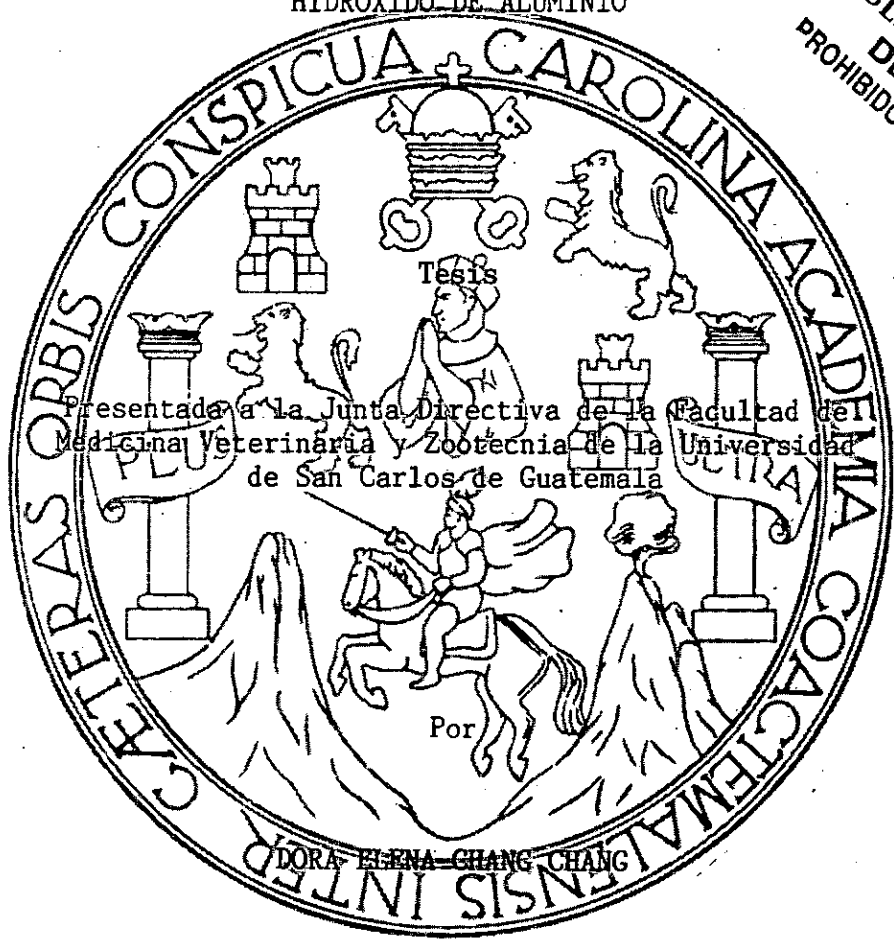


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS ANTIRRABICOS,  
DETECTADOS POR LA TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE),  
EN PERROS INMUNIZADOS CON VACUNAS DE CEREBRO DE RATON  
LACTANTE (CRL): 2% NORMAL Y 1% ADSORBIDA CON  
HIDROXIDO DE ALUMINIO

BIBLIOTECA CENTRAL-USAC  
DEPOSITO LEGAL  
PROHIBIDO EL PRESTAMO EXTERNO



Al conferirsele el Título de

MEDICO VETERINARIO

Guatemala, febrero de 1989.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DL  
10  
T.(407) v

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO:	Dr. Ernesto Villagrán Crespo
SECRETARIO:	Dr. José Roberto Urrutia Guerrero
VOCAL PRIMERO:	Lic. Rómulo Gramajo Lima
VOCAL SEGUNDO:	Dr. José Francisco Estrada García
VOCAL TERCERO:	Lic. Héctor González Villavicencio
VOCAL CUARTO:	Br. Jorge Pineda Melgar
VOCAL QUINTO:	Br. Mario Llerena Quan

ASESORES DE TESIS

Dr. Carlos del Aguila B.

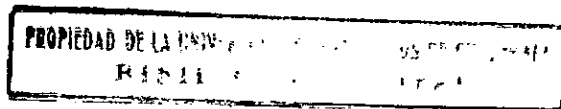
Dr. Miguel Bohl D.

Dr. Arnoldo Ericastilla G.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

De conformidad con lo que establecen los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de tesis: "COMPARACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS ANTIRRABICOS, DETECTADOS POR LA TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE), EN PERROS INMUNIZADOS CON VACUNAS DE CEREBRO DE RATON LACTANTE (CRL): 2% NORMAL Y 1% ADSORBIDA CON HIDROXIDO DE ALUMINIO", que me fuera aprobado por la Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, previo a optar el título de:

MEDICO VETERINARIO



ACTO QUE DEDICO

A DIOS Y LA VIRGEN MARIA

A MIS PADRES:

Arturo Chang Sam  
María Luisa Chang de Chang

A MIS HERMANOS:

Luisa Margarita  
Clara Elizabeth  
María Luisa  
José Arturo

A MIS SOBRINAS:

Diana Gabriela  
Perla Margarita

A MI NOVIO:

José Angel Jo Lau

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE PROMOCION

A TODOS LOS AMIGOS Y ENTIDADES QUE CONTRIBUYERON  
A REALIZAR ESTA INVESTIGACION.

## AGRADECIMIENTO

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A EL CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS (OPS/OMS):

Dra. Ana María Díaz

A MIS ASESORES DE TESIS:

Dr. Carlos del Aguila

Dr. Miguel Bohl

Dr. Arnoldo Ericastilla

A EL PERSONAL PROFESIONAL Y TECNICO DEL LABORATORIO BIOLOGICO, D.G.S.S.

Especialmente:

Licda. Rina de Rosal

Marta Elena Porras

Enrique Arbizú

Jaime Leiva

Rafael Muñoz

Carlos Vásquez

Aurora Fernández

César Jordán

A EL PERSONAL PROFESIONAL Y TECNICO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A QUIMICA HOECHST DE GUATEMALA

A TODAS LAS PERSONAS Y ENTIDADES QUE COLABORARON A REALIZAR ESTA INVESTIGACION

En especial a:

Erik Bonilla

Dra. Inf. Erika de Bonilla

## INDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	2
2.1 Hipótesis	2
2.2 Objetivos	2
III. REVISION DE LITERATURA	3
3.1 Sinonimias	3
3.2 Historia	3
3.3 Epizootiología	4
3.3.1 Urbana	4
3.3.2 Selvática	4
3.4 Distribución Geográfica	5
3.5 Hospederos afectados	6
3.6 Etiología	6
3.6.1 Características del virus	6
3.6.2 Propiedades del virus	10
3.6.3 Cultivo del virus	11
3.7 Fuentes de Infección y Modo de Transmisión	11
3.7.1 Factores que afectan	11
3.7.1.1 Susceptibilidad innata	11
3.7.1.2 Presencia del virus rábico en las glándulas salivales	12
3.7.1.3 Lugar de la herida	12
3.7.1.4 Vacunación	12
3.7.1.5 El papel de los roedores	12
3.7.2 Forma de Transmisión	13
3.7.2.1 Rabia Urbana	13
3.7.2.2 Rabia Silvestre	18
3.8 Síntomas de la Rabia	21
3.8.1 Fase prodromal	22
3.8.2 Fase Excitativa	22
3.8.3 Fase Paralítica	22
3.8.4 Rabia en el Hombre	23
3.8.5 Rabia en los animales	23
3.8.5.1 Perros	24
3.8.5.2 Gatos	25
3.8.5.3 Bovinos	25
3.8.5.4 Otros animales domésticos	26
3.8.5.5 Aves	27
3.8.5.6 Animales Silvestres	27
3.9 Patogenia	27
3.10 Lesiones	29
3.11 Diagnóstico	31
3.11.1 Empaquetado y envío de la Muestra	32
3.11.2 Métodos de Diagnóstico	35
3.11.2.1 Diagnóstico de Laboratorio	35
3.11.2.2 Histopatología	35

3.11.2.3 Inoculación intracerebral de ratones	37
3.11.2.3.1 Ventajas de la Prueba	39
3.11.2.3.2 Desventajas de la Prueba	39
3.11.2.4 Prueba de anticuerpos fluorescentes	39
3.11.2.4.1 Ventajas de la prueba	41
3.11.2.4.2 Desventajas de la prueba	42
3.11.2.5 Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta	42
3.11.2.6 Prueba del Índice de Neutralización del virus	42
3.11.2.7 Prueba de fijación del complemento	43
3.11.2.8 Otras Técnicas	43
3.11.3 Técnicas para detectar anticuerpos en suero sanguíneo	43
3.11.3.1 Prueba de la Hemaglutinación Pasiva para los Anticuerpos de la rabia	44
3.11.3.2 Técnicas de Difusión en Gel	45
3.11.3.2.1 Identificación de Anticuerpo Desconocido	45
3.11.3.2.2 Identificación de Virus Desconocido	45
3.11.3.3 Radioinmunoensayo RIA	46
3.11.3.4 Prueba de Sueroneutralización en Ratones SN	47
3.11.3.5 Prueba de Contrainmunolectroforesis (CIE)	48
3.11.3.5.1 Preparación de Reactivos	52
3.11.3.5.1.1 Solución de Sacarosa 7.5%	52
3.11.3.5.1.2 Solución Salina Amortiguada pH 7.2	52
3.11.3.5.1.3 Solución de Sacarosa - Glicina pH 7.2	52
3.11.3.5.1.4 CO <sub>2</sub> Na 0.16%, 0.02 M	52
3.11.3.5.1.5 Solución de Veronal 0.05 M pH 8.2	52
3.11.3.5.1.6 Preparación del Gel de Agarosa	53
3.11.3.5.1.7 Preparación de Placas	53
3.11.3.5.1.8 Virus Semilla	54
3.11.3.5.1.9 Antígeno	55
3.11.3.5.1.9.1 Estandarización	56
3.11.3.5.1.10 Suero Indicador	59
3.11.3.5.1.10.1 Estandarización	60
3.11.3.5.2 Procedimiento de la prueba	62
3.11.3.5.3 Estimación de títulos seroneutralizantes	66
3.12 Inmunidad	68
3.13 Tipos de Vacuna	69
3.13.1 Por la naturaleza del Virus	69
3.13.1.1 Vacunas Inactivadas	69
3.13.1.2 Vacunas Atenuadas	70
3.13.2 Por el tipo de Tejido	70
3.13.2.1 Vacunas de Tejido Encefálico	70
3.13.2.1.1 Tipo Semple	71
3.13.2.1.2 Tipo Fermi	71
3.13.2.1.3 Rata Lactante	72
3.13.2.1.4 Ratón Lactante	72
3.13.2.1.5 Conejo Lactante	78
3.13.2.1.6 Pasteur	78
3.13.2.2 Vacunas de Embrión de Aves	78
3.13.2.2.1 Vacuna de Embrión de Pollo	78
3.13.2.2.2 Embrión de pato	79
3.13.2.3 Vacunas de Cultivos Tisulares	80
3.13.2.3.1 Células Diploides	80
3.13.2.3.2 Tisular para Animales	81

3.13.3 Consideraciones de una Vacuna	82
3.13.4 Adyuvantes inmunológicos	83
3.13.4.1 Adyuvantes inertes	83
3.13.4.2 Adyuvantes dinámicos	83
3.13.4.1.1 Compuestos de Aluminio	84
3.13.4.1.2 Adyuvante incompleto de Freund	85
3.13.4.3 Recomendaciones al utilizar adyuvantes	86
3.14 Control y Erradicación	87
3.14.1 Rabia Urbana	87
3.14.2 Rabia Silvestre	88
3.14.2.1 Por Quirópteros	88
3.14.2.2 Por Carnívoros	90
3.14.3 Medidas de Transporte Internacional de Animales	90
3.15 Prevención de la Rabia	91
3.15.1 Esquema de Profilaxis en Humanos	91
3.15.1.1 Tratamiento Pré-Exposición	91
3.15.1.1.1 Vacuna CRL	91
3.15.1.1.2 Vacuna Embrión de Pato	92
3.15.1.1.3 Vacuna de Células Diploides Humanas	92
3.15.1.2 Tratamiento Post-Exposición	92
3.15.1.2.1 Tratamiento local de la herida	93
3.15.1.2.2 Administración de la Vacuna	93
3.15.1.2.2.1 CRL esquema reducido	93
3.15.1.2.2.2 CRL esquema clásico	93
3.15.1.2.2.3 Embrión de Pato	93
3.15.1.2.2.4 Celulas Diploides	94
3.15.1.3 Tratamiento de personas vacunadas anteriormente	94
3.15.1.3.1 Vacuna CRL	94
3.15.1.3.2 Vacuna Embrión de Pato	94
3.15.1.3.3 Vacuna de Células Diploides Humanas	94
IV. MATERIALES Y METODOS	
4.1 Investigación a nivel de campo	98
4.2 Investigación a nivel de laboratorio	99
V. RESULTADOS Y DISCUSION	103
VI. CONCLUSIONES	111
VII. RECOMENDACIONES	113
VIII. RESUMEN	114
VIII. SUMMARY	116
IX. APENDICE	118
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	150



## INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Distribución de la población canina en el estudio de la evaluación de vacunas antirrábicas CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub> y CRL 2% Normal. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	118
2	Distribución de los 387 perros inmunizados en el estudio de evaluación de las vacunas antirrábicas en la Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	118
3	Distribución por grupo etario y sexo de los 197 perros inmunizados, Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	119
4	Resultados del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 30, 60 y 90 días con Vacuna CRL 2% y CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub> . Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	120
5	Rango de anticuerpos circulantes contra Rabia obtenidos con la prueba de CIE, a los 0, 30, 60 y 90 días postvacunación con CRL 2% Normal y CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub> . Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	121
6	Determinación del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de Contra-inmuno-electroforesis en perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal. Relacionando Grupo etario y sexo. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	122
7	Determinación del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de Contra-inmuno-electroforesis en perros inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub> . Relacionando Grupo etario y sexo. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	123
8	Distribución por subgrupos de los 28 perros revacunados con los dos tipos de inmunógeno, cinco meses después de aplicada la Vacuna de Referencia. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989	124
9	Determinación del título final de anticuerpos antirrábicos detectados mediante la prueba de CIE, en perros revacunados con CRL 2% Normal y CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub> , cinco meses después de haber sido inmunizados. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	125

- |    |  |     |
|----|--|-----|
| 10 | Coefficiente de correlación (r) de los títulos obtenidos en 22 sueros de perros inmunizados con los dos tipos de vacunas, detectados por las pruebas de Contrainmunolectroforesis y Sueroneutralización en ratones. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989. | 126 |
| 11 | Coefficiente de Correlación (r) de los títulos obtenidos en 38 sueros de perros inmunizados con los dos tipos de vacunas, detectados por las pruebas de Contrainmunolectroforesis y Sueroneutralización en ratones. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989. | 127 |
| 12 | Distribución de las 205 lecturas efectuadas en la prueba de Contrainmunolectroforesis a los 30, 60 y 90 días postvacunación con CRL 2% Normal, de acuerdo al grupo etario y sexo. Guatemala, 1989  | 128 |
| 13 | Distribución de las 358 lecturas efectuadas en la prueba de Contrainmunolectroforesis a los 30, 60 y 90 días postvacunación con CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub> , de acuerdo al grupo etario y sexo. Guatemala, 1989.   | 129 |
| 14 | Resumen de las 438 pruebas de Contrainmunolectroforesis en los perros inmunizados, las 71 pruebas comparativas con SN y las 563 lecturas efectuadas en la presente investigación. Guatemala, 1989.   | 130 |

## INDICE DE GRAFICAS

Gráfica No.		Página
1	Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 30 días postvacunación en los perros inmunizados. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	133
2	Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 60 días postvacunación en los perros inmunizados. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	134
3	Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 90 días postvacunación en los perros inmunizados. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	135
4	Porcentaje de los títulos de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 30, 60 y 90 días en los perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989	136
5	Porcentaje de los títulos de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 30, 60 y 90 días en los perros inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub> . Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	137
6	Porcentaje de los títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 30 días postvacunación con CRL 2% Normal, en los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	138
7	Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 30 días postvacunación con CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub> , en los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	139
8	Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 60 días postvacunación con CRL 2% Normal, en los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.	140
9	Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 60 días postvacunación con CRL + Al(OH) <sub>3</sub> . En los diferentes	

- grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla. Guatemala, 1989. 141
- 10 Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 90 días post-vacunación con CRL 2% normal en los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989. 142
- 11 Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 90 días post-vacunación con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. En los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989. 143
- 12 Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE en perros inmunizados inicialmente con Vacuna 2% Normal, Grupo 1 y revacunados a los cinco meses con CRL 2% Normal (Subgrupo A y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, (Subgrupo B). Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989. 144
- 13 Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE en perros inmunizados inicialmente con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, Grupo 2 y revacunados a los cinco meses con CRL 2% Normal (Subgrupo C) y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, (Subgrupo D). Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989. 145
- 14 Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE en perros inmunizados inicialmente con Vacuna CRL 2% Normal (Grupo 1) y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, (Grupos 2); revacunados a los cinco meses con CRL 2% Normal (Subgrupo A y C). Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989. 146
- 15 Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE en perros inmunizados inicialmente con Vacuna CRL 2% Normal (Grupo 1) y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, (Grupo 2); revacunados a los cinco meses con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, (Subgrupo B y D). Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989. 147
- 16 Regresión lineal de los valores obtenidos con las pruebas de Sueroneutralización en ratones y Contra-inmunolectroforesis en 22 sueros caninos inmunizados contra Rabia. ( indica dos puntos superpuestos).  
 $y = 1.7979 + 0.3731 x$ . Coeficiente de Correlación  
 $r = 0.55$ . 148

17

Regresión lineal de los valores obtenidos con las pruebas de Sueroneutralización en ratones y Contra-inmunolectroforesis en 38 sueros caninos inmunizados contra Rabia. (▲ = 2; ■ = 3 puntos superpuestos).  
 $y = 1.8630 + 0.3518 x$ . Coeficiente de Correlación  
 $r = 0.67$ .

149

## I. INTRODUCCION:

La Rabia constituye uno de los principales problemas en Salud Pública, ya que esta antroponosis posee alta incidencia en humanos y animales. Las mordeduras de perros, son el origen de la mayoría de los casos de Rabia humana en América Latina, razón por la cual es necesario establecer Programas de Control de Rabia Canina a nivel Regional.

La Vacuna de Cerebro de Ratón Lactante (CRL) se utiliza con éxito en los países Latinoamericanos en la inmunización de los perros, por poseer un alto poder inmunogénico, estabilidad, seguridad, fácil elaboración y bajo costo de producción. (23,30)

Estudios anteriores demostraron la capacidad de la Vacuna CRL 2% Normal, de inducir altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra Rabia, capacidad que se incrementa cuando se adsorbe con Hidróxido de Aluminio, por ser un adyuvante químico inerte que retiene el antígeno y lo va liberando lentamente dentro del organismo animal, aumentando con ello la respuesta inmune. (25,30,46)

Se ha comprobado que hay una relación directa entre la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de las personas y animales inmunizados contra la Rabia y la protección frente a la infección por el Virus. Es por ello conveniente determinar el estado inmune, tanto de las personas como de los animales.

La técnica serológica de Contraelectroforesis (CIE) detecta los niveles de anticuerpos antirrábicos inducidos por la Glicoproteína presente en la envoltura del cápsid viral; dicha prueba se basa en la unión de las inmunoglobulinas antirrábicas presentes en los sueros problema, las cuales se enfrentan a cantidades constantes de antígeno, poniéndose en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo mediante una corrida electroforética simultánea, de las diluciones antígeno-anticuerpo y del suero hiperinmune antirrábico. (21)

En la presente investigación se evaluaron en condiciones de campo los niveles de anticuerpos antirrábicos inducidos por las Vacunas CRL 2% Normal y CRL 1% adsorbida con Hidróxido de Aluminio.

## II. HIPOTESIS.Y OBJETIVOS:

### 2.1 Hipótesis:

Se obtendrá mayor título de anticuerpos en aquellos perros que se les administre la vacuna CRL suplementaria con Hidróxido de Aluminio (CRL 1% + Al), en relación a los perros vacunados con la vacuna Normal (CRL 2%).

### 2.2 Objetivos:

Determinar los niveles de anticuerpos producidos por las vacunas antirrábicas CRL Normal (CRL 2%) y CRL suplementada con Hidróxido de Aluminio (CRL 1% + Al) en los perros seleccionados de Aldea "El Milagro", Masagua, Escuintla.

### III. REVISION DE LITERATURA:

#### 3.1 Sinonimias:

Hidrofobia, Lisa (1,29), Mal de Luna. La rabia parálitica de los bovinos recibe en cada país de América Latina diferentes nombres: Mal de Caderas y Rabia Paresiante en Argentina; Peste de Caderas en el Brasil; Renguera en Colombia y Costa Rica; Derrengue y Tronchado en México; Huequera en Panamá; Mal de Caderas, Tumbi Baba en Paraguay (29).

#### 3.2' Historia:

La rabia se conoce desde la antigüedad, la enfermedad fue descrita en perros ya 500 años A. de J. C. La relación de la rabia de los animales con la humana fue reconocida en el año 100 de nuestra Era y se recomendaba la cauterización de la mordedura del perro (28), se consideró como transmisible de los animales domésticos al hombre y su existencia ya se había detectado en este Continente Americano en el Siglo XVI (40,41,42).

Zinke dió a conocer en 1804 la transmisión de la rabia al perro sano mediante inoculación de saliva procedente de otro rabioso (41,42). Así probó la infecciosidad de la enfermedad, estableciéndose medidas de cuarentena en los países escandinavos ya en 1826. Como consecuencia de ello, estas naciones han estado libres de la rabia (41).

El trabajo clásico de Pasteur en 1880, en el que el virus podía modificarse de modo que inmunizaba sin peligro de producir la enfermedad (41) y le corresponde el mérito de haber efectuado la famosa inoculación con vacuna antirrábica de un niño mordido por un lobo rabioso en 1885 (35,42); también afirmó que el agente etiológico de la rabia era más pequeño que las bacterias (28). Remlinger, en 1903, mostró la naturaleza viral de este agente por su calidad filtrante y en el mismo año Negri describió cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en las células nerviosas de los animales rabiosos, señaló el valor diagnóstico de éstas (41,42).

En las Américas, la rabia ha existido indudablemente desde la época colonial, si bien fue puesta en evidencia sólo después de los descubrimientos de Pasteur. El primer informe impreso acerca de los vampiros relacionados con la rabia fue realizado en 1658



por Guilherme Piso, médico de Amsterdam que acompañó al príncipe Mauricio de Nassau a Brasil. Hizo notar que los nativos llamaban a estos quirópteros "andira" y cita los frecuentes casos en que muerden a los seres humanos por la noche. Sin embargo fue a partir del primer decenio del presente siglo cuando los primitivos conceptos sobre la Rabia y la forma de su propagación fueron puestos en duda. La causa de ello fue el descubrimiento del investigador brasileño Carini en 1911, al comprobar que la grave epizootia llamada "Derrenque de los Bovinos" existía desde años atrás en el estado de Santa Catarina, Sur de Brasil, la cual se debía al virus rábico, a pesar que en tales regiones muy distantes de las zonas urbanas no habían perros ni otros carnívoros afectados con la enfermedad. Fue entonces cuando por primera vez en la historia de la afección, se sospechó de los murciélagos hematófagos, cuyas mordeduras en los animales fueron muy frecuentes. Luego la enfermedad se propagó del sur del Brasil a las ganaderías vecinas de Paraguay, Argentina y Uruguay.

Haupt y Rebag en 1921 confirmaron plenamente en forma experimental, la sospecha de Carini, de que los transmisores y propagadores del Derrenque eran efectivamente los quirópteros, que al morder a los bovinos para lamer e ingerir su sangre, transmitían el virus (12).

En Venezuela Kubes y Galicia establecieron dentro del Instituto de Investigaciones Veterinarias de Caracas la diferenciación inmunológica del virus rábico canino y el virus rábico del murciélago, utilizando para tal efecto las siguientes reacciones: Prueba de Protección Cruzada, Sueroneutralización Cruzada y Cerebro Neutralización Cruzada (29).

### 3.3 Epizootiología:

Desde este punto de vista hay dos formas de rabia:

#### 3.3.1 Urbana:

Se propaga sobre todo entre los perros.

#### 3.3.2 Selvática:

Se observa principalmente en los zorros, chacales, lobos, coyotes, zorrinos, mangostas, comadrejas y los murciélagos (29).

La información disponible permite definir dos grandes zonas en las Américas: En la primera que comprende Canadá y Estados Unidos

de América, la enfermedad ha quedado prácticamente circunscrita a la fauna silvestre (rabia silvestre), con muy pocos casos humanos ya que la rabia canina se ha eliminado casi por completo; en la segunda, compuesta por el resto de los países, la situación se encuentra invertida, pues resulta elevado el número de casos en seres humanos y perros (rabia urbana), pero bastante menor en la fauna silvestre. Tanto la rabia humana como la canina constituyen un problema de carácter esencialmente urbano, presente en casi todos los países de América Latina y el Caribe, que se agudiza en los suburbios o zonas periféricas de ciudades grandes y medianas. Los perros representan más del 94% en los casos de rabia animal y son los transmisores de casi todos los casos humanos (1,58).

La infección natural ocurre en casi todos los mamíferos domésticos y silvestres, si bien las diferentes especies animales presentan distintos grados de susceptibilidad. En las ciudades, las fuentes principales de infección para el hombre son en primer término los perros, y en segundo, los gatos.

La rabia en carnívoros silvestres cuando se presenta en forma enzoótica suele pasar desapercibida, pero cuando adquiere proporciones epizooticas, el ciclo silvestre trasciende al hombre y a los animales domésticos.

El virus rábico fue aislado de ratas y de otros roedores en diferentes partes del mundo, pero se le atribuye un reducido potencial de transmisión al hombre. Tres casos humanos se atribuyeron a mordedura de ratas. La rabia en murciélagos es un problema independiente de los ciclos infecciosos de otros mamíferos y sólo resulta de interés en las Américas. Es necesario distinguir la infección en quirópteros hematófagos y no hematófagos (35).

La rabia en murciélagos no hematófagos ocurre de norte a sur de las Américas y se ha comprobado en numerosas especies de insectívoros, como en varias de frugívoros, omnívoros e ictiófagos. La rabia en murciélagos hematófagos o vampiros es un problema limitado a América Latina y Trinidad y Tobago. La infección ha sido comprobada en las tres especies de hematófagos: Desmodus rotundus, Diphylla ecaudata y Diaemus youngi, pero sólo la primera tiene importancia epidemiológica (35).

#### 3.4 Distribución Geográfica:

La rabia es endémica en casi todos los países del mundo con excepción de Japón, Irlanda, Gran Bretaña, Países Bajos, Bulgaria, España, Portugal. En las Américas no se registran casos en Uruguay, Barbados, Jamaica y otras islas del Caribe (1,14).

Un reciente reporte de la Organización Mundial de la Salud muestra que la Rabia estaba ausente en los siguientes países en 1982-1983: Antigua y Barbuda, Samoa Americana, Australia, Bahrain, Brunei Darussalam, Isla Cook, Dominica, Guyana Francesa, Fiji, Polinesia Francesa, Guam, Japón, Kiribati, Kuwait, Isla Niu, Northern Marianas, Mauritius, Oman, Papua, Nueva Guinea, Palau, St. Vincent y Grenadines, Surinam, Singapur, Samoa, Isla Salomón, Tonga, Uruguay y Vanuatu (35).

### 3.5 Hospederos afectados:

El virus de la rabia afecta primariamente perros, gatos y otros carnívoros, pero todos los mamíferos de sangre caliente, incluyendo al hombre, son susceptibles. Las aves pueden infectarse experimentalmente. Los reptiles y peces no son receptivos (41,42).

### 3.6 Etiología:

#### 3.6.1 Características del virus:

El virus rábico pertenece al género: Lyssavirus, familia Rhabdoviridae (1,2,7,10,28,19,41,42).

Hasta fines del decenio de 1960 se pensaba que, tanto desde el punto de vista serológico como patológico, el virus rábico constituía una entidad completa. Sin embargo, el aislamiento y la identificación en Africa de varios virus semejantes al rábico que producen enfermedades similares a la rabia, han modificado este concepto y planteado interrogantes acerca de las relaciones que guardan entre sí los componentes del grupo de virus rábico (Lyssavirus) y de su diagnóstico diferencial, especialmente las cepas atípicas. Así, el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos virus, incluyendo su antigenicidad, dinámica de replicación y patogenicidad, proporciona la base para el diagnóstico diferencial y facilitar el control de la rabia y de las enfermedades semejantes a esta (47).

El género Lyssavirus se identifica con varios Serotipos:

Serotipo 1:

CVS (Challengue Virus Standard), cepa prototipo de Virus Rábico Patrón de Prueba. Incluye la mayor parte de los virus encontrados y de las cepas de laboratorio de los distintos países, así como los aislados por primera vez en roedores en Europa Central (23,47).

Serotipo 2:

Virus Murciélagos Lagos (Lagos Bat Virus o LBV), aislado de tres especies de quirópteros frugívoros en Nigeria, República Centroafricana y Sudáfrica (1,7,20).

Serotipo 3:

Virus Mokola (MOK), aislado de musarañas africanas (*Crocida* spp), de dos casos humanos y más recientemente de gatos y un perro (Foggin, 1983), en Nigeria, Camerún y Zimbabwe.

Serotipo 4:

Virus Duvenhage (DUV), aislado del hombre en Sudáfrica (1, 2,12,13,29,42,52).

Serotipo 5:

Virus Kotonkan (KON), aislado de culicoides en Nigeria.

Serotipo 6:

Virus Obodhiang (OBOD), aislado de mosquitos (*Mansonia uniformis*) en Sudán (1,13,29,47).

Los Serotipos 2,3,4,5,6 reciben la denominación de: Virus Relacionados con el de la Rabia. Ninguno de estos virus afines al rábico parecen por ahora tener mucha importancia epidemiológica, si bien MOK y DUV han causado algunos casos de enfermedad humana y muerte. El virus KOT causa, según parece, una enfermedad en bovinos similar a la fiebre efímera bovina (1,6,18, 42,53).

Los virus relacionados con el rábico pueden presentar cierto grado de reacción cruzada con el virus rábico, en las pruebas de inmunofluorescencia y fijación del complemento; por tanto, es posible cierta confusión en el diagnóstico de rabia. La introducción de estos virus de Africa en otros países complicaría el diagnóstico de la enfermedad y obligaría a preparar reactivos específicos para estos agentes. Asimismo, debe tomarse en cuenta que la vacuna antirrábica no confiere protección

contra los virus relacionados.

En los estudios comparativos de patogenia realizados en hámsters con cepas de rabia clásica, Lagos y MOK se ha comprobado que los tres virus son similares en cuanto a su tropismo y al curso de la infección. En la experimentación también se ha demostrado que ratones, hámsters, perros y monos son susceptibles a la inoculación intracerebral de los virus africanos (Lagos y MOK), y los agentes pueden volver a aislarse del cerebro y glándulas salivales; en cambio, la inoculación de esos serotipos por otras vías raramente resulta en la muerte de los animales. Las cepas aisladas de mosquitos (OBOD) son patógenas sólo para ratones lactantes inoculados intracerebralmente. En el ganado bovino, ovino, equino, como también en roedores e insectívoros del norte de Nigeria se encuentran con frecuencia anticuerpos neutralizantes para el virus KOT, aislado de *Culicoides* (1,10,28,41,42,53).

El microscopio electrónico es un instrumento fundamental para la investigación, principalmente para conocer la estructura y morfología del Virión Rábico. En un corte longitudinal con contraste negativo, el virus adopta la forma de una bala, (1,10,28,41,42,53), que mide 100 a 150 nanómetros de diámetro y puede ser de 250 a 1000 nanómetros de longitud. Tiene un borde de espículas superficiales de masa densa, ciertas partículas presentan una estructura superficial neta en forma de hexágonos dispuestos en forma de panal. La nucleoproteína interna posee forma helicoidal y se aísla de los viriones desintegrados, aparece como una hélice monocateriana orientada a la derecha, su estructura es extremadamente lábil. La envoltura viral contiene lípidos, una glicoproteína con peso molecular 80,000 daltons y dos porciones proteicas, el nucleocápside contiene 95% de proteína y una banda simple de RNA (1,10,11,13,34,53).

Se han identificado cinco polipéptidos del virus de la rabia, son: Dos nucleoproteínas (N, NS), una glucoproteína (G) y dos proteínas de membrana ( $M_1M_2$ ) (42).

El virus rábico posee dos antígenos principales: Uno interno de naturaleza nucleoproteínica que es grupo específico

y el otro de superficie que es de composición glucoproteínica y responsable de los anticuerpos neutralizantes (1,4).

Se cree que la proteína-G (la más grande) determina al parecer el serotipo (42).

Los virus relacionados con el rábico se diferencian por sus antígenos superficiales o glucoproteínicos mediante las pruebas de neutralización y de protección cruzada; también se emplean anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleocápside (13,53).

Se han sintetizado 26 péptidos que representan varios segmentos de secuencia de aminoácidos del virus de la Rabia. La transportación del virus desde la neurovirulencia hasta la atenuación, se ha podido relacionar con el reemplazamiento de Arginina por Isoleucina o por glutamina en la posición 333 de la secuencia de aminoácidos de la Glucoproteína del Virión. La infección letal por virus de la Rabia produce inmunosupresión en el animal infectado, la cual se caracteriza por la incapacidad de reaccionar las células T (citotóxicas); esta supresión parece actuar sobre el Sistema Nervioso Central (53).

Se reconocen dos tipos de cepas del virus rábico:

El "virus calle":

Es el virus recientemente aislado de los animales infectados por vía natural y que no ha sufrido modificaciones en el laboratorio. Las cepas de este virus se caracterizan por un período variable en incubación, que en algunas ocasiones es muy prolongado y por su capacidad de invadir las glándulas salivales. Produce corpúsculos de inclusión en las neuronas (1,29, 41,42,58).

El "virus fijo":

Es un virus adaptado en el laboratorio, que se ha obtenido por pases sucesivos de virus calle por inoculación intracerebral en un animal de laboratorio (conejo, ratones, etc.). En estos animales el virus calle necesita un período de incubación de 15 a 21 días. Cuando, mediante pases, se ha conseguido la fijación, el período de incubación se acorta progresivamente y se hace "fijo", de 6 a 8 días. La capacidad de cepas de virus calle es muy variada. Algunas se fijan a

los veinte pases, mientras que otras requieren cincuenta o más pases, y todavía existen algunas que no pueden fijarse. Ordinariamente las cepas más virulentas del virus de calle son las más aptas para la fijación en unos pocos pases (42).

El virus fijo se modifica también en otras características, además del acortamiento del tiempo de incubación (4 a 7 días). Se multiplica más rápidamente y en el cerebro se encuentra mayor cantidad de virus. Pierde también la mayor parte de su capacidad para formar corpúsculos de Negri (29,42) y se hace menos virulento para otros hospederos distintos del que ha servido para la fijación (42).

El virus es muy estable, no invade las glándulas salivales (1,29), y es muy difícil conseguir la vuelta al estado de virus de calle. Este tipo de virus se emplea casi exclusivamente para la producción de vacunas (28,41,42,58).

### 3.6.2 Propiedades del virus:

El virus rábico es sensible a: La ebullición, muere a los 15 minutos de calentamiento a 70°C, (32) o a 56°C durante 30 a 60 minutos (29); las radiaciones ultravioletas destruyen rápidamente al virus (29,41) la pasteurización, disolventes de las grasas (solución de jabón, éter, cloroformo y acetona), etanol al 45-70%, preparados yodados, cloruro mercúrico, formol, ácidos y bases, amonio cuaternario (29,41).

El fenol, cloroformo y el éter son eficaces, pero requieren mucho tiempo para inactivar al virus. El ácido nucleico es fácilmente inactivado por la B-propiolactona (29,34).

El virus es resistente a la desecación, congelación, descongelación repetidas (34) y es estable en un PH de 7.4 a 9.0 (29).

La liofilización conserva el virus, pero la desecación lenta lo destruye.

Las sulfamidas, penicilina y estreptomycinina no lo afectan y suelen usarse para aislarlo a partir de productos contaminados (41).

Se conserva en glicerina al 50% por un año (41,42) y por congelación por más tiempo (39). No aglutina los eritrocitos (29).

### 3.6.3 Cultivo del virus:

El virus rábico puede cultivarse en medios tisulares a base de cerebro de embrión de conejo, ratón, rata o pollo suspendidos en solución Tyrode, suero y plasma (41). Los cultivos de células renales originales de perro (BK), hamster (BHK), gato, cerdo, cobaya y línea de células diploides humanas (WI-38) permiten el crecimiento del virus (29,41,42).

Puede observarse efecto citopático en las células renales de hamster y en las neuronas de cultivos de cerebro de gato. Estas acciones, que son de presentación irregular, se observan tras varios pases. Los embriones de pollo se infectan irregularmente, pero el virus puede adaptarse para conseguir un crecimiento satisfactorio, aunque no se producen lesiones específicas. La infecciosidad para los animales se reduce por el cultivo en embriones de pollo (41).

## 3.7 Fuentes de Infección y Modo de Transmisión:

### 3.7.1 Factores que afectan la transmisión:

#### 3.7.1.1 Susceptibilidad innata de la especie:

La cadena infecciosa en la naturaleza depende mucho de la susceptibilidad del animal mordido y de la cantidad del virus presente en las glándulas salivales o en la saliva del animal atacante. El zorro es el animal más susceptible de la Rabia que se ha estudiado; la zarigüeya, un animal marsupial, por el contrario es el animal más resistente que se ha estudiado.

La susceptibilidad de los animales a la infección rábica, según el sexto informe del Comité de Expertos de la OMS en Rabia, Ginebra, 1973. Evaluada, salvo si se indica otra cosa, por inoculación intramuscular de la dosis necesaria para infectar al 50% por lo menos de los animales,\* es la siguiente:

Susceptibilidad muy alta:

Zorros, coyotes, chacales,\* lobos,\* ratas canguro, ratas de algodón (Sigmodon hispidus) y ratón común campestre.



Susceptibilidad alta:

Hamsters, mofetas, mapaches, gatos domésticos, murciélagos, lince, mangostas,\* vivérridos,\* cobayos, conejos, otros roedores y bovinos.

Susceptibilidad moderada:

Perros, ovejas,\* cabras,\* caballos y primates sub-humanos.

Susceptibilidad baja:

Zarigüeyas.

### 3.7.1.2 Presencia del virus rábico en las glándulas salivales de los animales mordedores o atacantes:

Sólo un 50% de perros rabiosos tienen virus en la saliva, mientras que aproximadamente el 95% de zorriillos rabiosos lo tienen (29).

### 3.7.1.3 Lugar de la herida:

La implicación es que en las patogénesis de la Rabia el virus tiene una mejor oportunidad de infectar si puede entrar en los tejidos nerviosos y en las fibras sensoriales, después a los nervios periféricos y al sistema nervioso central. Obviamente también es importante el tamaño de los inóculos introducidos, pero el lugar donde el material vírico es introducido es muy importante, especialmente en el hombre.

Por ejemplo el hombre tiene más fibras sensoriales en la mano, cara y cuello, así que una mordedura en estas partes está considerando un mayor riesgo (29).

### 3.7.1.4 Vacunación:

Debemos considerar si el animal mordido fue vacunado o si las personas fueron o estaban actualmente siendo vacunadas. Este tratamiento debería prevenir la transmisión (6,29).

### 3.7.1.5 El papel de los Roedores:

Se tiene información epizootiológica que indica que los roedores no juegan ningún papel significativo en la transmisión de la Rabia en ninguna parte del mundo. Se ha examinado cientos de miles de roedores

de áreas enzoóticas y epizooticas, y no se tiene evidencia de Rabia en ninguno de los animales roedores. Basados en este punto epizootiológico se puede concluir que personas mordidas por roedores, rara vez requieren tratamiento antirrábico (19).

### 3.7.2 Forma de Transmisión:

Además de la transmisión por medio de la mordedura se pueden observar infecciones humanas provocadas por aerosoles en casos de exposición natural (virus fijo); también se ha observado la muerte de carnívoros salvajes mantenidos en cavernas de murciélagos o en el laboratorio en contacto con aerosoles (virus del murciélago de cola libre).

