Fuente : Diario Oficial de la Federación **Fecha de Publicación:** 03 de Julio de 2009

PROY-NOM-067-ZOO-2007

PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA, CAMPAÑA NACIONAL PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA RABIA EN BOVINOS Y ESPECIES GANADERAS.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

WOLFGANG RODOLFO GONZALEZ MUÑOZ, Coordinador General Jurídico de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, a petición del Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoosanitaria, con fundamento en los artículos 9, 12, 16, 26 y 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 1, 6 fracciones I, II, IV, VIII, IX, XV, XVI, XVIII y XXI, 54, 55, 56, 58, 63, 64, 65, 66 y 67 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40 fracción II, 41, 43, 44, 45 y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 fracción II y 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 3, 15 fracciones I, II, XXX y XXXI, fracción XXIX y 49 del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, y

CONSIDERANDO

Que es atribución de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, el fomentar la producción pecuaria y consecuentemente el diagnóstico, la prevención, control y erradicación de enfermedades y plagas, como es el caso de la rabia que afecta a la ganadería nacional, en su nivel de salud y producción;

Que las pérdidas económicas directas anuales estimadas en la ganadería nacional por la muerte de bovinos a causa de esta enfermedad son del orden de los 500 millones de pesos;

Que la rabia es una zoonosis infecto-contagiosa, aguda y mortal que ataca al sistema nervioso central, causado por un virus de la familia *Rhabdoviridae* y es transmitida por la saliva de un animal enfermo a los bovinos y especies ganaderas;

Que el murciélago hematófago o vampiro del género *Desmodus rotundus*, es el principal transmisor de la rabia al ganado bovino y especies ganaderas, que incide en la disminución de la producción de carne y leche y ocasiona la muerte de los animales, lo que repercute desfavorablemente en la producción ganadera y como una importante zoonosis;

Que las condiciones ecológicas en algunos estados del país favorecen la presencia de los vampiros del género *Desmodus rotundus*; que son reservorios del virus de la rabia;

Que los casos de rabia en bovinos y especies ganaderas, se han mantenido e incluso incrementado de manera considerable en el país y que su implicación con otros vertebrados la convierte en los últimos años en una importante zoonosis;

Que esta enfermedad se controla y previene mediante acciones conjuntas de los sectores público, social y privado, ofreciendo información educativa al respecto en función de una vigilancia epidemiológica eficaz, el control de las poblaciones de vampiro, control de focos y la vacunación de las especies ganaderas en riesgo, a fin de reducir las importantes pérdidas económicas ocasionadas en la ganadería del país;

Que es necesario garantizar la aplicación de una eficaz vacunación contra la rabia a los bovinos y especies ganaderas en riesgo, para inmunizar a éstas contra esta enfermedad, y

Que en la actualidad la aplicación de vampiricidas es una herramienta para el control de las poblaciones de vampiros, he tenido a bien expedir el siguiente:

PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-067-ZOO-2007, CAMPAÑA NACIONAL PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE LA RABIA EN BOVINOS Y ESPECIES GANADERAS

El presente anteproyecto se publica a efecto de que los interesados, dentro de los 60 días naturales siguientes a la fecha de publicación del mismo, presenten sus comentarios ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoosanitaria, sito en Municipio Libre número 377, piso 7, ala A, colonia Santa Cruz Atoyac, Delegación Benito Juárez, código postal 03310, México, D.F.; correo electrónico saguilar@senasica.sagarpa.gob.mx

Durante el plazo mencionado, la manifestación de impacto regulatorio que sirvió de base para la elaboración del anteproyecto de norma, estarán a disposición del público para su consulta en el domicilio del Comité.

Prefacio

Unidad Administrativa Responsable de la Elaboración de este Anteproyecto:

- Dirección General de Salud Animal

En la elaboración de este Proyecto de Norma Oficial Mexicana participaron los siguientes organismos e instituciones:

- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS-OMS en México)
- Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
- Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

Indice

1. Objetivo y campo de aplicación

2. Referencias

3. Definiciones y abreviaturas

4. Disposiciones Generales

5. Fases de la Campaña

6. Diagnóstico

7. Muestreo

8. Vacunas y Vacunación

9. Requisitos mínimos para las vacunas contra la rabia, de virus activo modificado y de virus inactivado

10. Tratamientos para el control de poblaciones de vampiros

11. Productos Vampiricidas

12. Vigilancia Epidemiológica

13. Movilización de animales

14. Animales y Productos Importados

15. Sanciones

16. Procedimiento de Evaluación de la Conformidad

17. Concordancia con Normas Internacionales

18. Bibliografía

Transitorios

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. El objetivo del proyecto de norma es instrumentar un mecanismo capaz de establecer las especificaciones zoosanitarias, criterios, estrategias y técnicas operativas para diagnosticar, prevenir y controlar la rabia transmitida por vampiros del género *Desmodus rotundus* a las especies ganaderas en riesgo.

1.2. El Proyecto de Norma Oficial Mexicana (NOM), aplica a los propietarios de bovinos y especies ganaderas en riesgo tales como equinos, ovinos, caprinos y porcinos.

Asimismo, de conformidad con el proyecto de NOM, la campaña se orienta al diagnóstico, prevención y el control de la rabia transmitida por vampiros a los bovinos y especies ganaderas, mediante la vacunación antirrábica del ganado susceptible y el control de las poblaciones de vampiros.

1.3. La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, los gobiernos de los estados y los Comités de Fomento y Protección Pecuaria de los estados, la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

1.4. La aplicación de las disposiciones previstas en esta Norma, compete a la Dirección General de Salud Animal, así como a las delegaciones estatales de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

2. Referencias

2.1. Para la correcta aplicación de esta Norma, se deben consultar las siguientes normas oficiales mexicanas.

2.2. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-011-SSA2-1993, Para la Prevención y control de la Rabia"

2.3. NOM-046-ZOO-1995, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

2.4. NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria.

2.5. NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio Lista de especies en riesgo.

2.6. NOM-008-SCFI-1993, Sistema General de Unidades de Medida.

3. Definiciones y Abreviaturas

Para los fines de esta Norma, son aplicables las definiciones siguientes:

3.1. Animal sospechoso: Animal enfermo que presenta signos sugestivos de rabia.

3.2. Animal confirmado: Caso a rabia comprobado por pruebas de laboratorio.

3.3. Area endémica: Sitio geográfico bien definido, donde se presenta la rabia bovina y especies ganaderas en forma habitual.

3.4. Antígeno: Sustancia que por sí misma sea capaz de estimular una respuesta inmune "*in vivo*", así como también pueda ser utilizada en la evaluación de la respuesta inmune "*in vitro*".

3.5. Biológico: Todo producto de fabricación nacional o importado con regulación correspondiente otorgada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, a través de la Dirección General de Salud Animal, procedente del cultivo del virus de la rabia, activo modificado o inactivado u otro, que al ser aplicado al animal susceptible confiera inmunidad contra esta enfermedad, de forma tal que los animales vacunados no enfermen si son expuestos al virus patógeno contra el cual han sido vacunados.

3.6. Campaña: Campaña Nacional para la prevención de la rabia en bovinos y especies ganaderas.

3.7. Cepa aprobada: Virus rábico vacunal o virulento que ha sido autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación para ser empleado en la producción de vacunas o para las pruebas de desafío, respectivamente.

3.8. Constatación: Procedimiento mediante el cual la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, verifica que el producto cumple con las especificaciones de calidad presentadas por el laboratorio productor y/o las normas oficiales mexicanas aplicables.

3.9. Control: Conjunto de medidas zoosanitarias que tienen por objeto disminuir la incidencia o prevalencia de la rabia en los animales de un área geográfica determinada.

3.10. Control de calidad: Es el conjunto de actividades llevadas a cabo en el laboratorio para certificar que las características del producto cumplen con las especificaciones vigentes.

3.11. CVS: Virus estándar de confrontación; virus fijo de la rabia que se utiliza en las pruebas de desafío.

3.12. Diagnóstico: Estudio que se basa en el análisis que se haga del conjunto de signos clínicos observados en los animales que permite descartar o confirmar la sospecha, en este último caso, mediante pruebas de laboratorio, del virus de la rabia.

3.13. Dirección: Dirección General de Salud Animal.

3.14. DLR-50%: Dosis letal para el ratón al 50%.

3.15. Dosis: Cantidad de producto recomendada en la etiqueta para ser administrada en el animal.

3.16. Endémica: Presencia habitual de la rabia en una población.

3.17. Especies ganaderas: Son todos aquellos animales cuyos productos carne y leche son aprovechados por el hombre y que consisten en las especies bovina, equina, ovina, caprina y porcina.

3.18. Fecha de caducidad: Fecha asignada a una vacuna o vampiricida que designa el término del periodo en que debe aplicarse.

3.19. Foco: Lugar donde se manejan, comercializan y/o explotan animales, sus productos y subproductos, en el cual se identifica la presencia de uno o más casos de rabia.

3.20. Georreferenciación: Sistema basado en el levantamiento de datos geográficos sobre las actividades en campaña, en apoyo al proceso de notificación de la rabia para así poder dictar las medidas contraepizoóticas a emprender.

3.21. Herida: Lesión en piel o mucosa con solución de continuidad.

3.22. Infección: Situación que se presenta cuando el virus de la rabia ha penetrado al organismo de una persona o animal.

3.23. Laboratorio autorizado/aprobado: Laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación para realizar servicios de diagnóstico y constatación de la rabia.

3.24. Laboratorio de Control de Calidad: Laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, que se encarga de la verificación y aprobación del cumplimiento de los requisitos mínimos de los productos biológicos, vacunas, antígenos y reactivos, utilizados en el diagnóstico y control de la rabia.

3.25. Laboratorio de Producción de Biológicos: Laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, para la fabricación de las vacunas, antígenos y reactivos utilizados en el diagnóstico y control de la rabia.

3.26. Lote: Es una cantidad específica de cualquier materia prima o producto que haya sido elaborado bajo condiciones equivalentes de operación y durante un periodo determinado

3.27. Medidas zoosanitarias: Disposiciones para proteger la salud animal, de la introducción, radicación o propagación de una plaga o enfermedad; de los riesgos provenientes de aditivos, contaminantes, toxinas u organismos causantes de enfermedades y daños.

3.28. Muestra: Encéfalo, cerebelo o médula, o parte de los mismos que se relacionan con la rabia, con el propósito de ser analizados mediante pruebas de diagnóstico y así identificar la presencia o ausencia del virus rábico.

3.29. Murciélago hematófago o vampiro: Quiróptero que se alimenta exclusivamente de sangre de animales domésticos e inclusive del hombre.

3.30. Número de lote: Cualquier combinación de letras, números o símbolos, que sirven para la identificación de un lote y bajo el cual se amparan todos los documentos referentes a su manufactura y control.

3.31. pH: Potencial Hidrógeno.

3.32. Potencia: Prueba de control de calidad para asegurar que un producto biológico es capaz de producir una respuesta inmune y proteger, lo cual se expresará en Unidades Internacionales o porcentaje de protección, de acuerdo a lo establecido en los requisitos mínimos de calidad del producto.

3.33. Prevención: Conjunto de procedimientos sanitarios, destinados a proteger al hombre y animales de una infección del virus rábico.

3.34. Producto liberado: Es aquel que aprobó satisfactoriamente las pruebas de control de calidad y que está listo para su comercialización.

3.35. Producto vampiricida: Producto químico elaborado con anticoagulantes para el control de las poblaciones de vampiros.

3.36. Pruebas de Control de Calidad: Es el conjunto de actividades llevadas a cabo en el laboratorio para certificar que las características de un producto cumplen con las especificaciones vigentes.

3.37. Pureza: Es la prueba mediante la cual se verifica que existe en el producto, únicamente el microorganismo indicado y que está libre de microorganismos extraños.

3.38. Rabia: Enfermedad infecto-contagiosa, aguda y mortal, que ataca el sistema nervioso central, provocada por un virus del género *Lyssavirus* y de la familia *Rhabdoviridae*. Transmitida al hombre o animales por la saliva de algún animal enfermo o material contaminado.

3.39. Reporte: Presentación de un informe sobre la detección de la rabia en un tiempo determinado.

3.40. Reservorio: Cualquier animal donde normalmente vive y se multiplica el virus de la rabia y del cual depende para su supervivencia, donde se replica de manera que pueda ser transmitido a un huésped susceptible.

3.41. Secretaría: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

3.42. Seguridad e inocuidad: Prueba de control de calidad para asegurar que un producto no cause reacciones desfavorables atribuibles al mismo.

3.43. SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

3.44. Titulación: Prueba de control de calidad para asegurar que un producto contiene la cantidad de antígeno de virus rábico o anticuerpos establecidos en los requisitos mínimos.

3.45. Vacunación: Administración de antígenos rábicos en la dosis adecuada con el propósito de inducir la producción de anticuerpos contra la rabia a niveles protectores.

3.46. Vigilancia epidemiológica: Conjunto de actividades que permiten reunir información indispensable para identificar y evaluar la conducta de la rabia, detectar y prever cualquier cambio que pueda ocurrir por alteraciones en los factores, condiciones o determinantes con el fin de recomendar oportunamente, con bases científicas, las medidas indicadas para su prevención, control y erradicación.

3.47. Zona en control: Area geográfica determinada en la que se operan medidas zoosanitarias tendientes a disminuir la incidencia o prevalencia de la rabia, en un periodo y especie animal específicos.

3.48. Zona libre: Area geográfica determinada en la cual se ha eliminado o no se han presentado casos positivos de rabia en animales específicos, durante un periodo preciso, de acuerdo a las normas oficiales y las medidas zoosanitarias que la Secretaría establezca.

3.49. Zoonosis: Enfermedades que afectan a distintos vertebrados, incluido el hombre.

4. Disposiciones Generales

4.1. La Campaña se orienta al diagnóstico, prevención y el control de la rabia transmitida por vampiros a los bovinos y especies ganaderas, mediante la vacunación antirrábica del ganado susceptible y el control de las poblaciones de vampiros.

4.2. La responsabilidad de operar los programas estatales de la Campaña, debe compartirse y concertarse entre el Gobierno Federal, los gobiernos estatales, los productores y propietarios de ganado, los médicos veterinarios zootecnistas y otros profesionistas relacionados con el problema, las empresas vinculadas a la producción comercialización de vacunas y productos vampiricidas, comerciantes y transportistas de ganado bovino y especies ganaderas, con las instancias correspondientes, así como otras que determine la Secretaría, quienes deben participar activamente en dichos programas.

4.3. La SECRETARIA por medio del SENASICA, supervisará el cumplimiento de las normas en lo referente a fabricación, importación, exportación, almacenaje, transportación, comercialización y uso de las vacunas antirrábicas para cada una de las especies afectadas, así como los productos vampiricidas.

5. Fases de la Campaña

5.1. Para efectos de esta Campaña se reconocen las zonas: **a)** zona de control y **b)** zona libre, las cuales deben ser consideradas a nivel municipal, regional o estatal.

5.2. Las vertientes estratégicas de la Campaña serán el diagnóstico, la capacitación de personal, la vacunación antirrábica del ganado y el control de las poblaciones de vampiros.

5.3. La SECRETARIA, realizará el reconocimiento oficial de las fases, bajo el cumplimiento de las siguientes medidas zoosanitarias:

5.4. La zona de control debe de contar con actividades de:

- Promoción y difusión de la Campaña las cuales se deben llevar a cabo por las instituciones involucradas, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.
- Capacitación de personal operativo y productores, mediante la programación de cursos y talleres sobre la prevención de la rabia y el control de las poblaciones de vampiros.
- Control de las poblaciones de vampiros, por la realización de actividades conforme a los puntos 10 y 11 de esta Norma y la georreferenciación de estas actividades.
- Vacunación de las especies ganaderas susceptibles conforme al punto 8 de esta Norma y la georreferenciación de estas actividades.
- Control de los focos rábicos conforme a lo dispuesto a los puntos 8, 10, 12 y 13 de esta Norma y la georreferenciación de estas actividades.
- Contar con un sistema de muestreo, y monitoreo de los lugares donde habitan los vampiros y la georreferenciación de estos lugares.
- Contar con un sistema de muestreo y monitoreo, basado en el diagnóstico de laboratorio para realizar la vigilancia epidemiológica de la rabia bovina y especies ganaderas.

