

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**



TEMA

DETERMINACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA LA RABIA EN CANINOS DE 2 A 6 MESES DE EDAD ANTES Y DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE VACUNA DE CEREBRO DE RATON LACTANTE PRODUCIDA EN EL SALVADOR.

POR:

BR. ROCIO ELIZABETH CANIZALEZ ORTEZ.

BR. CLAUDIA LISSETTE MARROQUIN SANCHEZ.

BR. WENDY YESENIA ORELLANA GAMEZ.

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2007



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**



TEMA

DETERMINACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA LA RABIA EN CANINOS DE 2 A 6 MESES DE EDAD ANTES Y DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE VACUNA DE CEREBRO DE RATON LACTANTE PRODUCIDA EN EL SALVADOR.

POR:

**BR. ROCIO ELIZABETH CANIZALEZ ORTEZ.
BR. CLAUDIA LISSETTE MARROQUIN SANCHEZ.
BR. WENDY YESENIA ORELLANA GAMEZ.**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2007

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA: DRA. MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ

SECRETARIA GENERAL. LICDA. ALICIA MARGARITA RIVAS DE RECINOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO: ING. AGR. LIC. JORGE ALBERTO ULLOA ERROA

SECRETARIO: ING. AGR. SANTOS ALIRIO SANDOVAL MONTERROSA

JEFE DE DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA.

M.V. ORLANDO SILVA HERNANDEZ

DOCENTES DIRECTORES

M.V. ORLANDO SILVA HERNANDEZ

M.V.Z. ROLANDO VARGAS LÓPEZ

LIC. BIOLOGIA. OSCAR BONILLA GOMEZ

RESUMEN

La rabia es un problema de salud pública muy importante de los países en desarrollo, principalmente por el mantenimiento del ciclo tanto urbano como silvestre. En nuestro país una de las formas de prevenir esta enfermedad, es a través de la aplicación de una vacuna de buena calidad a aquellos animales de compañía mayormente involucrados en la transmisión de dicha zoonosis, especialmente los caninos.

Por lo cual el MSPAS realiza campañas de vacunación a nivel nacional para tratar de reducir los problemas de rabia. A pesar de los esfuerzos de la Institución, la enfermedad persiste; esta situación obedece a diferentes causas entre las cuales podría destacarse: el diseño de las campañas de vacunación (cobertura), manejo de la vacuna, o la calidad inmunogénica de la misma.

El presente estudio tuvo como objetivo medir el nivel de protección que la vacuna de Cerebro de Ratón Lactante (CRL) producida en El Salvador proporciona a los caninos por medio de la titulación de anticuerpos antirrábicos por el método de Seroneutralización. La investigación se realizó en tres municipios del área metropolitana de los departamentos de San Salvador y La Libertad, república de El Salvador.

De 40 sueros analizados mediante dicho método, a los 21 días de aplicada la vacuna el 95% de los perros sobrepasaron títulos arriba de la normativa internacional de la OMS que es de 0.5 UI/ml (título 1:25). Estos resultados, demuestran que la vacuna CRL induce una satisfactoria producción de anticuerpos contra la rabia.

AGRADECIMIENTOS

A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES:

LIC. OSCAR BONILLA GOMEZ

M.V. ORLANDO SIVA HERNANDEZ

M.V.Z. ROLANDO VARGAS LOPEZ

Por su tiempo, responsabilidad, colaboración e interés en la elaboración de esta investigación.

A NUESTROS PADRES Y FAMILIA:

Por su apoyo, comprensión y paciencia a lo largo de nuestra carrera, para poder lograr una de nuestras metas.

A NUESTROS AMIGOS:

Por su apoyo y colaboración.

A NUESTRA FACULTAD:

Le agradecemos, por su aporte en nuestra formación académico – profesional, ya que nos brindaron las herramientas básicas para desarrollarnos como futuros profesionales. Así como también a cada una de las personas que la integran.