En el laboratorio se ha comprobado asimismo la infección oral de roedores, zorros y mofetas (29).

Los huéspedes animales que mantienen el virus rábico en la naturaleza son los carnívoros y los quirópteros. Los herbívoros y otros animales no mordedores, los roedores y los lagomorfos no desempeñan ningún papel en la epidemiología.

#### 3.7.2.1 Rabia Urbana:

El perro es el principal vector de la rabia urbana. La infección se transmite de un perro a otro y del perro al hombre y a animales domésticos, por mordeduras (1,35,41,42,44,58) pero el virus puede penetrar también por inhalación y a través de las mucosas de boca y ojos (42). La mordedura se indica como causa de transmisión en el 95% de las historias y el simple contacto en el resto (48). Las mordeduras de perro no sólo constituyen la causa de la gran mayoría de casos de rabia humana en América Latina, sino también de gran cantidad de heridas que requieren tratamiento antirrábico preventivo, como atención médica y/o quirúrgica (58).

La gran densidad de perros y su alta tasa de reproducción anual son factores importantes en las epizootias de rabia canina en América Latina y en diversas regiones (29,41,42).

El período de incubación de la rabia en condiciones naturales es variable. En general, cuanto mayor sea la cantidad de virus introducido en la herida tanto más corto es el período de incubación. La situación de la herida también tiene relación con la duración del período de incubación. En perros, el período mínimo es de 10 días y el promedio de 21-60, pero puede ser de 6 meses y muy rara vez hasta un año. En el hombre, el período de incubación varía entre uno y tres meses, con un mínimo de 10 días (29, 41,42).

En varias ocasiones se ha demostrado que el virus aparece en la saliva algunos días (2 ó 3 días y a veces 13 días) antes del comienzo de la enfermedad y la eliminación del agente por esta vía puede continuar hasta la muerte del animal (1,41). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que no todos los perros rabiosos eliminan el virus por la saliva y, en consecuencia, algunas mordeduras no son infectantes. Se estima que cerca de un 60 a 75% de los perros rabiosos eliminan virus por la saliva y su cantidad varía desde apenas vestigios hasta títulos muy altos (1,27,58). Como es obvio, el riesgo de la transmisión del virus al hombre por mordeduras o abrasión es mayor cuando la dosis es más alta. Asimismo, el riesgo de contraer la infección aumenta cuando la mordedura se produce en la cara, cuello o manos y disminuye cuando es el tronco o extremidades inferiores. Muchas heridas menores, por mordedura o rasguño, no contiene suficiente cantidad de virus como para provocar la enfermedad, sobre todo si se ha inferido la lesión a través de la ropa; (1,58). La enfermedad se transmite raras veces, si la saliva no se deposita bajo la piel (32). Antes del establecimiento de los esquemas de profilaxis posexposición, se estimaba que sólo se enfermaba un 20% de las personas mordidas por perros rabiosos (1).

El virus se desplaza en dirección centripeta a lo largo de los axones de nervios periféricos, y después de su entrada en el sistema nervioso central, casi siempre por la médula espinal, su trayecto ascendente hacia el cerebro es rápido. Aunque el sistema nervioso central es sin duda la meta del virus rábico, este agente infecta también otros órganos, como por ejemplo las glándulas salivales, por movimiento centrífugo a lo largo de la vía axoplásmica, siendo tal estímulo dinámico la causa de la acumulación del virus en las secreciones bucales (42). Ordinariamente, el virus alcanza el sistema nervioso central a través de los nervios que parten de la zona de la mordedura, aunque pueden utilizar otras vías, como la corriente sanguínea (41).

En las zonas urbanas, los gatos siguen a los perros en el número de casos comprobados de rabia. Se consideran que los gatos son huéspedes accidentales del virus y quizás no desempeñan un papel importante en el ciclo natural de la enfermedad, pero pueden servir como considerable fuente de infección humana y por tanto, se justificaría la necesidad de aumentar su vacunación. Los gatos pueden adquirir la rabia de perros infectados o de animales silvestres con los cuales entran en contacto (1,58).

Cabe aquí un comentario sobre la denominada Rabia "Abortiva" en perros y el estado de Portadores. En trabajos de laboratorio no es raro encontrar que algunos ratones inoculados con virus rábico se enferman y luego se recuperan. Numerosos hechos parecen sugerir que la rabia no es siempre mortal. Casos de rabia abortiva, si bien pocos, se han descrito en varias especies animales, incluso en el hombre. En un área enzoótica de Buenos Aires, Argentina, se examinaron mediante la prueba de cerebroneutralización 1015 perros y 114 gatos que habían dado resultados negativos a las pruebas de aislamiento y de inmunofluores-

cencia para el diagnóstico de la rabia. En los especímenes de cerebro de dos perros y de un gato del total de los examinados se encontraron títulos significativos a la prueba de cerebro-neutralización (en ausencia del virus), lo que se acepta como demostración de que los animales se habían recuperado de la enfermedad, ya que en perros vacunados o muertos por rabia esta prueba es negativa (1,26,58). A juzgar por este estudio, la incidencia de la rabia abortiva es muy baja (1,58).

Un aspecto que ha suscitado controversia desde hace tiempo es la posible existencia de portadores, es decir de animales clínicamente normales que eliminan virus por la saliva. Hasta época reciente, no había una prueba fehaciente de que existiera tal estado de portador de virus rábico. Sin embargo, en Etiopía y la India, se ha podido aislar el virus de la saliva de perros asintomáticos y durante períodos muy prolongados. De 1083 perros en apariencia sanos examinados en Etiopía, 5 fueron excretadores intermitentes del virus en la saliva. En fecha más cercana, se pudo comprobar el estado de portador en una perra experimentalmente infectada, que se enfermó de rabia y luego se recuperó. Esta perra fue inoculada por vía intramuscular (con un virus aislado de la saliva de un perro en apariencia sano de Etiopía) y a los 42, 169 y 305 días después de que se hubo recuperado de la enfermedad, se aisló el virus de su saliva. A los 16 meses, después de su recuperación, esta perra murió al parir dos cachorros que nacieron muertos, y pudo comprobarse la presencia de virus rábico viable en tonsilas, pero no en el cerebro u otros órganos (1,58).

La transmisión interhumana de rabia por transplante de córnea, uno de los cuales ocurrió en los Estados Unidos y otro en Francia. Los dos casos se produjeron por no haberse sospechado de rabia en los do-

nantes. La presencia del virus rábico se ha comprobado en la córnea de animales y del hombre por la técnica de impresión e inmunofluorescencia directa (1, 35).

El virus alcanza la mayor concentración en el sistema nervioso central y en la saliva, pero también se ha demostrado en varios órganos corporales, así como en la sangre y leche de animales infectados (35, 41). La transmisión transplacentaria de rabia por infección natural fue demostrada en bovinos y en zorritos. Experimentalmente se informó esta transmisión en ratón y en murciélagos (28).

La transmisión transplacentaria sugiere que el agente tiene una fase virémica en el huésped experimental. Esto indica una mayor susceptibilidad de tejidos inmaduros (fetos y recién nacidos) a la invasión viral. Se sabe también que durante la gestación, las glándulas mamarias tienen un mayor aporte sanguíneo, que puede afectar o favorecer la diseminación viral hacia este tejido, lo cual constituye otra posible ruta de transmisión del virus a partir de la madre a los recién nacidos (18).

Experimentalmente se demostró la presencia del virus rábico en glándulas mamarias de perras, en la leche, crías lactantes de cricetos y en glándulas mamarias de murciélagos gestantes.

En forma natural el virus rábico fue aislado de glándulas mamarias del gato de Algalia (Vivera civetta) por Johnson.

No se ha obtenido información precisa que indique cómo se lleva a cabo la transmisión del virus rábico, a animales lactantes a partir de la leche materna, pero es un hecho que la transmisión del virus al feto o a los animales lactantes, juegan un papel importante en la perpetuación del virus en la naturaleza (28).

En un estudio realizado por la Facultad de Medici-

na Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, se identificó y aisló el virus rábico a partir de glándulas mamarias de 6 ovinos estabulados, provenientes del Estado de Tlaxcala, México, infectados naturalmente. También se determinó la presencia del virus en encéfalos y glándulas salivales.

Para determinar si el virus era eliminado en la leche se inocularon cuyos gestantes. La infección rábica fue reproducida en estos animales, aislándose e identificándose virus a partir de leche, glándulas mamarias, encéfalos, nervios ciáticos, nervios braquiales, glándulas salivales, médulas espinales, corazón, riñón y pulmón, al igual que de las crías sacrificadas con signos nerviosos. Se utilizaron la prueba de Anticuerpos Fluorescentes y la inoculación al ratón (28).

#### 3.7.2.2 Rabia Silvestre:

La rabia silvestre se mantiene en la naturaleza en forma similar a la urbana. Dentro de un determinado ecosistema, una o dos especies de mamíferos, en especial carnívoros y quirópteros, se encargan de perpetuar la rabia. En diferentes partes del mundo varias especies silvestres mantienen el ciclo del virus rábico en sus diferentes ecosistemas (29).

Las epizootias y enzootias entre los animales silvestres dependen sobre todo de la dinámica de la población. Cuando la densidad de la población es alta, la rabia adquiere proporciones epizooticas y muere un gran número de animales. Cuando la densidad es baja, la rabia puede presentarse en forma enzoótica o, con el tiempo, desaparecer del todo. El período variable de incubación, que en algunos animales puede ser muy largo, favorece el mantenimiento de la propagación del virus (29).

Se han encontrado anticuerpos contra el virus rá-

bico en varias especies silvestres, tales como zorros, mapaches, mangostas y murciélagos insectívoros, este hecho indicaría que la infección rábica no siempre conduce a la enfermedad y muerte. En animales poco susceptibles, tales como mapaches, la tasa de reacciones puede ser alta en el período postepizoótico. En las glándulas salivales de mangostas rabiosas se han encontrado títulos bajos de virus, y este hecho sugiere que dosis subletales de virus podrían ser transmitidas por mordedura. Incluso en especies altamente susceptibles, como los zorros, se encuentran algunos ejemplares con un título muy bajo de virus en las glándulas salivales. Se cree que la condición inmune adquirida en forma natural de una población de animales silvestres es un factor importante para que un brote epizoótico no ocurra en una especie y área determinadas. Es decir que, mientras haya una alta tasa de animales con anticuerpos puede haber transmisión esporádica del virus, pero resultaría difícil que alcance proporciones epizoóticas (29).

La Rabia del murciélago vampiro plantea en América Latina problemas de gravedad, han vivido en calidad de huéspedes exclusivos del continente americano, desde épocas muy remotas. De la gran variedad de especies de murciélagos que existen en el continente, sólo tres de ellas son hematófagas. Taxonómicamente pertenecen a la familia Phyllostomatidae, Subfamilia Desmodinae, con sólo tres géneros, Desmodus es el más abundante en su distribución y número. Diphylla, con una distribución menor, es mucho menos abundante; por lo que respecta a Diaemus, es considerado una especie muy rara y escasa (29).

La razón de la amplia distribución y número de Desmodus es debida, a que no obstante la especialización en su hábito alimenticio puede obtener su sustento de mamíferos, reptiles y aves, mientras Diphylla y Diaemus muestran una extraordinaria especialización



en sus dietas, prefieren alimentarse con sangre de aves.

En las poblaciones de murciélagos vampiros, la transmisión del virus ocurre, posiblemente, durante la lucha por el sexo o por el sitio de descanso, ya que el refugio con frecuencia es compartido con murciélagos de otras especies, la enfermedad le es transmitida por el mismo mecanismo (29).

No se ha comprobado de modo fehaciente que haya portadores entre los murciélagos, como se había creído con anterioridad; los murciélagos mueren cuando se enferman de rabia y nunca se ha aislado virus de las glándulas salivales sin que también lo hubiera en el cerebro. Se ha comprobado que algunos murciélagos podían eliminar el virus por la saliva durante 10 días o más antes de la muerte, pero tal fenómeno se ha observado en otras especies animales, y se ha aislado el agente de la saliva de mofetas por lo menos durante 18 días y en zorros durante 17. Asimismo, es de suponer que algunos murciélagos se recuperan de la enfermedad y, tal como sucede con otros mamíferos silvestres, se hallan anticuerpos neutralizantes en vampiros de áreas donde ocurren brotes de rabia bovina. En un área de Argentina, se encontraron anticuerpos en el suero de 24 de 99 vampiros examinados, sin que se comprobara la presencia de virus en el cerebro u otros tejidos, ni anticuerpos neutralizantes en el sistema nervioso central, lo que indicaría que los animales no se habían enfermado de rabia (Lord et al, 1975). Se ha sugerido que los anticuerpos séricos podrían deberse a repetidas infecciones subletales, pero faltan evidencias experimentales al respecto (28).

En los últimos años se sabe de casos humanos de rabia adquirida por vía aerógena. En una cueva de Texas, Estados Unidos, donde se refugian durante el verano millones de murciélagos de cola libre (Tadari-

da brasiliensis), ocurrieron dos casos en científicos que permanecieron en el lugar algunas horas y no recibieron mordedura alguna (Constantine, 1971). En la misma cueva, también se comprobó la transmisión por vía aerógena en coyotes y zorros encerrados en jaulas a prueba de murciélagos o artrópodos. Es probable que los aerosoles se hubieran producido por la saliva (y orina) de los murciélagos insectívoros. Asimismo, el virus fue recogido del aire de la cueva por aparatos especiales e inoculado en zorros que se enfermaron y murieron de rabia. Otro caso ocurrió en el laboratorio; la víctima fue un microbiólogo que estaba preparando una vacuna concentrada.

De modo experimental se han podido infectar animales de laboratorio por vía digestiva y se ha comprobado la infección por canibalismo en madres de ratones lactantes inoculados con virus rábico. Se cree que este modo de transmisión puede desempeñar algún papel en la propagación de la rabia entre animales silvestres. No se conocen casos humanos de rabia adquirida por ingestión, aún cuando se ha detectado el virus en la leche de algunas vacas rabiosas (1).

### 3.8 Síntomas de la Rabia:

La Rabia se manifiesta en una de dos formas: furiosa y muda o paralítica.

#### La Rabia Furiosa:

Especialmente en el perro, se caracteriza por modificación de la conducta del animal, intranquilidad, apetito transtornado, excitación (41), complejo de ataque agresivo, sialorrea, incoordinación (42), alteración de la voz, parálisis faríngea, tambaleos, parálisis general y finalmente la muerte (41). Esta, generalmente, se presenta a los 3 ó 4 días de la aparición de los síntomas.

#### La Rabia Muda o Paralítica:

Se observa frecuentemente en animales con virus fijo y, en ocasiones, en otros animales con infecciones naturales por virus de calle. Los animales que muestran este tipo generalmente tienen un corto

período de excitación seguido de incoordinación, ataxis, parálisis, deshidratación y pérdida del estado general, seguida de la muerte (41,42).

El cuadro clínico se presenta en la mayoría de los casos en tres fases:

### 3.8.1 Fase Prodromal:

Variable de algunas horas hasta 1 ó 2 días, se caracteriza por depresión, cambios de conducta (segregación de otros animales, búsqueda de sitios o lugares oscuros, etc.), alucinaciones e inmovilidad, anorexia, cese de producción, elevación de temperatura 1 a 3 grados, siendo muy raro que el animal ataque en esta fase; frecuentemente este período es confundido con trastornos digestivos, lesiones, cuerpos extraños en la boca, intoxicaciones o enfermedad infecciosa inicial (29).

### 3.8.2 Fase Excitativa:

Llamada también Rabia Furiosa, es una etapa que progresa rápidamente a la fase paralítica.

Se caracteriza por una estimulación del sistema nervioso, con manifestaciones de agresividad, expresión facial de alerta, ansiedad y pupilas dilatadas, tendencia a atacar objetos que se muevan, muerden y degluten objetos extraños, a veces se mutilan partes de su propio cuerpo (equinos).

Estimulación del tracto genitourinario, se observa con frecuencia principalmente en especies mayores, caracterizándose por micciones frecuentes, erección del pene y deseo sexual.

El bramido del bovino, así como el ladrido del perro es muy orientador en el diagnóstico clínico. El tenesmo y arqueamiento del dorso son concomitantes con la micción frecuente (29).

### 3.8.3 Fase Paralítica:

Se caracteriza por una parálisis progresiva que principia en partes altas del tracto digestivo, que dificulta al animal deglutir y masticar (parálisis faríngea y músculos maceteros), con salivación profusa y caída de la mandíbula inferior (pe-

ros). La parálisis rápidamente progresa a todas partes del cuerpo, el animal adquiere la posición decúbito, debilitándose por la deshidratación, muere por fallo cardíaco (29).

#### 3.8.4 Rabia en el Hombre:

El período de incubación dura de 2 a 8 semanas, pero puede variar desde 10 días hasta 8 meses o más. La mayor o menor duración de la incubación puede depender de la dosis de virus inyectado por la mordedura, del lugar de la misma y la gravedad de la laceración. El período de incubación es más largo cuando la herida está más alejada del sistema nervioso central (1).

La enfermedad comienza con una sensación de angustia, cefalalgia, pequeña elevación de la temperatura corporal, malestar y alteraciones sensoriales imprecisas, a menudo relacionadas con el lugar de la mordedura. En la fase siguiente de excitación, hay hiperestesia y una extrema sensibilidad a la luz y al sonido, dilatación de pupilas y un aumento de la salivación. A menudo que la enfermedad progresa, hay espasmos en los músculos de deglución y la bebida es rechazada violentamente por contracciones musculares. Esta disfunción de la deglución se observa en la mayoría de los enfermos, muchos de los cuales experimentan contracciones espasmódicas laringofaríngeas a la simple vista de un líquido y se abstienen de deglutir su propia saliva (hidrofobia) (1,42). También pueden observarse espasmos de los músculos respiratorios y convulsiones generalizadas. La fase de excitación puede ser predominante hasta la muerte o sustituida por una fase de parálisis generalizada. En algunos casos, la fase de excitación es muy corta, y en casi todo el curso predomina la sintomatología paralítica. La enfermedad dura de 2 a 6 días, aunque a veces este lapso es mayor, y de modo casi invariable termina con la muerte (1).

#### 3.8.5 Rabia en los Animales:

Se distinguen las dos formas, rabia furiosa y la paralítica o muda, según la sintomatología nerviosa predominante.

### 3.8.5.1 Perros:

El período de incubación dura de 10 días a 2 meses o más. En la fase prodrómica, los perros manifiestan un cambio de conducta, se esconden en rincones oscuros o muestran una agitación inusitada y dan vueltas intranquilos. La excitabilidad refleja está exaltada, y el animal se sobresalta al menor estímulo. Se nota anorexia, irritación en la región de la mordedura, estimulación de las vías genitourinarias y un ligero aumento de la temperatura corporal. Después de 1 a 3 días, se acentúan en forma notoria los síntomas de excitación y agitación. El perro se vuelve peligrosamente agresivo, con tendencia a morder objetos, animales y al hombre, incluso a su propio dueño; muchas veces se muerden a sí mismos, infligiéndose graves heridas. La salivación es abundante, ya que el animal no deglute la saliva debido a la parálisis de los Nervios Recurrentes Laríngeos y los Músculos de la Deglución, y hay una alteración del ladrido por la parálisis parcial de las Cuerdas Bucales, con un aullido ronco y prolongado. Los perros rabiosos tienen propensión a abandonar sus casas y recorrer grandes distancias, a la vez que atacan con furia a sus congéneres u otros animales. En la fase terminal de la enfermedad, con frecuencia se pueden observar convulsiones generalizadas; luego, la incoordinación muscular y parálisis de los músculos del tronco y de las extremidades (3,29).

La forma muda se caracteriza por el predominio de síntomas paralíticos, en tanto que la fase de excitación es muy corta o a veces está ausente. La parálisis comienza por los músculos de la cabeza y cuello; el animal tiene dificultad en la deglución y, a menudo, por sospecha de que el perro se haya atragantado con un hueso, el dueño trata de socorrerlo, exponiéndose de esta manera a la infección. Luego sobreviene parálisis de las extremidades, parálisis general y

muerte. El curso de la enfermedad dura de 1 a 11 días.

En Africa Occidental ocurre una forma particular de rabia en perros, denominada "Ouloufato", que se caracteriza por la modalidad muda de la enfermedad, con corpúsculos de inclusión diferentes a los de Negri, período de incubación corto, diarrea y parálisis progresiva, sin fase furiosa. Se considera que el "uoloufato" es un virus rábico atenuado (3,29).

#### 3.8.5.2 Gatos:

La mayor parte de las veces la enfermedad es de tipo furioso, con sintomatología similar a la de los perros; atacan súbitamente, mordiendo y arañando enconadamente. En 2 a 4 días de haberse presentado los síntomas de excitación, sobreviene la parálisis del tercio posterior (3,29).

#### 3.8.5.3 Bovino (Cabra y Oveja):

En la rabia transmitida por vampiros, el período de incubación es largo, con fluctuaciones entre 25 días y más de 150. Los síntomas predominantes son del tipo paralítico; por ello, se denomina a la enfermedad como rabia bovino paresiante o paralítica. Los animales afectados se alejan del grupo; algunos presentan las pupilas dilatadas y el pelo erizado, otros somnolencia y depresión. Se pueden observar movimientos anormales de las extremidades posteriores, lagrimeo y catarro nasal. Los accesos de furia son raros, pero se pueden notar temblores musculares, inquietud, priapismo e hipersensibilidad en el lugar de la mordedura del vampiro, de modo que los animales se rascan hasta provocarse ulceraciones. Al avanzar la enfermedad, se observan incoordinación muscular y contracciones tónico-clónicas de grupos musculares del cuello, tronco y extremidades (3,29). Los animales tienen dificultad en la deglución y dejan de rumiar. Por último, caen y no se levantan más hasta la muerte. La emaciación es notable, el morro se cubre de una

baba amarillenta y espumosa, y el estreñimiento es pronunciado. Los signos paralíticos suelen presentarse entre el segundo y tercer días después de iniciados los síntomas. La duración de la enfermedad abarca de 2 a 5 días, pero en ocasiones se extiende a 8 ó 10 días. Sobre la base de la sintomatología no se puede diferenciar la rabia bovina originada por mordedura de vampiros de la causada por perros, en especial si la ocurrencia es esporádica. Los datos epizootiológicos, tales como la presencia de murciélagos hematófagos, el hallazgo de mordeduras que ocasionan estos quirópteros, la ocurrencia de múltiples casos, la preponderancia de manifestaciones paralíticas y sobre todo la ausencia de rabia canina en la región, inducen a la sospecha de rabia transmitida por vampiros. Es de esperar que mediante la técnica de anticuerpos monoclonales se puedan hallar diferencias antigénicas, que permitan distinguir los virus transmitidos por los vampiros de los de los perros (1).

En los animales con la forma furiosa son peligrosos, atacando y persiguiendo a los otros animales y al hombre. La lactación cesa bruscamente en el ganado lechero. En vez de la habitual expresión plácida, hay otra de estado alerta. Los ojos y las orejas siguen los sonidos y el movimiento. Un signo clínico de lo más típico en el ganado vacuno es el bramido, de un carácter que difícilmente puede confundirse una vez que se ha escuchado (3,42).

El origen de la Rabia Bovina en Guatemala es principalmente canina. En una investigación realizada en Guatemala sobre la detección del virus en cerebro de murciélagos, no se aisló el virus en éstos (40).

#### 3.8.5.4 Otros animales domésticos:

La sintomatología de la rabia en equinos, ovinos y caprinos no es muy diferente de la de los bovinos. Después de un período de excitación con duración e intensidad variable, se presentan fenómenos parali-

ticos que dificultan la deglución y luego provocan incoordinación de las extremidades. Se produce una alteración del gusto y muchos animales ingieren objetos indigeribles. En todos los casos hay una alteración de la conducta. En porcinos la enfermedad se inicia con fenómenos de excitación muy violenta y la sintomatología es, en general, similar a la de los perros (1,42).

#### 3.8.5.5 Aves:

La rabia adquirida naturalmente es excepcional en esta especie (1). En los pollos adultos son resistentes al virus rábico y a menudo se recuperan. Sin embargo, en la forma mortal las plumas se rizan y el animal ataca, apareciendo después gritos roncós ataxia, parálisis y muerte (42).

#### 3.8.5.6 Animales Silvestres:

La rabia ocurre naturalmente en muchas especies de caninos y de otros mamíferos. Sobre la base de datos experimentales y algunos epidemiológicos, se considera a zorros, coyotes, chacales y lobos como los más susceptibles. Las mofetas necesitan una dosis por lo menos 100 veces mayor de virus que para los zorros, en forma experimental. El período de incubación es variable y raramente menor de 10 días o mayor de seis meses. La sintomatología clínica en zorros, mofetas y mapaches infectadas de modo experimental es similar a la de los perros; la mayoría de los animales manifiestan rabia del tipo furioso; algunos, sin embargo, presentan rabia muda. La duración de la enfermedad es de 2 a 4 días en zorros y de 4 a 9 días en mofetas. En los murciélagos, tanto hematófagos como no hematófagos, se observa rabia furiosa y a veces muda (1).

### 3.9 Patogenia:

El virus rábico, al ser inoculado por vía subcutánea o intramuscular, como sucede naturalmente por una mordedura, se propaga del



lugar de inoculación al sistema nervioso central por el axoplasma de los nervios periféricos (1). En los animales de experimentación el virus progresa a lo largo de los nervios, en sentido centrípeto, a una velocidad aproximada de 3mm por hora, análoga a la velocidad de propagación del virus de la poliomiélitis (21). La neurectomía de los nervios regionales, con anterioridad a la inoculación con un virus fijo, previenen el desarrollo de la enfermedad en un animal de laboratorio. Tiene gran importancia la comprobación experimental de que el virus permanece un tiempo más o menos largo sin propagarse en el lugar de la inoculación. En la mayoría de ratones inoculados en la almohadilla plantar con virus calle, se pudo prevenir la rabia mediante la amputación de la pata inoculada hasta 18 días después de la exposición experimental. Se comprobó que en el período anterior a la invasión neural el virus se multiplicaba en los miocitos del lugar de la inoculación. El lapso de tiempo que media entre la inoculación del virus y la invasión neural es quizás el único período en el que el "tratamiento" vacunal profiláctico posterior a la exposición puede dar resultados satisfactorios (1).

Una vez que se produce la infección del sistema nervioso central, el virus se difunde en forma centrífuga a las glándulas salivales y otros órganos y tejidos por medio de los nervios periféricos de la misma manera en que se produce la progresión centrípeto (1,28, 35).

En las glándulas salivales se han comprobado títulos víricos más altos que en el cerebro y también se han hallado títulos altos en los pulmones; esto indicaría que el agente puede multiplicarse fuera del sistema nervioso central. Se ha aislado o detectado virus en diferentes órganos y tejidos, tales como las glándulas suprarrenales, grasa parda (glándula interescapular) de los murciélagos, riñones, vejiga, ovarios, testículos, glándulas sebáceas, células germinativas de los bulbos pilosos, córnea, papilas de la lengua, pared intestinal y otros. Sin embargo, conviene tener en cuenta que la distribución del virus no es uniforme y la frecuencia de la infección de diferentes órganos es variable. Es importante señalar que siempre que se aísla el virus de las glándulas salivales, se le encontrará asimismo en el sistema nervioso central.

En varias ocasiones se pudo comprobar una viremia temprana, fu-

gaz y de bajo título, pero no se ha podido demostrar de modo fehaciente que haya una diseminación hematógena del virus y que la misma desempeñe alguna función en la patogenia de la rabia (1).

Entre las distintas cepas de virus rábico se observan pronunciadas diferencias en cuanto a la capacidad infectante, la de propagarse por el organismo y la de provocar la enfermedad. Las cepas de laboratorio de virus "fijo", que se usan en la producción de vacunas o en distintas técnicas de investigación y de diagnóstico, poseen escasa patogenicidad cuando se inoculan periféricamente en pequeñas dosis. Así pues, las pequeñas heridas punzantes que puedan producirse accidentalmente en el laboratorio mientras se manipula virus fijo no son muy peligrosas y un tratamiento de mediana intensidad bastará para disipar toda inquietud. Se considera que están en este caso cepas como las CVS, LEP y HEP; de hecho, estas dos últimas cepas, tal como se usan en vacunas liofilizadas, se han inoculado a cientos de seres humanos sin efectos adversos (34).

El virus de la calle, en cambio, se debe manipular con precaución, sobre todo en presencia de saliva que contenga hialuronidasa, a pesar de que se ha observado que las diferentes cepas de virus de la calle tienen distinta capacidad infectante por inoculación periférica. En el animal, la capacidad infectante y patogénica es sobre todo función de la dosis de virus, es decir, parece existir un umbral que debe sobrepasarse para que aparezca la enfermedad. La sensibilidad del hombre a pequeñas cantidades de virus rábico de la calle no es al parecer tan grande como la del zorro y ganado mayor, pero como se conocen casos de infección humana consecutivos incluso a heridas punzantes relativamente pequeñas, por ejemplo en los dedos, es prudente considerar que toda herida contaminada con virus de la calle puede ser muy peligrosa. En cualquier caso, todo el personal de laboratorio debe someterse a una inmunización profiláctica (34).

#### 1.10 Lesiones:

Macroscópicamente: Se ve hiperemia, edema de la piamadre y a veces algunas petequias. En animales sacrificados a menudo no son muy marcadas las lesiones.

Se encuentran en forma dispersa infiltrados tisulares y perivasculares de linfocitos, y en casos crónicos plasmocitos o sea que se ob-

serva el cuadro de una polioencefalomielitis diseminada no purulenta (29,41).

En el tejido los infiltrados celulares se aglomeran principalmente alrededor de las células ganglionares (neuronas) y a lo largo de los fascículos nerviosos. En casos crónicos las células gliales se proliferan especialmente junto a las neuronas (satelitosis), formando pequeños focos o nódulos (nódulos rabiosos de Baves). Inflamación de las glándulas salivales se presenta principalmente en la glándula submaxilar, mientras que macroscópicamente sólo se observa una hipermia y pequeñas hemorragias (29,34).

Histológicamente: Se observa un infiltrado intersticial de linfocitos y plasmocitos, especialmente alrededor de conductos excretores pequeños y medianos, así como perivascularmente. Pueden presentarse también degeneraciones epiteliales focales. Los Corpúsculos de Negri no han sido observados ni en el tejido glandular ni en la secreción salival, sin embargo se han observado en las células ganglionares interglandulares.

Las células ganglionares en la Rabia callejera (Virus de la calle) casi no presentan lesiones, sin embargo en la Rabia producida con el virus de pasajes se observan fuertes degeneraciones, neuronofagia y necrosis total.

Las vainas de los nervios periféricos presentan infiltración linfocitaria en señal de inflamación. Alteraciones similares a las del Sistema Nervioso Central se observan en los ganglios cerebrospinales y simpáticos, especialmente el ganglio nodoso del nervio vago se presenta hiperémico o inflamado. Microscópicamente se observa un infiltrado linfoplasmocitario, así como degeneración y desaparición de neuronas, esto último por medio de la neuronofagia (29,34).

El diagnóstico positivo sólo se hace cuando se encuentran los corpúsculos de Negri, que son patognomónicos, estos tienen de 1 a 27 micras de tamaño, generalmente redondos, pueden tener formas ovoides, de pera, o de triángulos con los ángulos redondeados, y son cuerpos de inclusión claramente delimitados, los cuales van aumentando de tamaño con el transcurso de la enfermedad. Por eso se aconseja no sacrificar el animal (29,34,41).

En la mayoría de los casos los cuerpos de inclusión se encuentran intracitoplasmáticamente (pueden haber 20 o más inclusiones en una

sola célula) con frecuencia en las prolongaciones citoplasmicas de las grandes neuronas del asta de Ammón, y en menor proporción en otras regiones, a veces se encuentran libres en el tejido entre las células de glía (perros 95%, gatos 75%).

Para encontrar más fácilmente estos cuerpos de inclusión en perros y gatos es mejor buscar en las astas (cuernos) de Ammón (hipocampo mayor); en bovinos y rumiantes, en general debe buscarse en las células de Purkinje del cerebelo y en las células ganglionares de la médula oblonga.

En general las células que contienen las inclusiones muestran una estructura normal (29,34).

Los Corpúsculos de Negri se reconocen porque poseen una sustancia fundamental acidófila (entre color rosa y morado) y homogénea, entre la cual se observan corpúsculos basófilos (azul-azul negro) de forma variable y con estructura interna, en el diagnóstico diferencial hay que tomar en cuenta ciertos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos que se observan ocasionalmente en el cerebro de perros, gatos y otros felinos, así como en ratones normales, pero estos son pequeños uniformemente redondos, sin estructura interna, altamente refringentes y de un color de rosa hasta rojos. Cuando estos se presentan en el asta o cuerno de Ammón se les llama corpúsculos de Luzzan, y a los que se encuentran en el Tálamo se les conoce como Corpúsculos de Loewenthal. Es de mencionar aquí corpúsculos similares a los anteriores que se observan en el Moquillo canino.

De los corpúsculos de Negri han sido aislados histoquímicamente: proteínas, alfa aminoácidos, arginina, tirosina, hierro orgánico y ácido desoxiribonucleico.

Además de los Corpúsculos de Negri se han encontrado intra y extracelularmente corpúsculos puntiformes redondos u ovoides, solos, dobles o formando cadenas, sin estructura interna, pero de una coloración acidófila al de la sustancia fundamental de los Corpúsculos de Negri (gránulos de Babes-Koch) que debieran ser también considerados patognómicos para la Rabia y se les tiene como el agente etiológico. Para algunos los distintos tamaños visibles representan fases de desarrollo del virus (29,34).

### 3.11 Diagnóstico:

No es fácil el diagnóstico de rabia, y dada la posibilidad de ex-

posición humana, la rapidez y exactitud son esenciales. Si bien reconocemos la utilidad de los signos clínicos, es necesaria precaución extrema durante el examen antes de la muerte. Si el animal parece sano y está vivo es indispensable cuarentena y observación en cuanto a signos clínicos, y si estos no aparecen en 14 días, puede considerarse el caso negativo. Ahora bien, si el animal muere en cuarentena, o si ya mostraba signos en el momento de la mordedura, es imperativo el envío de muestras de tejidos para el diagnóstico de laboratorio, mientras que las personas mordidas deben ser tratadas inmediatamente sin esperar confirmación. El animal que padece rabia suele morir en dos o tres días, y si tal cosa no ocurre, no debe sacrificarse; al morir debe ser enviada la cabeza para el diagnóstico de laboratorio (42). El sacrificio prematuro de esos animales disminuiría la precisión del diagnóstico de laboratorio, ya que los Corpúsculos de Negri se desarrollan en el tejido cerebral en relación directa con la duración del proceso clínico de la rabia (34).

Si las circunstancias obligan a sacrificar el animal, se le matará de un tiro en el corazón, pues un disparo en la cabeza lesionaría el encéfalo y reduciría su utilidad para el diagnóstico. No se recomienda el empleo de venenos químicos, que ulteriormente pueden causar dificultades en las pruebas de inoculación animal (34).

### 3.11.1 Empaquetado y envío de la Muestra:

Una vez decapitado el animal sobre el terreno, la cabeza se enfría con rapidez y se mantienen a baja temperatura. Lo mejor es hacer el envío con un mensajero, pero si no es posible, se empaquetará para su expedición urgente por vía terrestre o aérea. Se coloca la cabeza en una lata o en otro recipiente metálico impermeable adecuado, que se cierre herméticamente y se coloca, a su vez, dentro de un envase metálico impermeable de mayor tamaño, llenando con hielo machacado el espacio que queda entre los dos recipientes. El paquete se ha de rotular con claridad y enviar al laboratorio con la máxima urgencia (29,34,56).

Para el envío de las cabezas al laboratorio pueden asimismo utilizarse bolsas de plástico grueso y una caja de cartón. Se debe emplear una bolsa interior de un grosor de 0.01 cm.

y de un tamaño de unos 45 cm. por 100 cm., de forma que tenga profundidad suficiente para que su extremo abierto se pueda retorcer y anudar firmemente una vez colocada la muestra en el interior. Si la cabeza tiene aristas o salientes agudos, como huesos astillados o púas de puerco espín, se debe envolver primero en varias hojas de papel de periódico y colocar después en la bolsa. Esta bolsa interna anudada, que contiene la cabeza, se introduce después en una bolsa exterior mayor, de doble pares, llena de trozos de hielo hasta un tercio de su volumen. La bolsa doble exterior está formada por dos sacos plásticos, uno dentro de otro, de unos 0.008 cm. de grosor, 60 cm. de anchura y 120 cm. de profundidad. Se agrega después más hielo triturado hasta recubrir la bolsa de la muestra y a continuación se cierra herméticamente el saco exterior doble, de mayor tamaño, retorciendo y anudando el extremo abierto. Se introduce todo el paquete en una caja de cartón corrugado que tenga la base cuadrada de 25 cm. por lado y 45 cm. de altura, se cierra con todo cuidado utilizando cinta de plástico autoadhesiva de 8 cm. de ancho para asegurarse de que los bordes de las cubiertas superior e inferior de la caja queden perfectamente cerrados (29,34,56).

El tiempo de transporte debe ser tan breve como sea posible, ya que el cerebro es un tejido que entra en autólisis en un tiempo corto, además de la probable contaminación bacteriana (56).

En los casos en que se envían secciones del Sistema Nervioso Central la muestra debe contener por lo menos 3 a 5 gramos. Existen soluciones que se pueden usar como medio de transporte sin refrigeración estricta, pero no es lo más recomendable (PBS, Glicerina al 50% en suero fisiológico). Es importante destacar que la muestra puede ser congelada, pero nunca debe ser puesta en desinfectantes, para su envío al laboratorio microbiológico (56).

Aunque con la congelación de la muestra y su envío en recipientes de nieve carbónica (dióxido de carbono sólido) o de nitrógeno se conserva el virus, no se puede hacer un examen microscópico rápido a causa del tiempo necesario para la des-

congelación. Los fragmentos congelados del encéfalo y de las glándulas salivales se manejan en el laboratorio con más facilidad que las cabezas enteras congeladas. Inmediatamente después de la descongelación se preparan los tejidos para el examen microscópico directo de los Corpúsculos de Negri, la prueba de anticuerpos fluorescentes o la prueba de inoculación al ratón (34).

Cualquier tipo de muestra en donde se sospecha de rabia debe ir perfectamente identificado en donde sea visible, y con una etiqueta de advertencia que diga: "PRECAUCION, ESTE PAQUETE CONTIENE LA CABEZA DE UN ANIMAL Y/O MUESTRA DEL QUE SE SOSPECHA HA MUERTO DE RABIA" (34,42).

Cuando se reciben muestras de animales sospechosos de rabia para su correspondiente examen, conviene disponer de los siguientes datos:

- 3.11.1.1 Especie y raza del animal.
- 3.11.1.2 Posibles contactos con otros animales o personas.
- 3.11.1.3 Si ha fallecido a causa de la enfermedad o ha sido sacrificado, y en este último caso, de qué manera fue sacrificado.
- 3.11.1.4 Si se le ha mantenido encerrado y en observación durante un período suficiente antes de la muerte. Y en caso afirmativo, la duración del período.
- 3.11.1.5 Síntomas de rabia, en casos que existan.
- 3.11.1.6 Antecedentes de vacunación antirrábica (34).

El establecimiento de laboratorio de Diagnóstico en países desarrollados tienen dos objetivos:

- 3.11.1.7 El Diagnóstico de Rabia a los animales sospechosos, para implementar tratamiento preventivo a personas expuestas.
- 3.11.1.8 Determinación de los títulos de Anticuerpos en personas vacunadas por correr alto riesgo, como los Laboratoristas y Médicos Veterinarios. Así como los títulos de protección a personas inmunizadas por exposición con animales rabiosos (35).