5.5. La zona libre debe demostrar lo siguiente:

- Ausencia del virus rábico en la población susceptible.
- Ausencia de vampiros del género *Desmodus rotundus*, en el área o región ya sea por razones ecológicas o por acciones de la campaña, comprobada mediante inspección oficial.
- Control de los focos rábicos conforme a lo dispuesto a los puntos 8, 10, 12 y 13 de esta Norma y la georreferenciación de estas actividades
- Control de la movilización de animales conforme al punto 13 de esta Norma.
- Contar con un sistema de muestreo y monitoreo, basado en el diagnóstico de laboratorio para realizar la vigilancia epidemiológica de la rabia bovina y especies ganaderas.

6. Diagnóstico

6.1. Las pruebas para la detección del virus rábico en bovinos y especies ganaderas, se deben realizar de acuerdo a lo descrito en la Parte 2, Sección 2.2, capítulo 2.2.5 del Manual de Pruebas Diagnósticas y vacunas para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (Ver Apéndice “B” Normativo).

7. Muestreo

7.1 Toma y envío de muestras a laboratorio

7.1.1. La muestra ideal para el diagnóstico de rabia en laboratorio es el encéfalo y médula de bovinos y especies ganaderas sospechosas que muestren signos nerviosos característicos de la enfermedad.

7.1.2. La toma de muestra deberá realizarse conforme a lo descrito en el Apéndice “A” (Normativo) de la presente Norma.

7.1.3. Registrar la información geográfica (georreferenciación) sobre la colecta de muestras para el diagnóstico de rabia.

8. Vacunas y Vacunación

8.1. Las vacunas antirrábicas que se utilicen en la Campaña deben ser las elaboradas con virus activo modificado y las elaboradas con virus inactivado, estas mismas deben contar con el reconocimiento oficial de la Secretaría. Su aplicación se realizará conforme a la vía de administración y dosis indicada por el laboratorio fabricante.

8.2. La vacunación antirrábica en las especies ganaderas en la área endémica, será obligatoria en aquellos lugares donde se presenten casos clínicos y/o confirmados por laboratorio y se deben realizar las acciones de manera focal y perifocal en un radio mínimo de 10 km del foco inicial.

8.3. Para garantizar una buena práctica de inmunización antirrábica en los animales, se deben conservar todas las vacunas antirrábicas en refrigeración y/o en recipientes con bolsas congelantes o hielo suficiente desde su compra y hasta la aplicación en los animales, siguiendo las recomendaciones de laboratorio productor.

8.4. El esquema de vacunación antirrábica para los bovinos y especies ganaderas mayores de un año, se realizará en el área endémica de rabia y cuando las acciones de campaña se encuentren en la zona.

8.5. El esquema de vacunación antirrábica para los bovinos y especies ganaderas menores de un año, se debe realizar en el área endémica de rabia y consistirá en la aplicación de la primera dosis de vacuna antirrábica a partir del mes de edad y la aplicación de sus refuerzos cuando cumplan la edad de tres y seis meses, respectivamente.

8.6. En el caso de tratarse de la revacunación antirrábica anual de los bovinos y especies ganaderas en el área endémica de rabia, ésta se debe realizar conforme a lo dispuesto en los puntos 8.4 y 8.5 de esta Norma.

8.7. Para el control de un foco de rabia en el ganado bovino y otras especies ganaderas, se deben aplicar vacunas antirrábicas de tipo virus activo modificado y/o de tipo virus inactivado, además de realizar actividades de control del transmisor referidas en los puntos 10 y 11 de esta Norma, cuando así proceda.

9. Requisitos mínimos para las vacunas contra la rabia, de virus activo modificado y de virus inactivado

9.1. Características del producto. Elaborado con una cepa aprobada de virus de rabia, activo modificado liofilizado o inactivado y presentado en forma líquida o liofilizada.

9.2. Medios de producción. Cultivos celulares primarios o a partir de líneas celulares o embrión de pollo.

9.3. Requisitos de pruebas. Por cada lote de producto terminado antes de que salga al mercado, el elaborador y/o titular del registro debe realizar las siguientes pruebas:

9.3.1. Pruebas de pureza. Esta prueba consiste en demostrar que el producto vacunal está libre de cualquier contaminante y que contiene únicamente el microorganismo que se indica.

9.3.1.1. El análisis bacteriológico, usando medios para gérmenes aerobios y anaerobios, debe comprobar que el producto está exento de cualquier contaminación bacteriana.

9.3.1.2. Se deben realizar las pruebas necesarias, a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

9.3.1.3. Se deben realizar las pruebas que se requieran para demostrar que el producto está libre de micoplasmas.

9.3.1.4. Se deben realizar las pruebas necesarias, a fin de demostrar que el producto está libre de virus contaminantes.

9.3.2. Prueba de inactivación viral para vacunas inactivadas. La suspensión viral inactivada debe someterse a esta prueba, para la cual se debe utilizar:

a) 10 ratones sanos y susceptibles a la rabia, de la misma cepa o estirpe, de 21 días de edad y de 12 a 16 gr de peso.

b) Una camada de por lo menos ocho ratones lactantes sanos y susceptibles a la rabia, de tres a cinco días de edad.

c) Por lo menos dos conejos sanos y susceptibles a la rabia, de 1.5 a 2.5 kg de peso.

Estos animales deben ser inoculados con la suspensión viral en estudio, por vía intracerebral; los ratones de 21 días con 0.03 ml, los ratones lactantes con 0.02 ml, y los conejos con 0.25 ml, todos los animales deben ser observados diariamente durante 28 días postinoculación. Se deben colectar los cerebros de los animales que mueran entre los días cinco y 28, postinoculación y se tratará de detectar la presencia o ausencia del virus, mediante la inyección de cinco ratones por vía intracerebral, con el material procedente de cada cerebro, debiéndose observar durante 30 días. Para la confirmación de la presencia o ausencia

del virus de la rabia, se debe realizar la prueba de anticuerpos fluorescentes, basado a lo estipulado en el capítulo 6 de esta Norma.

Si se confirma la presencia del virus, el lote es insatisfactorio.

9.3.3. Prueba de seguridad o inocuidad para las vacunas inactivadas. Esta prueba debe realizarse en ratones y en cobayos.

En caso de que la vacuna deba reconstituirse, se hará utilizando el diluyente que la acompaña, de acuerdo a las indicaciones del laboratorio productor.

9.3.3.1. Prueba en ratones adultos. Se debe utilizar 10 ratones de 21 días de edad de 12 a 16 gr de peso, sanos y susceptibles a la rabia, cada uno de los cuales se debe inocular con 0.5 ml de la vacuna en estudio por vía intraperitoneal y serán observados diariamente durante 21 días post-inoculación. Para que la prueba se considere satisfactoria, todos los animales deben permanecer sanos, sin signos de enfermedad durante el periodo de prueba.

9.3.3.2. Prueba en cobayos. Se deben utilizar 2 cobayos de 250 a 300 gr de peso, sanos y susceptibles a la rabia, los cuales deben ser inoculados por vía intraperitoneal con 2 ml del producto y deben ser observados diariamente durante 21 días post-inoculación.

La prueba se debe considerar satisfactoria cuando los cobayos permanezcan sanos, sin signos ni reacciones indeseables atribuibles al producto durante el periodo (de observación)

9.3.4. Prueba de seguridad o inocuidad para las vacunas de virus activo modificado. Esta prueba debe realizarse en ratones y cobayos.

La vacuna debe ser reconstituida con el diluyente que la acompaña, según indicaciones del laboratorio productor.

9.3.4.1. Prueba en ratones adultos. Se deben utilizar 10 ratones de 21 días de edad de 12 a 16 gr de peso, sanos y susceptibles a la rabia, cada uno se inoculará con 0.5 ml de la vacuna, por vía intraperitoneal y serán observados diariamente durante 21 días post-inoculación.

La prueba se debe considerar satisfactoria, si en el periodo de observación sobrevive por lo menos el 80% de los ratones, sin presentar reacciones desfavorables atribuibles al producto, siempre y cuando se demuestre que los que murieron (<20%). fueron a causa de la cepa vacunal de rabia y no a causa de otros agentes infecciosos ajenos al producto.

9.3.4.2. Prueba en cobayos. Se deben utilizar 2 cobayos de 250 a 300 gr de peso, sanos y susceptibles a la rabia, los cuales deben ser inoculados por vía intramuscular, en el músculo gastrocnemio, con 2 ml del producto y deben ser observados diariamente durante 21 días post-inoculación.

La prueba se debe considerar satisfactoria cuando los cobayos permanezcan sanos, sin signos, ni reacciones indeseables atribuibles al producto durante el periodo de observación.

9.3.5. Prueba de seguridad o inocuidad para el trámite de regulación de los productos nuevos y para la semilla de trabajo y/o cuando se requiera. Esta debe realizarse en cada una de las especies animales que el producto recomiende en la etiqueta.

Se deben utilizar 10 animales sanos y susceptibles a la rabia, de cada especie a ser probada (negativos a anticuerpos antirrábicos a la dilución 1:2 ante la prueba de seroneutralización).

Cinco animales deben ser inoculados por vía intramuscular, cada uno con el equivalente a 10 dosis del producto y cada uno de los otros cinco debe ser inoculado también por vía intramuscular, infiltrando el inóculo en un nervio mayor con el equivalente a 10 dosis del producto.

Todos los animales deben ser observados diariamente durante 90 días, tiempo durante el cual deben permanecer sanos, sin signos de enfermedad.

Si alguno de los animales presenta signos de enfermedad o se demuestra el virus de la rabia en su sistema nervioso central, el producto o la semilla se deben considerar insatisfactorios.

9.4. Prueba de titulación para productos de virus activo modificado. Para esta prueba se deben utilizar ratones blancos. Todos de la misma cepa o estirpe, sanos y susceptibles a la rabia, de 21 días de edad y de 12 a 16 gr de peso.

Dos frascos de la vacuna de un mismo lote deben ser reconstituidos con el diluyente que los acompaña; media dosis será extraída de cada frasco para completar la dosis total, que será considerada como la dilución 10^0.

Se deben realizar diluciones decimales desde10^0 a 10^{-6} de la vacuna con una solución tampón fosfatada (conteniendo 2% ml de suero de caballo, libre de anticuerpos contra la rabia, o albúmina de bovino al 0.4%), con un pH de 7.2 ± 0.3 o con el diluyente recomendado por el productor.

Con cada dilución se deben inocular 10 ratones de 21 días de edad de 12 a 16 gr de peso, por vía intracerebral, cada uno con 0.03 ml, empezando la dilución más alta de 10^{-6}, después con 10^{-5}, 10^{-4} y así sucesivamente.

Los ratones deben observarse diariamente durante 14 días post-inoculación y se deben registrar las muertes y los signos de parálisis y espasmos que se observen en los ratones, esto a partir del quinto día post-inoculación. Los ratones que mueran dentro de los primeros cuatro días post-inoculación deben ser descartados.

Para que la prueba sea válida, por lo menos el 80% de los ratones inoculados con cada dilución, deben sobrevivir, a partir del cuarto día post-inoculación.

Con los ratones que mueran a partir de quinto día, se deben calcular los resultados por el método de Reed and Muench o de Spearmen-Karber, expresados como la dosis letal 50% para el ratón (DLR-50%) Los ratones que mueran o presenten signos atribuibles a rabia, se les deben hacer pruebas de inmunofluorescencia a partir del cerebro, por lo menos un animal por dilución.

La vacuna probada debe tener un título mínimo de $10^{3.3}$ DLR 50% por cada 0.03 ml al inicio y durante el periodo de vigencia.

9.5. Pruebas de potencia.

9.5.1. Pruebas de potencia para vacunas de virus activo modificado. Para esta prueba se deben utilizar 15 cobayos de la misma cepa o estirpe, sanos y susceptibles a la rabia, con un peso mínimo de 350 gr elegidos al azar, 10 cobayos deben constituir el lote de prueba y los otros 5 el lote testigo.

Dos frascos de la vacuna del mismo lote deben ser reconstituidos por el diluyente que los acompaña.

La mitad de la dosis recomendada por el laboratorio productor debe ser extraída de cada frasco, para completar una dosis total. Posteriormente se debe agregar el diluyente antes mencionado, hasta completar una dilución de 1:10.

Cada uno de los cobayos del lote de prueba debe ser inoculados con 0.25 ml de la vacuna previamente diluida, en el músculo gastrocnemio, en la cara interna de la pierna, tan cerca del nervio como sea posible.

Tres semanas después de la inoculación, los cobayos vacunados y los testigos deben ser desafiados con el virus CVS de rabia, con 0.5 ml de la dilución anterior a la que en una titulación previa haya matado al 100% de los cobayos, utilizando diluciones dobles, por vía intramuscular, en la extremidad opuesta a la empleada para la vacunación.

Todos los cobayos deben ser observados diariamente durante 14 días post-desafío, las muertes que ocurran entre el primero o cuarto día posterior al desafío deben ser descartadas.

La prueba se debe considerar satisfactoria cuando por lo menos 8 de los 10 cobayos vacunados sobrevivan sin manifestar signos de rabia y cuando por lo menos el 80% de los testigos mueran o presenten signos de rabia en el periodo de observación.

9.5.2. Prueba de potencia para vacunas inactivadas. Esta debe realizarse por la técnica del NIH (Técnica del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América).

9.5.2.1. Prueba de potencia del NIH. Los lotes comerciales deben probarse mediante la prueba del NIH. Para esta prueba se deben utilizar ratones blancos de la misma cepa o estirpe sanos y susceptibles a la rabia, del mismo sexo, de 21 días de edad y con un peso de 12 a 16 gr de peso y se requiere del empleo de una vacuna de referencia aprobada por la Secretaría.

Para la vacuna de prueba y la de referencia se debe seguir el mismo procedimiento.

Con solución salina tamponada de fosfatos pH 7.6, se deben realizar diluciones quintuples seriadas de la vacuna (desde 1:5 hasta 1:625)

Con cada dilución deben vacunarse 16 ratones, cada uno con 0.5 ml por vía intraperitoneal; se debe comenzar por la dilución mayor y se debe terminar con la menor. Al momento del desafío, se realizará la titilación del CVS, en 6 ratones

por dilución, empleando la previa a la que contenga 50 DLR al momento del desafío.

La vacunación debe repetirse una semana después. Todos los ratones vacunados, así como los testigos deben ser desafiados por vía intracerebral a los 7 días después de la segunda vacunación; cada uno con 12 a 50 DLR 50% de CVS, contenidas en 0.03 ml y se deben observar diariamente durante 21 días post-desafío, registrando la morbilidad y mortalidad.

Se deben registrar aquellos que mueran a partir del quinto día posdesafío manifestando signos de rabia tales como parálisis y espasmos, asimismo, se deben registrar aquellos que después de presentar signos de rabia sobrevivan al periodo de prueba. Los muertos antes del quinto día posdesafío serán descartados.

La prueba debe considerarse válida cuando la titulación del virus de confrontación (CVS) tenga una concentración de 12 a 50 DLR 50%, en 0.03 ml

Se debe calcular el punto final de protección de las vacunas por el método de Reed and Muench o el de Spearman-Karber y se debe expresar como la dosis protectora (DP) 50%, tanto de la vacuna de referencia como la de prueba.

La potencia de la vacuna de prueba debe ser expresada en Unidades Internacionales por mililitro (U.I. por ml) y calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Potencia de la vacuna de prueba} = \frac{\text{DP50\% de la vacuna de prueba}}{\text{DP 50\% de la vacuna de referencia}} \times \text{Potencia de la vacuna de referencia en UI/ml}$$

La prueba debe considerarse satisfactoria cuando la potencia relativa de la vacuna que está siendo probada tenga un valor mínimo de 2 U.I. por dosis.

9.5.3. Prueba de potencia para el trámite de regulación de los productos nuevos, para la semilla de trabajo y/o cuando se requiera.- Debe realizarse en las especies animales que el producto recomienda en la etiqueta; el protocolo de prueba que se debe seguir debe estar previamente autorizado por la autoridad competente.

Para que los resultados sean satisfactorios, el producto debe proteger por lo menos al 80% de los vacunados con una sola dosis, al ser desafiados al término del periodo de protección indicado por el laboratorio productor y deben morir por lo menos el 80% de los testigos, después de ser observados durante 90 días.