AL MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA (MAG):

Especialmente al personal que labora en la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal, por su valiosa colaboración. Ya que sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de esta investigación.

Agradecemos también:

Ing. Margarita de Cisneros

Lic. Orbelina de Chávez.

Sr. Roberto Flores.

Lic. Rhina Ostorga de Orellana

Lic. Celia de Asturias.

A todos ellos por su especial colaboración en la realización de cada fase de nuestra investigación.

AL LABORATORIO DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS DEL MSPAS.

Especiales agradecimientos por brindarnos sus conocimientos y orientación, para el desarrollo de nuestro trabajo.

Agradecemos también:

Lic. Lorena Alvarado.

Lic. Ignacio Mejilla.

A TODOS ELLOS MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO:

Al cual se lo debo todo y le agradezco por haberme guiado y llevado de su mano hasta lograr una de mis metas que es la de finalizar mi carrera.

A MIS PADRES:

JOSE GABRIEL ORELLANA PINEDA Y BERTA ALICIA GAMEZ RUIZ, por su apoyo, comprensión y esfuerzo para que llevará acabo este especial logro académico.

A MIS HERMANAS:

IVONNE Y ANDREA, por su apoyo, ayuda y paciencia en todo.

A MI TIA:

ROSA ELVIRA DE FUENTES, por la ayuda brindada.

LIC. ORBELINA FERNANDEZ DE CHAVEZ.

Por su gran ayuda, colaboración y amistad para conmigo.

A MIS AMIGOS:

CAROLINA Y NICOLAS, por su apoyo, colaboración, paciencia, comprensión y su querida amistad.

WENDY YESENIA ORELLANA GAMEZ.

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO:

Al cual se lo debo todo y le agradezco por haberme guiado y llevado de su mano siempre.

A MIS PADRES:

JOSE RICARDO CANIZALEZ SALAZAR Y ROSA ERLINDA ORTEZ DE CANIZALEZ, por su esfuerzo y apoyo para que llevará acabo este especial logro académico.

A MIS HERMANOS

ROSITA y GUAYO, por su paciencia y ayuda en todo.

LIC. ORBELINA FERNANDEZ DE CHAVEZ.

Por su gran ayuda, colaboración y amistad para conmigo.

A MIS AMIGOS:

Por su apoyo, colaboración, paciencia, comprensión y su querida amistad.

ROCIO ELIZABETH CANIZALEZ

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO:

Al cual se lo debo todo y le agradezco por haberme guiado y llevado de su mano hasta lograr una de mis metas que es la de finalizar mi carrera.

A MIS PADRES:

HERNÁN PASTOR MARROQUIN y LUZ DE MARIA SÁNCHEZ, por su apoyo, comprensión y esfuerzo para que llevara acabo este especial logro académico.

A MIS HERMANOS:

PATRICIA y HERNAN, por su apoyo, ayuda y paciencia en todo.

LIC. ORBELINA FERNANDEZ DE CHAVEZ.

Por su gran ayuda, colaboración y amistad para conmigo.

A MIS AMIGOS:

Kevin Cuellar, Julio Castillo y Drs. Ciudad Real por su apoyo, colaboración, paciencia, comprensión y su querida amistad.

CLAUDIA LISSETTE MARROQUIN

ÍNDICE

	Página
AUTORIDADES UNIVERSITARIAS.....	I
ASESORES.....	II
RESUMEN	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	VI
INTRODUCCION	1
1. Antecedentes	2
2. Revisión de Literatura	7
2.1 Historia de la Rabia	7
2.2 Virus de la rabia	8
2.2.1 Taxonomía	8
2.2.2 Estructura Viral	9
2.2.3 Propiedades del virus	10
2.2.4 Virus fijo de Laboratorio	11
2.3 Generalidades de las vacunas.....	12
2.4 Historia de las vacunas	12
2.5 Tipos de Vacunas Antirrábicas	13
2.6 Historia de la vacuna CRL	16
2.7 Producción de vacuna CRL	18
2.7.1 Preparación virus semilla y trabajo	19
2.7.2 Método de producción de vacuna antirrábica ..	20
2.7.2.1 Preparación del inóculo	20
2.7.2.2 Fabricación de la vacuna	21
2.7.2.3 Requisitos de potencia	23
3. Descripción del problema	24
4. Justificación	25
5. Hipótesis de la investigación	28