### 3.11.2 Métodos de Diagnóstico:

#### 3.11.2.1 El diagnóstico de laboratorio incluye:

3.11.2.1.1 Identificación del Corpúsculo de Negri en células del hipocampo teñidas por los métodos de Giemsa o Seller.

3.11.2.1.2 Si no se encuentra cuerpos de Negri, procede inocular intracerebralmente ratones destetados con la suspensión de cerebro, técnica con la cual suelen aparecer signos en seis a 15 días, aunque pueden demorarse hasta tres semanas. Los ratones suelen morir uno o dos días después del comienzo de los signos clínicos, si bien en algunos casos es preciso esperar hasta 21 días. Cabe efectuar el diagnóstico temprano por examen de los cerebros de ratón en busca de cuerpos de Negri cinco a seis días después de la inoculación.

3.11.2.1.3 La prueba de anticuerpos fluorescente (FA), ampliamente usada, es el método preferido y se emplean para la misma; frotis de cerebro (29).

#### 3.11.2.2 Histopatología:

Es el método de diagnósticos más rápido, simple, cómodo y económico. Consiste en detectar los Corpúsculos de Negri con la ayuda de un colorante adecuado, mediante un examen microscópico. Se utilizan muchas tinciones como las de: Sellers, May-Grunwald, Mann, Giemsa, Mann Modificado, etc. (1,34).

A la media hora de haberse recibido la muestra ya puede darse un diagnóstico positivo basado en la observación de los Corpúsculos de Negri. Si el resultado es negativo, habrá que recurrir a la técnica de anticuerpos fluorescentes, si se emplea la misma, y comenzar la prueba de inoculación al ratón (34,41).

Este método se utiliza más en los países en desarro-



llo, aunque es menos sensible, un investigador experimentado puede obtener un diagnóstico correcto en 80 a 90% de los casos, sobre todo en perros muertos de rabia furiosa. La detección de los corpúsculos de Negri mediante las tinciones, asegura el diagnóstico de rabia, pero cuando no se encuentran esas inclusiones no se puede excluir la posibilidad de la infección.

Se recomienda no limitar los exámenes al tejido nervioso sino también investigar la presencia del virus en las glándulas salivales, en especial las submaxilares (1).

El hallazgo de corpúsculos de inclusión específicos o del antígeno rábico maxilares reviste especial importancia para el tratamiento. El examen de esas glándulas es imprescindible, ya que la detección del virus rábico en el cerebro de un animal cuando sus glándulas salivales están exentas de él alivia un poco la inquietud inherente al tratamiento de una persona expuesta, pero no excluye del todo la posibilidad de que se hubiese excretado en el momento de la mordedura (34, 62).

En los animales sacrificados en las primeras fases de la rabia se encuentran a veces corpúsculos de inclusión intracitoplásmicos atípicos, por lo cual es indispensable mantener en cuarentena los perros mordedores y sospechosos, en lugar de sacrificarlos inmediatamente y enviar el encéfalo al laboratorio de diagnóstico. Ya que podrá observarse la sintomatología de la rabia, lo que permitirá efectuar el diagnóstico clínico de la enfermedad, y cuanto más tiempo viva el animal mayores serán las probabilidades de hacer un diagnóstico microscópico. En la rabia, la duración del proceso clínico guarda relación directa con el tamaño, la abundancia y el grado de desarrollo de los corpúsculos de Negri. Por ello, si se deja que la enfermedad evolucione plenamente es probable que los

corpúsculos de Negri sean más abundantes y estén totalmente formados, con una buena estructura interna.

Los laboratorios de diagnóstico encuentran a veces en los encéfalos de animales otros tipos de inclusiones que, a causa de ciertas analogías, pueden confundirse con los corpúsculos de Negri, puede servir de guía en esa diferenciación el siguiente esquema:

Corpúsculos de Negri:

1. - Presencia de gránulos interiores basófilos.
2. - Matriz heterogénea.
3. - Menos refringentes.
4. - Color rojo violáceo (heliotropo).

Corpúsculos de Inclusión diferentes a la rabia:

1. - Ausencia de estructura interna.
2. - Matriz homogénea.
3. - Más refringentes.
4. - Color más acidófilo (más rosado)

3.11.2.3 Inoculación intracerebral de ratones:

En vista que no siempre se puede encontrar los Corpúsculos de Negri en el cerebro de animales muertos por Rabia, es conveniente realizar la prueba biológica en aquellos casos en que los cerebros fueron negativos por el Método Histopatológico (34).

Antiguamente se creía que el cobayo y el conejo eran los animales de laboratorio más apropiados para esta prueba, pero desde que se demostró que el ratón albino suizo, era altamente susceptible a la inoculación intracraneal del virus rábico el cual producía en él una infección típica y constante; los diferentes laboratorios de diagnóstico lo utilizan en la prueba biológica (34).

La inoculación intracerebral de ratones para aislamiento del virus sigue siendo una de las pruebas más útiles para el diagnóstico de la rabia. El ratón lactante es el animal más susceptible a la prue-

ba de inoculación. Se recomienda el empleo de ratones lactantes de hasta tres días, ya que son más sensibles que los animales de mayor edad (1). Los ratones más apropiados son aquellos con una edad de 21 a 35 días (3 a 5 semanas) (29,34,62), con un peso de 8 a 12 gramos, por ser más fáciles de manejar, inocular, mantener y observar; sin embargo en algunos laboratorios, emplean ratones de menor edad, donde se puede acortar un poco el período de incubación.

Para la inoculación se prepara una suspensión de tejido cerebral (corteza, cuerno de Amón, cerebelo y médula) o glándula salival. Se debe agregar antibióticos para prevenir la eventual contaminación bacteriana, siendo los de elección: Penicilina (500 U.I.) y Estreptomina (2 mg. ó 1560 U.I.) por mililitro de suspensión total, dejándolos que actúen por 30 minutos, antes de la inoculación (29).

La suspensión de tejido cerebral y glándulas salivales se deben centrifugar por 5 minutos a 1000 g con el objeto de eliminar las partículas gruesas. Se inoculan intracerebralmente cinco a seis ratones (1) algunos aconsejan utilizar 15 a 20 ratones (34). El lugar de la inoculación debe ser el vértice de un ángulo imaginario, cuyos lados se dirigen al ángulo externo del ojo y ángulo interno de la base de la oreja del ratón. La dosis a inocular es exactamente de 0.3 ml. por ratón (29,35).

Todos los ratones inoculados se colocan en las jaulas correspondientes, debidamente identificados y aquellos que mueren en las primeras 24 horas se eliminan, por considerarlo como muerte por traumatismo.

Los síntomas aparecerán en los ratones entre el 8° y 10° días a veces llega al 12°, 14° y hasta el 21° día, por lo que siempre deben observarse los ratones inoculados por 30 días. Los animales enfer-

mos presentan: pelo hirsuto, temblores cuando se les sostiene por la cola con una pinza, dorso incurvado incoordinación del tren posterior, parálisis, postración y muerte (29,35).

Para fines de diagnóstico se pueden sacrificar diariamente uno o dos ratones a partir del quinto día postinoculación, con el objeto de buscar en el cerebro los Corpúsculos de Negri (29,41).

Esta prueba rinde los mejores resultados si se combina con la prueba de inmunofluorescencia directa (1).

#### 3.11.2.3.1 Ventajas de la Prueba:

- Alta sensibilidad. El ratón blanco es altamente sensible al virus.
- No necesita de equipo sofisticado.

#### 3.11.2.3.2 Desventajas de la Prueba:

- Existencia de un Bioterio.
- Tiempo muy largo para dar el diagnóstico, de 8 a 21 días (36).

#### 3.11.2.4 Prueba de los anticuerpos fluorescentes (AF) o Inmunofluorescencia directa:

En la actualidad, la prueba microscópica más exacta para el diagnóstico de la rabia es la de los Anticuerpos fluorescentes. Debieran practicarla todos los laboratorios que se ocupan de esta enfermedad, pero para ello, se necesita una experiencia considerable, una práctica más o menos constante, reactivos y materiales adecuados. A cargo de personas competentes, la prueba es rápida, relativamente poco costosa y más exacta que la prueba de inoculación al ratón o que el examen de extensiones o cortes con los procedimientos recomendados. Se pueden examinar materiales recientes, congelados o glicerizados. En la mayor parte de los casos se puede llegar a un diag-

nóstico exacto al cabo de algunos minutos y horas, mientras que el examen de cortes o la inoculación en ratones requieren días o semanas (34).

Esta prueba se basa en una reacción antígeno-anticuerpo in vitro (29,36). El procedimiento consiste en marcar el anticuerpo con un fluorocromo, dejar que el anticuerpo marcado reaccione con el antígeno específico cuya presencia se quiere determinar y observar el resultado de la reacción con un microscopio de fluorescencia. Se dice que una sustancia es fluorescente si, después de adsorber energía luminosa de una determinada longitud de onda, emite luz de una longitud de onda diferente (1,29,34,35,41,62).

Los antígenos que reaccionan con anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína, el colorante más empleado en la rabia, aparecen a la luz ultravioleta como partículas brillantes de color verde manzana o amarillo verdoso sobre un fondo oscuro, que puede contener o no material fluorescente no específico (34).

La utilización de filtros puede modificar las características y la intensidad del color. El isotiocianato de fluoresceína se puede adquirir en el comercio en forma de polvo y se conserva largo tiempo sin deteriorarse.

El microscopio de fluorescencia es un microscopio ordinario de buena calidad provisto de un condensador de campo oscuro y un emisor de luz ultravioleta. Como sólo una pequeña parte de la radiación incidente se transforma en luz fluorescente, la observación se hará en una habitación poco iluminada, con un foco luminoso lo más intenso posible; se utilizan filtros de excitación y de barrera. Debe considerarse la conveniencia de emplear un condensador para campo oscuro seco, ya que así no es necesario emplear aceite entre el porta objetos y las lentes an-

teriores del condensador ordinario. El empleo de mucho aceite en el microscopio puede presentar riesgos, ya que con los métodos de preparación de las muestras, no se inactiva el virus rábico.

Como la prueba de los anticuerpos fluorescentes permite descubrir el antígeno, sea inactivado o vivo, es posible que en algunos casos se obtengan resultados positivos en la prueba de la fluorescencia y negativos en la inoculación al ratón (34).

El Comité de Expertos de la OMS en Rabia, recomienda que al introducirse esta prueba en un laboratorio debe usarse en forma simultánea con la inoculación en ratones lactantes, durante un año, como mínimo (1). La prueba de fluorescencia es a este respecto, más sensible que la de inoculación (34).

También se recomienda inocular ratones con material de cerebro de un animal sospechoso que ha mordido a una persona, si la prueba de inmunofluorescencia resulta negativa (1).

Los errores son en general atribuibles a deficiencias del material o del conjugado, a la falta de preparaciones testigo, inexperiencia del encargado de interpretar las preparaciones, empleo de un equipo defectuoso o mal regulado, fluorescencia inespecífica, baja progresiva e inadvertida de la iluminación por deterioro de la lámpara, utilización de testigos inadecuados o percepción anormal de los colores por parte del operario. Se ha de evitar que el tejido procedente de una preparación positiva se adhiera a otra que sea negativa (34).

#### 3.11.2.4.1 Ventajas de la prueba:

- Alta sensibilidad 99%,
- Alta especificidad 99.8%,
- Exactitud.
- Rapidez, se puede obtener el resultado en

dos horas (1,54).

- Demuestra el antígeno viral infectante o no, en contraste con los métodos de tinción directa que revelan únicamente las inclusiones celulares (54).
- Puede usarse esta prueba, en pacientes o el animal rabioso que está aún con vida (1,29).

#### 3.11.2.4.2 Desventajas de la prueba:

- Inversión inicial muy alta.
- Necesita de personal bien entrenado (54).

#### 3.11.2.5 Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta:

Es útil para la detección inicial de Anticuerpos en muestras de suero, pero para ello es necesario que la antiglobulina específica de la especie de que se trate se conjugue con el Isotiocianato de Fluoresceína (34).

#### 3.11.2.6 Prueba del Índice de Neutralización del Virus:

Es el método más exacto para determinar la especificidad del virus rábico y para ello debe combinarse con la técnica de los anticuerpos fluorescentes. Además, esta prueba se puede utilizar para descubrir la presencia y la cantidad de anticuerpos en un suero, aunque en tales casos es preferible la técnica de diluciones del suero y cantidad constante de virus. Como es necesario aguardar por lo menos 14 días hasta la lectura del resultado, la prueba de neutralización del virus no sirve para el diagnóstico rápido.

Para identificar un virus desconocido por la prueba del índice de neutralización del virus, se titula con suero normal y con un suero inmune conocido. Si el suero antirrábico neutraliza el virus problema y el suero normal no, se puede concluir que se tra-

ta de una cepa de virus rábico. Es importante someter todas las colecciones estándar de virus rábico a la prueba del índice de neutralización del virus para determinar si esas colecciones contienen contaminantes víricos procedentes de los animales o de los sistemas de cultivo tisular usados para obtener el virus (34).

#### 3.11.2.7 Prueba de fijación del complemento: (PFC)

La prueba de fijación del complemento, tan importante y utilizable en el diagnóstico de muchas virosis (Fulton, 1958), hasta la fecha no ha resultado muy útil para el estudio y el diagnóstico de la rabia. Si se quiere obtener resultados fidedignos es necesario usar un antígeno concentrado y puro para la demostración del anticuerpo FC, o antisueros mono-específicos con un título elevado de anticuerpos para la demostración del antígeno FC (34).

#### 3.11.2.8 Otras Técnicas:

Para aislar y detectar el virus de la rabia en un laboratorio de investigación pueden utilizarse otras muchas técnicas que, sin embargo, no son adecuadas para el diagnóstico. El aislamiento en el virus rábico en diversos sistemas de cultivo tisular y el examen con microscopio electrónico de material cerebral pueden ser útiles para el estudio de la rabia, pero las pruebas que antes se descubrieron son mucho más fáciles para los laboratorios de diagnóstico (34).

#### 3.11.3: Técnicas para detectar Anticuerpos en Suero Sanguíneo:

Las pruebas serológicas se usan habitualmente para conocer la capacidad inmunogénica de las vacunas y la respuesta inmune de personas sometidas a un régimen de pre o postinmunización. Todas las pruebas que miden anticuerpos neutralizantes son útiles para conocer el grado de resistencia contra la in-



fección (34).

### 3.11.3.1 Prueba de la Hemaglutinación Pasiva para los Anticuerpos de la Rabia:

Es un nuevo método de medición de los anticuerpos de la rabia que ofrece algunas ventajas evidentes sobre otras pruebas hoy en uso. Una vez preparado un antígeno satisfactorio, puede efectuarse en unas horas e indica con rapidez la respuesta inmunológica (34).

Los sueros problema se inactivan por calentamiento a 56°C durante 30 minutos y después se adsorben sobre un volumen igual de suspensión al 1% de eritrocitos de ganso normales lavados. Se incuban a 37°C durante 30 minutos y después se centrifuga a 1000 g. durante 10 minutos, para separar los eritrocitos de los sueros. Con los sueros se prepara una serie de diluciones dobles, empleando un diluyente de albúmina de suero bovino al 0.4%, borato sódico 0.05 M y solución de cloruro sódico al 0.86%, Ph 9. Se colocan los sueros en las microplacas con micropipetas de 0.025 ml. de capacidad, se agrega el diluyente en fracciones de 0.025 y se hacen diluciones dobles del suero utilizando microdiluidores de 0.025 ml. Se depositan los eritrocitos sensibilizados (0.05 ml.) en cada cavidad y las placas se cierran herméticamente con cinta adhesiva, manteniéndolas a 4°C durante una hora aproximadamente antes de leer la posible hemaglutinación. El resultado es negativo si en el fondo de la cavidad se observa un conglomerado de hematíes claramente definido. Cuando la respuesta es positiva se forma un anillo de eritrocitos en las paredes de las cavidades o pueden verse grumos de hematíes aglutinados.

La prueba de hemaglutinación pasiva es rápida, su técnica es fácil y da títulos que guardan una correlación satisfactoria con los que se obtienen en las

pruebas de neutralización realizadas con sueros humanos en el período postvacunal tardío.

Para medir la respuesta inmunológica precóz (macroglobulinas específicas de la rabia o anticuerpos Ig M) la prueba de hemaglutinación pasiva es más sensible que la prueba de neutralización del suero (34).

### 3.11.3.2 Técnica de Difusión en Gel:

En esta técnica es necesario que el antígeno que interviene en la reacción contenga suficiente virus y que la concentración del anticuerpo sea asimismo suficiente si se quiere obtener un precipitado visible con esa reacción (34).

3.11.3.2.1 Si se trata de identificar anticuerpos desconocidos: (por ejemplo, para el diagnóstico de la rabia latente en perros de zonas donde esa enfermedad es enzoótica), es necesario disponer de un antígeno rábico suficientemente concentrado para que reaccione. En esos casos, por lo tanto, se hace reaccionar el suero problema con un antígeno preparado con encéfalos de ratones lactantes inoculados con una cepa muy virulenta de virus fijo de título elevado, con un antígeno antirrábico concentrado preparado en cultivo tisular.

3.11.3.2.2 Si se trata de identificar un virus desconocido: (por ejemplo en encéfalos de perros sospechosos de rabia, que han sido sacrificados y que se examinan para confirmar el diagnóstico después de haber observado los Corpúsculos de Negri o para obtener evidencias adicionales en casos dudosos o negativos), es necesario disponer de un suero hiperinmune preparado mediante la inmunización del animal donante con un virus rábico obtenido de una especie animal distinta de la

estudiada.

La técnica de difusión en gel exige una ejecución cuidadosa, es a la vez específica y sensible.

Sin embargo, tiene sus limitaciones; por lo tanto no puede considerarse en la actualidad del todo fidedigna. Un resultado positivo permite el rápido diagnóstico de la rabia o de la presencia del anticuerpo rábico, pero un resultado negativo no excluye necesariamente la rabia ni la presencia de los anticuerpos correspondientes.

La reacción positiva se interpreta cuando se ve una doble línea de precipitación que se extiende entre el suero específico y la cavidad con el antígeno (34).

### 3.11.3.3 Radioinmunoensayo para Anticuerpos Antirrábicos: (RIA)

Es un nuevo método inmunológico de detección y evaluación de los anticuerpos específicos de la rabia, que se basa en la capacidad de esos anticuerpos de fijar el antígeno del virus rábico marcado con I. Parece ser el más sensible de los métodos de investigación de anticuerpos hoy en uso y muy útil para la detección de los anticuerpos que se forman rápidamente tras la administración de las vacunas antirrábicas modernas, concentradas y purificadas, obtenidas en cultivo tisulares; estos anticuerpos no se detectan por los métodos clásicos de neutralización del virus, fijación del complemento o inmunofluorescencia.

Para simplificar los métodos inmunológicos y aumentar su precisión pueden marcarse los antígenos con isótopos radioactivos, lo que permite determinar cantidades de reactivos mucho más pequeñas que con los demás métodos.

La proteína pura del antígeno se marca in vitro

por adición de un átomo extraño, en general de cromo o de yodo.

El método se basa en la observación de que la inmunoglobulina conserva sus propiedades antigénicas cuando forma un complejo con un antígeno (34).

#### 3.11.3.4 Prueba de Seroneutralización o Neutralización en Ratonos (SN):

El método consiste en una serie de diluciones del suero problema frente a un virus constante, previamente titulado. El método se utiliza sobre todo para la titulación y el ensayo de la potencia de inmunoglobulina y suero antirrábicos terapéuticos, pero asimismo aplicable a cualquier suero que contenga anticuerpos antirrábicos; por consiguiente puede servir para determinar los títulos de anticuerpos de sueros humanos tomados en el curso de ensayos terapéuticos de distintas vacunas (21,25,31,34).

- a) Para la determinación de los anticuerpos por medio de la prueba SN, los sueros se inactivan durante 30 minutos a 56°C, se preparan diluciones seriadas de los sueros problemas, utilizando el factor de dilución 1:5; empleando como diluyente suero equino al 2%. Las diluciones iniciales son: 1:2.5; 1:5; 1:25 y 1:125.
- b) Se mezclan volúmenes iguales de cada dilución y de una suspensión de virus CVS que contenga entre 10 a 100  $DL_{50}/0.03$  ml. De esta manera las diluciones finales son: 1:5; 1:25; 1:125 y 1:625.
- c) Para la Titulación del Virus, se preparan tres diluciones decimales a partir de la dilución inicial, que contengan las dosis letales<sub>50</sub> requeridas.
- e) Luego los sueros se enfrían, sumergiéndolos en Baño de Hielo, y por vía intracerebral se inocula 0.03 ml de cada una de las diluciones en seis ratones de 3 a 4 semanas de edad, comenzando por la dilución menor del suero.

- f) Para la titulación del virus se inocula diez ratones con las cuatro diluciones correspondientes, iniciando la inoculación con la mayor dilución del virus.
- g) Los ratones albinos suizos se observan durante 14 días postvacunación, registrando diariamente la evolución de los síntomas y las muertes presentadas.
- h) Se calcula el Título del suero como la máxima dilución del suero que protegió al 50% de los ratones inoculados, mediante el Método de Reed y Muench. Cuando no se detecta el título final con las diluciones normales, se incrementan éstas, manteniendo el factor de dilución 1:5 (12,21,25,31,34).

#### 3.11.3.5 Prueba de Contrainmunoelectroforesis (CIE):

Esta técnica es similar a la Inmunolectroforesis, aunque más sensible, rápida y requiere menor cantidad de reactivos. Es una combinación de la electroforesis y la inmunodifusión en gel de agar.

Tanto el antígeno como el anticuerpo simultáneamente son sometidos a la acción de un campo eléctrico en un gel de agar con pH 8.2; en estas condiciones, los anticuerpos, que tienen una carga muy pequeña y por consiguiente no deberían haber movimiento electroforético; se desplazan hacia el polo negativo (cátodo) a causa del fenómeno conocido como movimiento Electroendosmótico. Este efecto es debido principalmente a que el agar en un medio alcalino tiene carga negativa, lo que hace que el agua se cargue positivamente y migren hacia el cátodo arrastrando las moléculas que se encuentran en solución, sobre todo las que no tienen carga. Al mismo tiempo, el antígeno de carga negativa debido a la corriente eléctrica, se dirige hacia el polo positivo (ánodo). En esta forma el antígeno y el anticuerpo se encuentran y reaccionan formando una línea de precipita-

ción (43).

La técnica se ha utilizado para detectar anticuerpos contra *Brucella* en líquido cefalorraquídeo (24), como Diagnóstico de la Meningitis Bacteriana (5), detección de Rotavirus en las heces de Bovino (43) y para la determinación de anticuerpos antirrábicos (21, 22).

Se ha comprobado que hay una relación directa entre la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de las personas y animales inmunizados contra la rabia y la protección frente a la infección. Por ello, su determinación es de gran utilidad para conocer el estado inmune tanto del hombre como de los animales, para establecer el diagnóstico de la enfermedad y para realizar estudios seroepidemiológicos (16, 21).

Desde que en 1935 se describió la primera prueba serológica para determinar anticuerpos antirrábicos (15,38), se han desarrollado muchas otras, algunas de las cuales detectan anticuerpos dirigidos contra la Ribonucleoproteína viral, tales como las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (21,55), fijación de complemento, inmunoprecipitación, el radioinmunoensayo y el método inmunoenzimático (ELISA) (21).

Otras técnicas miden anticuerpos inducidos fundamentalmente por la glucoproteína (Proteína G) presente en la envoltura viral, por ejemplo: La prueba estándar de Seroneutralización en ratones (SN) y las de reducción de placas, inhibición rápida de campos fluorescentes (ICF o RFFI siglas en inglés) y hemo-adsorción. A este grupo se han incorporado la técnica de Contrainmunolectroforesis modificada (CIE) (21, 22). Cuando se estudiaron comparativamente sueros de personas que recibieron tratamiento antirrábico después de la exposición, se observó una correlación entre los resultados obtenidos por la CIE y las téc-

nicas de SN, e ICF (21).

La técnica de Contrainmunolectroforesis se basa en la unión de los anticuerpos antirrábicos presentes en diluciones variables de un suero problema con una cantidad constante de antígeno (virus rábico inactivado). La reacción se pone en evidencia mediante una corrida electroforética simultánea de las mezclas antígeno-anticuerpo y de un suero antirrábico hiperinmune (suero Indicador).

La presencia de bandas de precipitación indica que no hay anticuerpos antirrábicos en el suero problema, por lo cual el antígeno libre reacciona con el suero indicador (21,55).

Se considera como título del suero la mayor dilución que no produjo bandas de precipitación cuya forma, tamaño y ubicación fueran comparables con las del sistema de referencia utilizado en la prueba (22).

En un estudio que participaron cuatro laboratorios que utilizaron los mismos reactivos estandarizados y sueros codificados en el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO); se evaluaron la reproducibilidad de la técnica de contrainmunolectroforesis (CIE) para la determinación de anticuerpos antirrábicos. Los títulos de los sueros obtenidos en pruebas de seroneutralización en ratón que se realizaron en el CEPANZO se compararon con aquellos obtenidos por CIE en los otros laboratorios. Los resultados demostraron que la sensibilidad y especificidad de la técnica fueron adecuadas, además confirman que la CIE es una técnica reproducible y confiable para la titulación de anticuerpos en el suero de personas inmunizadas contra la rabia. Se pudo confirmar que es posible estimar los títulos de anticuerpos neutralizantes en función de los que se obtienen por CIE. En este estudio demuestra, por último, que por su reproducibilidad, sensibilidad y especificidad satisfactorias, la técnica de CIE puede resultar útil a aquellos laboratorios

de diagnóstico de rabia que necesiten realizar controles serológicos rápidos y económicos (22).

En otro estudio realizado para evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica Contrainmunolectroforesis (CIE) y los test de Anticuerpos Fluorescentes Indirectos (IFA) comparados con los test de Seroneutralización (SN) para la detección de anticuerpos al virus rábico. Los resultados obtenidos por la técnica CIE se correlacionaron bien con los test de SN, esto es debido a que ambos test cuantitativos han mostrado ser principalmente medidores de anticuerpos de inmunoglobulina G (Ig G) y otro factor es que el método usado para su preparación e inactividad, el antígeno parece reconocer los anticuerpos neutralizantes.

Además, la línea obtenida en la regresión lineal concluyeron que los títulos de suero de SN podría estimarse en base a los resultados de CIE (16,19).

La realización del sistema CIE es una técnica sencilla y requiere aproximadamente la misma cantidad de tiempo que el test de IFA, el CIE es más sensible que el IFA para la determinación del status inmunológico de individuos que habían recibido inmunización rábica. La sensibilidad de la técnica CIE es comparativo al del SN, además la CIE permite determinaciones cuantitativas de títulos de anticuerpos séricos de rabia en 4 horas aproximadamente, en relación de 15 días que requiere el de SN (15,19,20).

Actualmente El Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) está desarrollando la técnica de CIE para la detección de antígenos en Vacunas Antirrábicas (33).

Dentro de las principales utilidades prácticas de la prueba de Contrainmunolectroforesis están:

1. Control constante de todo personal de laboratorio o de campo, involucrado con el diagnóstico o prevención de la rabia.
2. Como método de estudio, en la producción de nuevos



tipos de vacuna antirrábica, basándose en la respuesta inmune que produce.

3. Como método de control epidemiológico de la rabia en murciélagos vampiros. Dicho control se ha venido desarrollando satisfactoriamente en Argentina, ya que con la detección de anticuerpos antirrábicos en los vampiros, se ha podido anticipar a brotes de rabia en bovinos (55).

### 3.11.3.5.1 Preparación de Reactivos: (12,21)

#### 3.11.3.5.1.1 Solución de Sacarosa 7.5%

H<sub>2</sub>O bidestilada ..... 100 ml.  
 Sacarosa ..... 7.5 g.  
 Esterilizar por filtración.

#### 3.11.3.5.1.2 Solución "Salina Amortiguada pH = 7.2

Na<sub>2</sub>POH<sub>4</sub> \* ..... 8.33 g.  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1.09 g.  
 NaCl ..... 8.5 g.  
 H<sub>2</sub>O bidestilada ..... 1000 ml.  
 \* NaHPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O ..... 10.4 g.

#### 3.11.3.5.1.3 Solución de Sacarosa-Glicina pH = 7.2

Sacarosa ..... 5 g.  
 Glicina ..... 0.01 g.  
 H<sub>2</sub>O destilada pH = 7.0 ... 100 ml.  
 Esterilizar por filtración

#### 3.11.3.5.1.4 CO<sub>3</sub> Na 0.16%, 0.02 M

CO<sub>3</sub>H Na ..... 0.168 g.  
 H<sub>2</sub>O destilada ..... 100 ml.  
 Esterilizar por filtración.

#### 3.11.3.5.1.5 Solución de Veronal 0.05 M pH = 8.2

Veronal sódico ..... 10.31 g.  
 (5-5 Dietilbarbiturato de sodio) Merthiolate (polvo) 100 mg.

HCl, 1 N ..... 23 ml.  
 H<sub>2</sub>O destilada estéril c.s.  
 p. .... 1000 ml.

Disolver el Veronal sódico y el Methiolate en 800 ml, de agua destilada. Llevar a pH = 8.2 con ClH 1 N. Completar a un litro con agua destilada. Mantener en refrigeración (4°C).

#### 3.11.3.5.1.6 Preparación del gel de Agarosa:

- a) Preparar una suspensión de agarosa 0.9% en solución de veronal 0.05 M, = 8.2, que contenga merthiolate 1:10000 en baño de agua a una temperatura no mayor de 90° C.
- b) Distribuir en volúmenes convenientes en tubos con tapa. Mantener a 4°C hasta el momento de usar.

#### 3.11.3.5.1.7 Preparación de Placas:

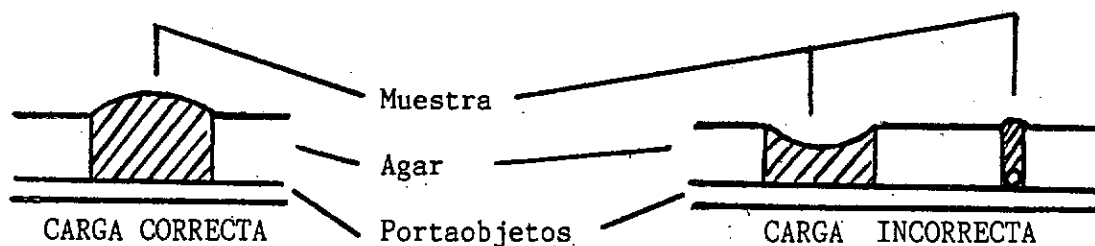
- a) Limpiar con alcohol y secar las láminas portaobjetos de 75 x 25 mm. o de 75 x 50 mm. Cubrirlas con 4 u 8 ml. de la suspensión de agarosa, respectivamente. Dejar gelificar.
- b) Colocar las placas 10 minutos a 4°C.
- c) Marcar los orificios usando el diagrama que corresponda (figura 2).

En cada una de las 2 filas paralelas se marcan a una distancia de 8 mm. cinco orificios, de 6 mm. de diámetro los de la prime-

ra fila y de 3 mm. los de la segunda fila.

- d) Cargar los orificios con las muestras que corresponda.
- e) Las láminas con sus respectivos puentes de papel, y los orificios de mayor tamaño del lado del Cátodo, se colocan en una cuba de un equipo de electroforesis.

El orificio está bien cargado cuando no hay burbujas en su interior y el nivel superior de la muestra forma una superficie convexa con respecto a la superficie plana del agar.



#### 3.11.3.5.1.8 Virus Semilla:

Como virus semilla se utiliza el CVS (Challenge Virus Standard, virus estándar de desafío) preparado en cerebro de ratón en los Institutos Nacionales de Salud de EUA con dos pases sucesivos en cerebro de conejos lactantes (CVS/CCL/2°P) realizados en el Centro Panamerica-

no de Zoonosis. Tiene un título infectante que varía entre  $10^{7.6}$  y  $10^{7.8}$  en 0.03 ml. por vía intracerebral (IC) en ratón adulto.

#### 3.11.3.5.1.9 Antígeno:

El Antígeno inactivado (AG) que se utiliza en la técnica CIE se prepara con cerebros de conejos lactantes infectados con virus CVS/CCL/2°P. En este huésped se producen títulos infectantes comparables con los obtenidos en tejido nervioso de ratones lactantes. Además, con el antígeno así preparado se pueden determinar los anticuerpos antirrábicos en seres humanos y animales (perros, bovinos, equinos) inmunizados con vacuna de cerebro de ratón lactante (CRL) sin riesgo de detectar falsos positivos por reacciones cruzadas producidas por el tejido presente en la vacuna. Este hecho tiene especial importancia para América Latina y el Caribe, donde la producción y aplicación de la vacuna CRL está ampliamente difundida.

Se ha demostrado además que el antígeno también es eficiente para evaluar la respuesta inmune en individuos que recibieron vacuna producida en células diploides de origen humano.

En los primeros estudios de estandarización de la técnica de CIE, el antígeno se preparaba en

agua destilada estéril de pH 7.2 a 7.4 y mantenía su estabilidad alrededor de diez meses en estado líquido y seis meses liofilizado.

Es sabido que sustancias tales como la sacarosa y la glicina tienen capacidad de estabilizar suspensiones de virus rábico. Por esto, a partir de 1981 se les incorporó al diluyente empleado en la preparación del antígeno. Se recomienda titular el antígeno cada tres meses para detectar posibles pérdidas de actividad y poder usarlo siempre en la dilución óptima con respecto al suero indicador.

#### 3.11.3.5.1.9.1 Estandarización del Antígeno:

El título del antígeno se debe determinar frente a un suero patrón, que el Centro Panamericano de Zoonosis distribuye sin cargo a los laboratorios interesados. Para ello, al terminar la preparación del lote se hará la primera titulación, que permitirá tener una idea aproximada de la calidad del producto. Después de mantener el antígeno tres semanas a 4°C, se iniciará el procedimiento de estandarización. Para ello:

- a) Hacer diluciones del Ag en solución salina amortiguada pH 7.2 como sigue:

Tubo	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>
Ag (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Salina (ml)	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	1.7
Dilución	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14	1:16	1:18

- b) Incubar 60 minutos a 37°C.
- c) Recubrir dos láminas portaobjetos de 75 x 50 mm con agarosa y marcar la serie de orificios que indica el diagrama de la Figura 2.
- d) Preparar una lámina portaobjetos de 75 x 25 mm recubierta con agarosa y marcar los orificios que indica el diagrama de la Figura 2.
- e) Retirar el agar de los orificios de 6 mm de las láminas preparadas en c) y cargar cuidadosamente con cada una de las diluciones de antígeno, usando pipeta Pasteur y propipeta (Figura 2).
- f) Retirar el agar de los orificios de 6 mm de la lámina preparada en d) y cargar cuidadosamente (Fig. 1) con la dilución de antígeno estándar que indique el laboratorio de referencia que lo produce (Fig. 2).
- g) Colocar puentes de papel filtro en los extremos de las láminas preparadas anteriores y aplicar una diferencia de potencial de 2 mA/cm de lámina durante 45 mi-

nutos.

- h) Cortar el paso de corriente.
- i) Retirar la agarosa de los orificios de 3 mm de las láminas preparadas en c) y cargarlos con el suero estándar diluido según indicaciones del laboratorio de referencia que lo produce (Fig.2)
- j) Retirar la agarosa de los orificios de la lámina preparada en d). Cargar el superior con el suero estándar diluido según las indicaciones del laboratorio de referencia que lo produce (control positivo) y el inferior con solución salina amortiguada pH 7.2 (control Negativo).
- k) Continuar la electroforesis por un período adicional de 120 minutos a 2 mA/cm de lámina.
- l) Evitar el recalentamiento del gel manteniendo un pasaje constante de corriente y humedeciendo periódicamente los puentes de papel filtro.
- m) Leer las láminas al finalizar la corrida con ayuda de luz incidente.
- n) Determinar la óptima dilución del antígeno que produce bandas nítidas cuya forma y ubicación sean comparables con las que produce el sistema antígeno-suero estándar ubicadas en ambos orificios. Si en la primera titulación de es andarización del antígeno se obser

van bandas nítidas hasta la última dilución probada, será necesario repetirla extendiendo las diluciones.

Una vez obtenido el título final, se repiten por lo menos dos veces las titulaciones para confirmar los resultados obtenidos antes de poner en uso el antígeno.

AG. PATRON	SUERO INDICADOR
1:4	○ { ○
1:6	○ { ○
1:8	○ { ○
1:10	○ { ○

1:12	○ ( ○
1:14	○ ( ○
1:16	○ ○
1:18	○ ○

AG. PATRON.	○ ( ○	SUERO INDICADOR
1:X	○ ○	SOL. SALINA

Fig. 2: Título del antígeno 1:14

#### 3.11.3.5.1.10 Suero Indicador: (12,21)

Se puede utilizar como suero indicador un suero antirrábico hiperinmune preparado en equinos o en conejos. Los sueros indicadores deben tener alrededor de 200 UI/ml y producir bandas de precipitación nítidas cuando reaccionan con el antígeno. La forma y ubicación de ellas deben ser iguales a las que produce la reacción de un suero y un antígeno patrón.



### 3.11.3.5.1.10.1 Estandarización del suero indicador:

Cuando se ha obtenido un suero antirrábico con los títulos indicados de la siguiente forma:

Los títulos de anticuerpos obtenidos de la preparación en conejos oscilan entre 1:1200 y 1:1500 cuando se los determinan por CIE y entre 1:15000 y 1:25000 por la prueba de neutralización en ratón. Habitualmente contiene entre 130 y 200 UI/ml.

Los títulos de anticuerpos obtenidos de la preparación en equinos oscilan entre 1:12000-1:18000 cuando se les determina por la prueba de neutralización en ratón. Habitualmente contiene 200 UI/ml.

Es necesario determinar la dilución de trabajo en la que se le debe emplear para que, al enfrentarlo con un antígeno patrón, produzca una banda de precipitación de morfología, ubicación e intensidad similares a las de la banda que el antígeno produce con un suero de referencia.

En general, la dilución del suero indicador cumple estos requisitos está comprendida entre 1:10 y 1:20.

- a) Hacer diluciones del suero en solución salina amortiguada pH 7.2 como sigue:

Tubos	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>
Suero (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Salina (ml)	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	1.7
Dilución	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14	1:16	1:18

- b) Preparar la dilución óptima del suero de referencia según lo indicado por el laboratorio de referencia que lo produce.
- c) Recubrir dos láminas portaobjetos de 75 x 50 mm y una lámina de 75 x 25 mm con agarosa y marcarlas según se indica en los diagramas de la figura 3.
- d) Retirar el agar de los orificios de 6 mm de las tres láminas y cargar con pipeta Pasteur y propipeta la dilución óptima del antígeno patrón, determinado en el inciso n).
- e) Colocar los puentes de papel de filtro y aplicar durante 45 minutos una diferencia de potencial de 2 mA/cm de lámina.
- f) Cortar el paso de la corriente.
- g) Retirar la agarosa de los orificios de 3 mm de las láminas de 75 x 50 mm y cargarlos con las distintas diluciones del suero preparadas según inciso a).
- h) Retirar la agarosa de los orificios de 3 mm de la lámina de 75 x 25 mm y

cargar uno, con la dilución de suero de referencia preparada en inciso b) y el otro, con solución salina amortiguada pH 7.2.

- i) continuar con la electroforesis por un período adicional de 120 minutos a 2mA/de lámina. Humedecer periódicamente los puentes de papel de filtro colocados en los extremos de las láminas.
- j) Leer las láminas al finalizar la corrida con ayuda de luz incidente.
- k) Determinar la dilución de suero óptima que produce una banda similar a la del sistema antígeno patrón-suero de referencia de la lámina de control.

En los diagramas siguientes se ha esquematizado la titulación de un suero indicador.