Para efectos de comprobación, el elaborador y/o titular del registro debe asegurar todos los requisitos señalados durante el periodo de vigencia que ofrezca, por cada lote del producto, a partir de la fecha de elaboración.

Para muestra de retención, en vacunas de virus activo modificado el título mínimo aceptable debe ser de $10^{3.3}$ DLR 50% en 0.03 ml, durante 3 meses más a la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Para vacunas inactivadas el valor mínimo será de 2 U.I. por dosis, durante tres meses más a la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

9.6. Prueba de vacío para vacunas liofilizadas- Esta prueba debe realizarse en un cuarto oscuro, empleando el aparato de Tessler que es el generador de alta frecuencia, el cual debe aplicarse a cada frasco de vacuna liofilizada a una distancia de no más de 5 mm de la retapa de aluminio. Existirá vacío si la descarga eléctrica ilumina el interior del frasco de la vacuna.

Al término del proceso de liofilización se puede sellar también con gas inerte, para lo cual, en este caso, no se realizará la prueba de vacío.

9.7. Prueba de humedad para vacunas liofilizadas. Esta prueba consiste en determinar el porcentaje de humedad que tiene la vacuna liofilizada, que debe ser igual o menor del 4%, se puede determinar por los métodos de Abderhalden, Karl Fischer o Termogravimétrico.

9.8. Prueba de pH.

9.8.1. Para vacunas de virus activo modificado. La vacuna reconstituida debe mostrar un pH entre 6.9 y 7.4 el cual debe ser comprobado con un potenciómetro previamente calibrado.

9.8.2. Para vacunas de virus inactivado. Deben mostrar un pH entre 7.2 y 8.2.

10. Tratamientos para el control de poblaciones de vampiros

10.1. Las capturas para el control de vampiros se realizarán por personal oficial de la Secretaría o personal capacitado para tal fin, el cual será supervisado por el personal oficial de la Secretaría.

10.2. En las zonas de fase de control, además de lo indicado en los puntos 8 y 9, se realizarán operativos para el control de las poblaciones de vampiros indicados en los puntos 10 y 11 de esta Norma.

10.3. En cada operativo para el control de vampiros, sea este comunitario, municipal, regional o estatal, debe diseñarse una estrategia y un programa de acciones, considerando e indicando la dimensión del área, las barreras naturales, la población bovina y especies ganaderas, la incidencia de mordeduras, así como la población estimada de vampiros.

10.4. En cada operativo de control de vampiros en cualquiera de sus niveles, se debe registrar la cantidad de vampiros capturados y tratados, así como los enviados para diagnóstico de rabia. Asimismo se debe registrar, el número de bovinos y especies ganaderas tratadas conforme a lo establecido en el punto 10.5 y los resultados obtenidos en este ámbito.

10.5. En los operativos para el control de vampiros, se deben utilizar únicamente los tratamientos descritos en los puntos 10.5.1., 10.5.2. y 10.5.3., sin causar daños ni trastornos en las poblaciones benéficas de murciélagos.

10.5.1. Tratamiento tópico con pomada vampiricida elaborada a base de anticoagulantes orales, en vampiros capturados con redes ya sea en corral o refugio. Esta técnica sólo debe ser empleada por personal oficial y/o personal entrenado en las técnicas de control, además de estar vacunado previamente contra la rabia.

10.5.2. Tratamiento tópico con pomada vampiricida elaborada a base de anticoagulantes orales aplicado en las heridas ocasionadas por la mordedura de los vampiros en los bovinos y especies ganaderas. Esta técnica podrá ponerla en práctica cualquier persona, siguiendo las indicaciones establecidas en el producto.

10.5.3. Tratamiento sistémico del ganado con vampiricida elaborado a base de anticoagulantes de uso sistémico. Esta técnica puede utilizarla cualquier persona.

10.6. El control de vampiros se llevará a cabo con recursos de la Secretaría, los Gobiernos de los Estados, Municipios, Grupos Organizados, Comités de Fomento y Protección Pecuaria, Uniones Ganaderas Regionales y aquellos que los productores tengan destinados para su efecto.

10.7. Registrar la información geográfica (georreferenciación) sobre las actividades de control de vampiros.

11. Productos Vampiricidas

11.1. Los productos vampiricidas que se utilicen en la Campaña deben ser los elaborados con sustancias anticoagulantes. Sus vehículos, dosificación, así como el mismo vampiricida deben contar con el reconocimiento oficial de la Secretaría. Su aplicación se realizará conforme a la vía de administración y dosis indicada por el laboratorio fabricante.

11.2. Para el control de poblaciones de murciélagos hematófagos, no deben utilizarse productos vampiricidas o sustancias que no cuenten con el reconocimiento oficial de la Secretaría.

12. Vigilancia Epidemiológica

12.1. En el caso de focos de rabia en una explotación o de un resultado positivo a rabia por laboratorio, es obligación tanto del propietario de los animales, médico veterinario aprobado, así como del público en general según corresponda, el notificarlo de forma inmediata a la Secretaría.

12.2. En las zonas de control y libres de rabia, es responsabilidad de los gobiernos federal y estatal, así como de poseedores o productores de ganado bovino y otras especies ganaderas, médicos veterinarios, responsable de la explotación o del laboratorio; así como del público en general según corresponda la notificación inmediata de morbilidad, mortalidad, sospecha o confirmación de rabia en los animales.

12.3. La vigilancia epidemiológica de la rabia en el área endémica del país, debe reportarse de la manera siguiente:

- Notificación inmediata de los casos o sospechas de rabia en bovinos y especies ganaderas a la Delegación de la SECRETARIA en los estados, Comités de Fomento y Protección Pecuaria, Gobiernos de los estados, Presidencias municipales, laboratorios de diagnóstico, Dirección de Vigilancia Epizootiológica (DIVE) y/o la Campaña.

- Las Delegaciones estatales, los estados, Comités de Fomento y Protección Pecuaria, Gobiernos de los estados, Presidencias municipales, laboratorios de diagnóstico, Dirección de Vigilancia Epidemiológica (DIVE), deben enviar a la Campaña, la información geográfica (georreferenciación) sobre las actividades de vacunación y control de vampiros, así como la correspondiente a los focos de rabia bovina.
- Realización del diagnóstico de rabia conforme a lo referido en el punto 6 de esta Norma.
- El Seguimiento epidemiológico de los casos en bovinos y especies ganaderas, se debe realizar de acuerdo a lo referido en los puntos 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de esta Norma.
- El Cierre de los casos se debe efectuar cuando ya no existan bovinos y especies ganaderas con evidencias de rabia o sospechas de la enfermedad como efecto de las acciones indicadas en los puntos 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de esta Norma.

12.4. En cada una de las medidas zoosanitarias aplicadas en la vigilancia epidemiológica, es necesario contar con la participación de las instituciones involucradas en la Campaña, mismas que deben actuar en su oportunidad y de manera coordinada, para la obtención y envío de la información zoosanitaria.

13. Movilización de Animales

13.1. Las especificaciones contenidas en este capítulo se aplican para el ganado bovino y especies ganaderas, para su movilización se debe comprobar que los animales fueron vacunados 30 días antes de la movilización e igualmente, ésta no podrá ser realizada cuando el animal tenga más de 6 meses de la última vacunación. Adicionalmente debe contar con el Certificado Zoosanitario correspondiente.

13.2. En la zona libre.- Los bovinos y especies ganaderas que se encuentren en zonas colindantes a la endémica, se mantendrá una vigilancia epidemiológica activa de acuerdo a las circunstancias y periodicidad, a través de las Delegaciones, quienes informarán a los productores a través de las instancias correspondientes.

13.3. En la zona en control.- Es obligatoria la vacunación antirrábica de los bovinos y especies ganaderas, además de realizar los operativos de control de vampiros, los cuales se deben dar a conocer en cada región a través de las Delegaciones, quienes informarán a los productores mediante las instancias correspondientes.

13.4. Todos los animales originarios de zonas libres de rabia pueden movilizarse sin ninguna restricción a zonas libres; en el caso que el destino de los animales sea un estado, zona o región en control, éstos deben estar vacunados contra la rabia, 30 días antes de la movilización e igualmente, ésta no podrá ser realizada cuando el animal tenga más de 6 meses de la última vacunación conforme a los puntos 8.4 y 8.5 de esta norma.

13.5. Los bovinos y especies ganaderas originarias de zonas en control podrán movilizarse en el territorio nacional siempre y cuando comprueben la vacunación antirrábica de los animales, 30 días antes de la movilización e igualmente, ésta no podrá ser realizada cuando el animal tenga más de 6 meses de la última vacunación, además de contar con el Certificado Zoosanitario correspondiente.

13.6. No se deben movilizar bovinos y/o especies ganaderas con signos nerviosos y/o sugestivos o sospechosos a rabia.

14. Animales y Productos Importados

14.1. La importación de bovinos y especies ganaderas que provengan de países endémicos de rabia, tendrán que demostrar la vacunación antirrábica de los animales 30 días antes de la movilización e igualmente, ésta no puede ser realizada cuando el animal tenga más de 6 meses de la última vacunación a su importación y de acuerdo a lo estipulado en el punto 8 y 13 de esta Norma.

14.2. Los productos biológicos (vacunas) y vampiricidas importados deben cumplir con todos los requisitos establecidos en esta Norma.

14.3. Las vacunas importadas para su uso en bovinos y especies ganaderas, deben provenir de una empresa elaboradora con registro Federal o Nacional, de su país de origen y cumplir con todos los requisitos establecidos en esta Norma y con las disposiciones correspondientes, según sea la especie y el caso.

14.4. Sólo pueden importarse productos que se estén comercializando libremente en el país de origen, lo cual debe ser avalado con el certificado de libre venta o su equivalente.

15. Sanciones

15.1. El incumplimiento de las disposiciones contenidas en esta Norma, será sancionado conforme a lo establecido en la Ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

15.2. Las personas que teniendo conocimiento de la presencia o sospecha de rabia y que no lo notifiquen serán sancionadas conforme a lo dispuesto en el artículo 254 fracción II del Código Penal para el Distrito Federal en Materia del Fuero Común y para toda la República en Materia del Fuero Común.

16. Procedimiento de Evaluación de la Conformidad

Para efecto de la presente regulación, la evaluación de la conformidad será realizada por la Secretaría a través de la expedición de dictámenes, informe de resultados y certificados zoosanitarios, por sí misma o mediante personas físicas o morales acreditadas y, en su caso, aprobadas para ello.

Los dictámenes serán elaborados por el médico veterinario oficial o las unidades de verificación acreditadas y, en su caso, aprobadas, en los cuales se presentan los resultados obtenidos de la verificación realizada.

Mediante el informe de resultados se presentarán los resultados obtenidos de las pruebas y/o análisis realizados por un laboratorio oficial o aprobado, así como otra información relevante derivada de los mismos.

El certificado zoosanitario debe ser expedido por la Secretaría o por quienes estén acreditados o aprobados para constatar el cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana. Tratándose de animales será signado por un médico veterinario de la Secretaría o por un médico veterinario aprobado o acreditado.

El certificado zoosanitario constata el cumplimiento de la presente Norma o parte de la misma.

17. Concordancia con Normas Internacionales

No se tiene concordancia con normas internacionales al momento de su elaboración.

18. Bibliografía

1. Baer G.M. (1991). The Natural History of Rabies, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

2. Council of Europe (1997). Vaccinum rabie inactivatum ad usum veterinarium. Inactivated Rabies Vaccine for Veterinary Use. European Pharmacopoeia, Third Edition. Monograph 0451. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France.

3. Flores, C.R. La rabia en las diferentes especies sus transmisores y su control. 1a. edición, Editado por INIFAP SARH (Agosto de 1998).

4. Flores, C.R. Prevención de la Rabia Paralítica Bovina y el control de los murciélagos vampiros. 1a. Edición Mayo 1996. Editado por INIFAP-SAGAR-PAIPEME. (1996).

5. Flores, C.R. Técnicas, substancias y estrategias para el control de murciélagos vampiros. 1a. Edición, Marzo 2003, México, D.F. ISBN 970-92109-1-2 Impreso por Laboratorios Bayer de México.

6. Jiménez, R.A. 2005. Manual para la Toma de Muestras para el Diagnóstico de Rabia en Bovinos.

7. Jiménez, R.A. 2006. Manual Técnico sobre Técnicas para el control de poblaciones de vampiros *(Desmodus rotundus)*. 1a. edición. Impreso por Laboratorios Bayer de México.

8. Manual Operativo para el control de la Rabia Paralítica Bovina. México, D.F., SAGARPA, 2002.

9. OIE. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, 5a. Edición, París Francia 2004.

10. Organización Mundial de la Salud. 8o. Informe del Comité de expertos de la OMS sobre rabia. Serie de Informes Técnicos No. 824, 1992.

11. Rexford, D.L. Manual de campo para el control de murciélagos vampiros y la rabia. Bat Conservation International. Austin, Texas, July 31, 1998.

12. World Health Organization (1996). Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., Eds. WHO, Geneva, Switzerland.

TRANSITORIO

PRIMERO.- La presente Norma entrará en vigor a los 60 días posteriores a su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

SEGUNDO.- Se cancela la Norma Oficial Mexicana NOM-035-ZOO-1996, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la rabia en las especies domésticas.

México, D.F., a 12 de junio de 2009.- El Coordinador General Jurídico, **Wolfgang Rodolfo González Muñoz**.- Rúbrica.

Apéndice "A" (Normativo)

Toma y Envío de Muestras al Laboratorio para Diagnóstico de Rabia

La recolección de muestras de animales sospechosos de rabia, o de aquellos animales que muestren signos de enfermedad nerviosa y de las condiciones en su envío al laboratorio y es la parte del trabajo en campo más importante, ya que de esto depende el poder disponer de un resultado de laboratorio rápido y confiable.

Para la manipulación de muestras sospechosas de rabia, de las cuales se pretende hacer el diagnóstico en laboratorio, se requiere de un cuidado especial para que las muestras lleguen al laboratorio en las condiciones óptimas y así obtener los resultados con mayor exactitud.

Para el diagnóstico de rabia, las muestras ideales son las de tipo nervioso como el encéfalo y la médula; estos órganos son donde se concentra la mayor cantidad de virus rábico.

Para enviar el cerebro, se emplea glicerol al 50% en solución salina neutra o simplemente en condiciones de refrigeración.

En el caso de que se encuentre el animal en el laboratorio de diagnóstico, la necropsia de éste deberá efectuarse en una habitación exclusivamente con este propósito, además de contemplarse todas las precauciones necesarias para la toma y envío de muestras y éstas van desde la vacunación del personal antes de la exposición, el uso obligatorio de lentes protectores para los ojos, bata u overol, guantes de hule grueso hasta la utilización de cubrebocas; con el fin de evitar la exposición al virus a las personas encargadas de la extracción de muestras.

El equipo e instrumental para la extracción de las muestras de encéfalo y médula, para diagnóstico de rabia es indispensable y debe ser exclusivo para ello, mismo que consiste en:

- Bata u overol
- Lentes protectores para los ojos
- Guantes de hule grueso
- Careta o mascarillas con protección
- Cubrebocas
- Segueta o sierra de carnicero
- Cuchillo
- Tijeras para cirugía
- Pinzas.

Para el envío de las muestras de encéfalo y médula, a laboratorio para el diagnóstico de rabia se requiere de:

- Bolsas de plástico suficientes (de preferencia con cierre hermético, tipo zip)
- 1 ó 2 frascos de plástico de boca ancha con cierre hermético de un volumen de 1 ½ litros.
- Hielo en cantidad suficiente; o
- Glicerina fosfatada al 50%
- Hielera con refrigerante.

El procedimiento para la extracción de las muestras de encéfalo y médula, para diagnóstico de rabia es indispensable y debe ser exclusivo para ello, mismo que consiste en:

1. Retirar la piel del cráneo y efectuar los siguientes cortes con segueta o sierra de carnicero para el corte de los huesos.
2. El primer corte de hueso es transversal y posterior a las cuencas oculares, las cuales sirven para sujetar la cabeza y como puntos de referencia.