6. Objetivos de la investigación	28
7. Materiales y métodos	29
7.1 Generalidades	29
7.1.1 Ubicación del estudio	29
7.1.2 Duración de la investigación	29
7.2 Descripción de las unidades en estudio	29
7.3 Metodología de campo	30
7.3.1 Toma de datos	30
7.3.2 Toma de muestras	30
7.3.3 Materiales utilizados	31
7.4 Metodología de laboratorio	31
7.4.1 Inmunización de personal involucrado	31
7.4.2 Prácticas de manejo	31
7.4.3 Procedimiento de Laboratorio	32
7.4.3.1 Técnica de Seroneutralización para determinar anticuerpos contra la rabia	33
7.4.3.2 Fórmula de Reed y Muench	38
7.4.3.3 Materiales, equipo y reactivos	39
7.4.4 Ensayo de la técnica de seroneutralización	39
7.5 Metodología estadística	44
8. Resultados	45
9. Discusión de resultados.....	46
10. Conclusiones	48
11. Recomendaciones	49
12. BIBLIOGRAFÍA	50
13. ANEXOS	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Diferencias entre el virus fijo y el virus calle	11
2. Casos de personas mordidas por animales transmisores de la rabia y rabia humana	25
3. Casos de Rabia Humana	26
4. Casos de rabia, por especie animal y año, diagnosticados por MSPAS Y MAG	26
5. Casos de Rabia en zona urbana y rural	27

LISTA DE FIGURA

Figura		Pg.
1.	Esquema de dilución del suero de referencia y los sueros problemas	34
2.	Esquema de dilución del virus CVS	36
3.	Confrontación del suero con dilución $10^{-5.5}$	37

INDICE DE ANEXOS

Cuadro A.	Pg.
1. Resumen de resultados de prueba N° 1	61
2. Resumen de resultados de prueba N° 2	62
3. Resumen de resultados de prueba N° 3	64
4. Resumen de resultados de prueba N° 4	65
5. Resumen de resultados de prueba N° 5	66
6. Resumen de resultados de prueba N° 6	68
7. Títulos de anticuerpos de caninos al día 0 y 21.....	70

Gráfico A	Pg.
1. Casos de Rabia Canina en el cuatrienio 2003-2006 diagnosticados por MSPAS Y MAG.....	71
2. Título de Anticuerpos Maternales al día 0, en los 20 caninos	71
3. Título de Anticuerpos Antirrábicos a los 21 días en los 20 caninos vacunados	72
4. Promedio de títulos de Anticuerpos Antirrábicos según edad del día 0 y 21	72
5. Promedio de títulos de Anticuerpos Antirrábicos maternales al día 0 según edad	73

INTRODUCCIÓN

La finalidad del presente estudio fue determinar los anticuerpos neutralizantes contra la rabia en caninos de dos a seis meses de edad antes y después de haber recibido la vacuna de Cerebro de Ratón Lactante (CRL), y así evaluar el poder inmunológico que tiene la vacuna producida por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) en El Salvador, para generar un título de anticuerpos satisfactorios en los caninos y poder decir que estos están protegidos contra la rabia o el virus calle de la rabia frente a una exposición.