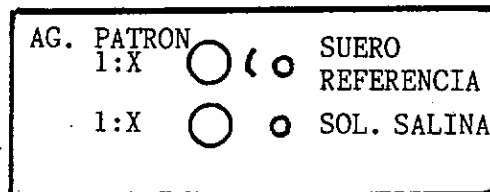
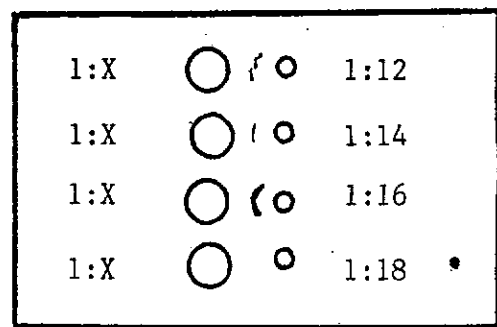
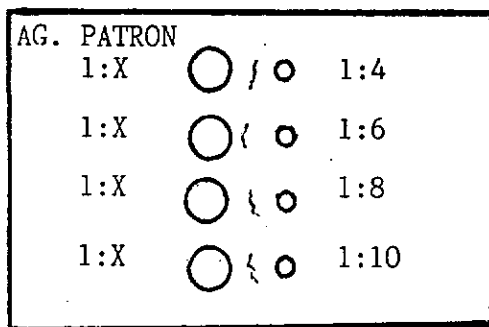


Fig. 3: Título del suero: 1:16

### 3.11.3.5.2 Procedimiento de la prueba. (12,21)

Se debe extraer la sangre por punción venosa. Dejar coagular en un tubo de ensayo a

temperatura ambiente y una vez retraído el coágulo, trasvasar el suero exudado a un tubo de centrifuga. Centrifugar a 2000 g. durante 10 minutos y distribuir el suero sobrenadante en tubos de Kahn (12 x 75 mm) en volúmenes de 0.5 ó 1 ml. Conservar el resto del suero congelado para ensayos posteriores.

Para titular un suero problema:

- a) Calentar los sueros a 48-50°C durante 30 minutos.
- b) Recubrir con agarosa una lámina de 75x50 y otra de 75x25 mm. y marcarlas según se indica en la figura 4.
- c) Preparar diluciones iniciales seriadas del suero en solución salina amortiguada, pH 7.2, según el siguiente esquema:

Tubo	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
Salina (ml)	0	0.45	0.3	0.3	0.3
Suero (ml)	0.5 →	0.3 →	0.3 →	0.3 →	0.3
Dilución	0	1:2.5	1:5	1:10	1:20

- d) Distribuir 0.05 ml. de la óptima dilución de antígeno (un medio de la dilución determinada en el inciso 9.1) en cada uno de 5 tubos de ensayo de 12x75 mm. y 0.1 ml. en un sexto tubo para control de la reacción.

(Tubos: T<sub>I</sub>, T<sub>II</sub>, T<sub>III</sub>, T<sub>IV</sub>, T<sub>VI</sub>).

- e) Agregar 0.05 ml de suero sin diluir (T<sub>1</sub>) y - 0.05 ml. de cada dilución de suero (T<sub>2</sub> al T<sub>5</sub>) a 5 tubos preparados en el inciso d), de manera que las diluciones finales del suero problema sean 1:2, 1:5, 1:10, 1:20

y 1:40.

- f) Al sexto tubo preparada en el inciso d), agregar 0.1 ml. de solución salina amortiguada pH 7.2.

(Ver el siguiente esquema)

e) y f)

Tubos del inciso c)	T <sub>I</sub>	T <sub>II</sub>	T <sub>III</sub>	T <sub>IV</sub>	T <sub>V</sub>	Solución Salina
ml. utilizado	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Tubo	T <sub>I</sub>	T <sub>II</sub>	T <sub>III</sub>	T <sub>IV</sub>	T <sub>V</sub>	T <sub>VI</sub>
Optima dilución del Ag. (ml).	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1
Dilución final	1:2	1:5	1:10	1:20	1:40	

- g) Incubar los 6 tubos a 37°C durante 60 minutos.
- h) Retirar el agar de los orificios de 6 mm. de la lámina 75x50 y con pipeta Pasteur y propipeta, cargar con las mezclas antígeno-diluciones del suero preparadas en el inciso e).
- i) Retirar el agar de los orificios de 6 mm. de las láminas 75x25 mm. y cargarlos con la dilución de antígeno preparada.
- j) Colocar los puentes de papel y aplicar durante 45 minutos una diferencia de potencial de 2 mA/cm de lámina.
- k) Cortar el paso de la corriente.
- l) Retirar la agarosa de los orificios de 3 mm. de la lámina 75x50 mm. y cargarlos con la dilución óptima de suero indicador calcu-

lada en el inciso 3.1 k) (Estandarización del suero indicador).

- m) Retirar la agarosa de los orificios de 3 mm de la lámina de 75 x 25 mm. y cargar el primero con la dilución óptima de suero indicador (Control Positivo) y el segundo con solución salina (Control Negativo).
- n) Continuar la electroforesis por un período adicional de 120 minutos aplicando una corriente de 2 mA/cm de lámina.
- ñ) Humedecer periódicamente los puentes de papel filtro colocados en los extremos de las láminas.
- o) Leer las láminas al finalizar la corrida con ayuda de luz incidente.
- p) Determinar la dilución de suero óptima que no produce bandas nítidas de precipitación, de forma y ubicación comparables con las del control incluido en la prueba. Esta dilución es el título buscado del suero problema.

Si no se obtienen punto final con las diluciones de suero aquí propuestas, se puede incrementar su número, manteniendo el factor de dilución 1:2.

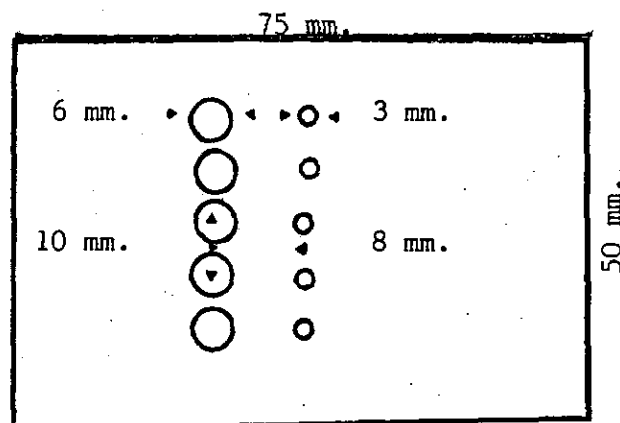


Figura 4: Diagrama (tamaño natural) lámina 75 x 50 mm para la titulación de sueros.

En los diagramas siguientes se ha esquematizado la titulación de un suero problema:

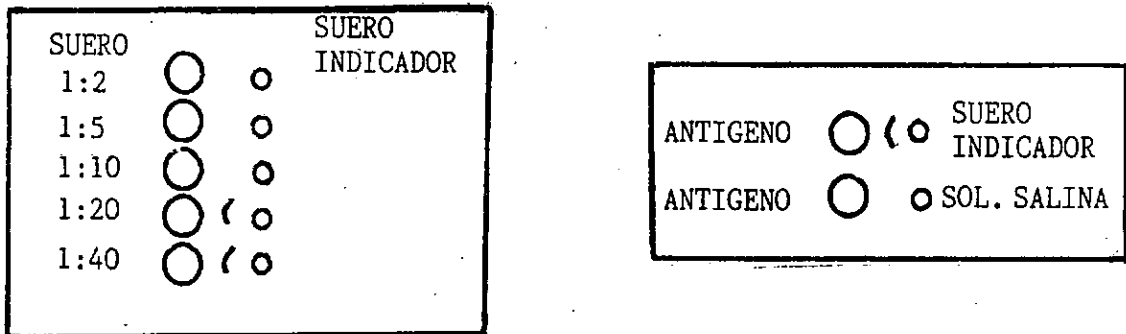


Figura 5: Título del suero problema 1:10

### 3.11.3.5.3 Estimación de títulos Seroneutralizantes: (21)

Los resultados de varios estudios comparativos de titulación de anticuerpos antirrábicos por las pruebas de Seroneutralización estándar en ratones (SN) y Contraimmunoelectroforesis (CIE) efectuados en el Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS) indican que los datos individuales obtenidos con los sueros positivos se ajustarían a una relación lineal teórica entre los logaritmos de las inversas de los títulos. Esta relación permitiría estimar títulos de los anticuerpos neutralizantes a partir de los resultados obtenidos con la CIE aplicando la siguiente fórmula:

Título SN estimado =  $a + b \times$  (título CIE observado).

En el Centro Panamericano de Zoonosis se han llevado a cabo determinaciones, con cuyos resultados se han calculado valores para "a" y "b", con los cuales se ha integrado la relación siguiente:

Título SN estimado ( $\log_5$ ) =  $1.78 + 0.41 \times$  título CIE ( $\log_2$ ).

Con estos valores numéricos se elaboró la tabla de valores que se reproduce a continuación, en la cual figuran los títulos SN estimados, correspondientes a los valores que se obtienen habitualmente en el laboratorio con la CIE. Por ejemplo, a un título de 1:20 por CIE correspondería teóricamente un título seroneutralizante de 1:283. (Cuadro 1).

Los laboratorios que quieran utilizar los valores que surjan de sus propias titulaciones, previamente deben de titular sueros por medio de las dos pruebas. Para establecer el grado de significancia entre los títulos obtenidos por las pruebas de SN y CIE se calcula el Coefficiente de Correlación "r", su valor puede estar comprendido entre -1 y 1, la cual indica una máxima correlación y el 0 indica la falta absoluta de correlación. Para calcularla se aplica el siguiente procedimiento:

- a) Expresar los títulos de SN en  $\log_5$  y los títulos de CIE en  $\log_2$ . Para ello, utilizar las relaciones con los  $\log_{10}$ :

$$\begin{array}{l} \log SN (y) = \log_{10} SN \\ SN (y) = \log_{10} SN \end{array} \qquad \begin{array}{l} \log CIE (x) = \log_{10} CIE \\ CIE (x) = \log_{10} CIE \end{array}$$

$$\frac{\quad}{0.69897} \qquad \frac{\quad}{0.30103}$$

- b) Calcular el Coeficiente de Correlación por medio de la fórmula:

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

- c) Calcular los Coeficientes de la recta de regresión:

$$\text{Pendiente } b = \frac{n \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

El coeficiente "b", pendiente de la recta de regresión, indica el monto del aumento de la variable "y" por cada unidad de aumento de la variable "X"

$$\text{Ordenada en el origen } a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$



El coeficiente "a", valor de la ordenada en el origen, se usa en este caso sólo para poder trazar la recta de regresión.

- d) Calcular la ecuación de la recta de regresión, para ello, se reemplaza los valores de a y b en la fórmula:

$$\text{Título SN (y)} = a + b \times (\text{título de CIE})$$

- e) Estimar los títulos en SN, por medio de la fórmula:

$$\log_5 \text{SN}_E = a + b (\log_2 \times \text{título CIE})$$

$$\text{SN}_E = a + (b * x) \log_{10} 5$$

### 3.12 Inmunidad:

El hecho de que en esta enfermedad no haya virtualmente tratamiento ha sido, sin duda, un importante estímulo para la cuantiosa investigación sobre ella y sobre todo lo que se refiere a los métodos de inmunización. Pasteur, con la ayuda de Chamberlan y Roux, en 1884, demostró que los perros podían protegerse contra la rabia inyectando suspensiones de médula desecada de conejo infectado. Al año siguiente, Pasteur realizó la vacunación histórica al muchacho de 9 años que había sido mordido por un perro rabioso y cuya vida salvó la vacuna (1).

En los años siguientes millares de personas contagiadas fueron inoculadas con la vacuna antirrábica y los resultados fueron muy satisfactorios. Aunque se han introducido varias modificaciones en la vacuna de Pasteur, todavía se emplea el nombre de "tratamiento de Pasteur" para el tratamiento antirrábico humano (1,41).

Pasteur aisló el agente causante de la enfermedad conocido con el nombre de "virus calle" y mediante sucesivos pasajes en conejos, obtuvo una nueva cepa y de virus que presentaba características diferenciales bien definidas, denominándolo con el nombre de "virus fijo". Esta cepa de virus así obtenida sirvió a Pasteur para elaborar la primera vacuna antirrábica (22).

Posteriormente otros investigadores utilizando similares procedimientos lograron obtener otras cepas de virus para la producción de diversos tipos de vacunas:

Cuadro 1: Títulos de Seroneutralización estimados (SNE) calculados a base de los resultados de CIE (16).

Título CIE	Título SNE	Título CIE	Título SNE
2	33	320	3726
5	78	340	3942
10	149	360	4156
20	283	380	4371
40	539	400	4584
80	1028	420	4796
100	1264	480	5430
120	1498	500	5640
140	1728	520	5849
160	1957	540	6058
180	2183	560	6266
200	2407	580	6474
220	2630	600	6681
240	2852	620	6887
260	3072	640	7093
280	3291	680	7504
300	3509	700	7709

<u>Cepa</u>	<u>Material de Replicación</u>
PV-11	Cerebro de conejo Células de riñón de bovino, perro, etc. Líneas celulares: BHK, WI-38 NIL-2, Vero, etc.
CVS, 51 y 91	Cerebro de ratones
LEP y HEP	Huevos embrionados
SAD: ERA	Células de riñón de porcino
Vnukovo	Células de riñón de hamster

En la actualidad la OMS no recomienda las técnicas de producción de las vacunas de Pasteur y las de Fermi, principalmente para uso humano, por el peligro latente que existe en su aplicación en el organismo, ya que el virus fijo no es lo suficientemente inocuo como originalmente se pensó (52).

Otros investigadores han elaborado diferentes vacunas antirrábicas empleando otros agentes inactivados del virus como por ejemplo el Cloroformo (Kesler), éter (Hempt), etc., pero en la actualidad estos métodos han sido reemplazados por procedimientos más eficaces. Habel desarrolló un método sencillo y práctico, utilizó la luz Ultravioleta para inactivar el virus fijo contenido en la suspensión vacunal, sin que con ello se alterara su calidad antigénica, se obtuvieron en esa forma, vacunas mucho más potentes que las producidas con los métodos tradicionales. Similares resultados se han obtenido con otros productos químicos como la B-propiolactona y la etilenamina (52).

Las vacunas que más se emplean en América Latina son las de cerebro de ratón lactante (CRL) inactividad con luz ultravioleta, y en la actualidad les siguen en importancia numérica varias elaboradas en cultivo de tejido (Centro Panamericano de Zoonosis, 1980) (1,35,40).

### 3.13 Tipos de Vacuna

3.13.1 De acuerdo a la naturaleza del virus en el producto final podemos diferenciar dos tipos de vacunas antirrábicas:

#### 3.13.1.1 Vacunas Inactivadas:

No se puede determinar la presencia del virus re-

sidual (35). Se distinguen en este grupo las elaboradas con Virus fijo en tejido nervioso y elaboradas en cultivo celular (1,29,42).

### 3.13.1.2 Vacunas Atenuadas o de Virus Vivo Modificado (VVM):

Requieren necesariamente una concentración determinada de virus viable para poder ser consideradas como tales. Entre las vacunas de virus vivo se encuentran las preparadas en embrión de pollo mediante un reducido número de pases (LEP: "Low Egg Passage") o de alto pasaje (HEP: "High Egg Passage"), y la elaborada en riñón de cerdo (Cepa ERA) (1,29).

Si bien son pocos los casos de rabia provocadas por las vacunas de virus modificado en perros y gatos, es indudable que las vacunas de virus inactivado presentan las mejores garantías de inocuidad.

De acuerdo con ensayos comparativos de diferentes tipos de vacunas para animales, se estableció que las vacunas VVM de cultivo celular y la Flury LEP en embrión de pollo confieren, con una sola inyección, una inmunidad por tres años, y que la vacuna (CRL) inactivada protege todos los perros durante un año y 80% durante tres años. Por consiguiente, los dos tipos de vacunas más empleados en América Latina son de eficacia comprobada (1,58).

La cepa LEP es menos atenuada y debe administrarse sólo a perros adultos, mientras que la HEP, más atenuada, se prescribe a cachorros, perros, gatos y bovinos.

Se ha preparado varias vacunas Inactivadas y Atenuadas en cultivos de células, incluyendo riñón de criceto, de embrión de ovino, de cerdo, fibroplastos de embrión de pollo, riñón de perro (DK), BHK-21 y de líneas de células WI-38 humanas (42).

### 3.13.2 Las vacunas según el tipo de tejido se dividen en:

#### 3.13.2.1 Vacunas de Tejido Encefálico:

### 3.13.2.1.1 Vacuna de Tipo Semple:

Es una emulsión al 10% de cerebro de conejo infectado con virus de rabia inactivado con fenol, que presenta el riesgo de producir una encefalomielitosis alérgica, en el 0.01 - 3% de los casos, de los cuales el 20% mueren y otro 30% sufre secuelas permanentes. Esta vacuna es totalmente inaceptable, aún cuando se asegure que casi todo el material encefalomielitógeno puede ser nervioso con fluorocarbón (28).

### 3.13.2.1.2 Vacuna de Tipo Fermi:

La vacuna consiste en una suspensión acuosa al 5% de tejido encefálico de cordero o de cabra inoculados con virus rábico fijo. La suspensión se trata con fenol a una concentración inicial de 1%, que se puede reducir al 0.5% en la vacuna lista para usar. Aunque la vacuna de tipo Fermi se suele clasificar como una vacuna inactivada, además del virus inactivado contiene una cantidad precisamente determinada de virus activo y, por lo tanto, es una vacuna mixta atenuada e inactivada (34).

Una ventaja de la vacuna de tipo Fermi es la facilidad de su preparación: Es posible producir con gran rapidez una vacuna cuya potencia puede evaluarse aproximadamente por el título de virulencia residual cuando no haya tiempo de hacer una prueba de potencia completa. El Instituto Pasteur de París, por ejemplo, a partir de enero 1967 ha suspendido completamente el uso de la vacuna de tipo Fermi y ahora produce una vacuna liofilizada inactivada con B-propiolactona que posee una potencia muy superior, puede conservarse más tiempo y resiste mejor las altas temperaturas de los países tropicales (34).

Existe la evidencia de los accidentes ocurridos en Brasil donde se presentaron 18 casos de rabia en personas tratadas con vacuna tipo Fermi (52) y

en consecuencia la Organización Mundial de la Salud no recomendó su uso en seres humanos (14).

#### 3.13.2.1.3 Vacuna de Encéfalo de Rata Lactante:

Para preparar la vacuna antirrábica liofilizada se usan ratas lactantes de 4 a 8 días de edad. Para la infección se emplean la Cepa Pasteur de virus fijo, que ha sido sometida a 3249 pases por cerebro de conejo. Se administra a las ratas por vía intracraneal. Se extrae el encéfalo y se inactiva con Fenol, luego se diluye hasta obtener una suspensión de: 10% de encéfalo con el 7.5% de Sacarosa. Por último se liofiliza (34).

#### 3.13.2.1.4 Vacuna de Cerebro de Ratón Lactante (CRL):

Uno de los inconvenientes que se habían presentado con las otras vacunas en el tratamiento humano, eran los accidentes postvacunales. Aunque no se conoce exactamente la etiología de estas encefalitis, se considera que alguno de los componentes de la mielina contenida en el tejido nervioso, actuaría como el agente sensibilizante (42).

A pesar de que el uso de la Vacuna CRL, redujo la incidencia de reacciones adversas en personas inmunizadas contra la Rabia, en América Latina se informaron casos de accidentes postvacunales con relación al sistema nervioso periférico (14).

Kabat y col. en 1947 demostraron que los agentes encefalitogénicos presentes en los cerebros de animales adultos, no existían o no se detectaban en los cerebros de los mismos animales recién nacidos. Posteriormente en 1962 Svet-Moldavsky realizó un estudio similar en diferentes especies de animales y a diferentes días de nacidos, para determinar la fecha de aparición de estos componentes encefalitogénicos; en el caso de los ratones se demostró su presencia a partir del noveno día de nacido (1).

Fuenzalida y Palacios en el año 1954 basándose en estas experiencias y el hecho igualmente comprobado de que los cerebros de los animales lactantes actuaban como mejores antígenos que los adultos, por presentar una mayor concentración del virus al final del periodo de incubación, prepararon una nueva antirrábica

Con el fin de minimizar el riesgo de la presencia de la mielina en el material cosechado para la producción de vacuna, se introdujo una modificación en el método original descrito Fuenzalida y Palacios, que consiste en centrifugar la suspensión de cerebros de ratones lactantes a 17,000 g durante diez minutos (22).

Al compararla con las primeras vacunas de tejido nervioso, la CRL tiene una mayor concentración de antígeno en un menor volumen de tejido nervioso. Su potencia antigénica, es determinada por el método de NIH (National Institutes of Health), la cual es alta e induce una adecuada respuesta serológica (17).

La Vacuna de Fuenzalida y Palacios conocida también con el nombre de CRL (Cerebro de Ratón Lactante) es la que actualmente se encuentra más difundida en América Latina, tanto para el control de la Rabia Canina, como para su uso en el tratamiento antirrábico Humano.

Este biológico ha demostrado ser un producto estable, seguro, de alto poder inmunogénico, fácil elaboración y bajo costo (23,24,30). Esta capacidad es superior cuando se adsorbe en hidróxido de Aluminio (17,30).

Cada dosis de 2 ml. de Vacuna Antirrábica Humana contiene virus inactivado con Luz Ultravioleta en 20 mg de encéfalo de ratón lactante, utilizándose como conservadores: fenol de 1:1000 y mertiol-

te de 1:10000.

Cada dosis de 2 ml. de Vacuna Antirrábica Canina posee virus inactivado con Luz Ultravioleta en volumen de 50 mg. de cerebro de ratón lactante, con los mismos conservadores.

El Fenol y el Mertiolate (Timerosal), que se adiciona a la Vacuna, es para proteger al antígeno contra la acción de las enzimas del tejido nervioso y preservar su esterilidad (49,52).

Preparación de la Vacuna Antirrábica de Cerebro de Ratón Lactante: (34,49,52)

Para la preparación de esta vacuna se utilizan tres cepas de virus básico fijo: dos cepas aisladas en Chile (cepa 51 de origen canino y cepa 91 de origen humano) y la cepa CVS procedente de la cepa original de Pasteur.

a) Preparación del virus semilla:

Se preparan a partir de suspensiones de cerebro al 20% de ratones de 3 a 4 semanas de edad, previamente inoculados con las cepas respectivas. Estas suspensiones son liofilizadas y se mantienen de -20 a -65 °C.

b) Preparación del Virus:

Se utilizan cerebros de ratones adultos, infectados con el virus semilla de cada cepa, para preparar una suspensión al 20%, peso/volumen, en suero equino al 2% que contiene 200 unidades de penicilina y 200 microgramos de estreptomina por ml. Las diluciones del sobrenadante de esta suspensión, que deben ser bacteriológicamente estériles, se inoculan en ratones lactantes cuyos cerebros se utilizan para la producción de la Vacuna CRL.

La suspensión se conserva en ampollas de -30 a -70 °C. El virus de trabajo debe poseer un título mínimo de  $10^6$  DL<sub>50</sub>/0.03 ml. para ser considerado ap-



to para la producción de vacunas, y deben repetirse las titulaciones cada seis meses.

c) Preparación del Inóculo:

De una de las ampollas de virus de trabajo (CVS, 51 y 91) se preparan diluciones que contengan entre 100 a 1,000  $DL_{50}/0.01$  ml utilizando como diluyente el Suero Equino al 2%. Este inóculo se mantiene en agua con hielo durante la inoculación de los ratones lactantes.

d) Inoculación de ratones y control del título:

Los ratones lactantes utilizados para la producción de Vacunas Antirrábicas Humanas deben tener como máximo entre 24 a 48 horas de nacidos y de 48 a 72 horas para la producción de Vacunas Caninas.

Se desinfectan los ratones con alcohol yodado en el área de inoculación y se inyecta 0.01 ml. intracerebralmente de la dilución del inóculo, previamente calculado, para determinar la viabilidad del virus, la misma dilución es inyectada en dosis de 0.03 ml. a 10 ratones de 3 a 4 semanas de edad, por vía intracerebral; a los 14 días postvacunación el 100% de los ratones de 3 a 4 semanas deben desarrollar síntomas de Rabia. Si uno o más ratones permanecen sanos durante este período, se debe renovar la suspensión del virus de trabajo.

e) Cosecha de Cerebros:

Aproximadamente 96 horas después de la inoculación, es decir, un día antes de la finalización normal del período de incubación, se sacrifican todos los ratones utilizando eter o cloroformo. La cosecha realizada en este período de tiempo, evita pérdidas por muertes prematuras y se obtiene el título más alto del virus.

Todos los ratones se sumergen en fenol durante diez minutos, la cosecha se realiza dentro de una campana de seguridad con luz ultravioleta o un ga-

binete de flujo laminar clase II. Se extraen los cerebros mediante succión por vacío, utilizando una aguja calibre No. 18 de 1.5 pulgada de largo, lo cual se conecta mediante una manguera al frasco recolector y frasco de trampa.

f) Preparación de la suspensión de cerebro para la vacuna y sus controles:

Inmediatamente antes de la preparación de la vacuna, se descongelan parcialmente los cerebros a temperatura ambiente. Una suspensión al 10% (peso/volumen) de tejido se prepara en agua bidestilada. Para obtener una suspensión homogénea, se utiliza el equipo de OMNI Mixer, el cual se opera tres veces durante tres minutos cada uno, intercalados por un minuto de reposo.

g) Centrifugación de la Vacuna:

La suspensión se centrifuga a 17,000 g durante 10 minutos, en centrífuga refrigerada. Se colecta el Sobrenadante y se restituye con agua bidestilada el volumen original.

h) Control de Virulencia:

Se determina el título del virus del sobrenadante por inoculación intracerebral de diluciones decimales seriadas en ratones de 3 a 4 semanas de edad, el título obtenido debe estar entre  $10^{6.3}$  a  $10^{7.3}$ .

i) Control de Contaminación Bacteriológica:

Antes de proceder a la inactivación por irradiación con luz ultravioleta, se realiza una titulación bacteriológica para confirmar la esterilidad. Se inocula 1 ml. de la suspensión de vacuna a cada uno de 5 tubos que contienen 9 ml. de medio de tioglicolato. El quinto tubo se agita manualmente y se transfiere 1 ml. de la suspensión a cada uno de otro grupo de cinco tubos, llegando hasta la dilución  $10^6$ . No se permite contaminación en las va-

cunas para humano y animal. A pesar de que las bacterias son destruidas por la irradiación con luz ultravioleta, un alto grado de contaminación es indicio de que existen deficiencias en la técnica de la preparación de la vacuna y ya que ésto aumenta las reacciones locales en personas y animales inmunizados.

j) Inactivación del Virus:

Se preparan las diluciones correspondientes, dependiendo si la Vacuna es Canina o Humana. El virus es inactivado mediante flujo continuo con luz ultravioleta producida por cuatro lámparas contenidas en el equipo J.J. Dill. La suspensión de virus es expuesta como una película sobre las paredes internas de un tubo de acero inoxidable que rota gradualmente de acuerdo a la velocidad de flujo de la vacuna.

k) Control de Viabilidad y Contaminación:

Luego de la inactivación de la suspensión de virus, se inoculan 10 ratones adultos y 20 ratones lactantes. Todos los ratones deben estar libre de síntomas de Rabia durante los 14 días de observación. Para verificar la ausencia de otros factores no relacionados con el virus rábico, se continúa la observación de éstos hasta 30 días postinoculación.

l) Dilución final de la Vacuna:

Inmediatamente después de la irradiación, se agrega volúmenes de agua bidestilada hasta obtener la concentración final de la vacuna. Se le agrega los conservadores fenol 1:1,000 y mertiolate 1:10,000.

m) Prueba de esterilidad después de inactivada la vacuna:

Se inocula 1 ml. de la suspensión final en cada uno de los cuatro tubos con medio de tioglicolato y cuatro tubos con agar de Sabouraud. Se incuban

durante 7 - 14 días. El tioglicolato a 37°C y el Sabouraud a 22°C.

n) Prueba de Potencia:

La potencia inmunogénica de la vacuna se determina por la prueba de Habel o por la de NIH (National Institutes of Health), y ésta última se puede realizar si se dispone de un estándar de referencia.

ñ) Pruebas de Control de Calidad posterior al envase:

Una vez que el producto haya sido distribuido, se le realizan las pruebas de esterilidad, inocuidad, pureza, concentración y potencia (34,49).

3.13.2.1.5 Vacuna de Encéfalo de Conejo Lactante:

La vacuna es una suspensión acuosa al 5% de encéfalos de conejos lactantes inoculados con virus rábico fijo, 24 horas después del nacimiento como máximo, e irradiada con luz ultravioleta. La suspensión contiene un 2% de amortiguador de McIlvain (pH 7.2) y un 5% de lactosa y se liofiliza en cantidades de una dosis o sea, 2 ml. Cada ampolla de vacuna se reconstituye con 2 ml de una solución al 0.01% de tiomersal (timerosal o mertiolato) en agua destilada (21).

3.13.2.1.6 Vacuna de Pasteur o Médula Desezada:

Se inoculan conejos subduralmente con virus fijo, se matan a los 6 a 7 días y se recogen las médulas. Se cortan en dos o tres trozos y se colocan en recipientes con hidróxido potásico para que se desequen y se mantienen a 23°C en la estufa. La pérdida de virulencia es paralela a la de la humedad de la médula.

Originalmente Pasteur aplicó inyecciones de médula desecada durante 14 días, inoculando cada día con virus progresivamente menos atenuados, hasta llegar a aplicar al undécimo día médula de un día de desecación (29).

3.13.2.2 Vacunas de Embrión de Aves:

3.13.2.2.1 Vacuna de Embrión de Pollo:

Las cepas Flury y Kelev de virus rábico adaptadas y modificadas en embrión de pollo se utilizan para fabricar las vacunas antirrábicas de embrión destinadas a la inmunización profiláctica de los perros (21).

La cepa Flury, modificada aún más mediante continuos pases en huevos (180 pases), se ha hecho menos patógena para los animales de laboratorio sin que al parecer haya perdido su antigenicidad. De momento, la vacuna con muchos pases en huevo viene recomendándose para el ganado vacuno y los gatos, mientras que la de pocos pases en huevo, se aplica a los perros solamente (21).

La vacuna tiene las siguientes ventajas: Posee grandes propiedades antigénicas, producen una inmunidad de mayor duración.

En la especie humana, se han empleado con cierta amplitud, tras muchos pases por embrión de pollo (HEP). Los virus con pocos pases por embrión (LEP) se consideran inseguros para toda clase de animales, excepto el perro (29).

#### 3.13.2.2.2 Vacuna de Embrión de Pato:

La vacuna antirrábica de embrión de pato consiste en una preparación liofilizada que contiene tejido de embrión de esa especie y virus rábico inactivado con B-propiolactona. Para estabilizarla se agrega clorhidrato de cisteína, gelatina, lactosa y fosfato potásico alcalino. Contiene además sulfato de estreptomina y potásico alcalino. Contiene además sulfato de estreptomina y de succinato de cloramfenicol en concentraciones muy bajas. Se agrega timerosal como conservador. La vacuna se prepara para su inyección reconstituyendo el material liofilizado con agua destilada estéril (18).

La vacuna producida en embrión de pato, es mu-

cho menos peligrosa, pero produce una alta incidencia de reacción local de tipo Arthus y un número moderado de reacciones alérgicas generalizadas especialmente en aquellos sujetos presensibilizados a los tejidos de embrión de pollo. Además, la respuesta de anticuerpos a la vacuna es demasiado baja durante el intervalo crucial entre el primero y segundo mes después de la exposición (28).

### 3.13.2.3 Vacunas de Cultivos Tisulares:

Con la aparición de las técnicas en cultivo celular se dió un nuevo impulso a la producción de vacunas antirrábicas en especial aquellas que se destinaban a uso animal. Se considera que una de las grandes ventajas que se ha logrado con estas técnicas de producción, es que permite elaborar grandes volúmenes de vacuna sin depender del suministro permanente de un gran número de animales, lo cual muchas veces son difíciles de criar u obtener (23).

Otra de las ventajas que tiene gran importancia para la elaboración de vacunas de uso humano, sería el hecho de que se trabajaría con antígenos más puros (sin proteínas extrañas) que permitiría obtener productos completamente inocuos para el tratamiento antirrábico humano. Sin embargo, estas técnicas de producción no son sencillas y como lo manifiesta el Dr. Kaplan "no todos los laboratorios estarían en condiciones de producir estos tipos de vacuna" (36).

Para la elaboración de los diferentes tipos de vacunas antirrábicas en cultivo de tejido, se pueden utilizar células de primer transplante proveniente de órganos de animales recién nacidos (pulmón, riñón, etc.) pudiendo presentarse en forma inactivada para uso humano o animal o atenuada exclusivamente para uso veterinario (36).

#### 3.13.2.3.1 Vacuna de células diploides humanas: (para humanos)

Con las vacunas de cultivo tisular se trata sobre todo de conseguir un producto más inocuo y mucho más inmunogénico que las vacunas antirrábicas

hoy disponibles, lo que permite proteger mejor al hombre con una pauta de inmunización mucho más reducida (21). Los progresos recientes de las técnicas virológicas han facilitado la obtención de una vacuna purificada y concentrada que posee esas características y que se prepara en cultivos tisulares diploides humanas (cepa WI-38). Esta vacuna, administrada en una sola inyección antes de la exposición al virus de la calle, ha protegido a simios en experimentos repetidos (34).

Koprowski y colaboradores, en el Instituto Wistar, han dedicado muchos años al desarrollo de una vacuna antirrábica más confiable. En un ensayo muy extenso, compararon cerca de una docena de diferentes vacunas cultivadas en varios tejidos no neuronales, para determinar su eficacia en monos. Todas ellas dieron una inmunidad superior a la proporcionada por las vacunas preparadas en cerebro de conejo o de ratón y en embrión de pato, que se usaron como estándares de referencia. La mejor fue una vacuna inactivada con B-propiolactona, concentrada, cultivada en líneas diploides de fibroplastos humanos WI-38. Una sola dosis inyectada 4-6 horas después de que el virus de la rabia había sido inoculado en los músculos del cuello de los monos fue suficiente para salvar la vida de los animales (28,35).

#### 3.13.2.3.2 Vacuna de Cultivo Tisular: (para animales)

La aparición de las técnicas de cultivo tisular ha dado gran impulso a las investigaciones sobre el virus rábico. Ya a comienzos del siglo actual se intentó cultivar el virus de la rabia en cultivos celulares, pero con poco éxito (Levaditi, 1913); el primer progreso importante se debe a Kissling (1958), que obtuvo en el ratón títulos de  $10^{-3.5}$  DL<sub>50</sub> utilizando la cepa CVS en cultivos pri-

marios de riñón de hámster. Ulteriormente, varios investigadores consiguieron que diversas cepas de virus rábico fijas y de campo proliferasen tanto en cultivos celulares primarios como continuos, procedentes de diversos tejidos; de esta forma han podido prepararse varios tipos de vacuna antirrábica para la inmunización de animales.

Como el virus rábico prolifera sin gran destrucción de células, la mayor parte de las vacunas producidas por este sistema están relativamente exentas de proteínas extrañas, factor que puede tener su importancia cuando es necesario repetir las vacunaciones (14,34).

El procedimiento para la producción de vacunas varía según el tipo de cultivo celular y la cepa de virus que se utilicen. La primera condición es conocer a fondo la producción de cultivos celulares en gran escala, incluidas las variantes según los medios de cultivo, el pH, y el tiempo y la temperatura de incubación. Después de haberse sembrado los virus en las células, pueden requerirse otras modificaciones para conseguir el máximo rendimiento de virus. Es preciso determinar también el momento ideal para la cosecha y la liofilización (21).

### 3.13.3 Consideraciones de una vacuna:

Los principios que sirven de base para la fabricación de vacunas antirrábicas de calidad satisfactoria no difieren de los que consideran generalmente aplicables a toda vacuna vírica. Como es evidente, los factores importantes son la inocuidad, la potencia, la facilidad de fabricación y la estabilidad, incluso tras un almacenamiento prolongado. Hasta la fecha ningún tipo de vacuna antirrábica ha resultado superior a los demás en todas esas características, y en consecuencia, puede elegirse entre diversos productos, cada uno de los cuales tiene sus propias ventajas (21).



La liofilización permite conservar la potencia durante un almacenamiento prolongado; antes sólo podía aplicarse a las vacunas inactivadas por un agente viricida eliminable (como rayos ultravioleta o la B-propiolactona), pero en la actualidad esta técnica es asimismo aplicable a las vacunas fenoladas (21).

### 3.13.4 Adyuvantes Inmunológicos:

La palabra Adyuvante significa asistir o ayudar, y los adyuvantes inmunológicos pueden definirse como sustancias no antigénicas, que en forma inespecífica, aumentan el poder y duración de la respuesta inmune a agentes específicos (7,25,31,46,50,59,61); los cuales al combinarse con vacunas, producen niveles de inmunidad más altos que aquellas sin adyuvante (25).

Los adyuvantes no son agentes inmunogénicos, ya que no deben estimular una respuesta inmunitaria contra sí mismos, siempre se debe tomar en cuenta su seguridad y eficacia (46).

Los adyuvantes pueden clasificarse como:

3.13.4.1 Adyuvantes inertes: Son los que retienen al antígeno y lo liberan lentamente, como el Hidróxido de Aluminio, adyuvante incompleto de Freund, alumbres, fosfatos, etc.

3.13.4.2 Adyuvantes dinámicos: Actúan directamente sobre las células responsables de la respuesta inmunitaria, como las Endotoxinas bacterianas, Saponinas, Sulfato de Dextrano, etc. Cuando ejercen mayor acción sobre los linfocitos B, como los lipopolisacáridos, se les denomina Adyuvante B; y si la acción es mayor sobre los linfocitos T, como las *Mycobacterias* y derivados, polinucleótido de doble cadena, se denomina Adyuvantes T. (25,46,50,59).

Existen adyuvantes inertes y dinámicos, como el Adyuvante Incompleto de Freund con *Mycobacterium tuberculosis*, ya que tiene efecto sobre la respuesta humoral y sobre la inmunidad mediada por células;

pero con el inconveniente de originar indeseables estados de hipersensibilidad (7).

En algunos casos la acción del adyuvante es imprescindible para que se produzca respuesta inmune, como la Vacuna contra el Antrax.

3.13.4.1.1 Compuestos de Aluminio: Son los más importantes utilizados actualmente, para preparar las vacunas con Aluminio, existen dos métodos:

a. Método para Vacunas Precipitadas con Alumbre:

Es la adición de una solución de Alumbre  $Al(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ , al antígeno para formar un precipitado de proteína aluminada.

b. Método para Vacunas Adsorbidas con Aluminio:

La solución de antígeno se le agrega al Hidróxido de Aluminio, fosfato de Aluminio, fosfato de Aluminio u óxido de gama aluminio (25).

El Hidróxido de Aluminio es un coloide anfótero, con punto isoeléctrico entre pH 9.2 a 9.4, se considera un adyuvante inerte, y actúa principalmente por concentración del virus, acción de depósito, formación de granuloma y liberación lenta del antígeno (17,46). El Gel de Aluminio causa una degranulación extensa de los mastocitos en el lugar de la inyección, acelera el drenaje linfático en la región, y esto facilita el transporte del antígeno a los nódulos linfáticos. (25,30,61)

Emulsión: Es un sistema de dos fases, consistiendo de una fina dispersión de un líquido en otro en el cual, no es miscible. Los dos líquidos clásicos inmiscibles son: Agua y Aceite que puede ser mineral o vegetal. Cualquiera de las dos puede ser la Fase Dispersa.

Dependiendo cuál líquido sea la Fase Dispersa, las Emulsiones resultantes tendrán diferentes características físicas:

1. Emulsión tipo AGUA EN ACEITE (W/O): cuando la fase Acuosa es dispersada en el aceite, que es la Fase externa.
2. Emulsión tipo ACEITE EN AGUA (O/W): cuando el aceite es dispersado en el agua, que es la Fase externa (7).

Características de la Fase Externa de la Emulsión:

- Si la Fase Externa es la porción acuosa, Emulsión tipo O/W, una gota de la emulsión, se dispersará rápidamente en el agua, por ser los dos líquidos miscibles.
- Cuando se coloca una gota de la Emulsión tipo O/W en aceite, no ocurre la dispersión porque la Fase Externa no es miscible.
- Si la Emulsión fuera del tipo W/O, la gota de emulsión no se dispersará en agua, pero si en el aceite.

El empleo de los dos tipos básicos de Emulsión en las Vacunas indican que las del tipo O/W no resultan ser buenos adyuvantes, ya que el antígeno contenido en la fase acuosa externa, es soluble con los líquidos orgánicos de los animales, por lo tanto el Antígeno quedará expuesto a la acción fagocitaria del organismo, y su efecto inmunizante será fuertemente reducido (7).