3. Hacer dos cortes, uno en cada hueso pariental, tomando como punto de referencia la comisura externa del ojo y la porción lateral del agujero magno exactamente encima de los cóndilos del occipital, procurando evitar cortar la masa encefálica.
4. Al desprender la bóveda craneana dejamos al descubierto el encéfalo.
5. Cortar con las tijeras las meninges que cubren la superficie del encéfalo y que se caracteriza por ser muy duras en los bovinos.
6. Extraer con sumo cuidado el encéfalo.
7. Cada encéfalo se pone en una bolsa de plástico y se deposita dentro de la hielera, misma que contiene refrigerantes o hielo en cantidad suficiente, para asegurar su óptimo traslado y conservación hasta el laboratorio.
8. Por cada muestra, debe elaborarse y anexarse una hoja con la información completa y detallada (SIVE 1).
9. Una vez hecho todo lo anterior se procede a su envío al laboratorio más cercano lo más pronto posible.

Apéndice "B" (Normativo)

Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para Animales Terrestres

PARTE 2; SECCION 2.2; CAPITULO 2.2.5

RABIA

Resumen

La rabia es una importante zoonosis para la cual las técnicas de diagnóstico se han tenido que estandarizar internacionalmente. Debido a que no hay lesiones patognomónicas de la enfermedad, el diagnóstico de la rabia debe hacerse solamente en el laboratorio. Las técnicas de laboratorio conducen preferentemente con tejido del sistema nervioso central (CNS) removido del cráneo. Un compuesto de muestras del CNS debe ser probado y el tallo cerebral es el componente más importante de la muestra.

Identificación del agente: La identificación del agente preferentemente se realiza utilizando la prueba de anticuerpos fluorescentes (FAT por sus siglas en inglés). Una gota de inmunoglobulina purificada previamente conjugado con isotiocianato de fluoresceína es añadida en acetona

La identificación del agente se hace preferentemente usando la prueba de anticuerpos fluorescentes (FAT). Una gota de inmunoglobulina purificada conjugada previamente con isotiocianato de fluoresceína se agrega a un frotis de tejido del cerebro fijado acetona-fijo, es preferible hacerlo de varias partes del cerebro, incluyendo el hipocampo, el cerebelo y la médula oblongada. Para una gran cantidad de muestras, como en el caso de vigilancia epidemiológica, la técnica inmunoenzimática puede proporcionar los resultados rápidos (inmunodiagnóstico rápido de la enzima de la rabia [RREID]). El FAT proporciona un diagnóstico confiable entre el 98-100% de los casos para todos los genotipos si se utiliza un potente conjugado, mientras que RREID detecta solamente el virus del genotipo 1.

Las células nerviosas infectadas han demostrado por pruebas histológicas y estos procedimientos revelan agregados del material viral (Corpúsculos de Negri) en el citoplasma de las neuronas. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica histológica es mucho menor al de los métodos inmunológicos, especialmente si estos han sufrido cierta autolisis del espécimen. Consecuentemente, las técnicas histológicas no pueden ser recomendadas por mucho tiempo.

Una simple prueba negativa en el material fresco no elimina la posibilidad de infección, las pruebas de inoculación, u otras pruebas, se deben realizarse simultáneamente. Ratones lactantes o de 3 a 4 semanas de edad serán inoculados intracerebralmente con una serie de diversos tejidos del CNS, incluyendo el tallo cerebral y después se mantienen bajo observación por 28 días. Cualquier ratón que muera entre los 5 y 28 días, la causa de la muerte deberá ser confirmada por el FAT. Sucesivamente, una capa de cultivo celular susceptible se inoculará con el mismo material utilizado en los ratones. La inmunofluorescencia (FAT) realizada después de una incubación apropiada demostrará la presencia o la ausencia del antígeno viral. Donde sea posible aislar el virus en cultivos celulares, deberá remplazarse por la inoculación en ratones.

La identificación del agente puede ser suplementada en laboratorios especializados mediante la identificación de cualquier variante de cepa del virus a través del uso de anticuerpos monoclonales, pruebas de ácido nucleico específicas, o por la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) seguido por la secuenciación de ADN de áreas genómicas. Tales técnicas pueden distinguir entre el virus de campo y cepas vacunales, y posiblemente identificar geográficamente el origen de las cepas de campo. Estas pruebas son muy sensibles y deberán ser utilizadas por el personal entrenado y en laboratorios especializados.

Pruebas serológicas: Los análisis de neutralización del virus (VN) en cultivos celulares son de las pruebas ordenadas para el comercio internacional. Alternativamente, el uso puede hacerse de una prueba que es conocida a correlacionar con ésta, notablemente un análisis de inmunoabsorción enzima-ligado usando el anticuerpo de la proteína de G o la prueba de neutralización en ratones. Los resultados se expresan en Unidades Internacionales o unidades equivalentes relativas para un antisuero estándar internacional.

Requerimientos para las vacunas y biológicos para el diagnóstico: Las vacunas antirrábicas para su uso en animales contienen virus vivo atenuado para la especie objetivo (tales como ola FLURY de bajo pasaje, Flury de alto pasaje, SAD/Street Alabama Dufferin o Kelev), de virus inactivado por medios químicos o físicos o vacunas recombinantes. El virus es cultivado en tejido del CNS de animales recién nacidos, en huevos embrionados, o en cultivos celulares.

Las vacunas antirrábicas se liofilizan generalmente, pero las vacunas de virus inactivado con un coadyuvante y pueden ser almacenadas en forma líquida.

Antes de registrar el desarrollo de nuevas vacunas, debe determinarse la duración de la inmunidad que resulta de su uso en animales vacunados para cada especie objetivo.

Para las vacunas de virus vivo, deberá establecerse el contenido mínimo viral que resultará en una respuesta inmunológica adecuada.

La potencia de las vacunas de virus inactivado es establecido y controlado mediante la vacunación en ratones seguido por desafío intracerebral utilizando pruebas formuladas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en los Estados Unidos o por la Farmacopea Europea, en otra parte. Los productos finales de ambos tipos de vacuna están sujetos a pruebas de inocuidad y ausencia de toxicidad.

Para vacunas vivas que estén preparadas para la vacunación oral en animales silvestres (o domésticos), deberán demostrar la seguridad y eficacia en los animales objeto y la seguridad en especies no objeto.

A. Introducción

La rabia es causada por un virus neurotrópico del género *Lyssavirus* de la familia Rhabdoviridae, y se transmite a todos los mamíferos. Como también se transmite al ser humano por inoculación o por inhalación del virus, todo el material sospechoso de infección debe manejarse bajo condiciones apropiadas de seguridad especificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (37).

Puede distinguirse siete líneas genéticas distintas del género *Lyssavirus* mediante pruebas de protección cruzada y por análisis de biología molecular (5, 14, 21), a saber el virus de la rabia clásica (RABV, genotipo 1, serotipo 1), el virus Lagos bat (LBV, genotipo 2, serotipo 2), Virus Mokola (MOKV, genotipo 3, serotipo 3), y virus Duvenhage (DUUV, genotipo 4, serotipo 4). Los lyssavirus de murciélagos europeos (EBLV), subdividido en dos biotipos (EBLV1, genotype 5 and EBLV2, genotipo 6) y el lyssavirus de murciélagos australianos (ABLV, genotipo 7), recientemente aislado en Australia (24), también son miembros del género de los Lyssavirus genus, pero aún no se han clasificado en serotipos. Los virus de los serotipos 2-4, los EBLV y el ABLV son conocidos virus relacionados con la rabia. El uso de anticuerpos monoclonales (MAbs) están dirigidos contra los antígenos víricos de la nucleocápside o la glicoproteína, o la secuenciación de fragmentos genómicos determinados ha hecho posible la definición de numerosos subtipos dentro de cada serotipo. Los Lyssaviruses causan una enfermedad clínica indistinguible de la rabia clásica. Los sitios antiénicos conservados en la nucleocápside permiten el reconocimiento de todos los lyssavirus con recientes preparaciones comerciales de conjugados de anticuerpos antirrábicos usados para el diagnóstico con muestras de cerebro. Los sitios antigénicos conservados en la superficie de la glicoproteína de RABV, DUUV, EBLV and ABLV, permiten la neutralización cruzada y la inmunidad cruzada mediante la vacunación antirrábica. Existe poca o nula protección cruzada contra MOKVo LBV por vacunación antirrábica y la mayoría de los antisueros no neutralizan estos lyssaviruses.

El personal que trabaja con material sospechoso debe estar vacunado contra los lyssaviruses y otros patógenos que pueden estar presentes en las muestras a diagnosticar. El laboratorio debe cumplir con la normativa nacional de biocontención y de bioseguridad para proteger al personal del contacto con los patógenos; también debe cumplir con las directrices señaladas en el capítulo I.1.6. Seguridad humana en el laboratorio de Microbiología.

La OMS recomienda la inmunización preventiva del personal expuesto. El protocolo de inmunización incluye tres inyecciones en los días 0, 7, y 28. La evaluación serológica de la inmunización se realice de 1 a 3 semanas después de la última inyección y se comprueba cada 6 meses en el caso de trabajadores de laboratorio o cada 2 años en otro personal. Debe suministrarse un refuerzo cuando el título desciende por debajo de 0.5 Unidades Internacionales por

mililitro UI/ml. En ausencia de control serológico, el regimen de vacunación debe consistir en una vacunación de refuerzo inicial después de 1 año y continuando cada 1 a 3 años.

Como no existen signos clínicos o lesions evidentes post-mortem que puedan considerarse patognomónicas en animales domésticos o silvestres, el diagnóstico de la rabia depende en pruebas de laboratorio. La evidencia serológica de infección es raramente útil debido a la seroconversión tardía y a la elevada tasa de mortalidad de las especies hospedadoras, aunque tales datos pueden usarse en algunos análisis epidemiológicos.

1. Identificación del agente

La observación clínica puede conducir solamente a una sospecha de rabia porque los signos de la enfermedad no son característicos y puede variar grandemente de un animal a otro (36). La única manera de realizar un diagnóstico de rabia confiable es la identificación del virus o parte de sus componentes específicos mediante pruebas de laboratorio.

Como el virus de la rabia es inactivado rápidamente, las muestras a diagnosticar deberán enviarse al laboratorio en refrigeración y por los medios más rápidos disponibles. Las condiciones del envío deben ser considerados para ser parte de la “cadena de diagnóstico de la rabia”.

Pueden utilizarse varias técnicas de laboratorio, mismas que han sido detalladas y estandardizadas en la 4ta edición de Técnicas de Laboratorio para la Rabia de la Organización Mundial de la Salud (OMS's Laboratory Techniques in Rabies) (37). Los métodos varían en su eficacia, especificidad y confiabilidad. Se aplican generalmente al tejido cerebral, pero pueden también ser aplicados aunque con menos eficacia a otros órganos (e.g. glándulas salivales). En el cerebro, el virus de la rabia es particularmente abundante en el tálamo, el Puente de Varolio y la médula. El hipocampo (cuerno de Ammon), el cerebelo y diferentes partes del cerebro se han reportado negativos en 3.9 - 11.1% de los cerebros positivos. La estructura de la elección es el tálamo y esto fue positivo en todos los casos. Se recomienda que una serie de tejidos cerebro sean incluidos la corteza el tallo cerebral debe ser colectado y probado (12). Para alcanzar estas partes del cerebro, es necesario remover el órgano completo después de haber abierto el cráneo en un cuarto de necropsias. Bajo algunas condiciones (como en el campo o cuando se realizan muestreos grandes para estudios epidemiológicos), puede emplearse un método de muestreo simplificado a través del agujero occipital (11), o a través de la cavidad orbital (26).

a) Envío de muestras

Durante el envío de material sospechoso para diagnóstico (cabezas de animales, cerebro u otros tejidos), no debe existir ningún riesgo de contaminación al hombre: los cerebros deben colocarse en un envase rígido y hermético (las cabezas de animales serán envueltas en material absorbente) como se señala en la Asociación Internacional para el Transporte Aéreo (IATA). Estas regulaciones se resumen en el capítulo I.1.1. Métodos de muestreo.

Cuando no sea posible enviar las muestras en refrigeración, otras técnicas de conservación pueden usarse. La elección de conservación está estrechamente ligada a las pruebas de diagnóstico utilizadas:

- La formalina inactiva el virus de la rabia, por lo que no puede utilizarse pruebas del aislamiento y el diagnóstico depende del uso de pruebas modificadas y con menos sensibilidad como son la de inmunofluorescencia directa (FAT), inmunohistoquímica o histológica (33, 37);
- La infecciosidad a temperatura ambiente puede extenderse por varios días si el material del cerebro se mantiene en una mezcla tamponada de glicerol al 50% y solución salina fosfatada (PBS). La mezcla Glicerol/PBS retarda la acción bacteriana y por lo tanto la protege contra los efectos químicos y biológicos de la putrefacción. Esta no protege contra la declinación del título debido a las condiciones térmicas y por lo tanto como el virus de la rabia es termolábil, el título del virus declinará durante su almacenaje en Glicerol/PBS. Bajo condiciones de transporte normal en las zonas tropicales, esta protección puede ser eficaz por cuestión de días. Por lo tanto, siempre que sea posible mantener las muestras en Glicerol/PBS deben mantenerse refrigeradas. Como el virus no se inactivada por el Glicerol/PBS, todas las pruebas de laboratorio pueden utilizarse en estas muestras.

b) Colecta de muestras

Usualmente el cerebro es colectado seguido de abrir el cráneo en una sala de necropsias y las muestras apropiadas son tomadas. Este paso puede ser peligroso si los técnicos de laboratorio no se encuentran entrenados, o están bajo condiciones de campo. En tales casos, existen dos métodos de colecta de muestras de cerebro sin la necesidad de abrir el cráneo:

- **Ruta del Agujero Occipital para la toma de muestra de cerebro**

Se introduce un popote de beber de 5 milímetros (11) o una pipeta plástica disponible de 2 ml (16) en el agujero occipital en la dirección de un ojo. Puede tomarse muestras de Bulbo raquídeo, de la base del cerebelo, del hipocampo, de la corteza y de la médula oblongada. La Encefalopatía Espongiforme de los bóvidos (BSE) debe considerarse en el diagnóstico diferencial de la mayoría del ganado que es considerado "sospechoso a rabia". El muestreo de tejido cerebral para ambas enfermedades puede hacerse mediante el uso de una "cucharada de cerebro o herramienta" desarrollada para el muestreo del tejido para BSE y con mejor efectividad que con el uso de un popote o pipeta. Las muestras resultantes son relativamente fácilmente de reconocer como el área de cerebro muestreada.

- **Ruta Retro-orbital para la toma de muestra de cerebro**

En esta técnica (26), se utiliza un trócar para hacer un agujero en la pared posterior de la cuenca del ojo y se introduce una pipeta de plástico a través de este agujero. Las partes del cerebro muestreadas son las mismas que en la técnica anterior, pero se toman en la dirección opuesta.

c) Pruebas de Rutina en el laboratorio

El diagnóstico de laboratorio puede desarrollarse usando tres tipos de procedimientos.

- **Identificación histológica de lesiones celulares características**

Los corpúsculos de Negri corresponden a una acumulación de proteínas virales, pero las técnicas clásicas de tinción sólo detectan una afinidad de estas estructuras para tinciones acidofílicas. Las Pruebas Inmunohistoquímicas son las únicas pruebas histológicas específicas para la rabia.

Un frotis de tejido sin fijar, puede ser teñido por el método de Seller's, el diagnóstico es después obtenido en una 1 hora aproximadamente. Generalmente, las pruebas histológicas, como la prueba de Mann, se realizan en material fijado después de su inclusión en parafina y el resultado de la prueba se obtiene en un lapso de 3 días. Estas técnicas tienen la ventaja que el equipo del laboratorio necesario para realizarlas es barato y se evita cualquier necesidad para mantener las muestras frías después de ser fijadas. Cualquiera que sea el método de tinción usado, la evidencia de la infección es proporcionada por la presencia de cuerpos acidofílicos intracitoplásmicos. Estos métodos histológicos, especialmente el método de Seller's, no pueden recomendarse porque tienen una sensibilidad baja y deben descartados.