Se hace necesario este estudio ya que la rabia es una zoonosis viral, cuya importancia recae en que tiene una letalidad cercana al 100% y una relevancia epidemiológica cuando se tiene contacto con animales portadores del virus, el cual propaga con su mordedura a animales sanos y al humano. La forma de la evaluación de dicha vacuna fue medir su capacidad de generar anticuerpos neutralizantes después de 21 días de ser aplicada por primera vez a los cachorros.

Esto nos permite asegurar que la vacuna que se aplica en las campañas es aceptable, y que cualquier falla en los propósitos u objetivos de las mismas no es debido a su calidad sino a otros factores.

Con el presente trabajo se pretende además, sentar las bases para complementar los estudios de eficacia de la vacuna producida en el país mediante la evaluación de la respuesta inmunitaria en los caninos.

1. ANTECEDENTES

Desde que se inicia con la producción de vacunas es necesario que se imponga un estricto control de calidad. Estas deben de ser analizadas en los laboratorios y las autoridades nacionales de los respectivos países deben efectuar pruebas rigurosas de la inocuidad y actividad de los productos acabados y en esta forma emplearse satisfactoriamente en animales y en seres humanos.

Cuando sea apropiado, se deben llevar a cabo pruebas serológicas en una muestra representativa de animales y de personas (Zarate, 2006).

En el Instituto de Investigaciones Zootécnicas del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, estado Aragua, Venezuela, se realizó un estudio para determinar el nivel de los anticuerpos neutralizantes en ovejas y la transferencia de estos anticuerpos a los corderos, utilizando la vacuna antirrábica inactivada potenciada con levamisol. Se realizaron tres tratamientos, el primero de control, el segundo solo con vacuna antirrábica y el tercero vacuna antirrábica más levamisol. A las muestras de sangre tomadas se les aplicó la técnica de seroneutralización y se evidenció la capacidad de transmisión pasiva de inmunidad a partir de ovejas madres vacunadas al tercer mes de gestación y la posibilidad de incrementar los niveles de anticuerpos, tanto en ovejas madres como corderos mediante la aplicación simultanea de vacuna y levamisol al 7.5 %, confirmando de esta manera, el efecto inmunopotenciador de este producto (Bracamonte, 2000).

En el Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico de la Rabia del Instituto de Investigaciones Veterinarias de Venezuela, se realizo un estudio en dos grupos de personas, el primero constituido por 16 individuos entre personal de laboratorio y voluntarios (en constante exposición) los que fueron inmunizados con vacuna tipo Fermi a los 0, 30 y 60 días y se obtuvo sueros para los estudios de seroneutralización antes de cada vacunación. Posteriormente otras muestras fueron tomadas a los 150 y 160 días después de la tercera y última vacunación. El Grupo II corresponde a 19 infantes de marina, quienes habían sido mordidos por vampiros en la Base Naval de Turiamo, Distrito Girardot, Municipio Ocumare de la Costa, Estado

Aragua. Fueron inmunizados con vacuna CRL tipo Fuenzalida Palacios. De este grupo de personas no se pudo obtener suero a los 0 días, solamente a los 30, 60 y luego a los 150 y 360 días de la última dosis.

En los resultados se puede observar que existen diferencias en la respuesta sérica inmunitaria entre el grupo de personas vacunadas con la vacuna de cerebro de carnero tipo Fermi y el grupo de personas inoculados con la vacuna FUENZALIDA-PALACIOS. Los valores de la respuesta inmunitaria referidos a los títulos neutralizantes del grupo N° 1, muestran que con un solo estímulo antigénico se generan títulos neutralizantes que varían entre 1:5 y 1:125 cuando se exponen con una dosis de 42 DL50 de virus. A los 60 y 150 días se pudo observar el efecto de refuerzo de la vacunación, ya que en todos los casos hubo un aumento apreciable de los títulos neutralizantes y a los 360 días, estos valores, aunque presentes disminuyen en cantidad. Sin embargo, al colocar un refuerzo a los 360 días, se puede notar un aumento apreciable de los títulos neutralizantes.