3.13.4.1.2 Adyuvante Incompleto de Freund: Conocidos los inconvenientes del Adyuvante completo de Freund, se suprimió la adición de Mycobacterias, a fin de aprovechar la excelente cualidad adyuvante de las emulsiones Agua en Aceite, comúnmente referido como Vacunas Oleosas, para la fabricación de ciertas vacunas de uso práctico, ya sea con el virus inactivado o toxoide; como las Vacunas Antiaftosa y contra Newcastle, etc. (7).

El mecanismo de la acción inmunogénica de estas vacunas emulsionadas es formar depósitos persistentes de antígeno, en el lugar de la inyección de estos de-

pósitos el antígeno es liberado lentamente, para ponerse en contacto con la primera línea de defensa del organismo: polimorfonucleares, histiocitos y sobre todo los macrófagos, de gran importancia en la respuesta inmune. Además, parte del antígeno migra por vía linfática y se forman múltiples depósitos de microgotas de vacuna oleosa en los órganos linfoides, donde se organizan nuevos focos de estímulo inmunitario. El adyuvante oleoso estimula la proliferación de células del Sistema Hístico Reticular Dendrítico (SHRD) para la síntesis de anticuerpos y la proliferación de células Inmunocompetentes (7).

La respuesta inducida por las vacunas con adyuvante oleoso es de más larga duración que las vacunas de Hidróxido de Aluminio y Saponina (46), ya que el adyuvante oleoso se obtienen muchas gotas de agua que contienen el virus vacunal, rodeadas de aceite, quedando de esta manera el virus vacunal perfectamente protegido al ataque de anticuerpos y sustancias inespecíficas (7,46).

3.13.4.3 La Organización Mundial de la Salud y otros expertos, han desarrollado una lista de recomendaciones técnicas que se deben tomar en cuenta, al utilizar adyuvantes en la preparación en las Vacunas:

3.13.4.3.1 La inmunopotenciación no debe ser excesiva, como para inducir hipersensibilidad en los tejidos del individuo.

3.13.4.3.2 Deben ser químicamente puros

3.13.4.3.3 Sin efectos farmacológicos

3.13.4.3.4 Su único efecto debe ser de potencializar la Vacuna, sin inducir daños.

3.13.4.3.5 Deben ser fácilmente biodegradables.

3.13.4.3.6 No deben contener Antígenos que posean reacción cruzada con Antígenos humanos o animales.

3.13.4.3.7 La vacuna tendrá que ser segura en la administración intramuscular y subcutánea.

- 3.13.4.3.8 No inducir hipersensibilidad alérgica hacia él mismo o combinarse con anticuerpos séricos naturales, para formar complejos inmunes potencialmente dañinos.
- 3.13.4.3.9 Sin efectos Carcinogénicos o Cancerígenos.
- 3.13.4.3.10 No deben producir efectos teratogénicos o abortivos.
- 3.13.4.3.11 La vacuna debe ser estable al almacenarlo por uno a dos años, de 4 a 7°C (25).

### 3.14 Control y Erradicación:

#### 3.14.1 Rabia Urbana:

El enfoque más racional para prevenir la rabia humana consiste en el control y la erradicación de la infección de los animales domésticos, sobre todo de los perros (1,58).

Los procedimientos usados en los programas de control y erradicación de la rabia humana tienen por objeto la reducción rápida de la población de animales susceptibles, mediante la inmunización de los perros y gatos con dueño y eliminación de perros callejeros. Para interrumpir las epizootias urbanas, se recomienda la vacunación, en el plazo más breve posible, de por lo menos 80% de toda la población canina de la ciudad y de sus áreas adyacentes. Una vez conseguida la interrupción de la epizootia, se debe continuar con la vacunación de los animales que no se inmunizaron con anterioridad, tanto de la generación vieja, como de los incorporados por crecimiento vegetativo o introducidos de otras áreas. Las campañas de vacunación pueden realizarse mediante visitas domiciliarias, por puestos fijos o clínicas móviles donde se concentran los perros de cada barrio, pero cuando los recursos lo permiten, es preferible el primer procedimiento.

En las campañas de vacunación en masa, el Comité de Expertos de la OMS en Rabia recomienda que se practique cada año la inmunización primaria de todos los perros comprendidos entre tres meses y un año de edad. Actualmente se dispone de un gran número de vacunas inocuas y de gran actividad para uso en perros (1,58).

Los perros deben revacunarse de acuerdo con la duración

de la inmunidad que confiere el tipo de vacuna empleada. Los cachorros menores de tres meses pueden vacunarse con una vacuna inactivada, pero deben ser revacunados lo antes posible después de cumplir esa edad (1,6,58).

Los gatos pueden vacunarse con una vacuna inactivada o de virus vivo modificado, con excepción de la Flury LEP, que puede resultar patógena para estos animales. La edad recomendada para la vacunación es la misma que para los perros, y la revacunación debe ser anual hasta que se disponga de más informaciones sobre la duración de la inmunidad en estos animales.

Deben eliminarse los perros o gatos que han sido mordidos por un animal rabioso. Se puede realizar una excepción cuando hay seguridad de que el animal mordido había sido vacunado con una vacuna activa y que aún está dentro del período de inmunidad prevista para ese producto biológico. Si se acepta no sacrificarlo, el animal mordido deberá quedar confinado y en observación por lo menos durante tres meses (1,58).

El control de perros vagabundos se puede llevar a cabo mediante programas de envenenamiento selectivo o por recolección a cargo de perreras. En este último caso, el perro puede ser devuelto a su dueño, previo pago de una multa y la vacunación antirrábica (1,12).

### 3.14.2 Control de la Rabia Silvestre:

3.14.2.1 El control de la rabia transmitida por quirópteros hematófagos resulta de especial interés para América Latina. Los procedimientos principales de control consisten en vacunar el ganado en áreas expuestas y en reducir la población de los vampiros (1).

En la actualidad se dispone de dos excelentes vacunas, ambas preparadas en cultivos celulares:

- Cepa Era: Proporciona una protección adecuada por más de tres años (1).

- Cepa V 319: Fue preparada por el proyecto de investigaciones sobre Rabia Parálitica FAO/INIP en México a partir de un aislamiento de virus rábico de origen de murciélago vampiro (34).

Otras vacunas útiles son la Flury HEP preparada en embrión de pollo, la CRL y PV-BHK-EI con coadyuvante de hidróxido de aluminio, que protegen por más de un año. En México se utiliza la vacuna de cepa Acatlán, preparada en cultivo tisular de células de vampiro.

La epizootiología de la rabia bovina aún no ha sido bien estudiada, pero en las observaciones realizadas en varios países se indica que esta infección tiene un carácter focal, por lo tanto, sería posible proteger al ganado mediante vacunación focal y perifocal, sin necesidad de recurrir a la vacunación en masa, que resulta muy onerosa. Para este propósito, se requieren estudios epizootiológicos y un adecuado sistema de vigilancia (†).

Los terneros de vacas inmunes se deben de vacunar hasta los 6 meses de edad, ya que los anticuerpos maternos, inhiben el virus vacunal, impidiendo que queden inmunizados (29).

Para la reducción de la población de vampiros, en el pasado se ha utilizado para este fin una serie de técnicas como dinamitar cuevas, usar gases venenosos y otros sistemas similares; los cuales se caracterizaban por su falta de selectividad, causando por ende daño a la ecología de la región.

El tratamiento que mejores resultados ha dado en la actualidad es el uso de anticoagulantes, puede ser de dos formas:

- Tratamiento Tópico de vampiros:

Esta técnica consiste en capturar un reducido número de vampiros, mediante redes alrededor de los corrales con ganado, aplicando sobre el cuerpo de los vampiros colectados un agente vampiricida de acción lenta y liberarlos para que vuelvan a sus refugios y contaminen, por medio del contac-

to directo, a los demás de su misma especie; para que posteriormente al efectuar cada uno de ellos la limpieza de su cuerpo, ingieran el producto que más tarde les causará la muerte (29). El compuesto que más se ha utilizado para este fin es la Difenadiona. Recientemente se está utilizando la Warfarina (29).

- Tratamiento Sistemático del Ganado:

La primera técnica sistemática utilizada en ganado bovino para el control de los vampiros consistió en suspender difenadiona en Corbapol, un aglutinante al 0.05% aplicándolo al ganado bovino por vía intrarruminal para que posteriormente circule en la sangre y los vampiros que se alimentan del ganado tratado reciban junto con la sangre, el compuesto que les causará la muerte.

Otra técnica sistemática en ganado bovino es la desarrollada por Flores y Col., que consiste en la aplicación de Warfarina, por vía intramuscular en dosis de 5 mg/kg con muy buenos resultados (29).

3.14.2.2 El control de la rabia transmitida por carnívoros silvestres de vida terrestre:

Consiste sobre todo en la aplicación de técnicas para reducir la población de la principal especie vectora del virus y responsable por el mantenimiento del ciclo de transmisión, como sería el zorro en Europa, y el zorro, la mofeta, mapache en los Estados Unidos (1,6).

3.14.3 Medidas de Transporte Internacional de Animales:

En los países que están libres de Rabia, se debe prohibir la introducción de perros y gatos de áreas infectadas, como se hace en Australia, o establecer una cuarentena prolongada de seis meses y simultáneamente inmunizar con una vacuna inactivada a los animales que se introduzcan en el país. En los países donde existe rabia y no es posible establecer una cuarentena prolongada, se deben exigir certificados oficiales de vacunación para perros y gatos, con un confinamiento adicional del animal en el domicilio, bajo vigilan-



cia veterinaria, hasta completar una cuarentena reducida (1).

Los animales silvestres deben ser sometidos a las mismas medidas. En lo posible, se debe prohibir la introducción de animales de áreas enzoóticas. Se recomienda el empleo de vacunas inactivadas, ya que las de Virus Vivo Modificado pueden ser patógenas para algunas especies silvestres (1).

### 3.15 Prevención de la Rabia:

#### 3.15.1 Esquemas de Profilaxis en Humanos:

##### - Tratamiento Pre-Exposición:

Indicado en personas que por la naturaleza de su ocupación, confrontan un riesgo mayor de adquirir la enfermedad, tales como Médicos Veterinarios, Personal de Laboratorio de Diagnóstico y Producción de Biólogos, cazadores, guardias forestales, comerciantes de especies zoológicas, taxidermistas, cuidadores de animales (8).

##### - Tratamiento Post-Exposición:

Indicado a personas que han sufrido una mordedura o han tenido contacto con la saliva (a nivel de piel lesionada o mucosas sanas) de un animal rabioso, desconocido o que enferma o muere de rabia durante el período de observación (8).

##### - Tratamiento de Personas Vacunadas Anteriormente:

Indicado en personas que recibieron anteriormente un tratamiento post-exposición y que nuevamente sufren una exposición (8).

#### 3.15.1.1 Tratamiento Pre-Exposición:

##### 3.15.1.1.1 Vacuna de Cerebro de Ratón Lactante:

- Una dosis de 2 ml. por vía subcutánea durante tres días consecutivos (8,18).
- Refuerzo a los 10, 20 y 90 días después de la última dosis.
- Revacunación anual con una dosis si el riesgo persiste (10,28).

A las tres semanas o al mes de la última dosis, es conveniente obtener una muestra de sangre para

determinar el título de los anticuerpos y, si resultara bajo, proceder a la administración de una o más dosis adicionales.

Las personas vacunadas en quienes se ha observado una satisfactoria formación de anticuerpos deben recibir una o más dosis de refuerzo, cuando son expuestas a la infección (1,48).

#### 3.15.1.1.2 Vacuna de embrión de pato:

- Tres dosis de 1 ml. por vía subcutánea, con intervalos de una semana.
- Una cuarta dosis, un mes después de la última.
- Revacunación anual con una dosis si el riesgo persiste (1,48).

#### 3.15.1.1.3 Vacuna de Células Diploides Humanas:

- Tres dosis de 1 ml. por vía intramuscular (1,13) ó 0.1 ml. intradérmica (8) los días 0, 7, 21 ó 28.
- Revacunación con una dosis de 1 ml. por vía intramuscular o 0.1 ml. por vía intradérmica, cada dos años si el riesgo persiste (1,8,36,37,60).

Esta vacuna en cultivo de células diploides humanas (HDCV = "human diploid cell vaccine") es altamente inmunológica pero de un costo inaccesible para los países en desarrollo. La conversión serológica se produce en más de 99% de los tratados y perdura dos años en 100% de los vacunados (1,35).

La administración intradérmica es de mucho menor costo y tan eficaz como la intramuscular. Efectos secundarios indeseables se observan en menos de 1% de los inmunizados y consisten en dolor muscular, cefalalgia y dolor en el lugar de la inyección (1,41,42).

#### 3.15.1.2 Tratamiento Post-Exposición: (Ver cuadro No. 2)

La prevención de la rabia después de la exposición consiste sobre todo en el tratamiento local de la herida y en la inmunización pasiva y activa del individuo.

### 3.15.1.2.1 El tratamiento Local de la herida:

Resulta de suma importancia y de por sí puede prevenir muchos casos de rabia, al eliminar o inactivar el virus inoculado. Se recomienda lavar la herida lo antes posible bajo un chorro fuerte de agua y limpiarla con agua y jabón, o agua y un detergente. A continuación se aplica alcohol al 40-70%, tintura al 0.1%. Las heridas no se deben de suturar inmediatamente. En ensayos efectuados en animales de laboratorio se ha comprobado que la infiltración de la herida con suero antirrábico es muy eficaz en la prevención; por tanto, se recomienda instilar suero dentro de la herida e infiltrarlo alrededor de la misma (8).

### 3.15.1.2.2 Administración de la Vacuna:

El largo período de incubación que se observa en la mayoría de los casos de rabia humana permite establecer una inmunización profiláctica posterior a la exposición. La vacunación debe iniciarse lo antes posible, con el fin de asegurar que el individuo quede inmunizado antes de que el virus rábico alcance el sistema nervioso central. Se estima que en el mundo se someten anualmente a tratamiento antirrábico de 500,000 a 1,500,000 personas o quizás más. Se pueden seguir los siguientes tratamientos:

#### 3.15.1.2.2.1 Vacuna de cerebro de ratón lactante: (Esquema reducido)

- Una dosis diaria de 2 ml. por vía subcutánea durante siete días.
- Refuerzos a los 10, 20 y 90 días después de la última dosis (8,14,57).

#### 3.15.1.2.2.2 Vacuna de cerebro de ratón lactante: (Esquema tradicional o Clásico)

- Una dosis diaria de 2 ml. por vía subcutánea durante 14 días.
- Refuerzos a los 10, 20 y 90 días (8).

#### 3.15.1.2.2.3 Vacuna de Embrión de Pato:

- Una dosis diaria de 1 ml. por vía subcutánea durante 14 días.
- Refuerzos a los 10, 20 y 90 días después de la última dosis (8).

#### 3.15.1.2.2.4 Vacuna de Células Diploides:

- Una dosis de 1 ml. por vía intramuscular, los días 0, 3, 7, 14 y 28 días.
- La OMS recomienda además una dosis de refuerzo al día 90 (8,14).

#### 3.15.1.3 Tratamiento de personas vacunadas anteriormente:

##### 3.15.1.3.1 Vacuna de Cerebro de Ratón Lactante:

- Una dosis de 2 ml. por vía subcutánea.
- Refuerzos a los 4, 10 y 20 días (8,14).

##### 3.15.1.3.2 Vacuna de Embrión de Pato:

- Una a cuatro dosis (los días 0, 3, 7, 20), dependiendo del esquema recibido anteriormente, del intervalo de la última vacunación y la nueva exposición y de la gravedad de ésta.
- Personas vacunadas anteriormente no deben recibir suero antirrábico, ni inmunoglobulina humana, porque podría atenuar la formación de anticuerpos (8, 14).

##### 3.15.1.3.3 Vacuna de Células Diploides Humanas:

- En persona vacunada hace menos de un año, administrar un refuerzo el día 0.
- En personas vacunadas hace más de un año, según la gravedad del caso, administrar refuerzos los días 0, 3, 7 (3,8,9,14).

La administración combinada de suero y vacuna es el método más eficaz de profilaxis antirrábica y puede utilizarse en todos los casos, con especial indicación cuando se trata de exposiciones graves. Los sueros pueden ser heterólogos, obtenidos por hiperinmunización de diferentes especies animales (équidos, conejos y otros) o inmunoglobulina antirrábica homóloga (de origen humano). El suero antirrábico

se administra una sola vez, por vía intramuscular a razón de 40 unidades internacionales (UI) por kg de peso corporal de suero heterólogo o Inmunoglobulina humana antirrábica (Suero homólogo) una dosis de 20 UI por kg. (1,14).

El suero debe administrarse lo antes posible, cualquiera que sea el tiempo transcurrido desde la exposición, para neutralizar el virus inoculado por la mordedura (1).

Para la profilaxis humano sólo está indicado el uso de vacunas inactivadas. El comité de Expertos de la OMS en Rabia recomienda que se suspenda el empleo de las vacunas que contienen virus vivo residual, tales como las de tipo Fermi (en tejido nervioso e inactivado con fenol a 22°C). Las vacunas inactivadas pueden ser las que se elaboran con virus fijo en tejido nervioso de animales adultos (tipo Semple), en cerebro de animales lactantes (conejo, ratas y ratones) o en cultivo celular. Con anterioridad, en los Estados Unidos se usaba una vacuna de embrión de pato, cuya producción fue discontinuada a fines de 1981, principalmente por ser poco activa. Se obtuvo un significativo avance con el perfeccionamiento de la vacuna en cultivo de células diploides humanas (HDCV) que sustituyó a otras vacunas de uso humano en Europa, Estados Unidos y Canadá. Esta vacuna es de gran actividad y los efectos secundarios locales o sistemáticos son menos frecuentes.

En América Latina, el uso de la vacuna Fuenzalida (CRL) ha desplazado prácticamente al de todo otro tipo. La CRL tiene la ventaja de ser mucho más activa y más inocua que la vacuna Semple, y los accidentes neurológicos son muchos menos frecuentes (1).

Al prescribir un tratamiento profiláctico en el hombre, debe tenerse en cuenta que tanto el Suero

como la Vacuna pueden originar complicaciones. El suero heterólogo puede provocar reacciones de tipo anafiláctico, y antes de administrarlo se debe practicar una prueba intradérmica u oftálmica de sensibilidad (1).

Se estima que el 15 a 25% de los tratados con suero equino sufren reacciones anafilácticas con las características de la denominada Enfermedad del Suero. Las complicaciones con suero homólogo son raras, pero su producción resulta costosa y su disponibilidad escasa (1).

Con respecto a las vacunas, se puede afirmar que ninguna es totalmente inocua. Se recomienda evitar todo abuso en la aplicación de tratamientos innecesarios. En la actualidad, con el avance tecnológico en la ingeniería genética se advierte la posibilidad de obtener una vacuna que sólo contenga las subunidades del virión rábico inductoras de la inmunidad. En época reciente se ha logrado la biosíntesis de la glucoproteína (GP) del virus, por la transferencia de genes del virus rábico a Escherichia coli. Si se lograra desarrollar una vacuna sobre la base de esta fracción, probablemente estaría desprovista de efectos secundarios y resultaría de bajo costo, al punto de permitir su uso en el hombre y en los animales. Igualmente utilizando las técnicas de recombinación de ADN se ha obtenido experimentalmente protección contra la infección rábica en ratones usando un virus recombinado Vaccinia-Rabia (1).

En la actualidad se realizan otros estudios con anticuerpos monoclonales, de mucho interés en la inmunización antirrábica, para correlacionar antígenicamente los virus de las vacunas con los virus activos en la población animal de una región determinada. Si bien es prematuro atribuir a la va-

riación antigénica algunas de las fallas en la inmunización post-exposición, ya que se ha demostrado experimentalmente en varios casos que una vacuna activa puede conferir protección a pesar de las diferencias antigénicas de las cepas, sin duda se necesitan más investigaciones en diferentes áreas del mundo para dilucidar este problema (1).

## Cuadro 2:

Tratamiento general específico de la Rabia (1)

Naturaleza del contacto	Estado del animal sin tener en cuenta si está vacunado		Tratamiento recomendado
	En el momento del episodio sospechoso	Durante el período de observación de 10 días	
I. Contacto sin lesión, contacto indirecto, ningún contacto.	Rabioso	---	Ninguno
II. Lamedura de la piel, arañazos o erosiones, mordeduras leves (en las partes cubiertas de los brazos, del tronco y de las piernas.	a) Presuntos Síntomas de Rabia *B	Sano	Iniciarse la vacunación. Interrúmpase el tratamiento si el animal sigue sano durante cinco días. *A*C
		Rabioso	Iniciarse la vacunación, si el diagnóstico es positivo administrar suero y proseguir con la vacunación.
	b) Rabioso, animal salvaje *D o animal que no puede ser sometido a observación.	---	Adminístrece suero y vacuna.
III. Lamedura de las mucosas, mordedura grave, mordeduras múltiples o situadas en cara, cabeza, dedos y cuello.	Animal doméstico o salvaje *B sospechoso de rabia *D o rabioso, o animal que no puede ser sometido a observación.	---	Adminístrece suero y vacuna. Interrúmpase el tratamiento si el animal sigue sano durante cinco días *A*C

\* A El período de observación redomendado en este cuadro sólo se aplica a perros y gatos.

\* B En las zonas de endemia, todos los casos de mordedura sin provocación previa deben considerarse sospechosos, a no ser que el análisis de laboratorio (investigación de anticuerpos fluorescentes en el cerebro) sea negativo.

\* C O si la prueba de anticuerpos fluorescentes en el tejido cerebral es negativo.

\* D En general, el contacto con roedores y conejos muy rara vez hace necesario el tratamiento antirrábico específico.



#### IV. MATERIALES Y METODOS:

##### 4.1 Investigación a nivel de campo:

La presente investigación se realizó en la Aldea El Milagro, Municipio de Masagua, Departamento de Escuintla. La cabecera municipal de Masagua se encuentra a 71 Kms. de la ciudad capital, a una altitud de 110 Mts. SNM y está ubicada a una latitud de  $14^{\circ} 12' 10''$  y una longitud de  $90^{\circ} 50' 55''$ ; la Aldea El Milagro se encuentra a 2 Kms. del Municipio de Masagua, quedando el Río Guacalate de por medio.

La población canina total estimada de acuerdo al censo efectuado por el Departamento de Zoonosis, Dirección General de Servicios de Salud (D.G.S.S.) fue de 425 perros, siendo inmunizados con una dosis de dos ml. subcutáneamente 387 (91.06%), habiéndose considerado en la presente investigación 197 perros (50.90%), de los cuales 99 (50.25%) fueron inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal, Grupo 1 y 98 (49.75%) con Vacuna CRL 1% +  $Al(OH)_3$ , Grupo 2.

Los perros vacunados y sangrados al día 0 fueron identificados con collares plásticos de color amarillo y se les elaboró las fichas de filiación correspondientes; en las que aparecen las características del animal: edad, raza, sexo, color y tamaño; así como el nombre y dirección de los propietarios. A cada perro se le asignó un número de indentificación, el cual se utilizó durante todo el estudio, entregándole a los propietarios el certificado de vacunación correspondiente, en el cual se indicaba, las fechas de sangrías, a los 30, 60 y 90 días postvacunación. (FICHAS 1 y 2).

4.1.1 A los perros se les obtuvo muestra de sangre en condiciones estériles, las cuales fueron transportadas en refrigeración al Laboratorio Biológico de la D.G.S.S.

4.1.2 La sangre se centrifugó a 2,000 g durante diez minutos.

4.1.3 El suero se inactivó en Baño María de  $50$  a  $56^{\circ}C$ , durante 30 minutos.

4.1.4 Los sueros se almacenaron a  $-20^{\circ}C$  hasta el momento en que se efectuaron las pruebas.

4.1.5 A todos los sueros se les efectuaron las titulaciones de anticuerpos antirrábicos por medio de la prueba de Contrainmunolectroforesis (CIE) y/o Sueroneutralización en ratones (SN), anotándose los resultados en los protocolos correspondientes para

su análisis posterior. (FICHA 1).

#### 4.2 Investigación a nivel de Laboratorio:

Durante el estudio se efectuaron 438 pruebas de CIE y 71 pruebas comparativas con SN, en los dos grupos de perros inmunizados contra la Rabia.

##### 4.2.1 Vacunas:

4.2.1.1 Se prepararon 500 ml. de Vacuna Canina CRL 2% Normal, lote 88-6\*, a la cual se le ajustó el pH a 7.2. Se distribuyeron 250 ml. de la vacuna en alícuotas de 30 ml, lo que equivale a 15 dosis por frasco, fueron identificados con el número de lote y fecha de expiración; almacenándose a 4 °C hasta el momento de su uso.

4.2.1.2 Los 250 ml de vacuna restante, CRL 2% Normal, fue adsorbida con igual volumen de una suspensión de gel de Aluminio, de tal manera que el producto final debía contener 1% de antígeno viral y 1.5 mg/ml de óxido de Aluminio. Se ajustó el pH a 7.2 y se envasó en frascos estériles con 30 ml de la vacuna, la cual se etiquetó y almacenó a 4 °C hasta su aplicación.

4.2.1.3 A los dos tipos de Vacunas se les efectuó las pruebas de Control de Calidad: Esterilidad, Pureza, Inocuidad y Potencia siguiendo las normas de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. (NIH).

##### 4.2.2 Virus:

Para las pruebas de Sueroneutralización en ratones (SN) se utilizó virus CVS patrón de prueba (Challenge Virus Standard), preparado en cerebros de ratón de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU., el cual se tituló para determinar el número de dosis letales<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub>), utilizando para la prueba de SN. de 10 a 100 DL<sub>50</sub>/0.03 ml.

##### 4.2.3 Antígeno inactivado para la Prueba de CIE:

Fue preparada según la técnica descrita por Díaz, A.M. y col. (21), que consiste en una suspensión al 40% de tejido nervioso de conejos lactantes infectados con Virus CVS/CCL/2°P, en agua

\* Laboratorio Biológico, D.G.S.S.

destilada suplementada con sacarosa y glicina e inactivada con Betapropiolactona 1:3,000. El antígeno se almacena en ampollas que contiene 1 ml. de la suspensión, el cual se liofiliza y en esta forma es distribuido por el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO).

Se determinó que la dilución 1:16 del Antígeno lote 47 produjo bandas nítidas, al enfrentarlo con el suero hiperinmune de conejo específico lote 3. Las bandas fueron comparadas con las que produce el sistema antígeno-suero estándar.

#### 4.2.4 Suero Indicador para la Prueba de CIE:

Se utilizó suero antirrábico hiperinmune de conejo, preparado por el Centro de Referencia Internacional, CEPANZO. Este contiene 130 a 200 UI/ml., el cual es liofilizado en ampollas con 1 ml. de suero hiperinmune.

Se determinó que la dilución 1:22 del suero hiperinmune lote 3 fue la óptima con el Antígeno lote 47; ya que produjo bandas de precipitación con morfología, ubicación e intensidad similares a las que produce el sistema antígeno-suero estándar.

#### 4.2.5 Prueba de Contrainmunolectroforesis: el procedimiento fue:

4.2.5.1 Se recubrieron láminas de vidrio de 75x50 mm. con 8 ml. de agarosa 0.9% en solución amortiguada con Veronal Sódico 0.05 M, pH 8.2 y se colocaron en cajas de Petri durante diez minutos a 4 °C. En cada una de dos filas paralelas de la lámina, se marcaron en la primera fila, cinco orificios de 6 mm. de diámetro y en la segunda fila cinco orificios de 3 mm. de diámetro.

4.2.5.2 Los sueros fueron inactivados de 48 a 50 °C, por 30 minutos y se prepararon diluciones iniciales de suero en solución salina tamponada pH 7.2, siendo éstas de 0; 1:2.5; 1:5; 1:10 y 1:20.

4.2.5.3 Se mezclaron 0.05 ml. de dilución 1:8 del Antígeno lote 47 con 0.05 ml. de cada dilución de los sueros problema. Para el CONTROL se agregó 0.1 ml. de dilución 1:8 del Antígeno con 0.1 ml. de solución salina pH 7.2. De esta manera la dilución final del Antígeno fue de 1:16 y las de los sueros problema fueron: 1:2; 1:5; 1:10; 1:20 y 1:40.

- 4.2.5.4 Todas las diluciones se incubaron por 60 minutos a 37 °C.
- 4.2.5.5 Se retiró la agarosa de las cavidades de 6 mm. y se colocaron en éstas, las distintas diluciones de suero-antígeno, así como los Controles positivo y negativo.
- 4.2.5.6 Las láminas con sus respectivos puentes de papel filtro, los orificios de mayor tamaño (6 mm.) del lado del Cátodo (polo -) y los orificios de menor tamaño (3 mm.) del lado del Anodo (polo +); se colocaron en la cuba del equipo de electroforesis.
- 4.2.5.7 Se hizo una corrida electroforética de 45 minutos, aplicando una diferencia de potencial de 8 a 10 voltios (2 mA. por cm de lámina) entre los extremos de cada lámina.
- 4.2.5.8 Posteriormente se suspendió el paso de la corriente, se retiró la agarosa de los orificios de 3 mm. y se llenaron con Suero Antirrábico Estándar, lote 3, diluido en 1:22.
- 4.2.5.9 Se reinició el paso de la corriente eléctrica nuevamente, aplicando la misma diferencia de potencial por 120 minutos. Humedeciendo periódicamente los puentes de papel filtro, colocados en los extremos de las láminas.
- 4.2.5.10 Transcurrido este lapso de tiempo, se identificaron las bandas de precipitación en las láminas, haciendo las lecturas con ayuda de luz incidente.
- Se consideró como título del suero problema, la mayor dilución que no produjo bandas de precipitación, comparables con las del Control Positivo.
- En el caso de no haber obtenido el título final con las diluciones realizadas del suero problema, se incrementó el número de diluciones; manteniendo el factor de dilución 1:2.
- 4.2.6 Prueba de Sueroneutralización en Ratones (SN):
- 4.2.6.1 Los sueros se inactivaron durante 30 minutos a 56 °C.
- 4.2.6.2 Se prepararon diluciones seriadas de los sueros problemas utilizando el factor de dilución 1:5, como dilu-

- yente se usó Suero Equino al 2%. Las diluciones iniciales utilizadas fueron: 1:2.5; 1:5; 1:25 y 1:125.
- 4.2.6.3 Se mezclaron volúmenes iguales de cada dilución y de una suspensión de virus CVS que contenía entre 10 a 100  $DL_{50}$ /0.03 ml. De esta manera las diluciones finales fueron: 1:5; 1:25; 1:125 y 1:625.
- 4.2.6.4 Para la Titulación del Virus se prepararon tres diluciones decimales a partir de la dilución inicial, que posea de 10 a 100  $DL_{50}$  requeridas.
- 4.2.6.5 Luego los sueros se enfriaron, sumergiéndolos en baño de hielo y por vía intracerebral se inoculó 0.03 ml. de cada una de las diluciones, en seis ratones de 3 a 4 semanas de edad, comenzando por la dilución menor del suero.
- 4.2.6.6 Para la titulación del virus se inocularon diez ratones con las cuatro diluciones correspondientes, iniciando la inoculación con la mayor dilución del virus.
- 4.2.6.7 Los ratones albinos suizos se mantuvieron en observación durante 14 días postinoculación, registrándose diariamente la evolución de los síntomas y las muertes presentadas.
- 4.2.6.8 Se calculó el Título de los sueros problemas, como la máxima dilución del suero que protegió al 50% de los ratones inoculados, mediante el Método de Reed y Muench.
- Cuando no se detectó el título final con las diluciones normales, se incrementaron éstas; manteniendo el factor de dilución 1:5.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION:

La presente investigación se realizó en la Aldea El Milagro, Municipio de Masagua, Departamento de Escuintla; por ser un área aislada en la cual la población canina no había sido inmunizada contra la Rabia.

La población de perros estimada en la Aldea El Milagro fue de 425; habiéndose inmunizado contra La Rabia un total de 387 perros, que corresponden al 91.06% del total de la población canina existente en el momento del estudio, obteniéndose desde el punto de vista epidemiológico una alta cobertura, ya que únicamente el 8.94% no fue inmunizados. (CUADRO 1).

La distribución de los 387 perros inmunizados, el 50.90%, corresponde a los perros investigados, de los cuales 99 (25.58%) se les administró la Vacuna CRL 2% Normal y 98 (25.32%) se inmunizó con la Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. El 49.10% de los perros vacunados, no fueron considerados en el estudio, ya que éstos fueron presentados por los propietarios durante el período de sangrías, en los cinco meses en que se realizó el estudio a nivel de campo; inmunizándolos con la Vacuna antirrábica estándar lote 88-5\*.

Los 197 (100.00%) perros investigados se distribuyeron en dos grupos, a los que se inmunizaron con la Vacuna CRL 2% Normal corresponde el 50.25% (99 perros) y a los que se les administró Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> fue el 49.75% (98 perros). (CUADRO 2).

En el estudio se investigaron un total de 197 perros, de los cuales 106 (53.81%) fueron machos y 91 (46.19%) hembras. La distribución de los grupos etarios de perros inmunizados, fueron machos de 3 a 11 meses de edad 33; 1 a 3 años 59. Y mayores de 3 años 14. Las hembras de 3 a 11 meses de edad fueron 34, 1 a 3 años 49 y mayores de 3 años 8.

Durante el estudio, de acuerdo a la distribución por edad, se observó, que la población canina por grupo etario fue mayor en los perros de 1 a 3 años, machos 59 y hembras 49; en comparación con el grupo etario mayor de 3 años que fue de 14 machos y 8 hembras. (CUADRO 3).

Los 197 perros fueron sangrados al día 0, 30, 60 y 90 para determinar los niveles de anticuerpos antirrábicos circulantes. Todos los sueros

\* Laboratorio Biológico, D.G.S.S.

fueron investigados mediante la prueba de Contrainmunolectroforesis (CIE), obteniéndose los siguientes resultados. Los perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal al día 0, sóloamente 1 (1.92%), presentó anticuerpos de los 52 estudiados. A los 30 días postvacunación presentaron los títulos siguientes:  $\underline{1:2}$  el 41.46%; 1:2 el 24.39%; 1:5 el 14.63%; 1:10 y 1:20 el 9.76%. A los 60 días postvacunación se obtuvieron los siguientes títulos:  $\underline{1:2}$  el 65.31%; 1:2 el 20.41%; 1:5 el 8.16%; 1:10 el 4.08% y 1:20 el 2.04%. A los 90 días postvacunación fueron:  $\underline{1:2}$  el 79.31% y 1:2 el 20.69%. (CUADRO 3), (GRAFICA 1,2 y 3).

Los perros inmunizados con Vacuna CRL 1% +  $\text{Al(OH)}_3$  presentaron los siguientes títulos de anticuerpos circulantes: al 0 día  $\underline{1:2}$  el 100.00%.

A los 30 días postvacunación el 6.38%  $\underline{1:2}$ ; 6.38% 1:2; 14.90% 1:5; 36.17% 1:10; 25.53% 1:20; 6.38% 1:40 y 4.26% 1:80. A los 60 días postvacunación el 36.00% fue  $\underline{1:2}$ ; 28.00% 1:2; 24.00% 1:5; 8.00% 1:10 y 4.00% 1:20. A los 90 días postvacunación el 52.78% fue  $\underline{1:2}$ ; 33.33% 1:2; 11.11% 1:5 y 2.78% 1:10. (CUADRO 4), (GRAFICA 1,2 y 3).

De acuerdo a los resultados serológicos anteriores, se puede determinar que la Vacuna CRL 1% +  $\text{Al(OH)}_3$  indujo la síntesis de anticuerpos antirrábicos en mayor proporción que la vacuna CRL 2% Normal, ya que a los 30 días postvacunación, se obtuvo el título más alto en la prueba de CIE de 1:80 que corresponde al 4.26% de los perros inmunizados, en comparación con el mayor título detectado en la prueba de CIE, el cual fue de 1:20 en el 9.76% de los perros vacunados con CRL 2% Normal. (CUADRO 4), (GRAFICA 1).

Los resultados obtenidos en la administración de ambas vacunas confirman la mayor respuesta de los perros a la Vacuna CRL 1% +  $\text{Al(OH)}_3$ , ya que a los 30 días el porcentaje promedio fue de 93.62% de los títulos obtenidos de 1:2 a 1:80; a los 60 días el porcentaje promedio fue 64.00% en los títulos 1:2 a 1:20. Y a los 90 días el porcentaje promedio fue 47.22% en los títulos 1:2 a 1:10; en comparación con el porcentaje promedio de los títulos obtenidos con la Vacuna CRL 2% Normal, el cual fue a los 30 días 58.54% en los títulos de 1:2 a 1:20; a los 60 días el porcentaje promedio fue de 34.69% en los títulos 1:2 a 1:20 y a los 90 días el porcentaje promedio fue de 20.69% en el título obtenido de 1:2. (CUADRO 5).

Se efectuó gráficamente la comparación entre las Vacunas CRL 2% Normal y CRL 1% +  $\text{Al(OH)}_3$  de los títulos de anticuerpos circulantes anti-

rrábicos obtenidos mediante la prueba de CIE a los 30, 60 y 90 días postvacunación. Se puede apreciar que la mejor respuesta inmune se obtuvo a los 30 días en ambas vacunas, siendo superior la Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. A partir de los 30 días postvacunación se observó que los niveles de anticuerpos fueron disminuyendo gradualmente en los dos grupos, lo cual posiblemente fue debido al continuo stress en que se mantienen los perros en la Aldea El Milagro, ya que por norma general los propietarios continuamente los llevan al campo por un período aproximado de once horas, tiempo en el cual, los perros consumen poca agua y escaso alimento, habiéndose confirmado por las deficientes condiciones nutricionales y el alto grado de parasitismo, observados durante los períodos de vacunación y sangrías. En la presente investigación se observó, que la Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> siempre indujo los niveles más altos de anticuerpos neutralizantes a los 30, 60 y 90 días postvacunación. (GRAFICAS 4 y 5).

Se determinó el título final de anticuerpos antirrábicos mediante la prueba de CIE, en los perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, estableciendo su relación entre el grupo etario y sexo, habiéndose obtenido el mayor número de sueros con título más alto a los 30 días postvacunación. Los títulos más altos de anticuerpos en los perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal fueron: en la hembra de 3 a 11 meses de edad con 1:10 (20.00%); machos de 1 a 3 años con 1:20 (13.30%); el macho mayor de 3 años con título 1:20 (20.00%). A los 60 días postvacunación en las hembras de 3 a 11 meses de edad con 1:5 (25.00); en los machos de 1 a 3 años con 1:10 (10.50%), en el macho mayor de 3 años con títulos de 1:20 (50.00%). A los 90 días postvacunación la hembra y el macho de 3 a 11 meses de edad con títulos de 1:2 (25.00%); en las hembras de 1 a 3 años con títulos de 1:2 (28.60%) y la hembra y macho mayores de 3 años con 1:2 (100.00%). (CUADRO 6).

El mayor porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos a los 30 días postvacunación con Vacuna CRL 2% Normal, fue en el grupo etario 1 a 3 años de edad, con título de 1:2. A los 60 días postvacunación fue en los perros mayores de 3 años con 1:20 y a los 90 días en perros de 3 a 11 meses con 1:2. (GRAFICA 6,8 y 10).

Los títulos más altos de anticuerpos obtenidos a los 30 días postvacunación en los perros inmunizados con Vacuna 1% + Al(OH)<sub>3</sub> fueron: en



la hembra de 3 a 11 meses de edad de 1:80 (10.00%); en la hembra de 1 a 3 años con 1:80 (9.10%) y el macho mayor de 3 años con 1:20 (33.30%). A los 60 días la hembra de 3 a 11 meses de edad con 1:20 (14.30%); el macho de 1 a 3 años con 1:20 (6.30%) y hembra mayor de 3 años con 1:10 (50.00%). A los 90 días postvacunación el macho de 3 a 11 meses con 1:2 (20.00%); el macho de 1 a 3 años con 1:10 (9.10%) y las hembras y machos mayores de 3 años con 1:2 (100.00%). (CUADRO 7).