- **Identificación inmunoquímica del antígeno del virus de la rabia**

i) ***Prueba de Anticuerpos fluorescentes (Inmunofluorescencia FAT)***

La prueba ampliamente utilizada para el diagnóstico de la rabia es la inmunofluorescencia, misma que es recomendada por la OMS y la OIE. Esta prueba puede utilizarse directamente en un frotis y también puede usarse para confirmar la presencia del antígeno del virus de la rabia en cultivos celulares o en tejido de cerebro de ratones que hayan sido inoculados para el diagnóstico. La inmunofluorescencia da resultados confiables en especímenes frescos con unas pocas horas en más de 95-99% de los casos. La sensibilidad de la inmunofluorescencia depende de la muestra (grado de autólisis y cómo fue muestreado el cerebro, vea la sección B.1.) (1, 9), en el tipo de lyssavirus y en la habilidad del personal de diagnóstico. La sensibilidad puede ser baja en muestras de animales vacunados debido a la localización del antígeno que se confina al tallo cerebral. Para el diagnóstico directo de la rabia, los frotis se preparan de una muestra compuesta del tejido cerebral que incluya el tallo cerebral, se fijan en acetona fría de alto grado y después se tiñen con una gota del conjugado específico. Los conjugados fluorescentes antirrábicos pueden prepararse en el laboratorio. Aquellos disponibles comercialmente son conjugados policlonales específicos al virus completo o específico a la proteína de la nucleocapside del virus, o pueden estar preparados con una mezcla de diversos anticuerpos monoclonales (MAbs). En la inmunofluorescencia, los agregados específicos de la proteína del nucleocapside son identificados por su fluorescencia. La especificidad y la sensibilidad de estos conjugados antirrábicos fluorescentes deben comprobarse para las variantes de los virus localmente predominantes antes de ser utilizados.

La inmunofluorescencia puede aplicarse a muestras conservadas en glicerol. Si la muestra ha sido conservada en una solución de formalina, la inmunofluorescencia puede ser utilizada solamente después que el espécimen se ha tratado con una enzima proteolítica (6, 7, 32, 33). Sin embargo, la

inmunofluorescencia en muestras fijas en formalina y digeridas son siempre menos confiable y más incómodas que cuando éstas se realizan en tejido fresco.

ii) Pruebas inmunoquímicas

El anticuerpo puede ser conjugado con una enzima como la peroxidasa en vez del isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este conjugado puede usarse para el diagnóstico directo con la misma sensibilidad que la inmunofluorescencia (22), pero atención debe tenerse cuidado del riesgo de resultados falso positivos no específicos. Este riesgo es reducido considerablemente por el entrenamiento cuidadoso de los técnicos. También debe enfatizarse que esta técnica necesita un paso de incubación más que la inmunofluorescencia.

El conjugado con peroxidasa puede usarse en secciones de tejido fijado en formalina para las pruebas immunohistoquímicas.

Una variación de la prueba inmunoquímica es un enzimoinmunoensayo (ELISA) que detecta antígeno de rabia. Esta prueba rápida del immunodiagnóstico de la enzima de la rabia (RREID) está disponible comercialmente (28). Los rangos de correlación entre la inmunofluorescencia y el RREID se extiende entre el 96% y el 99% (8, 15). La versión "rutinaria" de esta prueba no es sensible a los virus de rabia relacionados ya que RREID detecta solamente lyssaviruses del genotipo 1.

Detección de replicación del virus de la rabia después de la inoculación

Estas pruebas detectan la infecciosidad de una suspensión de tejido en cultivos celulares o en animales de laboratorio. Estas deben ser utilizadas si la inmunofluorescencia da un resultado incierto o cuando ésta es negativa en el caso de exposición humana conocida.

i) Prueba de inoculación en ratones

Se inoculan intracerebralmente de cinco a diez a ratones de tres a cuatro semanas de edad (12-14 g), o una camada de ratones de 2 días de nacidos. Es recomendable, aunque no estrictamente esencial, el uso de ratones libres de patógeno específico (SPF). El inóculo es el sobrenadante clarificado de un 20% (peso/volumen) homogéneo del material del cerebro (corteza, cuerno de Ammon, cerebelo, médula oblongada) en una solución isotónica bufferada conteniendo antibióticos. Para reducir el dolor en los animales, los ratones deben ser anestesiados cuando sean inoculados. Los ratones jóvenes adulto serán observados diariamente por 28 días y cada ratón que muera será examinado para rabia usando FAT. Para las cepas de calle de rabia en zorros, las muertes debido a la rabia generalmente comienzan 9 días post inoculación. Para resultados más rápidos en ratones recién nacidos, es posible revisar un ratón bebé por FAT en los días 5, 7, 9 y 11 post-inoculación.

Esta prueba *in-vivo* es demasiado costosa, particularmente si se utilizan los ratones SPF y debe evitarse en lo posible. No da resultados rápidos (comparados con las pruebas de inoculación *in-vitro*), pero cuando la prueba es positiva, una gran cantidad de virus puede ser aislada de un solo cerebro de ratón con el propósito de identificación de la cepa. Otra ventaja de esta prueba de baja tecnología es que puede fácilmente ponerse en práctica y ser aplicada en situaciones donde no está disponible habilidades e instalaciones para otras pruebas (por ejemplo cultivos celulares).

ii) Prueba de cultivos celulares

Para el diagnóstico rutinario de rabia se usan las líneas de células de Neuroblastoma, por ejemplo CCL-131 en la American Type Culture Collection (ATCC: American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, United States of America). Las células se cultivan en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 5% de suero fetal bovino (FCS) y se incuban a 36°C con 5% de CO_2. Esta sensibilidad ha sido comparada en células del riñón del hámster neonato (BHK-21) (29). Esta línea celular es la adecuada para los aislamientos de cepas de la calle sin ningún paso de adaptación, pero debe ser analizada, antes de su empleo, para comprobar su susceptibilidad a las variantes de virus predominantes localmente. La presencia del virus de la rabia en las células es revelada por inmunofluorescencia. El resultado de la prueba se obtiene por lo menos 18 horas después (un ciclo de

replicación de virus en las células); generalmente la incubación se prolonga por 48 horas (10) y en algunos laboratorios hasta cuatro días.

Esta prueba es tan sensible como la prueba de inoculación en ratones. Una vez que la unidad de cultivo celular existe en el laboratorio, esta prueba deberá sustituir la prueba de inoculación en ratones de esta manera se evita el uso de animales vivos, es menos costosa y da resultados más rápidos.

A menudo es recomendable realizar más de un tipo de prueba en cada muestra, por lo menos cuando existe una exposición en humanos.

d) Otras pruebas de identificación

Las pruebas anteriores pueden completarse en laboratorios especializados (como los laboratorios de referencia de la OIE o de la OMS) usando anticuerpos monoclonales, pruebas de ácido nucléico, o de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), seguida por secuenciación de DNA de áreas genómicas para tipificar el virus (16). Esto permite que se haga una distinción entre el virus vacunal y una cepa de virus de campo y posiblemente el origen geográfico de esta última.

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas son raramente utilizadas en la vigilancia epidemiológica, debido a la tardía seroconversión y al bajo porcentaje de animales que sobreviven a la enfermedad y por lo tanto que tienen anticuerpos post-infección. La inmunización oral en los reservorios de la rabia es el método de elección para el control en la fauna silvestre. Para las investigaciones de seguimiento en campañas de vacunación oral, las pruebas de neutralización del virus (VN) en cultivos celulares son las preferidas. Sin embargo, si una pobre calidad en los sueros son sometidos a la prueba VN los cultivos celulares son sensibles a la citotoxicidad, la cual podría conducir a resultados falso positivos. Para tales muestras, el uso de un ELISA indirecta con placas revestidas de glicoproteína de la rabia, han demostrado ser tan sensibles y específicas como la prueba del VN en células (19).

a) Prueba de neutralización del virus en cultivo celular: Prueba de neutralización del virus por anticuerpos fluorescentes (una prueba prescrita para el comercio internacional)

El principio de la prueba de Neutralización del Virus por Anticuerpos Fluorescentes (FAVN) (18) es la neutralización *in vitro* de una cantidad constante del virus de la rabia ('Challenge Virus Standard' [CVS] adaptada a cultivos celulares) antes de inocular las células susceptibles al virus de la rabia: células de BHK-21 C13.

El título del suero es la dilusión en la cual 100% del virus es neutralizada en 50% de los pozos. Este título es expresado en UI/ml comparándolo con la dilusión neutralizante de un suero estándar bajo las mismas condiciones experimentales (suero de la OIE de origen canino o estándar de la OMS para inmunoglobulina [humana] No. 2 o ambas). Puede ser usado un control interno calibrado contra el control internacional.

Este método de microplaca utiliza placas de 96 pozos y es una adaptación de la técnica de Smith et al. (30), modificado por Zalan et al. (38) y por Perrin et al. (27). Varias publicaciones (17, 18) han demostrado que la prueba de FAVN y la Prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes (RFFIT) dan resultados equivalentes.

- **Equipo esencial**

Incubador humedecido a 37°C con 5% CO_2; incubador seco a 37°C; gabinete de biocontención; microscopio de fluorescencia apropiado para fluorescencia con FITC y equipado con ocular x10 y objetivo x10. El aumento global del microscopio varía entre x100 y x125 debido al aumento adicional de algunos sistemas de epi-fluorescencia.

- **Reactivos y biológicos**

Solución tamponada PBS, pH 7.2, sin Ca^{2+} y Mg^{2+}, almacenada a 4°C;

Tripsina con etilen diamino tetra acético (EDTA);

Acetona de alto grado al 80% (diluida con agua desionizada), almacenada a 4°C;

Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + 10% de FCS inactivado por calor;

Conjugado antirrábico con FITC;

Células: BHK-21 C13 (ATCC CCL-10);

Virus: Cepa CVS-11 (ATCC VR 959), la cual está disponible en el ATCC o en el laboratorio de referencia de la OIE para la rabia, Nancy, Francia. Los frascos se almacenan a -80°C;

Inmunoglobulina antirrábica (humana) estandarizada de la OMS No. 2, 30 UI por ampolleta (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, United Kingdom) (reconstituido con 5 ml de agua estéril desionizada o destilada, almacenados a -20°C, y diluidos a 0.5 UI/ml con agua desionizada antes de usarse), o preferentemente suero estándar de la OIE de origen canino (Laboratorio de Referencia de rabia, Nancy, Francia de la OIE almacenado a -20°C y diluido a 0.5 UI/ml con agua desionizada estéril o agua destilada según al título del lote). Es aconsejable que para el control interno rutinario, los laboratorios utilicen un suero positivo o un conjunto de sueros de origen canino que se hayan sido calibrados con el Suero Estándar Internacional de la OIE;

Suero control: Conjunto de diez sueros caninos liofilizados, se almacena a 4°C, y se reconstituye con 0.5 ml de agua estéril desionizada o de agua destilada.

- **Producción de CVS (Challenge Virus Standar)**

i) ***Cultivo celular:*** Las células BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) son usadas para producir el virus CVS (ATCC VR 959 CVS-11) se tripsinizan durante la fase rápida de crecimiento, es decir, cuando las células están en fase exponencial de crecimiento. Si la confluencia de la capa es completa, un nuevo pasaje debe hecerse. Las células en suspensión no deben agregarse; se usan 2 x 10^7 células por cada frasco de cultivo de 75 cm^2. Se colectan las células con un volumen de 20 a 30 ml de medio de cultivo con 10% de FCS inactivado por calor.

ii) ***Infección de las células:*** La multiplicidad de infección (número de partículas infecciosas por célula) es ajustada entre 0.1 y 0.5. La botella de cristal que contiene la suspensión de virus/células es incubada por 60 minutos a 35.5 y 37°C. El contenido de la botella se agita suavemente cada 10 a 15 minutos.

iii) ***Crecimiento del virus:*** La suspensión de virus/células centrifugada a 800 g por 15 minutos y el precipitado se resuspende en el medio de cultivo mezclado con 10% de FCS inactivado por calor. El virus es cosechado 2 días después.

iv) ***Cosecha y almacenaje:*** El sobrenadante es centrifugado a 800 g por 15 minutos a 4°C. Si se han utilizado varios frascos, los diversos sobrenadantes centrifugados son mezclados y después repartidos en alícuotas y se congelan a -80°C. El título infectivo de la cosecha se establece por lo menos 3 días después de la congelación.

- **Titulación del virus en TCID50 (Dosis infectiva del 50% en cultivo de tejidos)**

Este método de titulación utiliza células BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) en placas del microtitulación.

Diversos pasos en este procedimiento pueden ser adaptados según los requisitos de seguridad y a las prácticas de funcionamiento del laboratorio, pero lo siguiente no debe ser cambiado:

- Inoculación de una capa de células de 24 horas,
- Dilusiones decimales preparadas con 0.9 ml de diluyente y 0.1 ml de suspensión del virus,
- seis réplicas de 50 µl por dilusión,
- Incubación por 72 horas,
- lectura cualitativa (es decir si el pozo es positivo o negativo),
- En cada sesión de titulación, se titula un vial de un lote control de virus y este título es integrado en una tarjeta control para validar el proceso de titulación,
- El cálculo por el método gráfico del neoprobit o por el método de Spearman-Kärber.

i) ***Suspensión celular:*** El día anterior a la titulación, se prepara una suspensión de células que contengan 10^5 células/ml en medio de cultivo celular que contenga 10% de FCS inactivado por calor y es distribuida

en la placa de microtitulación de 96 pozos, con 200 µl por pozo. Las placas son después incubadas por 24 horas a 35.5° C - 37°C con 5% de CO^2.

ii) ***Dilusión del virus:*** Las dilusiones seriadas son realizadas en tubos de 5 ml usando un medio de cultivo celular sin FCS como diluyente. Se preparan dilusiones de 10^{-1} a 10^{-12} (0.9 ml de diluyente con 0.1 ml de la dilusión anterior).

iii) ***Infección de las células:*** El medio de las placas del microtitulación es desechado usando un sistema de aspirado. Se distribuye en cada pozo 50 µl de cada dilusión de virus. Se usan seis réplicas por cada dilusión. La placa de microtitulación es después incubada por 1 hora a 35.5 - 37°C con 5% de CO^2. Después se añaden 200 µl de medio de cultivo con 5% de FCS.

iv) ***Incubación:*** Incubar por 3 días a 35.5 - 37°C en 5% de CO^2

v) ***La tinción y cálculo del título:*** Se tiñen las células usando inmunofluorescencia, como se detalla a continuación. La lectura es cualitativa, cada pozo que muestre fluorescencia específica es considerado como positivo. El cálculo del título se hace usando:

- El método gráfico de neoprobit (2) o,
- La fórmula de Spearman-Kärber:

$\log_{10}$ (dilución a punto final) = $\left(x0 - \frac{d}{2} + d\sum \frac{ri}{ni}\right)$

x0 = (($\log_{10}$ de la dilución más baja con todos los pozos positivos)

d = log10 del paso de la dilución, uno en este caso

ni = número de réplicas, seis en este caso

ri = número de pozos positivos

Fig. 1. Utilización propuesta de las microplacas para la prueba de neutralización del virus por anticuerpos fluorescentes. Los pozos a los cuales se les debe añadir sueros sin diluirse llenan con los "50 µl" indicados. Los pozos a los que se les debe añadir 50 µl de dilución de virus estandar de desafío se muestran en sombeado. Las diluciones se expresan en $\log_{10}$.

Plate 1: Controls

	H	G	F	E	D	C	B	A		
Challenge virus standard titration									1	
									2	
									3	
									4	
WHO or OIE standard serum (0.5 IU/ml)	50 µl					50 µl			5	Naive dog serum (negative)
	50 µl					50 µl			6	
	50 µl					50 µl			7	
	50 µl					50 µl			8	
	50 µl								9	
Internal positive control	50 µl								10	
	50 µl								11	
	50 µl								12	
log (dilution)	0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	2.87	3.35	Cells		

Plate 2: Sera to be tested

log dilution		0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	4.23	0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	4.23	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Serum 1	A	50 µl						50 µl						Serum 3
	B	50 µl						50 µl						
	C	50 µl						50 µl						
	D	50 µl						50 µl						
Serum 2	E	50 µl						50 µl						Serum 4
	F	50 µl						50 µl						
	G	50 µl						50 µl						
	H	50 µl						50 µl						

- **Procedimiento de la Prueba**

i) Las microplacas son usan según el modelo indicado en la figura 1. La placa No. 1 se usa para la titulación de CVS (filas 1 a la 4), y para los controles se emplean los sueros caninos control. La placa No. 2 y las siguientes se usan para los sueros que se van a probar.

ii) El medio se agrega a los pozos como sigue: placa 1, filas 1 a la 4 y pozos A9 a A12: agregue 150 µl por pozo; placa 2 y siguientes, filas 6 y 12: agregue 200 µl por pozo; el resto de los pozos: agregue 100 µl.

iii) Los sueros a probarse son inactivados por calor durante 30 minutos a 56°C. Como se indica en la figura 1, se agregan 50 µl de cada suero sin diluido a los cuatro pozos adyacentes.

iv) Las dilusiones de sueros se lleva a cabo en las microplacas de la siguiente manera:

El suero de la OIE, el suero de OMS, el control interno y el suero canino control: con una pipeta multicanal de 50-200 µl, mezcle los primeros pozos de la dilusión succionando dentro y fuera por lo menos ocho veces, transfiera 50 µl de una fila a la siguiente, hasta alcanzar la última. Descarte 50 µl de la última fila.

