virus rabia.*

muestra número	código número	número de ratones inoculados	ratones vivos	ratones muertos **	porcentaje de sobrevivencia ***
1	Ca-01	10	9	0	100
2	Ca-02	10	10	0	100
3	Ca-03	10	9	0	100
4	Ca-04	10	10	0	100
5	Ca-05	10	10	0	100
6	Ca-06	10	10	0	100
7	Ca-07	10	10	0	100
8	Ca-08	10	10	0	100
9	Ca-09	10	10	0	100
10	Ca-10	10	10	0	100
11	Ca-11	10	9	0	100
12	Ca-12	10	6	0	100
13	Ca-13	10	10	0	100
14	Ca-14	10	9	0	100
15	Ca-15	10	10	0	100
16	Ca-16	10	10	0	100
17	Ca-17	10	10	0	100
18	Ca-18	10	10	0	100
19	Ca-19	10	9	0	100
20	Ca-20	10	6	0	100
21	Ca-21	10	10	0	100
22	Ca-22	10	9	0	100
23	Ca-23	10	9	0	100
24	Ca-24	9	8	0	100
25	Ca-25	9	8	0	100
26	Ca-26	9	7	0	100
27	Ca-27	10	10	0	100
28	Ca-28	10	10	0	100
29	Ca-29	10	8	0	100
30	Ca-30	10	10	0	100
31	Ca-31	9	8	0	100
32	Ca-32	9	8	0	100
33	Ca-33	9	6	0	100
34	Ca-34	10	9	0	100
35	Ca-35	10	10	0	100
36	Ca-36	10	10	0	100
37	Ca-37	10	9	0	100

Tabla # 6 (continuación):

Resultado del análisis de los 52 extractos cerebrales, positivos a virus rabia.*

muestra número	código número	número de ratones inoculados	ratones vivos	ratones muertos **	porcentaje de sobrevivencia ***
38	Ca-38	10	10	0	100
39	Ca-39	10	8	0	100
40	Ca-40	10	7	0	100
41	Ca-41	10	7	0	100
42	Ca-42	10	8	0	100
43	Ca-43	10	10	0	100
44	Ca-44	10	10	0	100
45	Ca-45	10	10	0	100
46	Ca-46	10	10	0	100
47	Ca-47	9	9	0	100
48	Ca-48	8	8	0	100
49	Ca-49	8	7	0	100
50	Ca-50	10	10	0	100
51	Ca-51	10	10	0	100
52	Ca-52	8	8	0	100

* = Cada extracto se tomó como un biotipo de virus calle diferente.

** = Las muertes de ratones por traumatismo o canibalismo, no se tomaron en cuenta.

*** = Para sacarlo, se consideraron únicamente a aquellos ratones muertos por infección rábica, al finalizar todas las pruebas.

ANEXO 13.1.7

Tabla # 7:

Controles llevados a cabo durante el análisis.

control número	tipo ó código	características que busca comprobar	ratones inoculados	ratones vivos	ratones muertos
1	positivo	sobrevivencia de los ratones en el proceso	10	10	0
2	negativo	mortandad de los ratones frente a cada extracto	112	0	112
3	C-1	Sobrevivencia de los ratones a la vacuna lote 91-4	10	10	0
4	C-2	Sobrevivencia de los ratones a la vacuna lote 92-1	10	10	0
5	C-3	Sobrevivencia de los ratones a la inoculación intraperitoneal	10	10	0
6	C-4	Sobrevivencia de los ratones a la inoculación intracraneal	10	10	0

ANEXO 13.1.8

Tabla # 8:

Características de los lotes de vacuna antirábica trivalente tipo CRL de uso humano, 91-4 y 92-1, usados en las pruebas.*

lote de vacuna	potencia	inocuidad	fecha de vencimiento
91-4	1.20 UI**	satisfactoria	18-02-92
92-1	1.08 UI**	satisfactoria	20-12-92

* = Ambos lotes de vacuna, dieron los mismos resultados, en las diferentes pruebas realizadas.