El porcentaje más alto de anticuerpos neutralizantes detectados en los perros inmunizados con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, a los 30 días postvacunación fue en el grupo etario 1 a 3 años con títulos de 1:20. A los 60 días postvacunación en perros mayores de 3 años con 1:2 y 1:5; a los 90 días postvacunación en perros mayores de 3 años con títulos de 1:2. (GRAFICAS 7,9 y 11).

El título antirrábico más alto detectado a los 30 días postvacunación en los perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal, fue de 1:20; a los 60 días postvacunación de 1:20 y a los 90 días postvacunación de 1:2. En los perros vacunados con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, el mayor título obtenido a los 30 días fue de 1:80, a los 60 días de 1:20 y a los 90 días de 1:10. (GRAFICAS 6,7,8,9,10 y 11).

Con los resultados serológicos anteriores se demuestra, que los perros inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, presentaron títulos de anticuerpos antirrábicos iguales o superiores a los obtenidos con la Vacuna CRL 2% Normal.

De acuerdo a los resultados de la Prueba de CIE, se determinó aplicar una Dosis de Refuerzo, cinco meses postvacunación, los grupos de perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal (99 perros) y Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> (98 perros); los perros que tuvieron títulos de anticuerpos antirrábicos menores de 1:2 en la prueba de CIE, fueron: Grupo 1: 15 perros a los que se les administró como Vacuna inicial CRL 2% Normal y Grupo 2: 13 perros que se inmunizaron con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> inicialmente. (CUADRO 8).

Para un mejor análisis tanto a nivel de campo como de laboratorio se establecieron cuatro subgrupos: Grupos 1, subgrupo A: Vacuna de refuerzo CRL 2% Normal (7 perros). Grupo 1, subgrupo B: Vacuna de refuerzo CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> (8 perros), habiéndose inmunizado en este Grupo un total de 15 perros. Grupo 2, subgrupo C: Vacuna de refuerzo CRL 2% Nor-

mal (6 perros) Grupo 2, subgrupo D: Vacuna de refuerzo CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> (7 perros), habiéndose inmunizado en este Grupo 13 perros. Haciendo un total de 28 perros revacunados en los cuatro subgrupos. (CUADRO 8).

De los 28 perros revacunados, fueron sangrados a los 15 días postvacunación, 23 (82.14%), a los cuales se les realizó la Prueba de CIE, para determinar el título final de anticuerpos antirrábicos. El título mayor obtenido en el Grupo 1, subgrupo A fue de 1:40 (14.28%), en el Grupo 1, subgrupo B de 1:20 (28.57%). El Grupo 2, subgrupo C el título mayor fue de 1:40 (25.00%) y el Grupo 2, subgrupo D fue 1:160 (20.00%). (CUADRO 9), (GRAFICA 12 y 13).

De acuerdo a los resultados anteriores se confirma que la Vacuna de refuerzo CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, fue la que indujo niveles más altos de anticuerpos circulantes en los perros revacunados y que previamente habían sido inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, Grupo 2, subgrupo D, ya que en éstos el título mayor fue de 1:160 (20.00%), en comparación con el Grupo 1, subgrupo A que fueron inmunizados y revacunados con Vacuna CRL 2% Normal, determinando el mayor título de 1:40 que corresponde al 14.28%. (CUADRO 8), (GRAFICA 12,13 y 14).

Los resultados obtenidos en el Grupo 2, subgrupo C fueron superiores a los obtenidos en el Grupo 1, subgrupo A y B, lo cual indica que se obtiene mejor respuesta, al inmunizar los perros con la Vacuna CRL 1% + Al(OH) como dosis inicial y revacunar cinco a seis meses después con el mismo tipo de Vacuna, Grupo 2, subgrupo D; en comparación con la Vacuna CRL 2% Normal; Grupo 1, subgrupo A. Cuando se inmuniza inicialmente con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> y se revacuna con CRL 2% Normal se obtienen los más altos títulos de 1:40 (25.00%) Grupo 2, subgrupo C, en comparación a los perros inmunizados con CRL 2% Normal inicialmente y revacunados con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, en los cuales se obtuvieron los títulos más altos de 1:20 (28.57%) Grupo 1, subgrupo B. (CUADRO 9), (GRAFICA 12,13, 14 y 15).

De acuerdo a los resultados anteriores se concluye que la Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> proporciona mejores títulos de anticuerpos antirrábicos, que la Vacuna CRL 2% Normal, ya que induce en mayor proporción la síntesis de Inmunogamaglobulinas antirrábicas en perros de campo. Los anticuerpos permanecen por un período de tiempo mayor en los perros inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. (CUADRO 9), (GRAFICA 12,13,14 y 15).

El Coeficiente de Correlación ( $r$ ) fue calculado para establecer el grado de significancia, entre los títulos obtenidos por las pruebas de Sueroneutralización en ratones (SN) y Contrainmunolectroforesis (CIE). Para el análisis estadístico, los títulos de SN fueron expresados como  $\log_5$  y los títulos de CIE como  $\log_2$ . Los valores de las escalas de las dos pruebas representan el número de las diluciones de los sueros utilizadas. (GRAFICA 16 y 17).

En la presente investigación se obtuvo el Coeficiente de Correlación  $r = 0.55$  en 22 sueros caninos, los cuales fueron positivos a la prueba de CIE en las diluciones de 1:2 a 1:20, obteniéndose en la prueba de SN títulos entre 1:6 a 1:625. Se determinó el valor  $r = 0.67$  en 38 sueros, en los cuales se detectaron mediante la prueba de CIE títulos de anticuerpos antirrábicos menores de 1:2 a 1:20, en comparación con la prueba de SN, en la cual se detectaron títulos de 1:6 a 1:625. (CUADROS 10 y 11).

Los resultados anteriores indican alta correlación de la prueba CIE con la prueba SN. Es de hacer notar que el Coeficiente de Correlación obtenido en la presente investigación, entre las pruebas de CIE y SN, son comparables con el sistema de referencia utilizado, tomando en cuenta que son los primeros resultados obtenidos en la detección de anticuerpos antirrábicos mediante la prueba de Contrainmunolectroforesis en Guatemala.

Las ecuaciones de las rectas de regresión fueron:

$$y = 1.7979 + 0.3731 x \quad (n = 22 \text{ sueros})$$

$$y = 1.8630 + 0.3518 x \quad (n = 38 \text{ sueros}).$$

Las cuales se calcularon para estimar los títulos de anticuerpos neutralizantes en base a los obtenidos por la prueba de CIE, y se utilizó la siguiente conversión:

$$\log_5 SN_E = 1.7979 + 0.3731 \text{ título } \log_2 \text{ CIE} \quad (n = 22 \text{ sueros})$$

$$\log_5 SN_E = 1.8630 + 0.3518 \text{ título } \log_2 \text{ CIE} \quad (n = 38 \text{ sueros}).$$

De los coeficientes de las regresiones lineales, las ordenadas al origen, indican que los sueros con títulos de anticuerpos neutralizantes de 1:19 a 1:21 o menores en SN, no podrán ser detectados por CIE. (GRAFICAS 16 y 17).

La fórmula utilizada para calcular los títulos de anticuerpos neutralizantes en SN, en base a los resultados de CIE, fue:

$$\text{Título SN} = \log_{10} \text{SN} / \log_{10} 5$$

$$\text{Antilog (Título SN * 0.69897)} = \text{SN}$$

n = 22

SN = Antilog (1.85 \* 0.69897)

SN = Antilog (1.29)

SN = 19.50

SN = 1:19

n = 38

SN = Antilog (1.90 \* 0.69897)

SN = Antilog (1.33)

SN = 21.39

SN = 1:21

Desde el punto de vista de control serológico de los perros inmunizados contra la Rabia, esto no puede ser importante, si se toma en cuenta los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por los inmunógenos actuales. Sin embargo, títulos menores de 1:2 en la prueba de CIE nos indican que los sueros no tienen anticuerpos antirrábicos neutralizantes o éstos son muy bajos, por lo que es conveniente revacunar a los perros para garantizar su protección a nivel de campo y efectuar a estos sueros, pruebas comparativas de CIE y SN.

En la presente investigación se realizaron un total de 563 lecturas en la prueba de Contraimmunoelectroforesis, de las cuales 205 lecturas se efectuaron a los perros inmunizados con CRL 2% Normal en las tres sangrías; a los 30 días en los tres grupos etarios se realizaron 93 lecturas, a los 60 días 75 lecturas y a los 90 días 37 lecturas. En los perros del Grupo 1, los títulos más altos de anticuerpos antirrábicos fueron de 1:20. (CUADRO 12).

Los perros inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> en las tres sangrías, de los tres grupos etarios se efectuaron 358 lecturas, las cuales se distribuyeron así: 191 a los 30 días, 108 a los 60 días y 59 a los 90 días. Los títulos más altos de anticuerpos antirrábicos en los perros del Grupo 2 fueron de 1:80, los cuales se obtuvieron a los 30 días postvacunación. (CUADRO 13).

Los sueros caninos investigados para detectar la presencia de inmunoglobulinas antirrábicas por medio de la prueba de CIE fueron: antes de la vacunación (día 0) 94 sueros, de los cuales 52 (55.32%) pruebas pertenecen a los perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal y 42 (44.68%) con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>; a los 30, 60 y 90 días se efectuaron un total de 254 pruebas, perteneciendo 121 (47.64%) sueros de los perros in-

munizados con Vacuna CRL 2% Normal y 133 (52.36%) sueros de perros con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. (CUADRO 14).

Para establecer una mejor evaluación de los resultados a nivel de campo, se determinó realizar una revacunación cinco meses después de iniciado el estudio, en los perros que presentaron a la prueba de CIE títulos menores de 1:2 en ambos grupos; habiéndose vacunado en el Grupo 1 15 perros y en el Grupo 2 13 perros. Fueron sangrados un total de 23 perros, de los cuales pertenece 11 (47.83%), a la revacunación con Vacuna 2% Normal y 12 (52.17%) con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. (CUADRO 14).

Se determinó el título final de anticuerpos antirrábicos en la prueba de CIE, para lo cual fue necesario efectuar ampliaciones de las diluciones estándar, habiéndose realizado un total de 67 pruebas adicionales. (CUADRO 14).

Para confirmar la alta sensibilidad y especificidad de la prueba biológica de Sueroneutralización en ratones (SN) con la prueba serológica de Contraimmunoelectroforesis (CIE), se efectuaron 71 sueros, de los cuales 38 (53.52%) pertenecen a sueros con diferentes títulos en SN y 33 (46.48%) sin títulos en la prueba de SN. (CUADRO 14).

Para comparar el efecto de las dos vacunas investigadas, se realizó la Prueba de Mann Whitney, estableciéndose la relación de los títulos de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 30, 60 y 90 días postvacunación, se determinó que la Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> fue mejor que la CRL 2% Normal, obteniéndose estadísticamente una significancia /0.01.

## VI. CONCLUSIONES:

- 6.1 La técnica de Contrainmunolectroforesis (CIE) es confiable, reproducible, rápida, segura y específica; para la titulación de anticuerpos antirrábicos en perros inmunizados contra Rabia.
- 6.2 Mediante la prueba de Mann Whitney fueron comparados los títulos de anticuerpos antirrábicos neutralizantes sintetizados por las dos vacunas investigadas, determinándose que a los 30, 60 y 90 días se obtienen títulos más altos con la Vacuna 1% adsorbida con Hidróxido de Aluminio, empleando un nivel de significancia del  $\leq 0.01$ .
- 6.3 Los resultados serológicos obtenidos en la presente investigación por la prueba de CIE, en perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal y Vacuna CRL 1% +  $Al(OH)_3$ , se detectaron los títulos de anticuerpos neutralizantes más altos a los 30 días postvacunación, los cuales fueron disminuyendo gradualmente a los 60 y 90 días.
- 6.4 Durante el estudio se observó que la Vacuna CRL adsorbida con Hidróxido de Aluminio administrada subcutáneamente es de fácil y rápida aplicación, no habiéndose detectado ningún tipo de reacción en el área de inoculación.
- 6.5 La vacuna CRL 1% adsorbida con Hidróxido de Aluminio utiliza en su producción la mitad del tejido encefálico del empleado con la Vacuna CRL 2% Normal, lo cual permite a los Laboratorios duplicar su producción en un mismo período de tiempo.
- 6.6 El Coeficiente de Correlación ( $r=0.67$  en 38 sueros y  $r=0.55$  en 22 sueros), obtenido en el presente estudio entre las pruebas de Contrainmunolectroforesis (CIE) y Sueroneutralización en ratones (SN), fueron comparables al sistema de referencia utilizado.
- 6.7 Los sueros caninos con títulos de anticuerpos neutralizantes de 1:19 a 1:21 en SN, o menores no podrán ser detectados por la prueba de CIE.
- 6.8 Los sueros que presentaron títulos de anticuerpos antirrábicos menores de 1:2 en la prueba de CIE, indican que no poseen anticuerpos neutralizantes o éstos son muy bajos; posiblemente es debido a las deficientes condiciones nutricionales y alto grado de parasi-

tismo que presentan los perros, por lo que es conveniente revacunarlos para obtener una mejor respuesta inmune.

- 6.9 Los perros con títulos menores de 1:2 en la técnica de CIE, que fueron revacunados con CRL 2% Normal y CRL 1% +  $\text{Al(OH)}_3$ , cinco meses después de aplicada la Vacuna inicial, se obtuvo los títulos más altos en el Grupo 2, subgrupo D (Vacuna CRL 1% adsorbida con Hidróxido de Aluminio inicial y de refuerzo).
- 6.10 La Rabia Canina es una enfermedad inmunoprevenible siempre y cuando se utilicen inmunógenos de alta calidad, concentración y pureza, y que se mantenga durante su período de vigencia la cadena de frío intra y extra laboratorio.

## VII. RECOMENDACIONES:

- 7.1 La Vacuna CRL 1% adsorbida con Hidróxido de Aluminio fue la que indujo mejor respuesta inmune en los perros investigados, por lo que se deben realizar otros estudios, con el fin de incorporar esta Vacuna en los Programas de Control de Rabia Canina.
- 7.2 Los títulos finales obtenidos a los 90 días postvacunación fueron bajos con las dos vacunas investigadas, por lo que es conveniente realizar estudios a nivel de campo, para evaluar la influencia del estado nutricional y de salud en la respuesta inmune de los perros vacunados y así determinar el tiempo necesario para la revacunación.
- 7.3 Por ser la técnica de Contrainmunolectroforesis (CIE) confiable, reproducible, rápida, segura y específica, es conveniente que se implemente y estandarice en los Laboratorios de Diagnóstico de Rabia del país, así como a nivel Centroamericano; para lo cual es necesario contar con el apoyo de la Oficina Sanitaria Panamericana OPS/OMS.
- 7.4 Es conveniente que el personal profesional y técnico que trabaje en Laboratorios de Diagnóstico y Elaboración de Vacunas contra la Rabia, se inmunice periódicamente y se les determinen los niveles de anticuerpos neutralizantes, mediante la prueba de Contrainmunolectroforesis (CIE).



## VIII. RESUMEN:

El presente estudio comparativo entre la respuesta inmune de las Vacunas de Cerebro Ratón Lactante (CRL) 2% Normal y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> se efectuó en la Aldea El Milagro, Municipio de Masagua, Departamento de Escuintla; por ser un área aislada y que la población canina no había sido inmunizada con anterioridad. La población total de perros estimada según censo fue de 425, siendo inmunizados 387 (91.06%). Fueron investigados 197 perros (50.90%), los cuales se distribuyeron al azar en dos grupos: Grupo 1 99 perros (50.25%) se les administró Vacuna CRL 2% Normal y Grupo 2 98 perros (49.75%) se vacunaron CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>.

Los 197 perros fueron sangrados al día 0, 30, 60 y 90 postvacunación, para determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes por medio de la prueba de Contrainmunolectroforesis (CIE). Los títulos más altos de inmunogamaglobulinas antirrábicas se obtuvieron a los 30 postvacunación en ambos grupos, los cuales fueron disminuyendo gradualmente a los 60 y 90 días; el Grupo 2, Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, fue el que indujo la síntesis de anticuerpos en mayor proporción en las tres sangrías, en comparación con el Grupo 1, Vacuna CRL 2% Normal.

De acuerdo a los resultados de la prueba de CIE, se determinó aplicar una dosis de refuerzo cinco meses postvacunación, a los perros que se les detectó títulos menores de 1:2 con la prueba de CIE, en los Grupos 1 y 2. Se establecieron cuatro subgrupos: Grupo 1, subgrupo A Vacuna de refuerzo CRL 2% Normal, 7 perros; Grupo 1, subgrupo B Vacuna de refuerzo CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, 8 perros; Grupo 2, subgrupo C Vacuna de refuerzo CRL 2% Normal, 6 perros y Grupo 2, subgrupo D Vacuna de refuerzo 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, 7 perros; habiéndose revacunado un total de 28 perros. Fueron sangrados el 82.14% (23 perros) a los 15 días postvacunación, para determinar el título final de anticuerpos antirrábicos mediante la prueba de CIE; el mayor título obtenido Grupo 1, subgrupo A fue de 1:40 (14.28%), en el Grupo 1, subgrupo B fue 1:20 (28.57%), el Grupo 2, subgrupo C el título mayor fue de 1:40 (25.00%) y el Grupo 2, subgrupo D fue de 1:160 (20.00%). Con los resultados anteriores se confirmó que la Vacuna de Refuerzo CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, fue la que indujo los niveles más altos de anticuerpos circulantes, en los perros revacunados y que previamente habían sido inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> Grupo 2, subgrupo D, en comparación con el Grupo 1, subgrupo A que fueron inmunizados y revacunados con CRL 2%

Normal.

En base a los resultados obtenidos se concluye que la Rabia canina es una enfermedad inmunoprevenible siempre y cuando se utilicen inmunógenos de alta calidad, concentración y pureza y que se mantengan durante su período de vigencia, la cadena de frío intra y extra laboratorio.

Para confirmar la alta sensibilidad y especificidad de la Prueba Biológica en ratones (SN) con la Prueba Serológica de Contrainmunoelectroforesis (CIE), se efectuaron a 71 sueros caninos ambas pruebas, de las cuales el 53.52% (38 sueros) pertenecen a sueros con diferentes títulos en SN y 46.48% (33 sueros) los que no presentaron títulos en SN.

Para establecer el grado de significancia entre los títulos obtenidos por la prueba de Sueroneutralización en ratones y Contrainmunoelectroforesis, se calculó el Coeficiente de Correlación ( $r$ ). Los títulos de SN fueron expresados en  $\log_5$  y los títulos de CIE  $\log_2$ . El Coeficiente de Correlación en 22 sueros caninos fue de  $r=0.55$ , los cuales fueron positivos a la prueba de CIE en las diluciones 1:2 a 1:20 y en la prueba de SN los títulos fueron de 1:6 a 1:625. Además se determinó el valor de  $r=0.67$  en 38 sueros, que tuvieron títulos de anticuerpos antirrábicos en la prueba de CIE menores de 1:2 a 1:20 en comparación con la prueba de SN, la cual reportó títulos de 1:6 a 1:625; estableciéndose en la presente investigación una alta correlación entre las Pruebas de Contrainmunoelectroforesis y Sueroneutralización en ratones.

## VIII. SUMMARY:

The present comparative study between the immunologic response of the Suckling Mouse Brain Rabies Vaccine (SMB) Normal 2% and SMB 1% + Al(OH)<sub>3</sub>; - was made in the Aldea El Milagro, Masagua Escuintla because it is an isolated area and the canine population was not immunized before. The total estimated canine population was 425, being immunized 387 (91.06%) 197 (50.90%) of the dogs were investigated, there were two groups at random: Group 1 administered SMB 2% Normal to 99 dogs (49.75%). Group 2 SMB 1% + Al(OH)<sub>3</sub> was given to 98 dogs (49.75%).

The 197 dogs were bled at the 0, 30, 60 and 90 days after vaccination, to determine the levels of neutralizing antibodies by Counterimmunoelectrophoresis Test (CIE). The highest titers of antirabic immunoglobulins were at 30 days after vaccination in both groups, diminishing gradually at the 60 and 90 days; the group 2, SMB 2% Normal, induced the antibodies - synthesis in a greater proportion in the three bleedings, than the Group 1, SMB 1% + Al(OH)<sub>3</sub>.

According to the CIE test results, it was determined to administer a booster five months post-vaccination to the dogs with titers below 1:2 at the CIE test. We established four groups: Group 1, subgroup A SMB 2% Normal booster vaccine, 7 dogs; Group 1, subgroup B SMB 1% + Al(OH)<sub>3</sub> booster vaccine, 8 dogs; Group 2, subgroup C SMB 2% Normal, 6 dogs and Group 2, subgroup D SMB 1% + Al(OH)<sub>3</sub> booster vaccine, 7 dogs; having revaccinated 28 dogs. 23 dogs (82.14%) were bled 15 days postvaccination, to determine the final antirabic antibodies titer, by the CIE test; the highest titer in Group 1, subgroup A was 1:40 (14.28%), in the Group 1, subgroup B was 1:20 (28.57%), the Group 2, subgroup C the highest titer was 1:40 (25.00%) and Group 2, subgroup D was 1:160 (20.00%). The former results confirm that the SMB 1% + Al(OH)<sub>3</sub> induced the highest antibodies levels, in the revaccinated dogs and the ones that were previously vaccinated with SMB 1% Al(OH)<sub>3</sub>, Group 2, subgroup D; compared with the Group 1, subgroup A that were immunized and revaccinated with SMB 2% Normal.

With the results of this study we conclude that Rabies is an immunopreventable illness, when a high quality, concentration and purity of immunogen is used, it must be in force and keep the cold line intra and extra laboratory.

To confirm the high sensibility and specificity of the biologic test in

mice (Mouse serum neutralization) and the CIE serum test, both test were applied to 71 canine sera, wich had different titers in SN 53.52% (38 sera) and 46.48 (33 sera) did not presented titers in SN.

To establish the significant relationship between both test, the Correlation Coefficient was calculated. The titers of SN were expressed in  $\log_5$  and the titers of CIE in  $\log_2$ . The Correlation Coefficient in 22 canine sera was  $r=0.55$ , which were positive to the CIE test in 1:2 to 1:20 dilutions, and the SN test the titers were 1:6 to 1:625. We also determined  $r=0.67$  in 38 sera, that had antirabic antibodies in the CIE test less than 1:2 to 1:20 comparing to the SN test, that was 1:6 to 1:625, establishing in the present study a high correlation between the Counterimmunoelectrophoresis test and Mouse serum neutralization.

IX. APENDICE

CUADRO 1. Distribución de la población canina en el estudio de la evaluación de vacunas antirrábicas CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> y CRL 2% Normal. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

Distribución población canina	Número perros	Porcentaje	Número Perros	Porcentaje
1. Perros no inmunizados	-	-	38	8.94
2. Perros inmunizados	-	-	387	91.06
2.1 Investigados	197	46.00	-	-
2.2 No investigados	190	45.00	-	-
Población total	-	-	425	100.00

CUADRO 2. Distribución de los 387 perros inmunizados en el estudio de evaluación de las vacunas antirrábicas en la Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

Distribución población canina	Número perros	Porcentaje	Número Perro	Porcentaje
1. Perros investigados	-	-	197	50.90
1.1 Vacuna CRL 2% Normal	99	25.58	-	-
1.2 Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	98	25.32	-	-
2. Perros no investigados	-	-	190	49.10
Total de perros inmunizados	-	-	387	100.00

CUADRO 3: Distribución por grupo etario y sexo de los 197 perros inmunizados, Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989

Grupo	Machos			Hembras			Total
	3 - 11 meses	1 - 3 años	mayores 3 años	3 - 11 meses	1 - 3 años	mayores 3 años	
Grupo 1 Vacuna CRL 2% Normal	12	31	9	20	23	4	99
Grupo 2 Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	21	28	5	14	26	4	98
Total	33	59	14	34	49	8	197
	106			91			

CUADRO 4: Resultados del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE . a los 30, 60 y 90 días con Vacuna CRL 2% y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

Días post-vacunación	0			30						60					90			
Título CIE	/1:2	1:2	1:5	/1:2	1:2	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	/1:2	1:2	1:5	1:10	1:20	/1:2	1:2	1:5
Vacuna CRL 2% Normal Porcentajes	98.08	0	1.92	41.46	24.39	14.63	9.76	9.76	0	0	65.31	20.41	8.16	4.08	2.04	79.31	20.69	0
Positivos Totales	51/52	0	1/52	17/41	10/41	6/41	4/41	4/41	0	0	32/49	10/49	4/49	2/49	1/49	23/29	6/29	0

Días post-vacunación	0		30							60					90			
Título CIE	/1:2	1:2	/1:2	1:2	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	/1:2	1:2	1:5	1:10	1:20	/1:2	1:2	1:5	1:10
Vacuna CRL 1% + Al (OH) <sub>3</sub> Porcentajes	100	0	6.38	6.38	14.90	36.17	25.53	6.38	4.26	36.00	28.00	24.00	8.00	4.00	52.78	33.33	11.11	2.78
Positivos Totales	42/42	0	3/47	3/47	7/47	17/47	12/47	3/47	2/47	18/50	14/50	12/50	4/50	2/50	19/36	12/36	4/36	1/36



CUADRO 5: Rango de anticuerpos circulantes contra Rabia obtenidos con la prueba de CIE, a los 0, 30, 60 y 90 días postvacunación con CRL 2% Normal y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

Días postvacunación	0		30		60		90	
Título CIE	<u>/</u> 1:2	1:5	<u>/</u> 1:2	1:2-1:20	<u>/</u> 1:2	1:2-1:20	<u>/</u> 1:2	1:2
Vacuna CRL 2% Normal	98.08*	1.92	41.46	58.54**	65.31	34.69	79.31	20.69
Positivos/Totales	51/52	1/52	17/41	24/41	32/49	17/49	23/29	6/29

Días postvacunación	0		30		60		90	
Títulos CIE	<u>/</u> 1:2	1:2	<u>/</u> 1:2	1:2-1:80	<u>/</u> 1:2	1:2-1:20	<u>/</u> 1:2	1:2-1:10
Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	100*	0	6.38	93.62**	36.00	64.00	52.78	47.22
Positivos/Totales	42/42	0	3/47	44/47	18/50	32/50	19/36	17/36

\* Porcentaje

\*\* Porcentaje Promedio

CUADRO 6: Determinación del Título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de Contrainmunolectroforesis en perros inmunizados con Vacuna CRL 2% Normal. Relacionando Grupo etario y sexo. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

Títulos CIE	30 Días						60 Días						90 Días					
	3-11 meses		1-3 años		≥ 3 años		3-11 meses		1-3 años		≥ 3 años		3-11 meses		1-3 años		≥ 3 años	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
∠ 1:2	1/5*	4/5	6/10	5/15	1/2	0	4/8	7/7	10/12	10/19	0	0	3/4	3/4	5/7	11/13	1/1	2/2
	20**	80	60	33.3	50	0	50	100	83.3	52.6	0	0	75	75	71.4	84.6	100	100
1:2	1/5	0	3/10	5/15	1/2	1/5	2/8	0	2/12	6/19	0	1/2	1/4	1/4	2/7	2/13	0	0
	20	0	30	33.3	50	20	25	0	16.7	31.6	0	50	25	25	28.6	15.4	0	0
1:5	2/5	1/5	0	2/15	0	1/15	2/8	0	0	1/19	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	20	0	13.3	0	20	25	0	0	5.3	0	0	0	0	0	0	0	0
1:10	1/5	0	0	1/15	0	2/5	0	0	0	2/19	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	6.7	0	40	0	0	0	10.5	0	0	0	0	0	0	0	0
1:20	0	0	1/10	2/15	0	1/5	0	0	0	0	0	1/2	0	0	0	0	0	0
	0	0	10	13.3	0	20	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0
1:40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Totales sueros	5	5	10	15	2	5	8	7	12	19	0	2	4	4	7	13	1	2

\* Positivos/Totales

\*\* Porcentajes

**CUADRO 7:** Determinación del Título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de Contrainmunolectroforesis en perros inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. Relacionando Grupo etario y sexo. Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla. Guatemala, 1989.

Títulos CIE	30 Días						60 Días						90 Días					
	3-11 meses		1-3 años		≥3 años		3-11 meses		1-3 años		≥3 años		3-11 meses		1-3 años		≥3 años	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
1:2	1/10*	0	0	1/14	1/1	0	3/7	4/10	6/12	5/16	0	0	5/6	4/5	7/10	3/11	0	0
	10**	0	0	7.1	100	0	42.8	40	50	31.3	0	0	83.3	80	70	27.3	0	0
1:2	1/10	1/8	1/11	0	0	0	2/7	1/10	3/12	6/16	0	2/3	1/6	1/5	2/10	4/11	2/2	2/2
	10	12.5	9.1	0	0	0	28.5	10	25	37.5	0	66.7	16.7	20	20	36.4	100	100
1:5	1/10	2/8	1/11	2/14	0	1/3	0	3/10	3/12	4/16	1/2	1/3	0	0	1/10	3/11	0	0
	10	25	9.1	14.3	0	33.3	0	30	25	25	50	33.3	0	0	10	27.3	0	0
1:10	4/10	3/8	4/11	4/14	0	1/3	1/7	2/10	0	0	1/2	0	0	0	0	1/11	0	0
	40	37.5	36.3	28.5	0	33.3	14.3	20	0	0	50	0	0	0	0	9.1	0	0
1:20	1/10	1/8	4/11	6/14	0	1/3	1/7	0	0	1/16	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	12.5	36.3	42.8	0	33.3	14.3	0	0	6.3	0	0	0	0	0	0	0	0
1:40	1/10	1/8	0	1/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	12.5	0	7.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:80	1/10	0	1/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	9.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Totales sueros	10	8	11	14	1	3	7	10	12	16	2	3	6	5	10	11	2	2

\* Positivos/Totales

\*\* Porcentajes

**CUADRO 8:** Distribución por subgrupos de los 28 perros revacunados con los dos tipos de Inmunógeno, cinco meses después de aplicada la Vacuna de Referencia. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

Vacuna Referencia Inicial	Vacuna Refuerzo	Perros Revacunados	Porcentaje	Perros Sangrados 15 días postvac.	Porcentaje
Grupo 1 CRL 2% Normal	Subgrupo A CRL 2% Normal	7	25.00	7	25.00
	Subgrupo B CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	8	28.57	7	25.00
Grupo 2 CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	Subgrupo C CRL 2% Normal	6	21.43	4	14.28
	Subgrupo D CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	7	25.00	5	17.86
Total		28	100.00	23	82.14

**CUADRO 9:** Determinación del título final de anticuerpos antirrábicos detectados mediante la prueba de CIE, en perros revacunados con CRL 2% Normal y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, cinco meses después de haber sido inmunizados. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989

Vacuna Referencia Inicial	Refuerzo	Títulos CIE	Porcentajes	Positivos/Totales
Grupo 1 CRL 2% Normal	Subgrupo A CRL 2% Normal	∟ 1:2	0	0/7
		1:2	0	0/7
		1:5	28.57	2/7
		1:10	42.86	3/7
		1:20	14.28	1/7
		1:40	14.28	1/7
		1:80	0	0/7
	Subgrupo B CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	∟ 1:2	0	0/7
		1:2	28.57	2/7
		1:5	28.57	2/7
		1:10	14.29	1/7
		1:20	28.57	2/7
		1:40	0	0/7
		1:80	0	0/7
Grupo 2 CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	Subgrupo C CRL 2% Normal	∟ 1:2	0	0/4
		1:2	0	0/4
		1:5	25.00	1/4
		1:10	0	0/4
		1:20	50.00	2/4
		1:40	25.00	1/4
		1:80	0	0/4
	Subgrupo D CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	∟ 1:2	0	0/5
		1:2	20.00	1/5
		1:5	0	0/5
		1:10	40.00	2/5
		1:20	0	0/5
		1:40	20.00	1/5
		1:80	0	0/5
1:160	20.00	1/5		

**CUADRO 10:** Coeficiente de Correlación (r) de los títulos obtenidos en 22 sueros de perros inmunizados con los dos tipos de vacunas, detectados por las Pruebas de Contraimmunoelectroforesis y Sueroneutralización en ratones. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

No. Sueros	Fruebas		CIE $\log_2$ x	SN $\log_5$ y	Recta Ajustada SN
	CIE	SN			
109	1:20	1:186	4.3	3.2	3.4
118	1:10	1:38	3.3	2.3	3.0
125	1:2	1:11	1.0	1.5	2.2
137	1:5	1:54	2.3	2.5	2.7
143	1:10	1:191	3.3	3.3	3.0
150	1:20	1:103	4.3	2.9	3.4
153	1:2	1:6	1.0	1.1	2.2
403	1:5	1:70	2.3	2.6	2.7
405	1:2	1:21	1.0	1.9	2.2
410	1:5	1:282	2.3	3.5	2.7
417	1:20	1:188	4.3	3.3	3.4
433	1:10	1:240	3.3	3.4	3.0
434	1:2	1:13	1.0	1.6	2.2
437	1:10	1:32	3.3	2.1	3.0
441	1:5	1:625	2.3	3.9	2.7
443	1:2	1:56	1.0	2.5	2.2
451	1:5	1:422	2.3	3.8	2.7
454	1:5	1:45	2.3	2.4	2.7
477	1:5	1:625	2.3	3.9	2.7
492	1:20	1:240	4.3	3.4	3.4
555	1:2	1:48	1.0	2.4	2.2
555	1:5	1:56	2.3	2.5	2.7

$$n = 22$$

$$r = 0.55237$$

$$a = 1.7979$$

$$b = 0.3731$$

Recta Ajustada:

$$y = a + b x$$

$$y = 1.7979 + 0.3731 x$$

**CUADRO 11:** Coeficiente de Correlación (r) de los títulos obtenidos en 38 sueros de perros inmunizados con los dos tipos de vacunas, detectados por las pruebas de Contrainmunolectroforesis y Sueroneutralización en ratones. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

No. Sueros	Pruebas		CIE $\log_2$ x	SN $\log_5$ y	Recta Ajustada SN	
	CIE	SN				
104	/	1:2	1:5	0	1.0	1.9
105	∩	1:2	1:11	0	1.5	1.9
109		1:20	1:186	4.3	3.2	3.4
118		1:10	1:38	3.3	2.3	3.0
125		1:2	1:11	1.0	1.5	2.2
137		1:5	1:54	2.3	2.5	2.7
140	/	1:2	1:13	0	1.6	1.9
141	∩	1:2	1:13	0	1.6	1.9
143		1:10	1:191	3.3	3.2	3.0
144	/	1:2	1:8	0	1.3	1.9
146	∩	1:2	1:45	0	2.4	1.9
147	∩	1:2	1:25	0	2.0	1.9
147	∩	1:2	1:17	0	1.8	1.9
150		1:20	1:103	4.3	2.9	3.4
152	∩	1:2	1:38	0	2.3	1.9
153		1:2	1:6	1.0	1.2	2.2
158	/	1:2	1:56	0	2.5	1.9
401	∩	1:2	1:11	0	1.5	1.9
403		1:5	1:70	2.3	2.6	2.7
405		1:2	1:21	1.0	1.9	2.2
410		1:5	1:282	2.3	3.5	2.7
415	∩	1:2	1:48	0	2.4	1.9
417		1:20	1:188	4.3	3.3	3.4
418	∩	1:2	1:56	0	2.5	1.9
433		1:10	1:240	3.3	3.4	3.0
434		1:2	1:13	1.0	1.6	2.2
437		1:10	1:32	3.3	2.2	3.0
441		1:5	1:625	2.3	4.0	2.7
443		1:2	1:56	1.0	2.5	2.2
443	∩	1:2	1:55	0	2.5	1.9
451		1:5	1:422	2.3	3.8	2.7
454		1:5	1:45	2.3	2.4	2.7
472	/	1:2	1:10	0	1.4	1.9
476	∩	1:2	1:17	0	1.8	1.9
477		1:5	1:625	2.3	4.0	2.7
492		1:20	1:240	4.3	3.4	3.4
555		1:2	1:48	1.0	2.4	2.3
555		1:5	1:56	2.3	2.5	2.7

n = 38

r = 0.66857

a = 1.8630

b = 0.3518

Recta Ajustada:

y = a + b x

y = 1.8630 + 0.3518 x

CUADRO 12: Distribución de las 205 lecturas efectuadas en la prueba de Contrainmunolectroforesis a los 30, 60 y 90 días postvacunación con CRL 2% Normal, de acuerdo al grupo etario y sexo. Guatemala, 1989

Títulos CIE	30 días						60 días						90 días						Total
	3-11 meses		1-3 años		3 años		3-11 meses		1-3 años		3 años		3-11 meses		1-3 años		3 años		
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	
/ 1:2	1	4	6	5	1	0	4	7	10	10	0	0	3	3	5	11	1	2	73
1:2	2	0	6	10	2	2	4	0	4	12	0	2	2	2	4	4	0	0	56
1:5	6	3	0	6	0	3	6	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	27
1:10	4	0	0	4	0	8	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	24
1:20	0	0	5	10	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	25
1:40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	13	7	17	35	3	18	14	7	14	33	0	7	5	5	9	15	9	15	205
Lecturas	20		52		21		21		47		7		10		24		34		
	93						75						37						



**CUADRO 13:** Distribución de las 358 lecturas efectuadas en la prueba de Contrainmunolectroforesis a los 30, 60 y 90 días postvacunación con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, de acuerdo al grupo etario y sexo. Guatemala, 1989.

Títulos CIE	30 días						60 días						90 días						Total
	3-11 meses		1-3 años		≥ 3 años		3-11 meses		1-3 años		≥ 3 años		3-11 meses		1-3 años		≥ 3 años		
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	
/ 1:2	1	0	0	1	1	0	3	4	6	5	0	0	5	4	7	3	0	0	40
1:2	2	2	2	0	0	0	4	2	6	12	0	4	2	2	4	8	4	4	58
1:5	3	6	3	6	0	3	0	9	9	12	3	3	0	0	3	9	0	0	69
1:10	16	12	16	16	0	4	4	8	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	84
1:20	5	5	20	30	0	5	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	75
1:40	6	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18
1:80	7	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
Total Lecturas	40	31	48	59	1	12	16	23	21	34	7	7	7	6	14	24	4	4	358
	71		107		13		39		55		14		13		38		8		
	191						108						59						

CUADRO 14: Resumen de las 438 pruebas de Contrainmunolectroforesis en los perros inmunizados, las 71 pruebas comparativas con SN y las 563 lecturas efectuadas en la presente investigación. Guatemala, 1989.

1. Sueros sanguíneos caninos estudiados para detectar la presencia inmunogamaglobulinas antirrábicas mediante la prueba de Contrainmunolectroforesis (CIE)			
1.1 Antes de la vacunación (0 días)			
Vacuna CRL 2% Normal	-----	52	
Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	-----	<u>42</u>	94
1.2 Después de la vacunación (30, 60 y 90 días)			
Vacuna CRL 2% Normal	-----	121	
Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	-----	<u>133</u>	254
1.3 Revacunación cinco meses después de inmunizados			
Vacuna CRL 2% Normal	-----	11	
Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	-----	<u>12</u>	<u>23</u> <u>371</u>
1.4 Ampliaciones de la prueba de Contrainmunolectroforesis (CIE) para determinar título final			
	-----		<u>67</u>
1.5 Total de pruebas de CIE efectuadas			
	-----		438
2. Sueros sanguíneos investigados mediante las pruebas de CIE y Suero-neutralización en ratones (SN)			
2.1 Total de sueros con título	-----	38	(53.52%)
2.2 Total de sueros sin título	-----	<u>33</u>	(46.48%)
2.3 Total de pruebas CIE y SN	-----	71	
3. Total de lecturas obtenidas por la prueba de CIE			
3.1 Vacuna CRL 2% Normal	-----	205	(36.41%)
3.2 Vacuna CRL 1% + Al(OH) <sub>3</sub>	-----	<u>358</u>	(63.59%)
3.3 Total de Lecturas	-----	563	

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social,  
Departamento de Zoonosis.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
Departamento de Microbiología. USAC.

Oficina Sanitaria Panamericana,  
OPS/OMS.