Los sueros problemas (todas las placas): como se señaló antes, transfiera sucesivamente 50 µl de una fila a la siguiente hasta las filas 5 y 11 (dil. $10^{-2.39}$). Con una pipeta multicanal transfiera de 5 a 50 µl, transfiera 10 µl de las filas 5 y 11 a las filas 6 y 12 respectivamente (de dil. $10^{-2.39}$ a dil. $10^{-4.23}$). Usando una pipeta multicanal ajustada a 100 µl, mezcle las filas 6 y 12 y deseche 180 µl. Después agregue a estas filas 70 µl de medio. Este paso final no lleva por sí mismo a mayor rendimiento de la prueba. Para lograr o superar la dilución final recomendada pueden usarse procedimientos alternativos. Esto puede requerir modificaciones en la distribución de la placa.

- **Adición del Virus Estándar de Desafío (CVS)**

i) El stock de CVS es guardado en microtubos de 1 ml a -80°C. Un tubo se descongelada rápidamente bajo el chorro de agua corriente y se coloca en hielo.

ii) Se prepara una dilusión de este tubo para obtener 100 $TCID_{50}$ en 50 µl. De esta dilusión se agregan 50 µl de suero a cada pozo (véase la figura 1). Para la titulación del virus se añaden 50 µl a los pozos H1 a H4 (placa 1). Después, transfiera 50 µl de una fila a la otra fila (placa 1, líneas 1-4). Deseche los 50 µl de la última fila (placa 1, pozos A1 a A4). No agregue ningún virus a los pozos A9 a A12 de la placa 1 (controles).

iii) Incube las microplacas a 37°C en una incubadora húmeda con 5% de CO_2 por 1 hora.

iv) *Adición de células:* Tripsinizar un cultivo subconfluente de células BHK-21 de 3 días de edad. Resuspenda las células para obtener una suspensión de 4 x 10^5 células/ml en DMEM suplementada con 10% de FCS e inactivada por calor Agregue 50 µl de la suspensión de células a cada pozo.

v) Incube las microplacas por 48 horas a 37°C en una incubadora húmeda con 5% de CO_2.

- **Fijación y tinción**

i) Después de 48 horas del período de incubación, el medio es desechado y las microplacas se lavan una vez con PBS, pH 7.2, y una vez en acetona al 80%. Las microplacas son después fijadas en acetona al 80% a temperatura ambiente por 30 minutos (sin tapa) y se secan a temperatura ambiente por lo menos 1 hora.

ii) Agregue a cada pozo 50 µl de la dilución de trabajo del conjugado antirrábico con FITC, suavemente agite las microplacas e incúbelas a 37°C por 30 minutos. Deseche el conjugado fluorescente y lave las microplacas un par de veces con PBS. El exceso de PBS es retirado invirtiendo las microplacas en papel absorbente.

- Lectura e interpretación de resultados

i) Se observa la superficie total de cada pozo. La lectura de evaluación es cualitativa (más o menos): si no hay fluorescencia en las células se asigna un signo (–) para el pozo (registro negativo); si existe fluorescencia en las células (una célula o más), se asigna un (+) al pozo (registro positivo).

ii) Se leen primero los controles. Para las células control, la titulación de CVS, el suero control y los sueros estándares (Suero estándar de la OMS y/o suero estándar de la OIE), los títulos son calculados acorde al método gráfico de neoprobit (2) o el método de Spearman-Kärber.

iii) Los resultados de la titulación de CVS ($TCID_{50}$), del suero control (D_{50} [dosis media]) y del positivo estándar (D_{50}) se reportan en una tarjeta de control para cada caso. Los resultados de control de la prueba actual se compara con los resultados de las pruebas control de pruebas anteriores usando el mismo lote de control. La prueba se valida si los valores obtenidos para los tres controles en la prueba actual no son estadísticamente diferentes de la media de todos los valores obtenidos en las pruebas anteriores según esta técnica.

iv) El resultado de la prueba corresponde al virus no neutralizado después de la incubación con el suero de referencia o con el suero problema. Estos títulos son calculados con el método gráfico neoprobit (2) o con la fórmula de Spearman-Kärber (37). La comparación del título medido en los sueros probados con el del suero positivo estándar de título neutralizante conocido permite determinar el título neutralizante de los sueros problema en UI/ml.

b) La Prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes (RFFIT) para determinar la neutralización del virus de la rabia por anticuerpos (rabies virus-neutralising antibody) (Prueba prescrita para comercio internacional)

- **Procedimiento estandarizado (por OMS Laboratory Techniques in Rabies, 1996; [ref. 37])**

- Preparación de la suspension de virus de inóculo

i) Tripsinizar un cultivo de células de neuroblastoma de ratón (MNA) de 3 días de edad en un frasco de 150 ml (disponible Rabies Laboratory, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centres for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA). Estas células prefieren un medio ácido suplementado con vitaminas (34). Puede obtenerse una línea celular similar (CCL-131) por petición del ATCC.

ii) Resuspender 3 x 10^7 de células en un tubo cónico de centrífuga de 50 ml en 2.7 ml de medio mínimo esencial de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino (EMEM-10).

iii) Utilizando procedimientos estándares de seguridad contra la rabia, agrege 1 x 10^7 unidades infecciosas del virus de la rabia CVS-11 (ATCC, VR959) y mezcle con el vórtex una vez. Incube las células y el virus por 15 minutos a 37°C; someter una vez más las células al vórtex.

iv) Agregue 10 ml EMEM-10, mezclar con vórtex y centrifuge las células a 500 *g* por 10 minutos.

v) Deseche el sobrenadante. Resuspenda las células en 30 ml de medio de cultivo y transfiéralas a un frasco de 150 ml.

vi) Agite suavemente el frasco para mezclar la suspensión de células y después preparare tres portaobjetos con cámara para cultivo de tejidos con 8 pozos, midiendo con una pipeta 0.2 ml de la suspensión celular en un pozo de cada portaobjetos.

vii) Incube el frasco y los portaobjetos a 37°C en una incubadora humedecida con 0.5% de CO_2. El frasco debe incubarse como un cultivo cerrado (apretar la tapa).

viii) A las 20, 40 y 64 horas después de la infección, fije con acetona y tiña un portaobjetos usando por la técnica de inmunofluorescencia (23) para determinar la infecciosidad del virus. El sobrenadante debe ser cosechado 24 horas después de que las células alcanzan 100% de infecciosidad (típicamente 40 horas después de la infección).

ix) Transfiera el sobrenadante a un tubo de centrifugadora de 50 ml y centrifuge a 4000 *g* por 10 minutos.

x) Distribuya el sobrenadante en alícuotas de 0.5 ml y almacénelas a -70°C.

- Titulación de la suspensión viral de inóculo

i) Descongele una alícuota del virus inóculo y prepare diluciones decimales (a partir la 10^{-1} a 10^{-8}) en EMEM-10.

ii) Distribuya 0.1 ml de cada dilusión del virus en un pozo del portaobjetos con cámara para cultivo de tejidos. Agregue a cada pozo 0.2 ml de células MNA suspendidas en EMEM-10 (la concentración de las células 5 x 10^4 por 0.2 ml).

iii) Mezcle las células y el virus oscilando suavemente el portaobjetos, después incubese a 37°C en una incubadora humedecida con 0.5% de CO_2 por 40 horas.

iv) Fije con acetona y tiña el portaobjetos por la técnica de inmunofluorescencia. La evidencia de la infección del virus debe observarse en la dilución del virus 10^{-6}, indicando una existencia de virus de al menos 1 x 10^6 unidades infecciosas por 0.1 ml. Prepare suficiente virus inóculo para que no sea necesario frecuentes pasajes seriados del virus.

- Preparación de la suspension de virus stock

i) Infecte 3 x 10^7 de células de MNA con 1 x 10^7 unidades infecciosas de la preparación del virus inóculo (véase arriba).

ii) Coseche el sobrenadante 24 horas después de que las células alcancen el 100% de infecciosidad (típicamente 40 horas después de la infección).

iii) Distribuya el sobrenadante en alícuotas de 0.5 ml y almacénelo a -70°C.

- Titulación de la suspensión viral stock

i) Descongele una alícuota del virus inóculo y utilice esto para preparar dilusiones decimales (de 10^{-1} a 10^{-6}) en EMEM-10.

ii) Distribuya 0.1 ml de cada dilusión del virus en un pozo de un portaobjeto con cámara para cultivo de tejidos con ocho pozos. Agregue a cada pozo 0.2 ml de células MNA suspendidas en EMEM-10 (la concentración de células 1 x 10^5 por 0.2 ml).

iii) Mezcle las células y la suspensión del virus agitando suavemente el portaobjetos, entonces incube a 37°C en una incubadora humedecida con 0.5% CO_2 por 20 horas.

iv) Fije con acetona y tiña el portaobjetos por la técnica de inmunofluorescencia.

Cada pozo del portaobjeto con cámara para cultivo de tejidos con ocho pozos contiene 25-50 campos microscópicos distintos cuando se observa en la ampliación x160-200. Una unidad de virus para el RFFIT es determinada como la dilusión en la cual el 50% de los campos microscópicos observados contienen unos o más focos de células infectadas (la dosis de foco-formación, FFD50). La suspensión stock de virus debe contener al menos 1 x 10^4 FFD50 por 0.1 ml (es decir el pozo de células infectadas con la dilución 10^{-4} debe contener al menos un foco de células infectadas en 50% de los campos microscópicos observados). Una suspensión stock de virus con este título puede después diluirse a $10^{-2.3}$ para obtener un virus de desafío 50 FFD_{50}.

- **Suero de Referencia**

Debe incluirse un suero de referencia estándar nacional o internacional diluido a una potencia de 2.0 UI/ml en cada prueba. El suero de referencia usado en los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, es el primer estándar internacional de inmunoglobulina antirrábica (35), y puede obtenerse del NIBSC. El suero de referencia debe mantenerse en alícuotas congeladas en cantidades suficientes para 1 semana de pruebas. También debe prepararse por el laboratorio e incluirse en cada prueba un suero positivo estándar de control diluido a una potencia de 0.1 UI/ml y un suero negativo estándar.

- **Sueros problema**

Antes de probarse, las muestras del suero deben calentarse a 56°C por 30 minutos para inactivar el complemento. Si el suero está congelado, éste debe recalentarse después de descongelarse. Las dilusiones seriadas de los sueros problema pueden ser preparadas en un portaobjetos con cámara para cultivo de tejidos de ocho pozos. El análisis de las diluciones 1/5 y 1/50 es suficiente para una evaluación rutinaria de eficacia vacunal y pueden hacerse como sigue:

i) Prepare una dilución 1/2.5 agregando 0.1 ml de suero inactivado y 0.15 ml de EMEM-10 a uno de los portaobjetos. Mezcle suavemente oscilando la lámina portaobjetos.

ii) Transfiera 0.05 ml de la dilución 1/2.5 a un segundo pozo conteniendo 0.45 ml de EMEM-10. Deseche todos excepto 0.1 ml del pozo que contiene la dilución 1/2.5.

iii) Mezcle el segundo pozo y deseche todo excepto 0.1 ml.

iv) Agregue 0.1 ml de la preparación del virus del desafío (que contiene 32-100 FFD_{50}) a todas las diluciones del suero.

v) Mezcle e incube a 35° C en una incubadora humedecida con 0.5% CO_2 por 90 minutos.

- Adición de células

i) Durante el período de incubación, tripsinice un cultivo de células MNA de 3-5-días.

ii) Resuspenda las células en EMEM-10 a una concentración final de 1 x 10^5 células por 0.2 ml.

iii) Distribuya 0.2 ml de la suspensión de células en cada pozo del portaobjetos e incube a 35°C en una incubadora humedecida con 0.5% CO_2 por 20 horas más.

- Fijación con acetona y tinción por inmunofluorescencia

i) Después de 20 horas, saque los portaobjetos de la incubadora y deseche el medio virtiéndolo sobre una solución virucida.

ii) Lave los portaobjetos una vez en PBS y después fíjelas por 10 minutos a temperatura ambiente en acetona fría (- 20°C).

iii) Deje secar los portaobjetos por 10 minutos antes de agregar el suero de conjugado antirrábico con FITC. El conjugado puede ser preparado en EMEM-10 o PBS; no hay necesidad de adsorber el conjugado con papel o células. La dilusión del conjugado debe determinarse por titulación. Los portaobjetos deben teñirse durante 20-30 minutos a 37° C y después lavar con PBS y agua destilada, respectivamente.

iv) Observe los portaobjetos en un microscopio de fluorescencia.

- Cálculo de los títulos de virus neutralizado por anticuerpos

El virus residual es detectado usando un microscopio estándar de fluorescencia. El título de neutralización a punto final del suero se define como el factor de dilución de la dilución más alta del suero en la cual el 50% de los campos microscópicos observados contienen una o más células infectadas (es decir una reducción del 97% del virus inoculado). Este valor puede obtenerse por interpolación matemática. Alternativamente, un 100% de título neutralizado puede ser determinado registrando la dilución más alta del suero en la cual el 100% del inóculo del desafío se neutraliza y no hay células infectadas en los campos observados. Por ambos métodos de titulación, el título de anticuerpos en el suero problema (en UI/ml) puede ser obtenido por la comparación con el título de la referencia nacional incluida en cada prueba. Debe observarse que es también válido realizar la prueba RFFIT usando las células BHK-21 en vez de las células del neuroblastoma. Para tal fin se ha publicado un protocolo modificado (37).

c) Neutralización viral en ratones

El principio de esta prueba es la neutralización *in vitro* de una cantidad constante de virus rábico (50 LD_{50} [dosis letal al 50%] por 0.03 ml de cepa CVS) variando las cantidades del suero a ser titulado durante un paso de incubación de 90 minutos a 37°C. La mezcla de virus/suero (0.03 ml) es inoculado en el cerebro de ratones de 3 semanas de edad. El título del suero es la dilución final del suero en la mezcla del virus/suero que protege al 50% de los ratones (la mortalidad es 100% en ausencia de neutralización). Este título puede expresarse en UI comparándolo con la dilución que neutralizante de un suero estándar bajo mismas condiciones experimentales.

Para realizar la prueba, descongele una ampolleta de virus de CVS y prepare una suspensión que contenga 100 LD_{50}/0.03 ml (considere que será diluida dos veces por la adición del mismo volumen del suero antes de ser inyectado). La cantidad de virus usada realmente durante la prueba (límites permitidos: 30-300 LD_{50}/0.03 ml) es comprobado titulando cuatro diluciones de la preparación viral, cada una de las cuales se inocularán en cinco ratones. Los sueros de prueba se calientan a 56°C por 30 minutos para inactivar cualquier complemento.

Se debe incluir un suero estándar para comprobar las condiciones de titulación. La diferencia máxima permitida entre su capacidad neutralizante esperada y la medida durante la titulación es $10^{0.5}$. La dilución más grande no debe neutralizar el virus. El diluyente es el mismo que se usa para la preparación viral.

A cada dilución de suero se agrega un volumen igual de la preparación viral conteniendo 100 LD_{50}/0.03 ml. Las mezclas se incuban en un baño de agua a 37°C por 90 minutos y después se colocan en hielo para reducir la inactivación del virus debido a la temperatura. La reacción es detenida por la inmersión en hielo. Durante la inoculación, los tubos que no se utilizan inmediatamente se guardan en 4°C.