En el grupo N° 2 los títulos de anticuerpos neutralizantes generados a los 30 días de la última dosis son muy elevados y a partir de ese momento comienza a descender paulatinamente. A los 60 días de la última dosis la mayoría del grupo mantienen sus títulos pero al contrario de los del grupo N° 1 los títulos comienzan una curva francamente descendente. (Mogollón y colaboradores, 1976).

Desde 1993, el Laboratorio de Investigación de Rabia y de Patología de Animales Silvestres de Francia, ha sometido más de 25,000 sueros de perro y gato a una prueba de seroneutralización viral. Los análisis estadísticos realizados ponen de manifiesto que los gatos responden mejor que los perros a la vacuna antirrábica (Cliquet, 2003).

En los últimos años se han flexibilizado las reglamentaciones sobre el movimiento internacional de carnívoros domésticos de países infectados a países libres de rabia, con la adopción de un sistema que combina la vacunación antirrábica del animal y el control serológico con un título de anticuerpo superior a un valor umbral de 0.5 UI/ml.

En Guatemala se realizó un estudio para medir la respuesta serológica obtenida de personas que recibieron tratamiento reducido de inmunización antirrábica pre-exposición en comparación con el esquema clásico de una dosis diaria de vacuna por 14 días más dos refuerzos. Se utilizaron 100 voluntarios (estudiantes de Medicina Veterinaria de la Universidad de San Carlos) que no habían recibido nunca vacunación antirrábica, se les aplicó la vacuna de CRL al 1%. A cada voluntario se le tomó una muestra de sangre al inicio y luego a los días 12, 20, 90 y 181 después de iniciado el estudio; a todos los sueros se les aplicó la prueba de seroneutralización y se determinó el título de anticuerpos neutralizantes mediante el método de Reed y Muench.

Los resultados demostraron que los esquemas de vacunación estudiados, provocaron la aparición de anticuerpos antirrábicos en el 100% de los individuos tratados con la vacuna CRL. Y al día 0 todos los sujetos no presentaron anticuerpos contra la rabia. En promedio los títulos de anticuerpos en el esquema reducido fue de 10.47 UI/ml y en el clásico de 24.63 UI/ml al día 20 demostrando siempre un mayor aumento el esquema clásico; en general los títulos al día 20 y 90 en ambos esquemas se mantuvieron altos disminuyendo al día 181. (Palomo y Águila, 1981)

En el mismo país se realizó otro estudio comparando los niveles de anticuerpos en 197 perros inmunizados con vacunas antirrábicas, de los cuales a 99 se les administró CRL 2% y 98 se inmunizaron con CRL 1% más Hidróxido de Aluminio. A todos los sueros se les efectuaron titulaciones por la técnica de Contraelectroforesis y/o Seroneutralización en ratones. Los caninos fueron sangrados a los 0, 30, 60 y 90 días; y se pudo observar que la mejor respuesta inmune para ambas vacunas se obtuvo a los 30 días post vacunación, luego los títulos fueron disminuyendo gradualmente. También se comprobó que la vacuna CRL 1% más Hidróxido de Aluminio siempre indujo niveles más altos de anticuerpos neutralizantes a los 30, 60, y 90 días postvacunación. (Chang, 1989).

Para la detección de anticuerpos neutralizantes en Cuba se ha venido aplicando la prueba biológica durante muchos años. Se empleó la técnica de neutralización por reducción del número de placas (NRNP) para la detección de anticuerpos

antirrábicos en personal de riesgo. Se estudiaron muestras de suero de 25 individuos de alto riesgo y personas con antecedentes de vacunación y sin estos. La técnica de neutralización fue comparada con la prueba biológica en ratón y como resultado del estudio se obtuvo una concordancia de 100 %. Se encontró que el sexo no influye en la respuesta de anticuerpos a este virus, aunque el contacto directo y la cantidad de veces que el individuo ha recibido la vacuna actúan positivamente en la respuesta inmune. (Ribas y colaboradores, 2003).