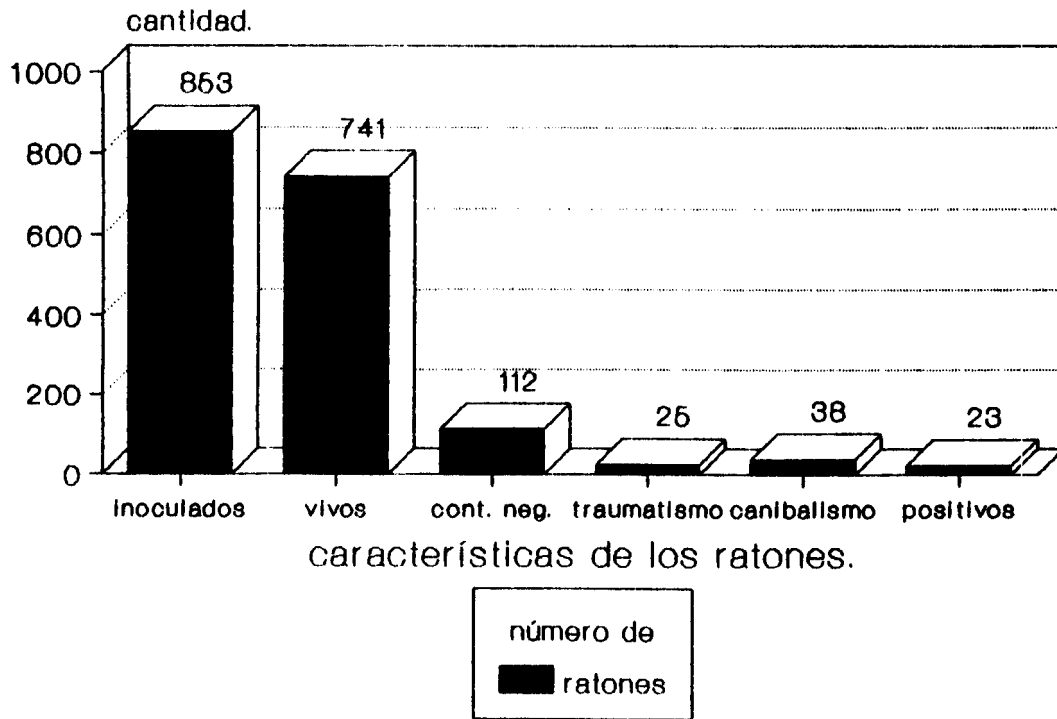
** = Unidades internacionales.

Tomado de [64,65].

ANEXO 13.2.1

Gráfica # 1:

Comparación entre el número total de ratones inoculados y el número de ratones muertos por traumatismo, canibalismo y los confirmados como positivos.*

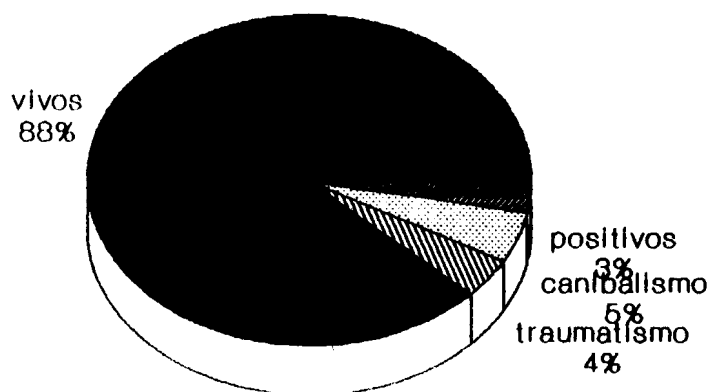


* = No debe de olvidarse, que los ratones que murieron y fueron confirmados como positivos, provocaron la repetición de algunas de las pruebas, tras lo que se obtuvo un 100 por ciento de sobrevivencia.

ANEXO 13.2.2

Gráfica # 2:

Comparación entre el porcentaje de ratones vivos y los muertos por traumatismo, canibalismo y los confirmados como positivos.*

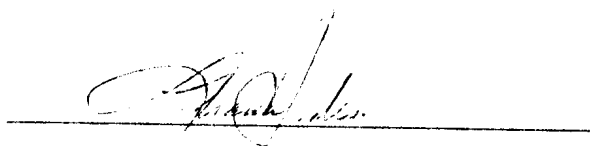


* = No debe de olvidarse, que los ratones que murieron y fueron confirmados como positivos, provocaron la repetición de algunas de las pruebas, tras lo que se obtuvo un 100 por ciento de sobrevivencia.



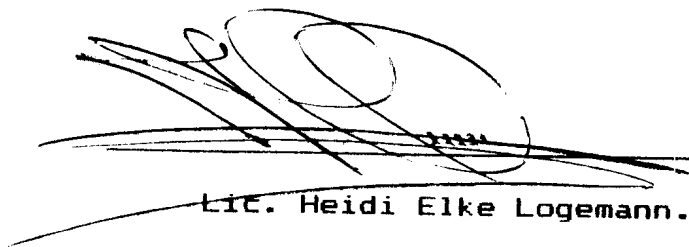
Julio César Rafael Flores Ordóñez.

Autor.



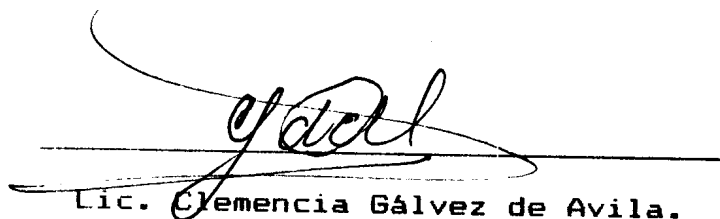
Lic. Liliana Vides.

Asesora de Tesis.



Lic. Heidi Elke Logemann.

Directora de Escuela.



Lic. Clemencia Gálvez de Avila.

Decana.