Para cada dilución, se inoculan cinco ratones intracerebralmente con 0.03 ml de la mezcla del suero/virus. La mortalidad es registrada durante 21 días después de la inoculación, aunque las muertes que ocurren durante los primeros 4 días son observadas como inespecíficas (debido al choque, a la infección, etc.). El título de suero puede ser calculado en UI por la comparación con un suero estándar internacional.

d) Enzimoinmunoensayo ELISA

Esta prueba de ELISA indirecta permite la detección cualitativa de los anticuerpos de rabia en muestras individuales de suero canino y de gato después de la vacunación. De acuerdo con las recomendaciones de la OMS (36), 0.5 UI por ml de anticuerpos antirrábicos es la medida mínima de título de anticuerpos considerado para representar un nivel de inmunidad que correlaciona con la capacidad de proteger contra una infección de la rabia. Aunque la ELISA indirecta tiene una sensibilidad más baja que el FAVN o el RFFIT, puede utilizarse como prueba de investigación rápida (aproximadamente 4 horas), y que no requiere el manejo del virus vivo de la rabia, para determinar si los perros y los gatos vacunados han seroconvertido. Debido a la baja sensibilidad de la prueba, los resultados negativos deben confirmarse por FAVN o RFFIT.

La reacción está compuesta por tres pasos:

1. Cada muestra de sueros problema es colocada en un pozo de una placa de microtítulo cubierta primero con los antígenos inactivados del virus de la rabia. Los anticuerpos presentes en la muestra se unen a los antígenos virales en la superficie del plástico.

2. Después del lavado, se agrega el conjugado de la proteína A/peroxidase, éste se une a las inmunoglobulinas (anticuerpos) previamente capturadas, formando un complejo: (antígeno de la rabia AG)-(anticuerpo antirrábico Ab)-(proteína A/peroxidasa).

3. El exceso de conjugado es eliminado por lavado. La enzima unida al complejo es revelada por la adición de un substrato que se transforma en un producto coloreado. Después de detener la reacción, se miden las densidades ópticas.

- **Preparación del antígeno**

La Cepa de virus rábico G5, 52 Wistar (derivada de la cepa Pasteur) se obtiene en células NIL2 con pocos pasajes, originadas en cultivos celulares de embrión del hámster. La cosecha del virus es clarificado para eliminar restos celulares por filtración en gel y la suspensión del virus se inactiva con betapropiolactone. Para la reacción en placas se utiliza un stock de antígeno de 4.1 µg/ml.

- **Reactivos**

(Available from Synbiotics Europe S.A.S., 2 rue Alexander Fleming, 69367 Lyon Cedex 07, France.)

Microplaca con seis filas de 16 pozos sensibilizados con antígenos de la rabia. Se deben usar en las 4 semanas después de abrir la bolsa, la cual debe estar cerrada después de cada uso;

Conjugado (CJ): Proteína A/peroxidasa (concentrado x 10). Diluir diez veces con el diluyente del conjugado (CD) y utilizarlas en el plazo de 24 horas seguidas a la dilución;

Sustrato de peroxidasa tamponado (PS); 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina;

Suero control negativo (N), Suero Libre de Patógenos Específicos diluidos en Stabilzyme, un estabilizador comercial proporcionado por Surmodics Inc., MN 55344-3523 USA;

Suero control positivo (P), Suero hiperinmune de caninos vacunados diluidos en Stabilzyme, un estabilizador comercial proporcionado por Surmodics Inc., MN 55344-3523 USA;

Diluente de la muestra (SD), PBS tamponado, pH 7.8, incluyendo 0.28% de caseina (peso/volumen), (volumen/volumen) Tritón X100 al 0.055%;

PEG al 0.55% (peso/volumen) SDS al 0.056% (peso/volumen) PVP al 1% (peso/volumen), Tetronic al 0.42% (peso/volumen) y Suero bovino inactivado por calor al 1% (volumen/volumen);

Solución de lavado (W), Tris/NaCl tamponado, pH 7.5, incluyendo Tween 20 al 1%;

Diluente del conjugado (CD), Tris tamponado, pH 8;

Solución de detención (S), Solución de Acido Sulfúrico 4 N + tiomersal al 0.02% (w/v).

Los reactivos diluidos deben ser almacenados a 5°C ± 3°C. Coloque todos los reactivos a temperatura del laboratorio por lo menos 1 hora antes de usarse.

- Muestras

La reacción se realiza con sueros individuales inactivados por calor (30 minutos a 56°C) diluidos a 1/100. Es necesario probar las diluciones apropiadas del suero estándar de referencia de la OIE que contiene 6.7 UI/ml (disponible en el laboratorio de referencia de la OIE para rabia, Nancy, Francia.

Las muestras de suero deben mantenerse a 5°C ± 3°C. Para conservación prolongada, las muestras de suero deberán congelarse a -20°C.

- Pasos preliminares de predilución

Seguir estrictamente el procedimiento indicado a continuación. Utilizar controles negativos y positivos por duplicado en cada prueba y/o para cada placa.

i) Fijar cuidadosamente la identificación y distribución de los controles y las muestras utilizando el protocolo que se señala más abajo.

ii) Prepare los sueros problema. Las diluciones se realizan con el diluyente de muestras (SD) de modo siguiente: Las muestras primero se prediluyen a 1/10 en una microplaca en blanco (10 µl de muestra en 90 µl de SD).

iii) Para la titulación del suero, debe hacerse un conjunto de seis diluciones del Suero Estándar de la OIE en un tubo o en una microplaca en blanco con la dilución inicial 1/10, luego 1/30, 1/100, 1/300, 1/1000 hasta la dilución final 1/3000. Estas diluciones del suero Estándar ede la OIE deben incluirse en cada prueba y/o microplaca con una dilución inicial de 1/10, 1/30, 1/100, 1/300, 1/1000 y 1/3000.

Se recomienda el siguiente esquema para preparar las diluciones apropiadas:

Dilución OIE	**Preparación**
1/10	10 µl de Suero Estándar Internacional de la OIE + 90 µl de diluyente de la muestra
1/30	10 µl de Suero Estándar Internacional de la OIE + 290 µl de diluyente de la muestra
1/100	10 µl de la dilución 1/10 + 90 µl de diluyente de la muestra
1/300	10 µl de la dilución 1/30 + 90 µl de diluyente de la muestra
1/1000	10 µl de la dilución 1/100 + 90 µl de diluyente de la muestra
1/3000	10 µl de la dilución 1/300 + 90 µl de diluyente de la muestra

Este rango de diluciones del Suero Estándar de la OIE debe estar presente en todas las placas.

- **Procedimiento de la prueba**

i) Distribución del control: Deposite 90 µl de diluente de muestra y añada 10 µl del control negativo en los pozos A1 y A2, y en los pozos B1 y B2. Añada 10 µl del control positivo.

ii) Distribución de muestras y diluciones del suero estándar de la OIE: Deposite 90 µl de diluyente muestra, añada 10 µl de la predilución de la muestra 1/10 o de cada una de las diluciones de 1/10 a 1/3000 en todos los pozos y mezcle cuidadosamente.

Las diluciones de la muestra y del suero estándar de la OIE deben probarse por duplicado. Se recomienda la siguiente distribución (reporte final de las diluciones probadas):

Cuantificación de anticuerpos (dilución final)

	1	2	3	4
A	N 1/10	N 1/10	S1 1/100	S1 1/100
B	P 1/10	P 1/10	S2 1/100	S2 1/100
C	OIE 1/100	OIE 1/100	S3 1/100	S3 1/100
D	OIE 1/300	OIE 1/300	S4 1/100	S4 1/100
E	OIE 1/1000	OIE 1/1000	S5 1/100	S5 1/100
F	OIE 1/3000	OIE 1/3000	S6 1/100	S6 1/100

G	OIE 1/10000	OIE 1/10000	S7 1/100	S7 1/100
H	OIE 1/30000	OIE 1/30000	S8 1/100	S8 1/100

Deben colocarse siempre las filas marcadas sobre el soporte de modo que se pueda utilizar tanto el lavador como el lector. Los pozos se cubren con cinta adhesiva cortada a la longitud necesaria en función del número de filas utilizadas. Mezclar por agitación manual suave o mediante un agitador de placas.

iii) Incubar las placas de microtitulación durante 1 hora ± 5 minutos a 37°C ± 3°C.

iv) Dilución del reactivo:

Lavado Tampón: Diluir la solución de lavado concentrada (W) a 1/10 con agua destilada o desmineralizada.

Conjugado: Diluir el concentrado (CJ) a 1/10 con el diluyente del conjugado (CD); se necesitan 2 ml para una fila, es decir 20 µl de CJ en 1.88 ml de CD.

v) Con cuidado remueva la cinta adhesiva y lave cuatro veces.

vi) Añada 100 µl de conjugado diluido a todos los pozos y cúbralos con una tira nueva de cinta adhesiva.

vii) Incube el conjugado por 1 hora ± 5 minutos a 37°C ± 3°C.

viii) Con cuidado remueva la cinta adhesiva y lave cuatro veces.

ix) Añada 100 µl de sustrato de peroxidasa tamponado a cada pozo (PS). No cubra con cinta adhesiva en esta fase. Mezcle suavemente la placa por agitación manual o mediante un agitador de placas para asegurar una correcta homogeinización.

x) Incube por 30 ± 5 minutos a temperatura del laboratorio (20°C ± 5°C), y protegida de la luz.

xi) Añada a cada pozo 50 µl de solución de parade (S). Mezcle suavemente la placa por agitación manual o mediante un agitador de placas. Asegúrese que no haya burbujas de los pozos. Seque cuidadosamente el fondo de los pozos.

xii) Mida la densidad óptica (OD) bicromáticamente a 450 y 630 nm o monocromáticamente a 450 nm (en el espectro amarillo).

- **Cuantificación de anticuerpos: Expresión e Interpretación de resultados**

Cálculo del título usando la curva de regresión

i) Calcular el valor medio de la OD para cada muestra problema y cada dilución del suero de la OIE.

ii) Calcular el valor del logaritmo natural (*ln*) de cada OD media y el valor ln de la concentración de anticuerpos rábicos para cada dilución de la OIE (a partir 6.7 a 0.0223 UI/ml, sin considerar el factor de dilución 1/100 de la prueba).

iii) Trace el *ln* de la (OD) (en ordenadas eje Y) en función del *ln* (concentración de anticuerpos antirrábicos) (en abcisas eje X) para obtener la curva de referencia para el suero estándar de la OIE.

iv) Utilizando todos los resultados individuales obtenidos de las diluciones estándar del suero de la OIE, realice una regresión lineal entre las concentraciones *ln* de la concentración de anticuerpos antirrábicos (expresadas en unidades ELISA/ml) y el *ln* de la (OD), para establecer el correspondiente modelo matemático:

ln de la concentración de anticuerpos antirrábicos = a + b x *ln* OD

v) Para cada muestra probada, calcule el valor promedio de la OD y después la concentración de anticuerpos antirrábicos de la muestra expresada como "unidades equivalentes por ml" (EU/ml), a partir del modelo establecido:

Concentración de anticuerpos antirrábicos de la muestra (EU/ml) = $e^{(a + b \times ln\ OD)}$

- **Validación de la Prueba.**

Los resultados de cada prueba corrida (o para cada placa) son válidos:

- Si la densida óptica obtenida con el control positivo (OD P) es mayor que o igual a 0.300, y
- Si la densidad óptica obtenida con el control negativo (OD N) es menor que 0.50 x OD P.
- El coeficiente de correlación entre *ln* ODs y *ln* la concentración de anticuerpos antirrábicos para el suero estándar de la OIE Standard Serum es mayor que 0.95.

Ejemplos.

	Control positivo:			—
	OD pozo B_1 = 0.610	OD pozo B_2 = 0.690	–>	OD P = 0.650
	Control negativo:			—
	OD pozo A_1 = 0.190	OD pozo A_2 = 0.210	–>	OD N = 0.200
				—
Muestra 1:				
	OD pozo 1 = 1.790	OD pozo 2 = 1.750	–>	OD = 1.770
Muestra 2:	OD pozo 1 = 0.350	OD pozo 2 = 0.390	–>	OD = 0.370

Validación de la prueba

OD P = 0.650 > 0.300 and OD N = 0.200 < 0.50 x 0.650 = 0.325, de esta forma la prueba es válida.

- **Resultados e interpretación (Titulación cuantitativa de anticuerpos).**

Si el título calculado es $\geq$ 0.6, se considera que el animal presenta sero-conversión después de la vacunación.

Si el título calculado es < 0.6, se considera que el animal no presenta un nivel suficiente de anticuerpos. Como la prueba de ELISA es una prueba de ensayo, una prueba confirmatoria por FAVN o RFFIT deberá realizarse en las muestras de suero que muestren un título < 0.6.

C. Requerimiento para las Vacunas y los materiales de Diagnóstico

Las vacunas antirrábicas preparadas de la cepa original 1885 de Pasteur y sus cepas derivadas (virus Pasteur, virus de desafío estándar (Challenge), Ptman-Moore, entre otras) y de las cepas aisladas recientemente (Flury, Street Alabama Duffering [SAD], Vnukovo y Kelev), protegen contra todas las cepas del genotipo 1 aisladas hasta la fecha. Las vacunas convencionales contra el virus de la rabia pueden no suministrar una adecuada protección cruzada contra otros Lyssavirus; no existe protección contra el virus Mogola (31). Los principios que rigen la preparación de vacunas inactivadas contra la rabia son idénticos para las que se usan en humanos o en animales, aunque en las vacunas para uso en animales se puede añadir un adyuvante.

En los animales, las vacunas vivas también son eficaces por rita oral y se pueden distribuir en cebos para inmunizar animales salvajes (o domésticos). También resultan eficaces las vacunas vivas recombinantes (por ejemplo, glicoproteína recombinante del virus de la rabia expresada en poxvirus) (25).

Las normas para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo I. 1.7. Principios de producción de vacunas veterinarias. Las directrices dadas aquí y en el Capítulo I.1.7. son de carácter general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

Se aplican diferentes estándares a las vacunas veterinarias con virus vivos modificados por pases en animales, huevos o cultivos celulares, para reducir su virulencia en el animal, que a las vacunas preparadas con virus inactivados. Ambos tipos de vacunas tienen sus ventajas e inconvenientes (5), pero los dos tipos pueden utilizarse para inmunizar animales por periodos de entre 1 y 3 años. En algunos países no se aceptan las vacunas con virus atenuados. No son adecuados para proteger animales no vacunados previamente que se hayan expuesto a la infección (13). La eficacia de un tratamiento con vacuna sola después de la exposición solamente se ha demostrado en humanos, pero incluso en estos casos se recomienda administrar adicionalmente inmunoglobulina antirrábica.

Toda manipulación del virus durante la producción y ensayo de las vacunas debe adaptarse a las estrictas precauciones de seguridad especificadas por la OMS (36, 37), la OIE (Capítulo I.1.6) y las directrices y normas nacionales.

1. Control de los inóculos.

a) Característica del inóculo.

Cualquier cepa perteneciente a la cepa del serotipo 1 que demuestre proteger contra los virus naturales de la rabia (que se encuentren actualmente en el país donde se va a usar la vacuna). La cepa de virus utilizada debe tener propiedades biológicas (patogenicidad) y antigénicas (caracterizadas por anticuerpos monoclonales) conocidas. Si es empleada como vacuna viva, el inóculo primario de virus no debe causar rabia clínica. Deben probarse al menos en dos animales (preferentemente cinco o seis por grupo) de cada una de las especies a las que va dirigida la vacuna y si fuera possible de cualquier especie que pueda estar en contacto con la vacuna o con animales vacunados. Esto se realiza inoculando en un nervio importante o en sus inmediaciones una dosis diez veces superior al título vírico contenido en una dosis del producto final propuesto. Los animales deben observarse por lo menos durante 90 días para cualquier efecto que se pueda atribuir al inóculo primario.

b) Método de cultivo.

Debe prepararse y mantenerse a -70°C, o a temperatura inferior, un stock de células primarias del virus de inóculo, cuyos subcultivos se utilizarán para la producción de vacuna. La multiplicación del virus se comprueba por titulación durante el crecimiento del virus de inóculo.

c) Validación como vacuna.