FICHA 1: Investigación sobre Evaluación  
de las Vacunas Antirrábicas:

1. CRL 2% Normal

2. CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>

Propietario: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Identificación del perro

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Tamaño: pequeño mediano grande

Otras Características: \_\_\_\_\_

Fecha de Vacunación: \_\_\_\_\_ Tipo de Vacuna: \_\_\_\_\_

No. Lote: \_\_\_\_\_

Sangrías:

día 0 Fecha: \_\_\_\_\_ Título de CIE: \_\_\_\_\_

30 días Fecha: \_\_\_\_\_ Título de CIE: \_\_\_\_\_

60 días Fecha: \_\_\_\_\_ Título de CIE: \_\_\_\_\_

90 días Fecha: \_\_\_\_\_ Título de CIE: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Profesional Responsable

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social,  
Departamento de Zoonosis.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
Departamento de Microbiología. USAC.

Oficina Sanitaria Panamericana,  
OPS/OMS.

FICHA 2: Investigación sobre Evaluación  
de las Vacunas Antirrábicas

CERTIFICADO DE VACUNACION

Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.

No. \_\_\_\_\_

Nombre del perro: \_\_\_\_\_

Raza: \_\_\_\_\_ Color: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_  
3 - 11 meses                      1 - 3 años                      + de 3 años

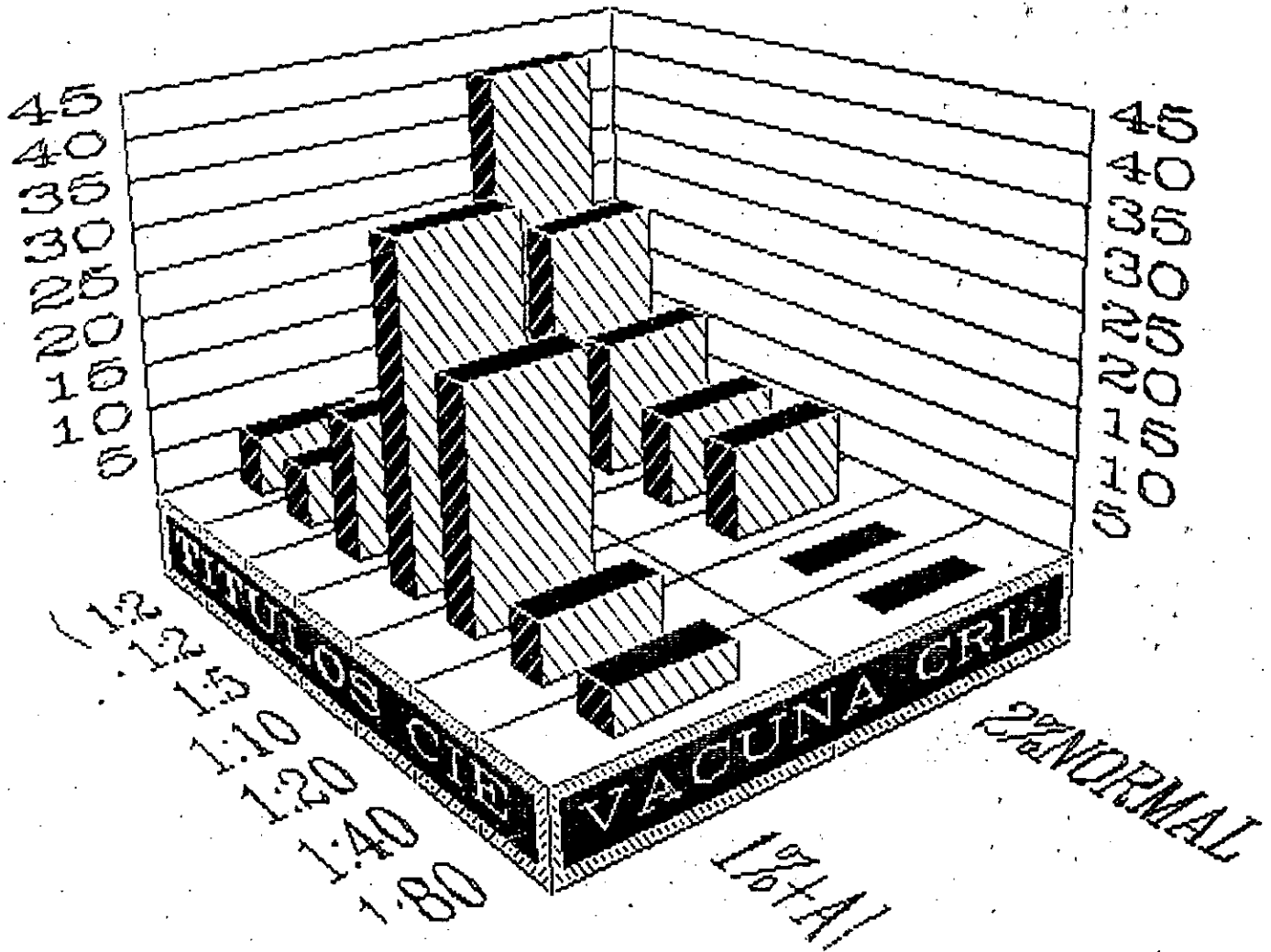
Tipo de Vacuna: \_\_\_\_\_ Lote: \_\_\_\_\_

Propietario: \_\_\_\_\_

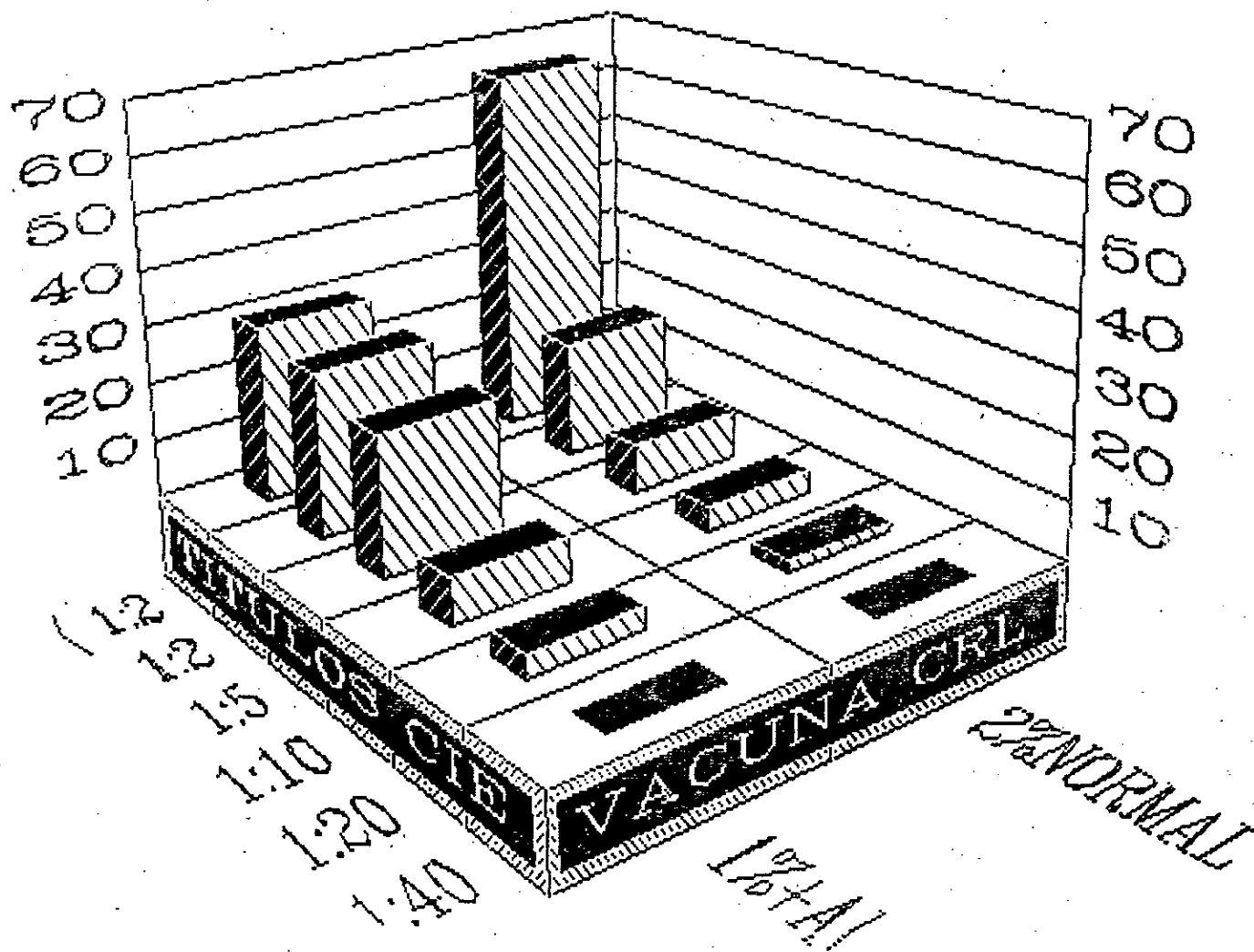
Dirección: \_\_\_\_\_

Fecha de Vacunación: \_\_\_\_\_

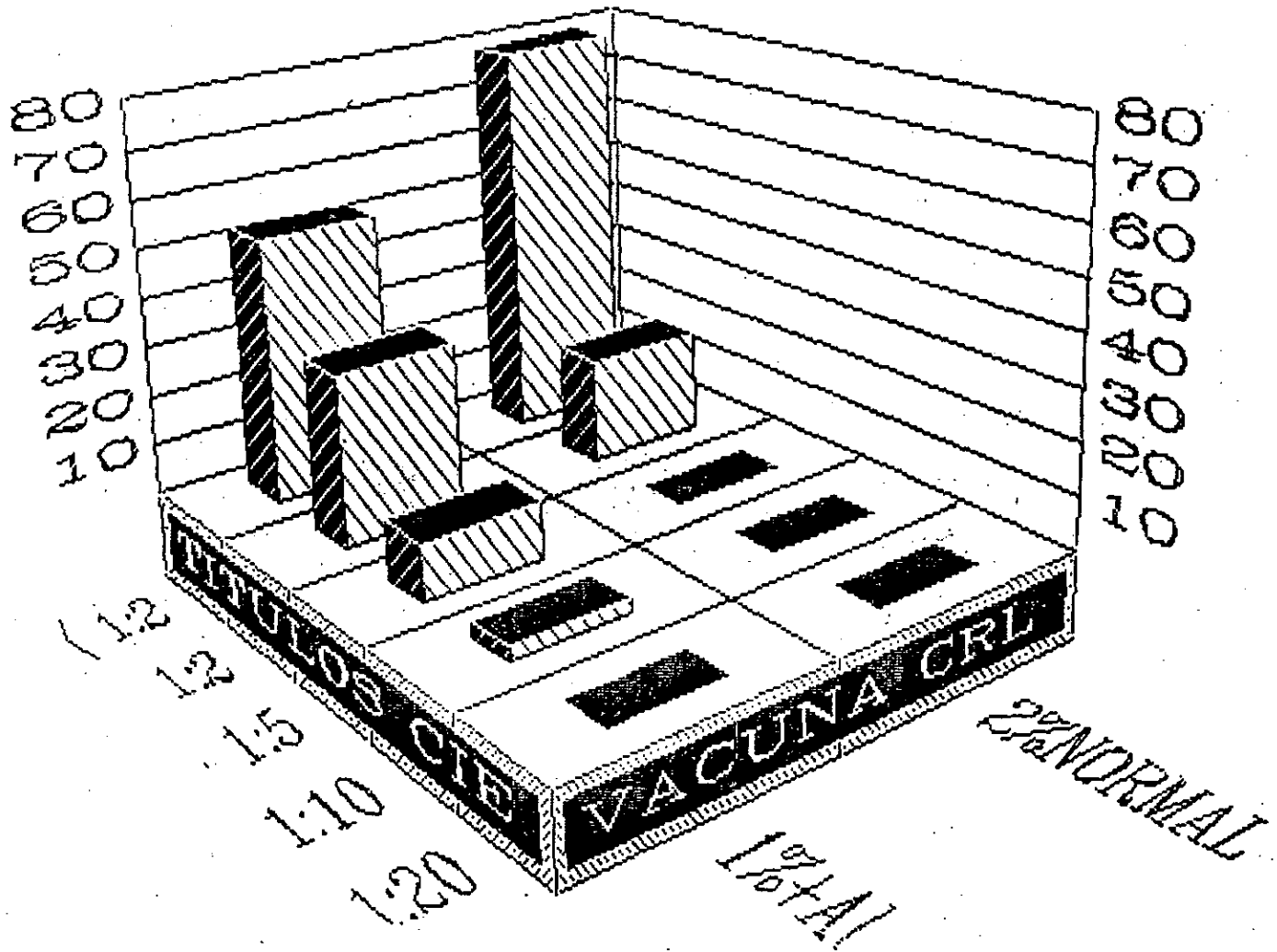
\_\_\_\_\_  
Vacunador Oficial



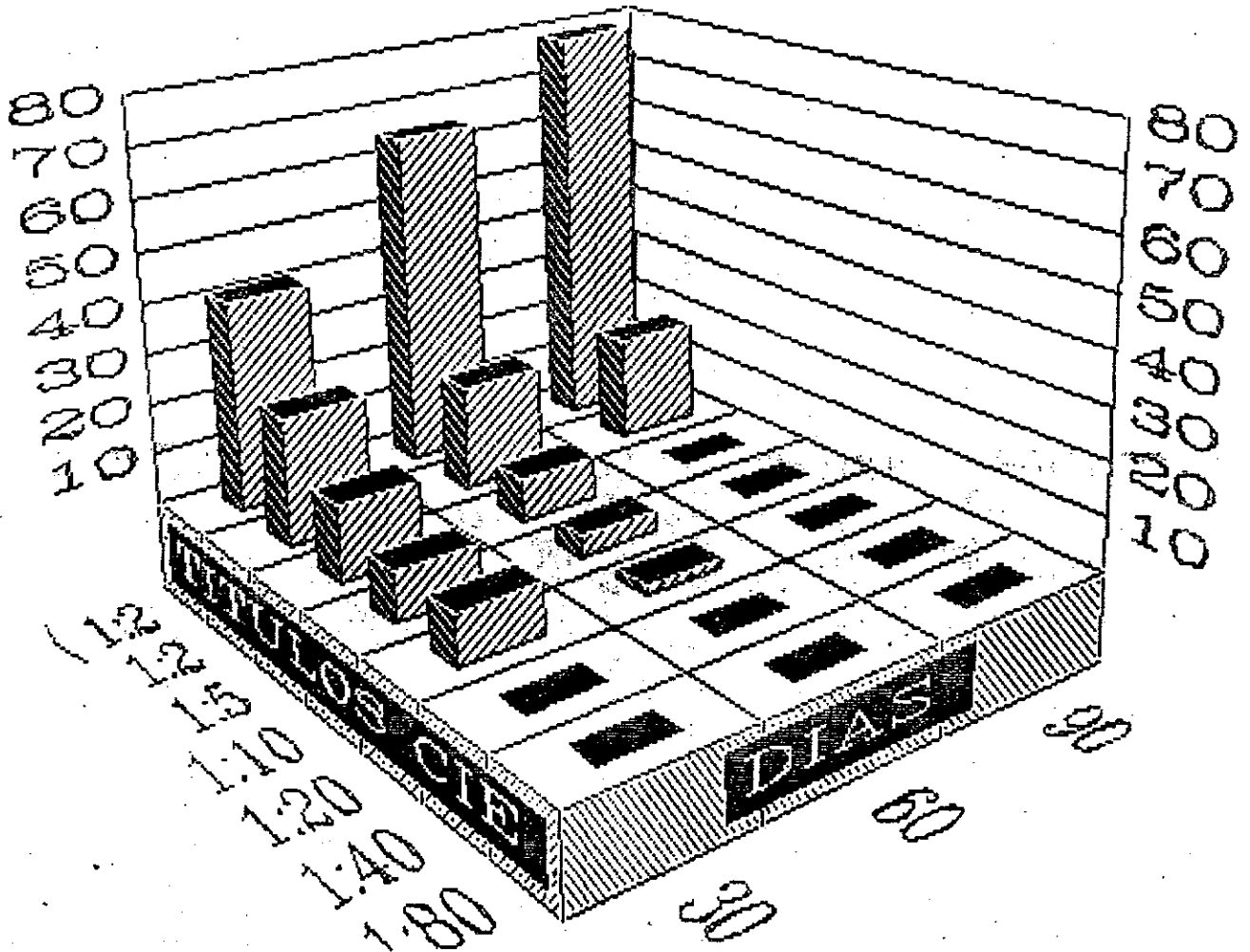
GRAFICA 1: Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 30 días postvacunación en los perros inmunizados. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.



**GRAFICA 2:** Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 60 días post-vacunación en los perros inmunizados. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

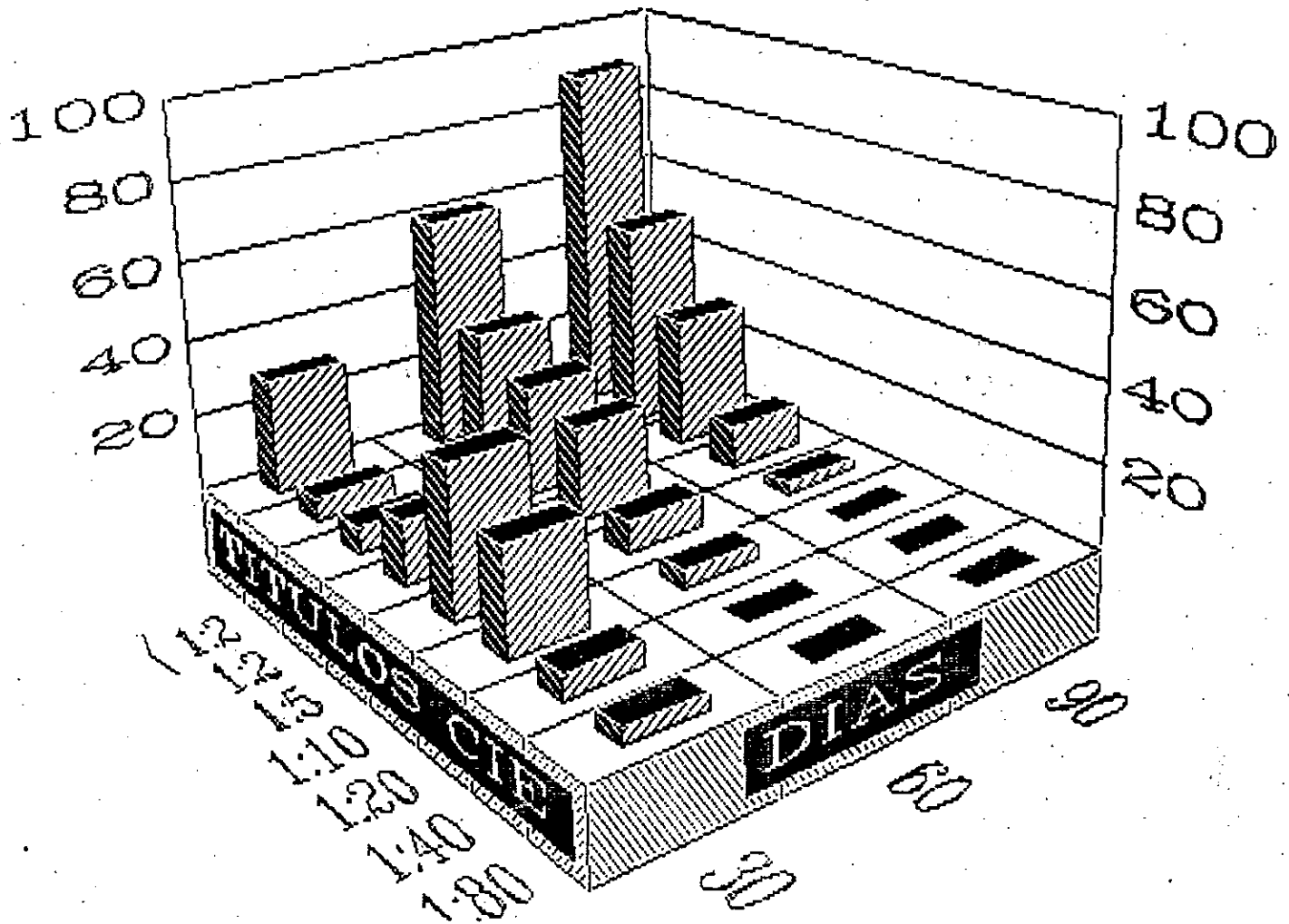


**GRAFICA 3:** Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 90 días post-vacunación en los perros inmunizados. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

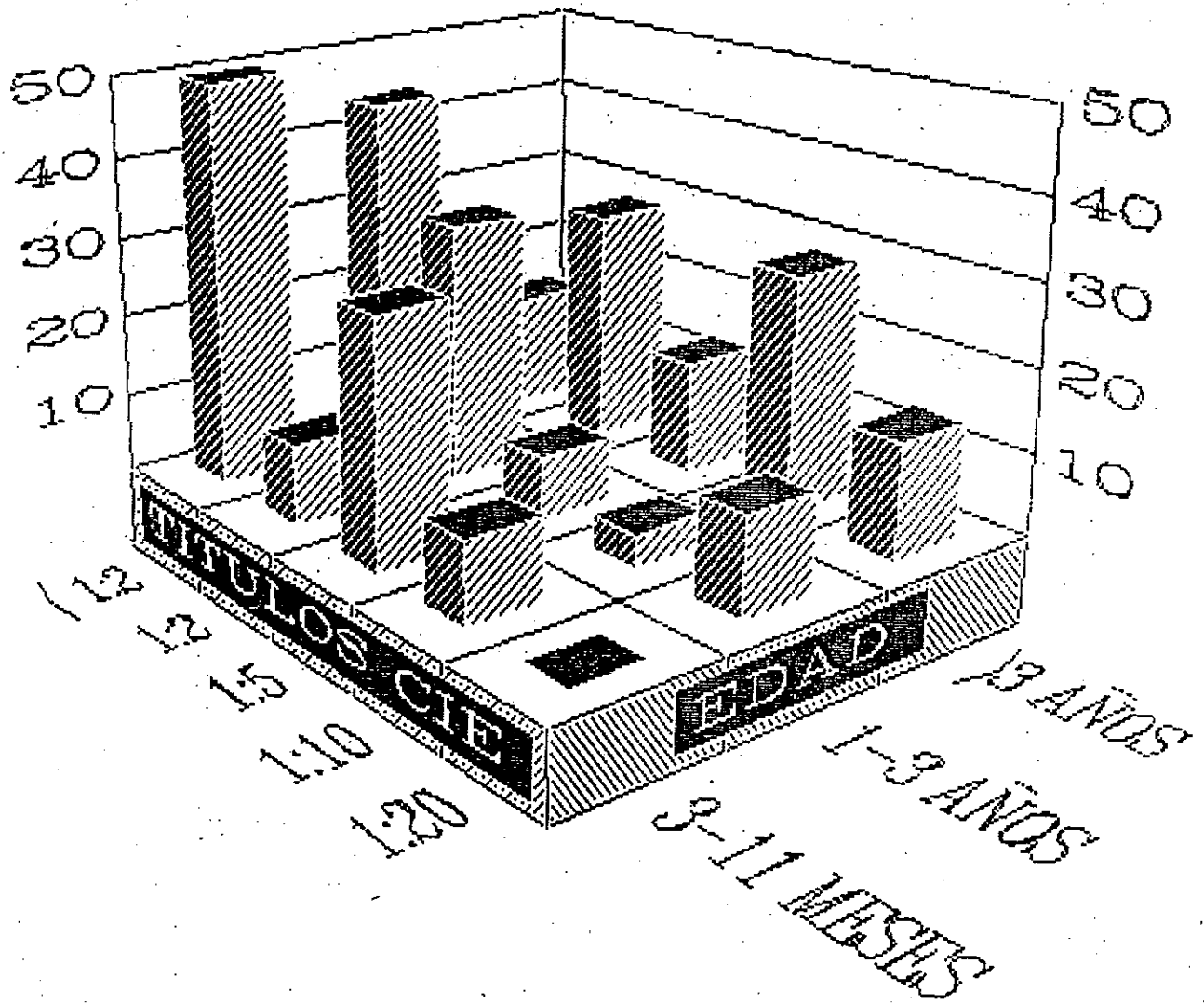


**GRAFICA 4:** Porcentaje de los títulos de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 30, 60 y 90 días en los perros inmunizados con Vaxina CRL 2% Normal. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

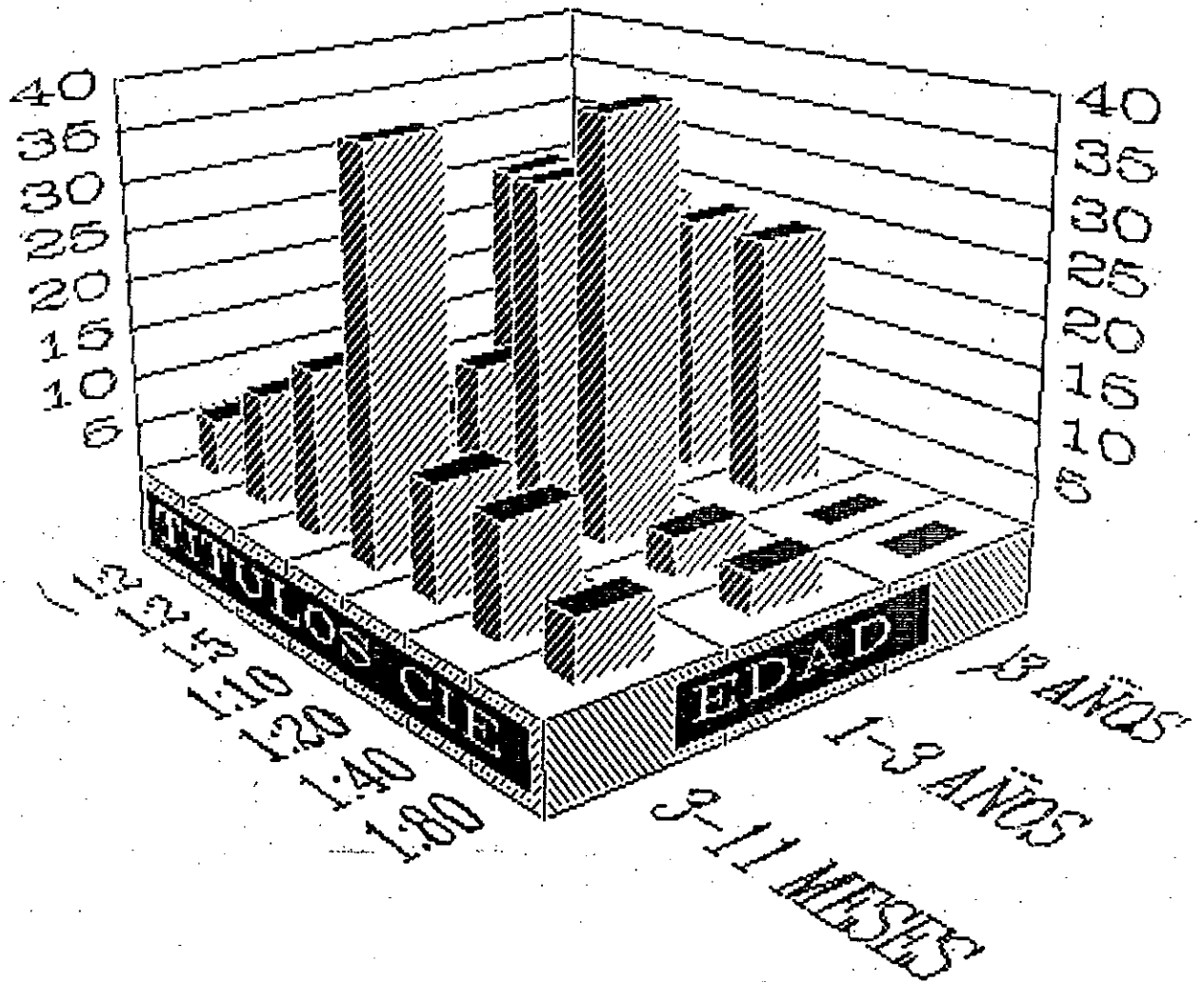




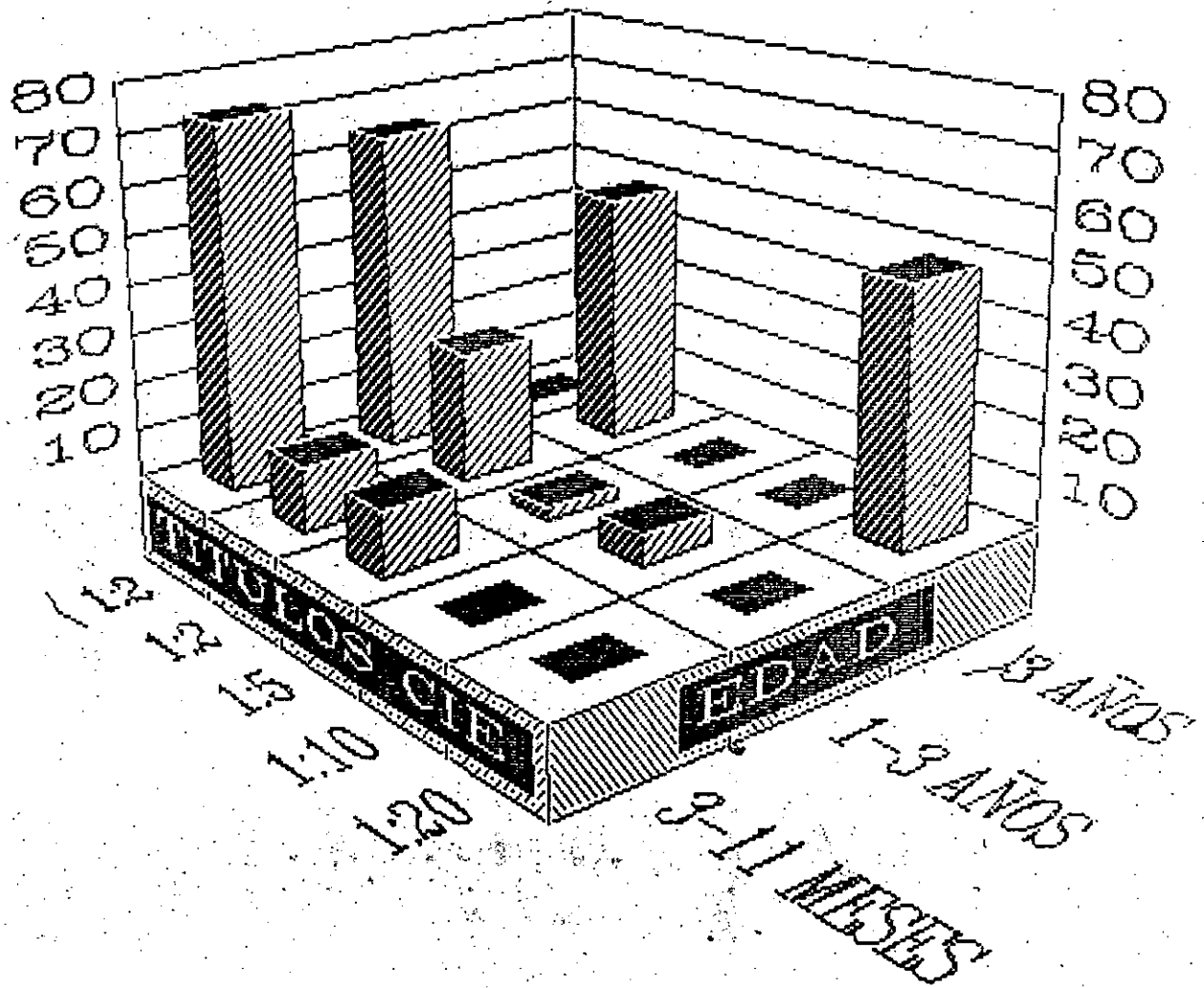
**GRAFICA 5:** Porcentaje de los títulos de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE a los 30, 60 y 90 días en los perros inmunizados con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla. Guatemala, 1989.



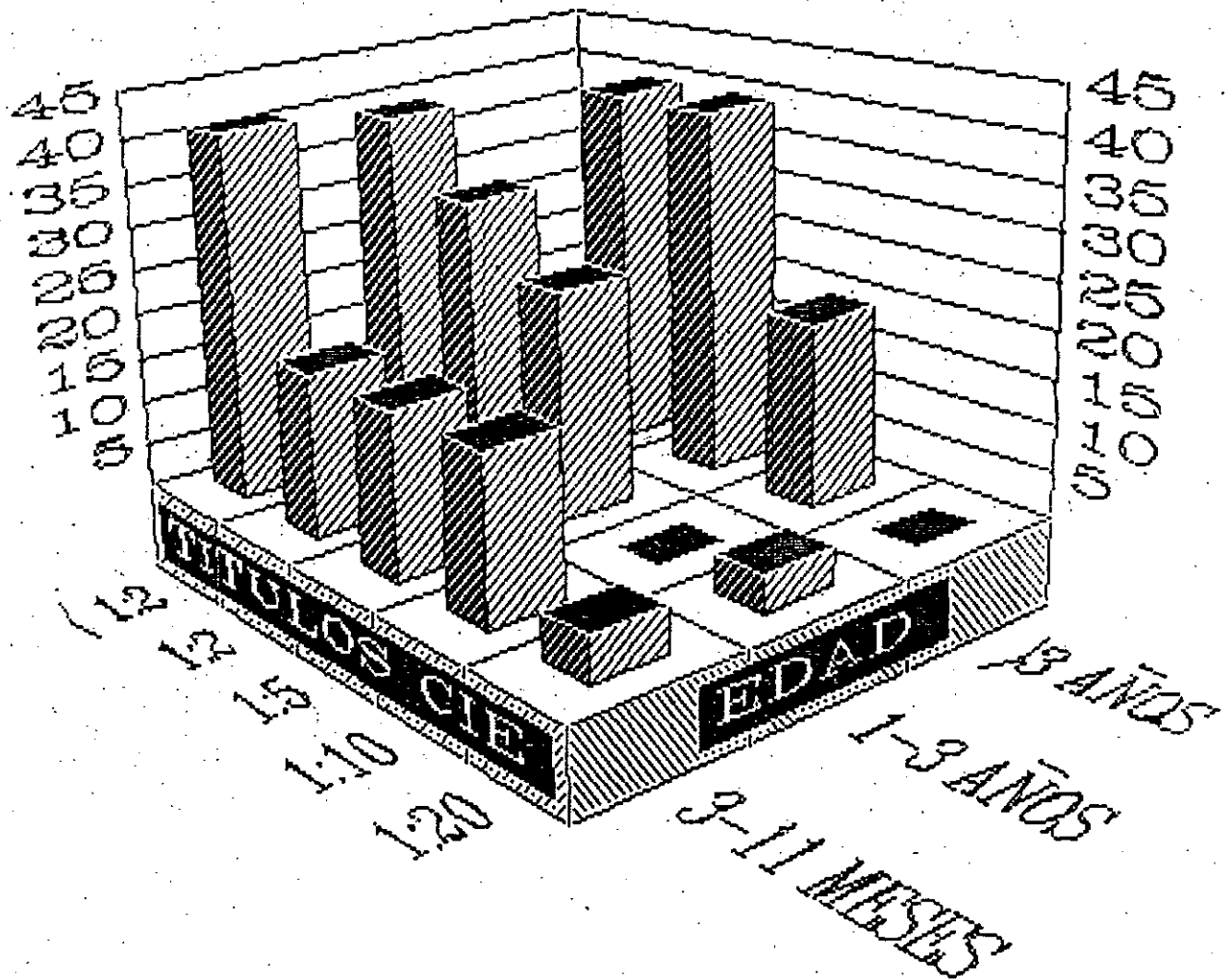
**GRAFICA 6:** Porcentaje de los títulos de anticuerpos anti-rábiticos obtenidos por la prueba de CIE a los 30 días postvacunación con CRL 2% Normal, en los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.



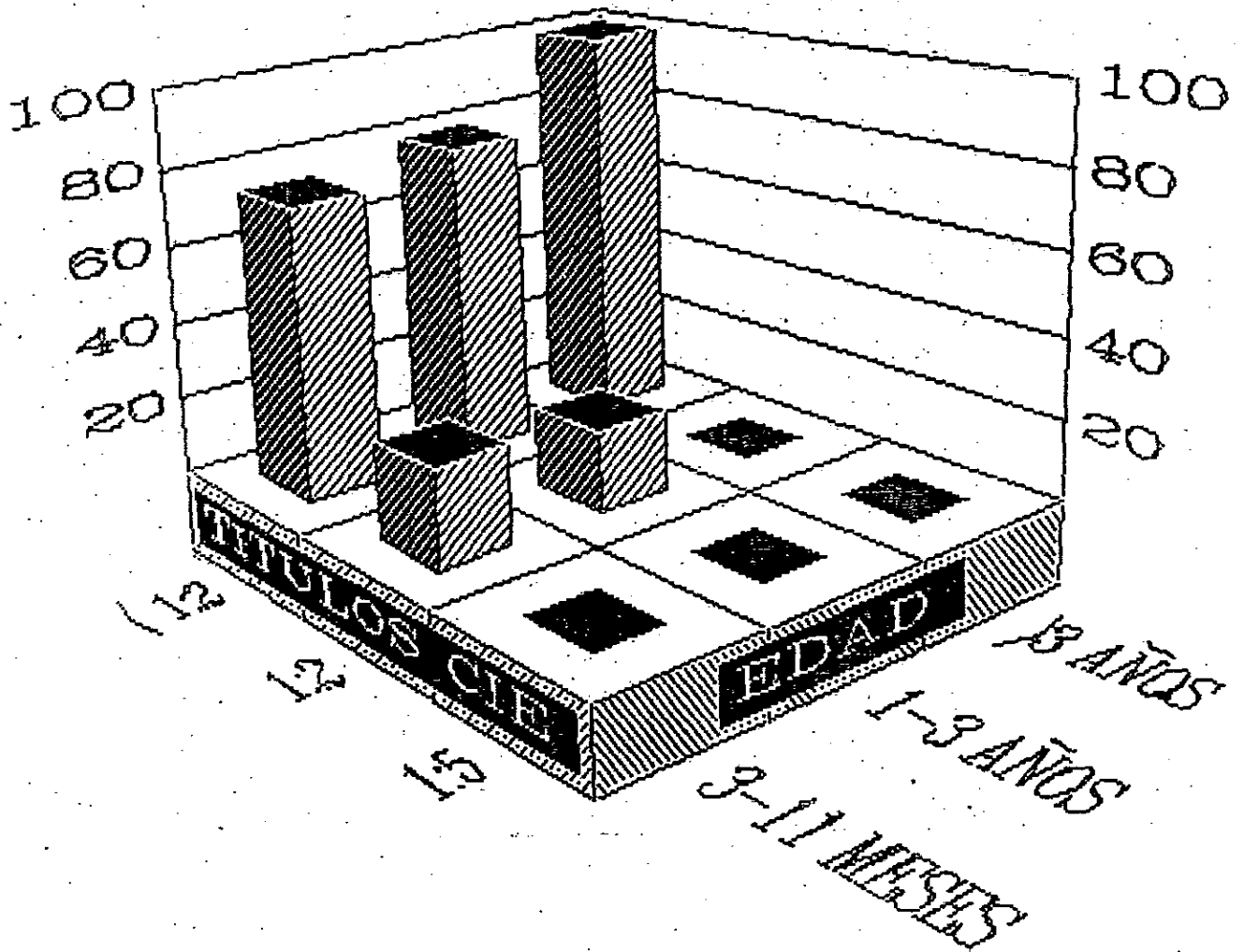
**GRAFICA 7:** Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 30 días postvacunación con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, en los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.