Antes que una vacuna sea autorizada, deben establecerse evidencias de su eficacia mediante inoculaciones de desafío en los animales vacunados y en animales control de cada especie determinada. La prueba de desafío debe realizarse después de la vacunción, al final del periodo en que el fabricante manifiesta que se mantiene la inmunidad. La cinética de producción de anticuerpos debe determinarse también para establecer la correlación entre el título de anticuerpos y la resistencia al desafío.

La eficacia de la vacuna producida se determina por estudios con cada especie a la que va dirigida, vacunada como se recomendó. La protección al final del periodo de inmunidad es monitoreada por la medición de anticuerpos neutralizantes específicos y por el desafío con virus de la rabia. Las condiciones experimentales de este desafío deben reflejar las condiciones naturales de la infección, aunque desde un punto de vista práctico, puede resultar más fácil obtener un 100% de mortalidad en los animales control con una cepa de virus de rabia conocida que con una aislada localmente. En los animales vacunados con vacunas inactivadas, el porcentaje de seroconversión y el nivel medio de anticuerpos permiten un buen pronóstico de sobrevivencia al desafío.

Debe establecerse la correlación entre potencia, la especie en cuestión y el valor antigénico determinado en ratones (ver Sección C.4.c. más adelante).

Para efectos de autorizar una vacuna, se deben realizar pruebas de seguridad en la especie a la que va dirigida. En el caso de las vacunas con virus vivos (incluyendo las vacunas recombinantes) que se utilizan en campañas de vacunación oral, las pruebas de seguridad también deben ser realizadas en aquellas otras especies que viven en las áreas de vacunación y que podrían estar expuestas a la vacuna (5).

La estabilidad de la vacuna se determina probando lotes después de un almacenamiento prolongado, usualmente 1 a 2 años. En ocasiones se utiliza un procedimiento de envejecimiento acelerado manteniendo la vacuna a 37°C durante 1 semana. El tiempo de validez o vencimiento manifestado por el fabricante se comprueba por la autoridad nacional. En general es de 12 a 18 meses para las vacunas líquidas y posiblemente de 24 meses para las liofilizadas.

2. Método de producción.

Cualquiera que sea el método adoptado, se debe prestar una especial atención a la calidad del sustrato. Tanto los animals como los huevos deben ser de origen SPF y los cultivos celulares, tales como la línea celuar BHK, deben cumplir con los estándares internacionales de esterilidad e inocuidad.

a) En animales.

El virus es inoculado intracerebralmente y cuando el animal muere en las fases terminales de la rabia se retira el tejido nervioso. El virus se inactiva por métodos físicos, como irradiación con luz ultravioleta o químicos como la adición de fenol o betapropiolactona. Las vacunas deben prepararse en animales jóvenes (ratones, corderos, entre otros) para obtener gran rendimiento vírico y reducir el contenido de mielina en la vacuna y otros efectos adversos asociados. En algunos casos el virus no se inactiva por completo, como por ejemplo en las vacunas de tipo Fermi tratadas con fenol, pero tales vacunas no se recomiendan más.

b) En huevos.

Se inocula una cepa de virus adaptada a huevos, en huevos embrionados de pollo SPF, los cuales se incubarán a 38°C por 5 o 6 días. El virus se recoge en forma de tejidos embrionados infecciosos y normalmente se liofiliza y se usa como una vacuna viva. Ejemplos de estas vacunas son las que contiene el Flury de bajo pasaje en huevo (LEP) o la cepa variante y la más deseable la de alto pasaje en huevo (HEP), la cual es más segura para especies animales como el gato.

c) En cultivos celulares.

Los cultivos celulares son infectados con cepas de virus de la rabia adaptadas al cultivo celular y se incuban a 35 o 36°C. Estos pueden ser usados como vacunas de virus vivo (como las vacunas Flury y SAD) o como vacunas inactivadas después de la adición de fenol (vacuna Semple) o cualquier otro compuesto, como la betapropiolactona.

Los cultivos celulares pueden utilizarse para obtener virus vectores (por ejemplo poxvirus) que lleven el gen que codifica la expresión de la glicoproteína del virus de la rabia (25).

Durante la producción se controla la multiplicación de los virus en uno de los sustratos antes mencionados y se recoge el virus al tiempo más apropiado, usualmente de 4 a 6 días después de la inoculación en los animales, los huevos o cultivos celulares. El virus obtenido se suspende en una solución tamponada a una dilución que provoque una antigenicidad óptima. Si se requiere, la suspensión se inactiva o liofiliza. Se recomienda un adyuvante para vacunas con virus inactivados, así como para otros antígenos de la vacuna que puedan incorporarse a vacunas polivalentes.

3. Control del Proceso.

Este consiste en el seguimiento del crecimiento viral para obtener un título óptimo y asegurar la ausencia de contaminación microbiana indeseable.

En las vacunas con virus vivo, debe establecerse la cinética del crecimiento viral para asegurar un título final de virus que se correlacione con la protección deseable de las especies concretas.

En vacunas con virus inactivados, deben evaluarse las propiedades inmunogénicas del producto final por técnicas *in vitro* (por ejemplo ELISA, inmunodifusión en agar de gel, pruebas de unión-anticuerpo o tinción de células infectadas). Estas estimaciones indicarán el mejor tiempo para recoger los virus de los cultivos celulares.

4. Control de lotes.

a) Esterilidad.

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación de materiales biológicos, se encuentran en el Capítulo I.1.5.

b) Inocuidad.

Las pruebas de inocuidad de los lotes de vacunas con virus inactivados se llevan a cabo mediante inoculación en cultivos celulares o intracerebralmente en ratones para detectar virus viables. Para vacunas antirrábicas vivas, debe realizarse una prueba de seguridad adecuada para cada lote de vacuna en la especie hospedadora concreta. Por lo menos tres y preferentemente cinco o seis animales de cada especie hospedadora en cuestión deben recibir una dosis equivalente a diez veces la dosis de campo recomendada por la ruta normal de administración. Los animales deben ser observados durante 90 días para detectar reacciones atribuibles a la vacuna.

c) Potencia.

La cantidad de virus presente en vacunas vivas atenuadas y en las recombinantes se determina por titulación. Una vez establecida una correlación entre la actividad de la vacuna en la especie a la que va dirigida y los títulos virales, las titulaciones representan unos indicadores fiables de la eficacia de la vacuna. Esto se realiza usando cultivos celulares o por inoculación intracerebral de ratones lactantes (en ratones sólo es posible con unos cuantos virus atenuados). Las vacunas recombinantes deben controlarse para la expresión de la proteína de la rabia hasta asegurar que la estabilidad de la expresión se mantiene en el proceso de producción. El título del vector puede usarse entonces como un indicador fiable de la eficacia de la vacuna.

Para las vacunas con virus inactivados, la correlación entre la potencia en la especie a la que van dirigidas y el valor antigénico estimado en ratones representa un indicador fiable de la actividad de la vacuna. En los Estados Unidos la potencia de la vacuna se establece por la prueba de NIH (Nacional Instututes of Health). En otras partes tiene gran aceptación la prueba de la Farmacopea Europea.

De acuerdo a la Farmacopea Europea (20) se inoculan grupos de al menos 10 ratones de 3 a 4 semanas de edad, con dosis decrecientes únicas de vacuna o con dosis separadas por 1 semana, según la prueba del HIH (37). Se compara un número suficiente de diluciones para determinar la dilución a la que el 50% de los ratones se protegen contra una inoculación intracerebral de desafío 14 días después (20, 37).

Para la calibración de estándares nacionales existe una vacuna internacional estándar de la OMS (ver nota 2 a pie de página), de modo que los resultados de la prueba de antigenicidad se pueden expresar en Unidades Internacionales (UI). La prueba no es válida a menos que:

i) Tanto para la vacuna examinada y la preparación estándar, la PD_{50} (dosis de protección al 50%) se encuentre entre la mayor y la menor dosis dada a los ratones.

ii) La titulación de la suspension del virus de desafío muestre que 0.03 ml de la suspensión contenía 10 LD_{50}. La dosis de desafío debe estar entre 12 a 50 LD_{50} para una prueba válida.

iii) El intervalo de confianza (p=0.95) para la prueba no debe ser menor de 25% ni superior al 400% de la potencia estimada: el análisis estadístico debe mostrar una notable pendiente sin desviaciones importantes de la linealidad o paralelismo de las líneas dosis-respuesta.

La vacuna supera la prueba si la potencia estimada es superior a 1 UI por dosis o la potencia demostrada en la prueba de duración de la inmunidad para autorizar el producto es la dosis prescrita más pequeña.

También se puede utilizar una prueba simplificada a efectos de anticipar qué vacunas es probable que tengan un valor antigénico $\geq$ 1 UI por dosis (4). Esta prueba se emplea como prueba de investigación aproximada para reducir el número de ratones utilizados en las pruebas de control de la potencia de la vacuna.

d) Duración de la inmunidad.

La duración de la inmunidad debe ser establecida por el producto autorizado, en la especie a la que va dirigida, con un protocolo de vacunación definido. Después de esto, no se prueba cada lote (ver anteriormente Sección C.4.c.).

e) Estabilidad.

Debe comprobarse por pruebas adecuadas el vencimiento (la caducidad) que se establece. Estos experimentos incluyen pruebas biológicas y de estabilidad físico-química y deben realizarse sobre un número suficiente de lotes de vacuna mantenidos en las condiciones recomendadas.

La termoestabilidad de las vacunas con virus vivos en forma líquida suele ser baja. En las vacunas liofilizadas con virus inactivados la estabilidad suele garantizarse por 2 años a 4°C.

f) Conservadores.

Las vacunas con virus inactivados pueden tener conservantes (formalina, mertiolato). La naturaleza y cantidad de dichos conservadores debe cumplir las normas de control nacionales.

5. Pruebas sobre el producto final.

a) Inocuidad.

Ver Sección C.4.b.

b) Potencia.

Ver Sección C.4.c.

Referencias

1. Aubert M.F.A. (1982). Sensibilité et fidélité du diagnostic de rage au laboratoire. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., **5**, 369-376.

2. Aubert M.F.A. (1982). Une méthode simple de calcul des titres des suspensions virales, vaccinales ou séroneutralisantes: la méthode graphique. (A simple method for calculating titres of virus, vaccine or serum-neutralising suspensions: the graphic method.) Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., **1**, 828-833.

3. Aubert M.F.A. (1992). Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., **11**, 735-760.

4. Aubert M.F.A. & Blancou J. (1982). Test simplifié de contrôle d'activité des vaccins antirabiques à virus inactivés. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., **1**, 811-822.

5. Baer G.M. (1991). The Natural History of Rabies, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 620 pp.

6. Barnard B.J.H. & Voges S.F. (1982). A simple technique for the diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. Ondersterpoort J. Vet. Res., **49**, 193-194.

7. Barrat J. (1992). Experimental diagnosis of rabies. Adaptations to field and tropical conditions. Proceedings of the International Conference on Epidemiology, Control and Prevention of Rabies in Eastern and Southern Africa. Lusaka, Zambia, 2-5 June 1992, 72-83.

8. Barrat J. (1993). ELISA systems for rabies antigen detection. Proceedings of the Southern and Eastern African Rabies Group International Symposium. Pietermaritzburg, South Africa, 29-30 April 1993, 152-155.

9. Barrat J. & Aubert M.F.A. (1995). Diagnostic de la rage animale en France de 1991 à 1993, bilan de CNEVA laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages en France. Revue Méd. Vét., **146**, 561-566.

10. Barrat J., Barrat M.J., Picard M. & Aubert M.F.A. (1986). Diagnostic de la rage sur culture cellulaire, comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation à la souris. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., **11**, 207-214.

11. Barrat J. & Blancou J. (1988). Technique simplifiée de prélèvement, de conditionnement et d'expédition de matière cérébrale pour le diagnostic de rage. Doc. OMS/Rab. Res./88.27.

12. Bingham J. & van der Merwe M. (2002). Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. J. Virol. Methods, **101**, 85-94.

13. Blancou J., Soria Baltazar R., Molli I. & Stoltz J.F. (1991). Effective postexposure treatment of rabies-infected sheep with rabies immune globulin and vaccine. Vaccine, **9**, 432-437.

14. Bourhy H., Kissi B. & Tordo N. (1993). Molecular diversity of the lyssavirus genus. Virology, **194**, 70-81.

15. Bourhy H., Rollin P.E., Vincent J. & Sureau P. (1989). Comparative field evaluation of the fluorescent antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzymes immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. J. Clin. Microbiol., **27**, 519-523.

16. Bourhy H. & Sureau P. (1991). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage; Métodos de laboratorio para el diagnostic de la rabia; Laboratory methods for rabies diagnosis. Commission des Laboratoires de référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur, Paris, France, 197 pp.

17. Briggs D.J., Smith J.S., Mueller F.L., Schwenke J., Davis R.D., Gordon C.R., Schweitzer K., Orciari L.A., Yager P.A. & Rupprecht C.E. (1998). A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. Biologicals, **26**, 347-355.

18. Cliquet F., Aubert M. & Sagne L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. J. Immunol. Methods, **212**, 79-87.

19. Cliquet F., Sagne L., Schereffer J.L. & Aubert M.F.A. (2000). ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. Vaccine, **18**, 3272-3279.

20. Council of Europe (1997). Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium. Inactivated Rabies Vaccine for Veterinary Use. European Pharmacopoeia, Third Edition. Monograph 0451. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1776-1777.

21. Fekadu M., Shaddock J.H., Sanderlin D.W. & Smith J.S. (1988). Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies virus and rabies-related viruses. Vaccine, **6,** 533-539.

22. Genovese M.A. & Andral L. (1978). Comparaison de deux techniques utilisées pour le diagnostic de la rage: l'immunofluorescence et l'immunoperoxydase. Rec. Med. Vet., **154** (7-8), 667-671.

23. Goldwasser R.A. & Kissling R.E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **98**, 219-223.

24. Hooper P.T., Lunt R.A., Gould A.R., Samaratunga H., Hyatt A.D., Gleeson L.J., Rodwell B.J., Rupprecht C.E., Smith J.S. & Murray P.K. (1997). A new lyssavirus (the first endemic rabies-related virus recognised in Australia. Bull. Inst. Pasteur, **95**, 209-218.

25. Kieny M.P., Lathe R., Drillien R., Spehner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H. & Lecocq J.P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature, **312**, 163-166.

26. Montano Hirose J.A., Bourhy H. & Sureau P. (1991). Retro-orbital route for brain specimen collection for rabies diagnosis. Vet. Rec., **129**, 291-292.

27. Perrin P., Lafon M., Versmisse P. & Sureau P. (1985). Application d'une méthode immunoenzymatique au titrage des anticorps antirabiques neutralisants en cultures cellulaires. J. Biol. Stand., **13**, 35-42.

28. Perrin P., Rollin P.E. & Sureau P. (1986). A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID) useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. J. Biol. Stand., **14**, 217-222.

29. Rudd R.J. & Trimachi C.V. (1987). Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. J. Clin. Microbiol., **25**, 145-168.

30. Smith J.S., Yager P.A. & Baer G.C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull. OMS, **48**, 535-541.

31. Von Teichman B.F., De Koker W.C., Bosch S.J., Bishop G.C., Meridith C.D. & Bingham J. (1998). Mokola virus infection: description of recent south African cases and a review of the virus epidemiology. J. S. Afr. Vet. Assoc., **69**, 169-171.

32. Umoh J.U. & Blenden D.C. (1981). Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin fixed tissue after treatment with trypsin. Bull. OMS, **59**, 737-744.

33. Warner C.K., Whitfield S.G., Fekadu M. & Ho H. (1997). Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome *in situ* in formalin-fixed tissues. J. Virol. Methods, **67**, 5-12.

34. Wiktor T.J., Doherty P.C. & Koprowski H. (1977). *In vitro* evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 334-338.

35. World Health Organization Expert Committee on Biological Standards. Thirty-Fifth Report (1985). World Health Organization Technical Report Series No. 725. OMS, Geneva, Switzerland.

36. World Health Organization Expert Committee on Rabies. Eighth Report (1992). World Health Organization Technical Report Series No. 824, 84 pp.

37. World Health Organization (1996). Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. OMS, Geneva, Switzerland.

38. Zalan E., Wilson C. & Pukitis (1979). A microtest for quantitation of rabies virus. J. Biol. Stand., **7**, 213-220.