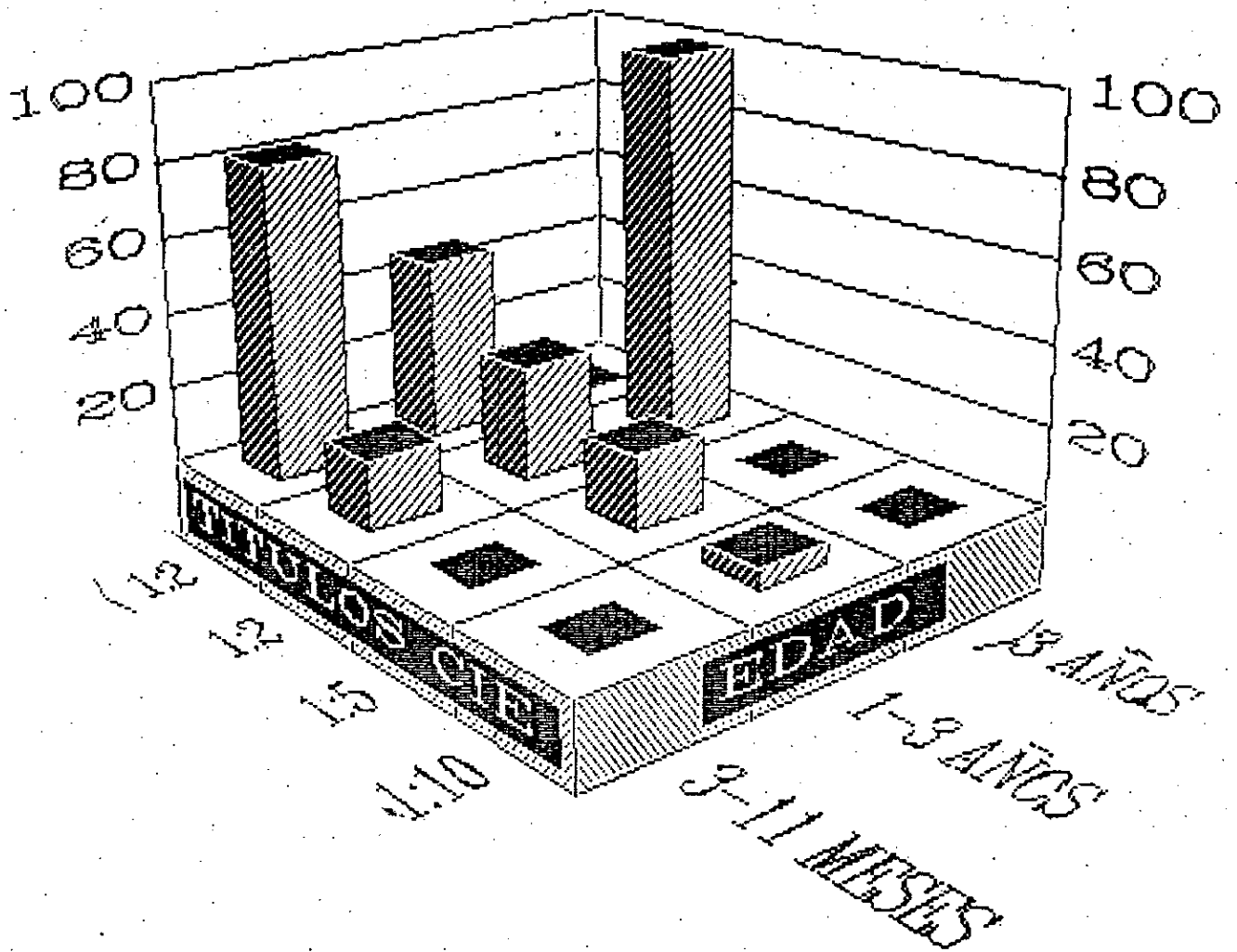
**GRAFICA 8:** Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 60 días postvacunación con CRL 2% Normal, en los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.



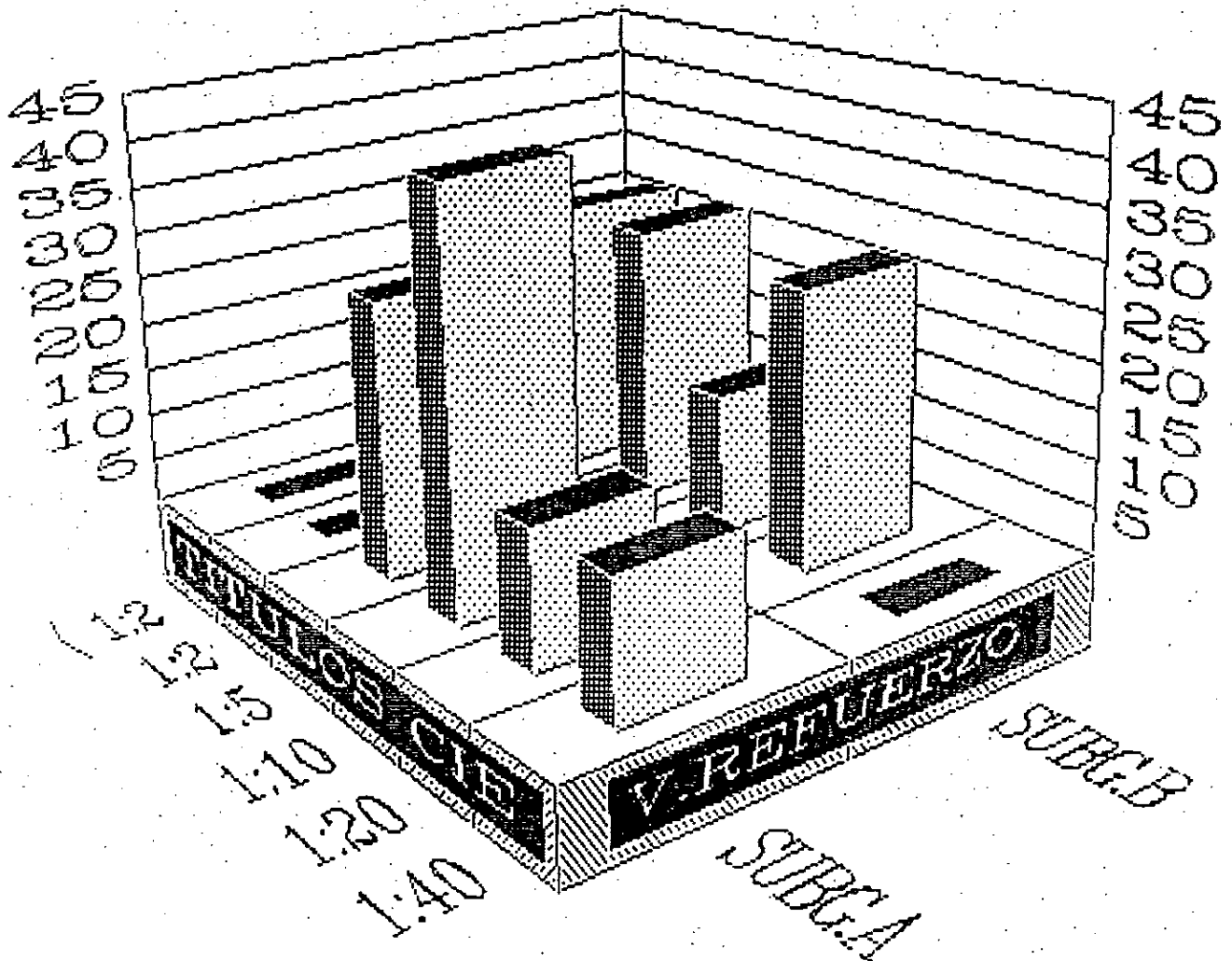
**GRAFICA 9:** Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 60 días postvacunación con CRL + Al(OH)<sub>3</sub>. En los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla. Guatemala, 1989.



**GRAFICA 10:** Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 90 días postvacunación con CRL 2% normal en los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

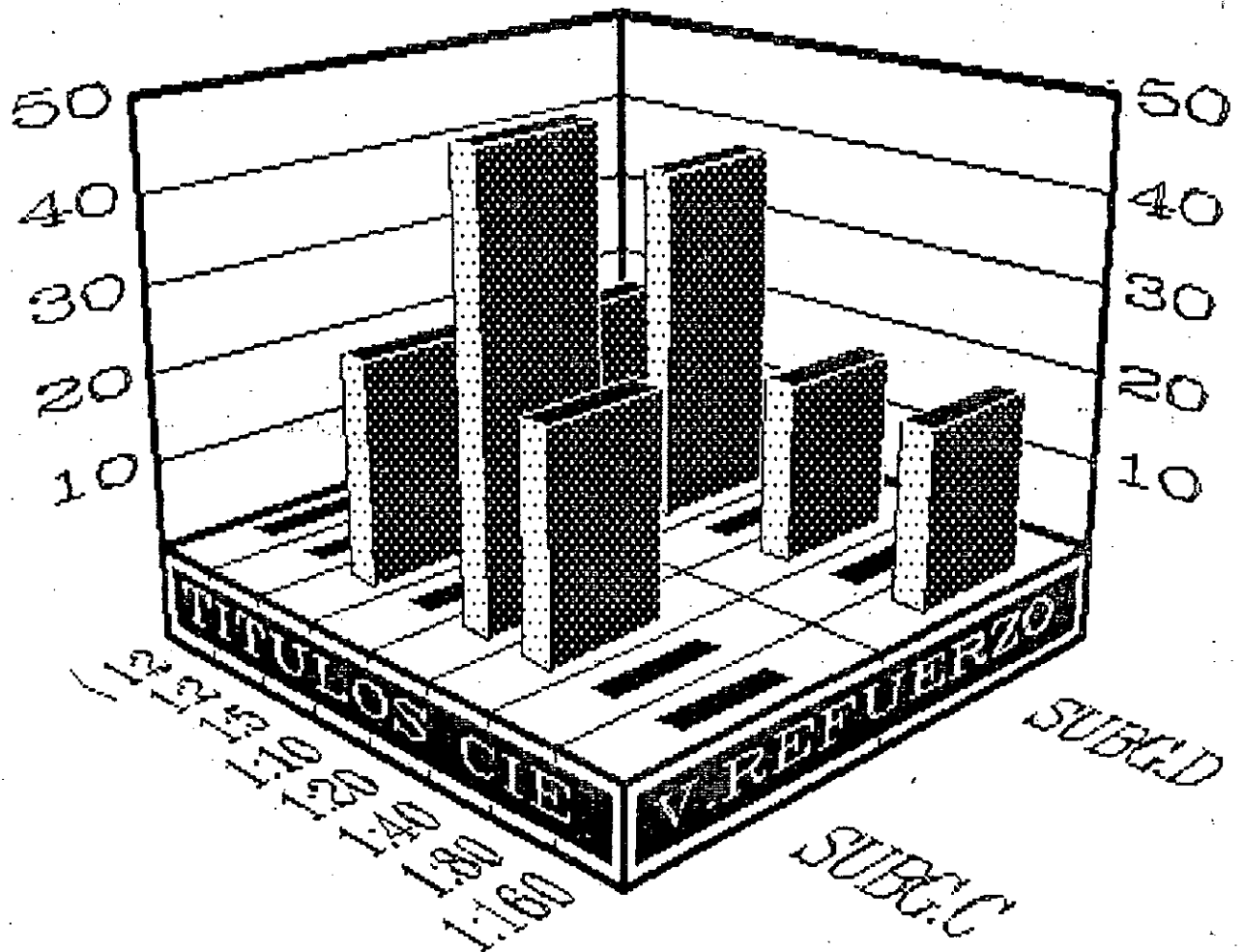


**GRAFICA 11:** Porcentaje de títulos de anticuerpos antirrábicos obtenidos por la prueba de CIE a los 90 días postvacunación con CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>. En los diferentes grupos etarios. Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.

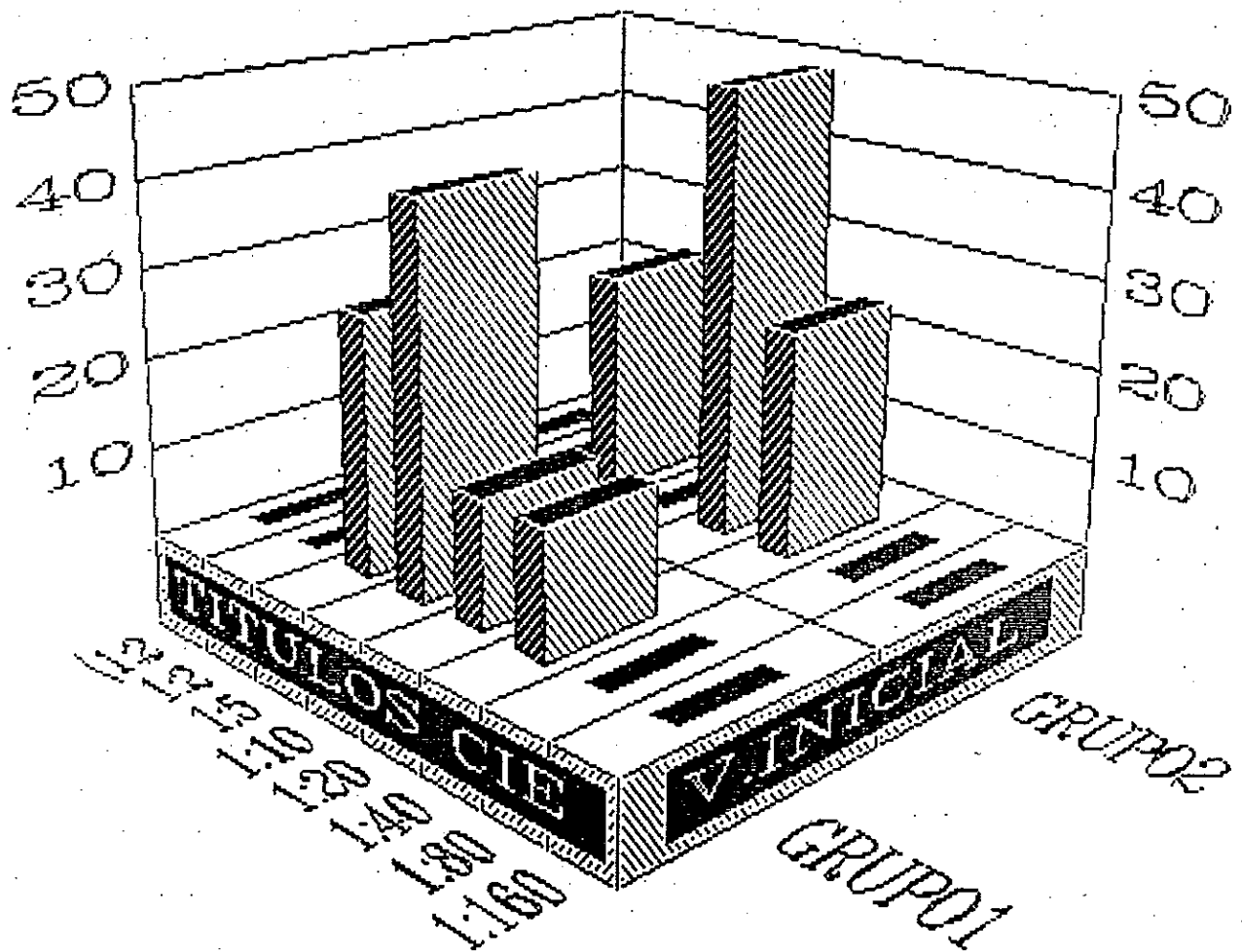


**GRAFICA 12:** Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE en perros inmunizados inicialmente con Vacuna 2% Normal, Grupo 1 y revacunados a los cinco meses con CRL 2% Normal (Subgrupo A) y CRL 1% + Al(OH), (Subgrupo B). Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla. Guatemala, 1989.

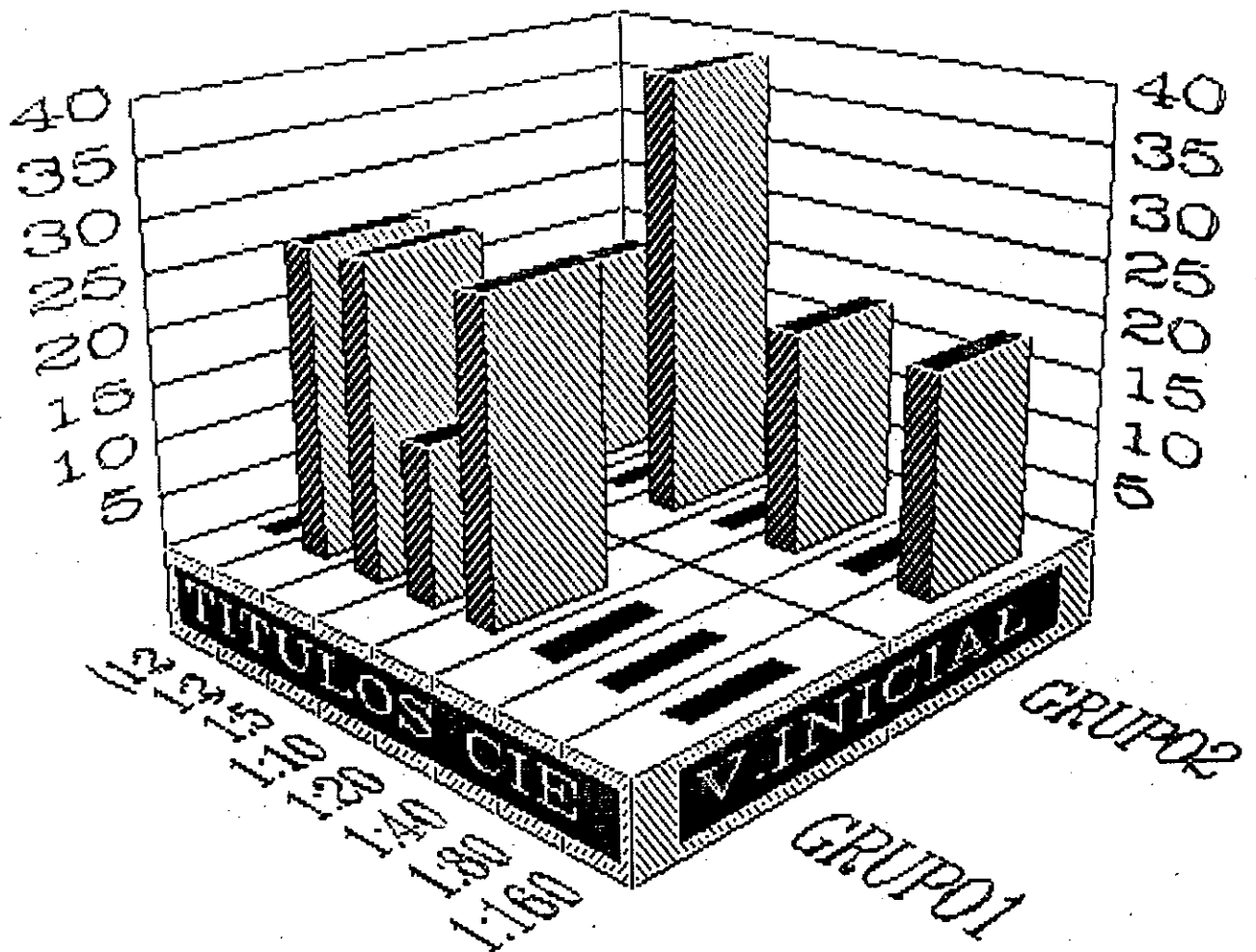




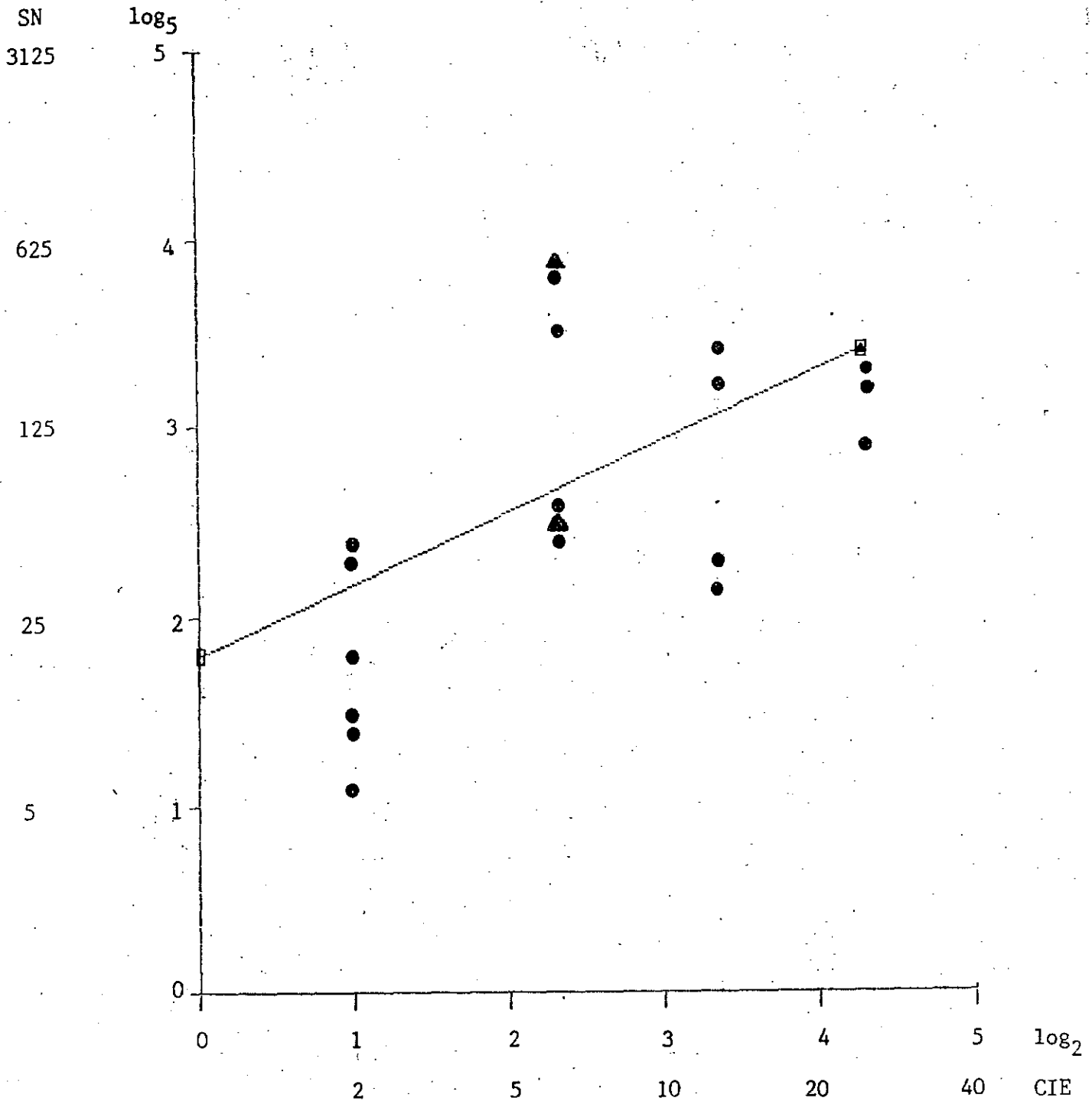
**GRAFICA 13:** Porcentaje del Título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE en perros inmunizados inicialmente con Vacuna CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub>, Grupo 2 y revacunados a los cinco meses con CRL 2% Normal (Subgrupo C) y CRL 1% Al+(OH)<sub>3</sub> (Subgrupo D). Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.



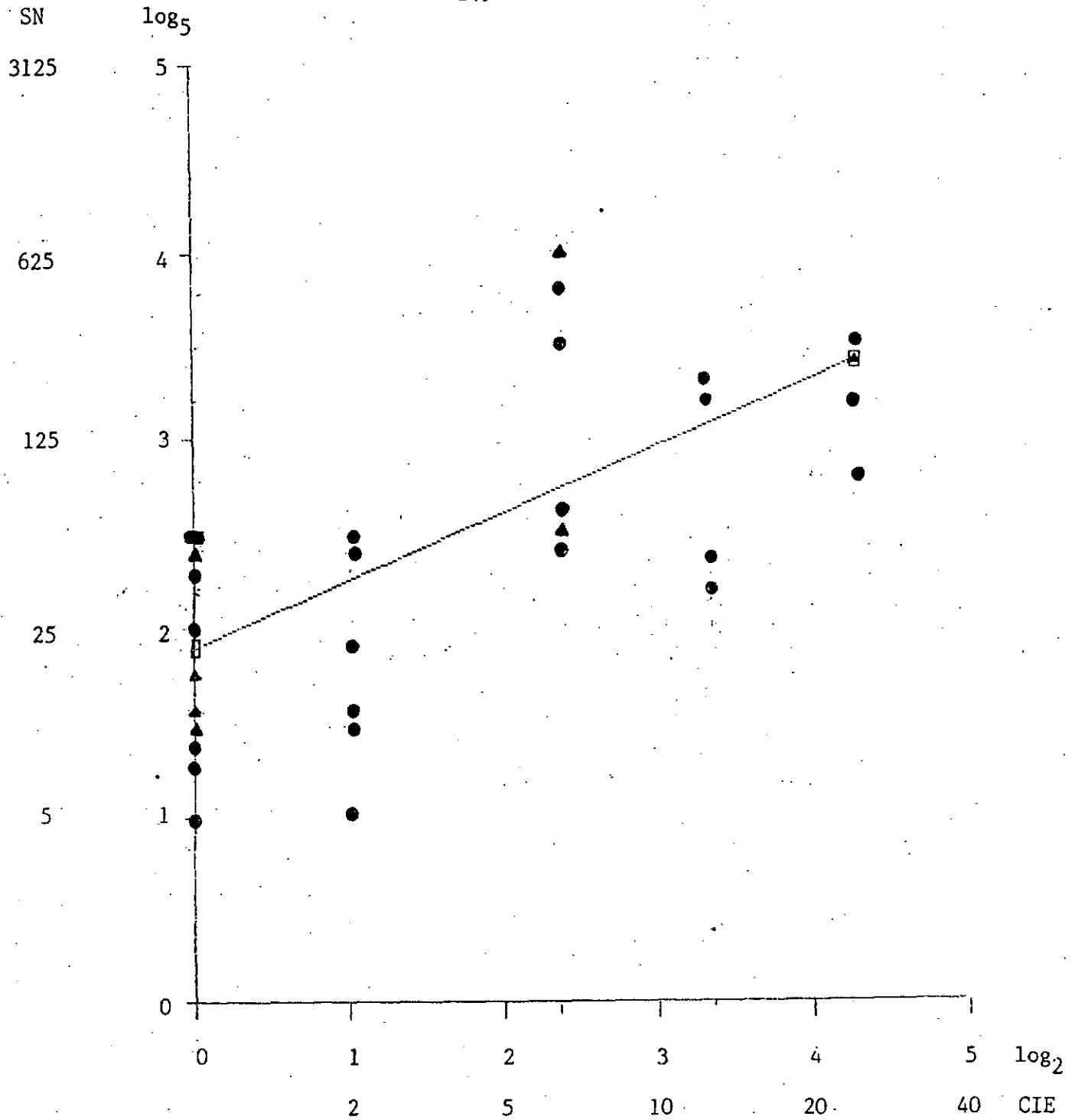
**GRAFICA 14:** Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE en perros inmunizados inicialmente con Vacuna CRL 2% Normal (Grupo 1) y CRL 1% + Al(OH)<sub>3</sub> (Grupos 2); revacunados a los cinco meses con CRL 2% Normal (Subgrupo A y C). Aldea El Milagro, Masagua. Escuintla. Guatemala, 1989.



**GRAFICA 15:** Porcentaje del título final de anticuerpos antirrábicos detectados por la prueba de CIE en perros inmunizados inicialmente con Vacuna CRL 2% Normal (Grupo 1) y CRL 1% + AL(OH), (Grupo 2); revacunados a los cinco meses con CRL 1% + Al(OH), (Subgrupo B y D). Aldea El Milagro, Maságuá, Escuintla. Guatemala, 1989.



**GRAFICA 16:** Regresión lineal de los valores obtenidos con las pruebas de Sueroneutralización en ratones y Contraimmunoelectroforesis en 22 sueros caninos inmunizados contra Rabia. ( $\blacktriangle$  Indica dos puntos superpuestos).  $y = 1.7979 + 0.3731 x$ . Coeficiente de Correlación  $r = 0.55$ .



**GRAFICA 17:** Regresión lineal de los valores obtenidos con las pruebas de Sueroneutralización en ratones y Contraimmunoelectroforesis en 38 sueros caninos inmunizados contra Rabia. (▲ = 2; ■ = 3 puntos superpuestos).  $y = 1.8630 + 0.3518 x$ . Coeficiente de Correlación  $r = 0.67$ .

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. ACHA, P. y SZYFRES, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales domésticos. 2 ed. Washington, OPS/OMS. p. 502-522.
2. BERAN, G. y GROWLEY, A. 1984. Research on rabies virus. JAVMA (EE.UU.) 184(9):1124.
3. BLOOD, D.; HENDERSON, J. y RADOSTITS, O. 1983. Medicina Veterinaria. 5 ed. México, Interamericana. p. 718-722.
4. CELIS, E. et al. 1985. Amplification of rabies virus induced stimulation of human T-cell lines and clones by antigen-specific antibodies. Journal of Virology (EE.UU.) 56(2):426-433.
5. COLDING, H. 1977. Counterimmuno-electrophoresis in the Diagnosis of Bacterial meningitis. Journal of Clinical Microbiology. (EE.UU.) 5(4):405-409.
6. COMPENDIUM OF animal rabies vaccines. 1984. JAVMA (EE.UU.) 184(1):14-17.
7. CONGRESO AVICOLA DEL ISTMO CENTROAMERICANO. (5., 1980 Managua). 1980. Evaluación serológica de campo de dos tipos de vacunas emulsionadas en aceite contra la enfermedad de Newcastle. Parada, J. y Tellez, A. Managua Nicaragua. s.p.
8. CONGRESO NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (7., 1984, Gua.). 1984. Procedimiento de vacunación antirrábica en humanos. Zeissig, O. Guatemala. s.p.
9. COSLETT, G.; HOLLOWAY, B. y OBJESKI, J. 1980. The structural proteins of rabies virus and evidence for their synthesis from separate monocistronic RNA species. J. Gen. Virol. (EE.UU.) 49:161-180.
10. CRICK, J. y BROWN, F. 1976. Rabies virus and the problem of rabies vaccination in man. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygienic (EE.UU.) 70(3):196-198.
11. DEL AGUILA, C. 1973. Rabia; Características del virión rábico. Asociación de Médicos Veterinarios Sanitaristas en Guatemala. p. 25.
12. DELLEPIANE, N. 1984. Estudio de las cepas de virus rábico utilizadas en la preparación de vacuna de cerebro de ratón lactante (tipo Fuenzalida-Palacios). Tesis Doctor en Ciencias Biológicas. Argentina, Universidad de Buenos Aires. 121 p.
13. \_\_\_\_\_ y DIAZ, A. M. 1986. La Rabia. I. Principales Características del agente etiológico y de la enfermedad. Revista Argentina de Microbiología. (Arg.) 18(2):83-95.

14. \_\_\_\_\_ Y DIAZ, A. M. 1987. II. Situación epidemiológica en las Américas. Vacunas e Inmunidad. Revista Argentina de Microbiología. (Arg.) 19:125-138.
15. DIAZ, A. M. 1980. Determination of serum neutralization antibodies to rabies by a modified counterimmunoelectrophoresis test. J. Clin. Microbiol (EE.UU.) 12(2):175-179.
16. \_\_\_\_\_ y MYERS, D. 1981. Comparison between a modified counterimmunoelectrophoresis test and the indirect fluorescent-antibody test for detection of antibodies to rabies virus in human sera. J. Clin. Microbiol (EE.UU.) 14(4):446-448.
17. \_\_\_\_\_ y LOMBARDO, R. 1981. Inmunización de terneros con vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. Revista Argentina de Microbiología. (Arg.) 13(2):45-48.
18. \_\_\_\_\_ 1982. Pre-exposure rabies immunization of man with suckling mouse brain vaccine. American Journal of Epidemiology. (EE.UU.) 115(2):274-277.
19. \_\_\_\_\_. 1983. Rabies neutralizing antibodies determination by the modified counterimmunoelectrophoresis test and rapid fluorescent focus inhibition test. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg/A/ (Alemania) 256(1):1-6.
20. \_\_\_\_\_. 1984. Evaluation of hiperimmune rabies sera by the counterimmunoelectrophoresis test. Journal of Biological Standardization (EE.UU.) 12:61-65.
21. \_\_\_\_\_. 1985. Técnica de contraimmunoelectroforesis para el diagnóstico serológico de la rabia. Centro Panamericano de Zoonosis. Serie de Monografías Científicas y Técnicas no. 13. 38 p.
22. \_\_\_\_\_ et al. 1986. La técnica de contraimmunoelectroforesis para la determinación de anticuerpos antirrábicos. Boletín Sanitaria Panamericana. 101(3):255-261.
23. \_\_\_\_\_; PERDOMO, G. y BECCO, O. 1988. Estabilidad de la Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante almacenada a distintas temperaturas. Bol Of Sanit Panam. 104(3):261-270.
24. DIAZ, R. et al. 1978. Rose Bengal Plate Agglutination and Counterimmunoelectrophoresis tests on spinal fluid in the diagnostic of Brucella Meningitis. Journal of Clinical Microbiology. (EE.UU.) 7(2):236-237.
25. EDELMAN, R. 1980. Vaccine adjuvants. Review of Infectious Disease. (EE.UU.) 2(3):370-383.
26. FEKADU, M. y BAER, G. 1980. Recovery from clinical rabies of two dogs inoculated with a rabies virus strain from Ethiopia. Am. J. Vet. Res. (EE.UU.) 41(10):1632-1634.
27. \_\_\_\_\_ y SHADDOCK, J. y BAER, G. 1982. Excretion of rabies virus

- in the saliva of dogs. The Journal of Infections Disease (EE.UU.) 145(5):715-719.
28. FENNER, R. y WHITE, F. 1981. Virología médica. Traducido por María Luisa Zarate y Carolina de Forner. 2 ed. México, La Prensa Médica. p. 384-389.
  29. FIGUEROA, M. 1984. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica. Costa Rica, Universidad Estatal a Distancia. p. 461-483.
  30. FUENZALIDA, E.; DIAZ, A. y RIVENSON, S. 1978. Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante suplementada con adyuvante. Su aplicación en Bovinos. Rev. Asoc. Arq. Microbiol. (Arg.) 10:47-53.
  31. HERBERT, W. 1972. Inmunología Veterinaria. Trad. M. Trazona. Zaragoza, España, Acribia. p. 203.
  32. HERNANDEZ, G. e ITURBIDE, R. 1984. Aislamiento de Virus rábico a partir de glándula mamaria de ovino infectado naturalmente. Veterinaria-México (Méx.) 15(3):183-187.
  33. INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON RABIES (2., 1988, Alemania). 1988. A counterimmuno-electrophoresis technique for *in vitro* detection of antigens in Rabies vaccines. Ana María Diaz, Graciela Mice-li y Ana Nebel. Buenos Aires, Arg.; CEPANZO. p. 7.
  34. KAPLAN, M. y KOPROWSKI, H. 1976. La rabia; técnicas de laboratorio. 3 ed. Ginebra, Suiza, OMS. 389 p.
  35. KHAN, M.; DIESCH, S. y GOYAL, S. 1986. Current status of rabies. Int. J. Zoon. (EE.UU.) 13(4):215-225.
  36. LEADS FROM the morbidity weekly report; rabies postexposure prophylaxis with human diploid cell rabies vaccine: lower neutralizing antibody titers with Wyeth vaccine. 1985. JAMA (EE.UU.) 253 (11):1537-1540.
  37. \_\_\_\_\_ the morbidity and mortality weekly report rabies prevention: supplementary statement on the preexposure use on human diploid cell rabies vaccine by the intradermal route. 1987. JAMA (EE.UU.) 257(8):1037.
  38. LUTWICK, L. y SHANLEY, J. 1980. Pretreatment antibody titers in repeated rabies prophylaxis. JAMA (EE.UU.) 224(7):691.
  39. MACFARLAN, R. *et al.* 1984. T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides. The journal of immunology (EE.UU.) 133(5):2748-2752.
  40. MARTINEZ, J. 1980. Detección del virus en cerebro de murciélago. Tesis Médico Veterinario. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. p. 20.



41. MERCHANT, I. y PACKER, R. 1975. Microbiología y virología veterinaria. 3 ed. España, Acribia. p. 599-605, 728-735.
42. MOHANTY, S. y DUTLA, S. 1985. Virología veterinaria. Traducido por Fernando Colchonero. México, Acribia. p. 238-244.
43. MORILLA, A. y BAUTISTA, C. 1986. Manual de Inmunología. México, Diana. p. 63-73.
44. NARAYAN, K. 1985. Urban dog rabies endemicity and dog physiology. International Laboratory of Zoonosis, Taipei, Taiwan (Taiwan) 12(1):22-27.
45. OFICINA SANITARIA PANAMERICANA. Centro Panamericano de Zoonosis. s. f. Curso sobre producción y control de vacunas antirrábicas. s.p.
46. \_\_\_\_\_, ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD Y BANCO INTERAMERICANO DE DESARROLLO. s. f. Producción, control y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa. Brasil. p. 51-57.
47. \_\_\_\_\_. 1981. Vigilancia Epidemiológica en las Américas; grupo del Virus rábico (Lyssavirus). 13(4-6).
48. \_\_\_\_\_. 1983. Diagnóstico de la salud animal en las Américas; enfermedades de los animales; rabia. no. 452:108-113.
49. \_\_\_\_\_ y ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1988. Manual de técnicas de laboratorio para la producción de calidad de vacuna antirrábica tipo CRL. OPS/OMS. 36 p.
50. OSEBOLD, J. 1982. Mechanism of action by immunologic adjuvants. JAVMA. (EE.UU.) 181(10):983-985.
51. PALOMO, L. 1982. Inmunoprofilaxis antirrábica humana con vacuna de cerebro de ratón lactante (CRL) usando esquemas reducidos de vacunación. Tesis Químico Biológico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 52 p.
52. SEMINARIO SOBRE ACTUALIZACION EN RABIA (1985, Guatemala). 1985. Vacunas Antirrábicas. Bohl, M. Guatemala, Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas de Guatemala. s.p.
53. \_\_\_\_\_. 1985. Virus rábico. Del Aguila, C. Guatemala, Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas de Guatemala. s.p.
54. \_\_\_\_\_. 1985. Diagnóstico de rabia. Ellgutter, E. Guatemala, Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas de Guatemala. s.p.
55. \_\_\_\_\_. 1985. Técnica de Contraelectroforesis para el diagnóstico serológico de la rabia. Flores, J. Guatemala, Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas de Guatemala. s.p.

56. \_\_\_\_\_. 1985. Diagnóstico de rabia. Girón, M. Guatemala, Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas de Guatemala. S.P.
57. RERUFO, J. et al. 1985. Reduced schedule for the prophylactic treatment of Rabies in man with the suckling mouse brain vaccine. *Arg Biol Tecnol.* 28(2):227-243.
58. SZYFRES, L.; ARROSSI, J. y MARCHESKY, N. 1982. Rabia urbana; el problema de las lesiones por mordedura de perro. *Oficina Sanitaria Panamericana. Boletín* 92(4):310-325.
59. TIZARD, I. 1984. *Inmunología Veterinaria*. Trad. por Folch. 2 ed. México, Diana. p. 43-44.
60. UBOL, S. y PHANUPHAK, P. 1986. An effective economical intradermal regimen of human diploid cell rabies vaccination for postexposure treatment. *Clin. Exp. Immunol. (EE.UU.)* 63(3):491-497.
61. VAZ, N.; KANE, R. y LYNCH, J. 1981. On the adjuvant effect of Aluminum Hydroxide for mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. (Bra.)* 76(1):93-98.
62. ZANABRIA, E. 1977. Estudio comparativo de los diagnósticos clínicos y los de laboratorio en rabia. *Revista Ecuatoriana de Higiene y Medicina Tropical (Ecuador)* 30(2):225-230.

*Dora Elena Chang*  
C-01

Br. Dora Elena Chang Chang

*Carlos del Aguila B.*

Dr. Carlos del Aguila B.  
Asesor Principal

*Miguel Bohl D.*

Dr. Miguel Bohl D.  
Asesor

*Arnoldo Ericastilla G.*

Dr. Arnoldo Ericastilla G.  
Asesor

IMPRIMASE :

*Ernesto Villagrán C.*

Dr. Ernesto Villagrán C.  
Decano