En otro estudio que se inició en el año 2000, para el cual se solicitó la participación voluntaria de estudiantes de ambos sexos, entre 22 y 24 años de edad del último año de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Santo Tomás en Chile, los que no habían sido sometidos a vacunación antirrábica previamente. Se vacunaron 54 voluntarios; el primer grupo fue vacunado con vacuna CRL tipo Fuenzalida-Palacios en una dilución al 2,5% en dosis de 2 ml (0,6 UI/dosis) con un esquema de 4 dosis subcutáneas peri umbilical en los días 0, 3, 7 y 28, el segundo grupo fue vacunado con vacuna Verorab[®] en dosis de 0,5 ml (2,5 UI/dosis) con un esquema de 3 dosis intramusculares en la zona deltoidea a los días 0, 7 y 28. La vacuna Verorab[®], es realizada en células Vero (proveniente de riñón de mono verde africano). Para determinar el nivel inmunológico basal de los participantes se tomó una muestra de sangre el día 0 junto con la aplicación de la primera dosis de vacuna antirrábica y posteriormente se tomaron muestras de sangre los días 7, 42 y 365. De un total de 22 individuos vacunados con F-P, ninguno de los sueros analizados presentó títulos protectores (0,5 UI/ml) a los 7 días; sin embargo de 30 individuos vacunados con Verorab[®], 5 sueros analizados presentaron títulos protectores. En los sueros analizados a los 42 días todos los individuos presentaron títulos protectores con ambas vacunas, no existiendo una diferencia estadísticamente significativa en el promedio de los títulos. El nivel de títulos de anticuerpos seroneutralizantes en los sueros colectados a los 365 días marcó una diferencia significativa, al comparar ambas vacunas, en que 10 de 22 individuos vacunados con F-P, presentaron títulos protectores; en cambio con Verorab[®] el 100% de los individuos tenía títulos de anticuerpos seroneutralizantes mayores de 0,5 UI y cuyo título promedio fue de 2,065 UI. (Favi y Roosk, 2004).

A pesar de que son numerosos los brotes de rabia en el mundo y especialmente en Asia, países como Japón han decidido examinar el sistema vigente de importación de perros, para evitar que esos animales introduzcan la rabia, principalmente por el traslado de mascotas no vacunadas. Los puntos principales de la revisión incluyen al sistema de notificación previa en el cual las personas que quieran importar perros, deben proporcionar información sanitaria relativa a la mascota 40 días antes de la importación, además de la vacunación contra la rabia a los tres meses de edad o más tarde. Será necesaria una revacunación en un plazo máximo de cuatro semanas y dentro del período de validez de la primera vacunación. Las mascotas deberán permanecer en los países exportadores al menos seis meses después de que se les haya extraído sangre tras la revacunación. Se aplicará a la sangre la prueba de titulación de los anticuerpos neutralizantes de la rabia; la titulación del suero será superior a 0,5 UI/ml (OMS, 2004).

En El Salvador, se inicio la producción de la vacuna CRL en el año de 1994, periodo en el cual se realizaron ensayos que culminaron con la reducción del tiempo tradicional de cosecha de cerebros de 96 a 72 horas en la elaboración de vacuna humana y canina. Se logró así disminuir de un 23% a un 10% la mortalidad y se obtuvo un 13% más de ratones infectados con virus rábico y en consecuencia una mayor cantidad de tejido cerebral en la fabricación de la vacuna (Bonilla, 1996).

En nuestro país se han realizado estudios en humanos para determinar la calidad y eficacia de la vacuna antirrábica tipo CRL en la producción de anticuerpos suficientes para la protección contra el virus rábico. El estudio se realizó en los Laboratorios del MSPAS, con un total de 30 personas, las cuales fueron inmunizados con la vacuna antirrábica nacional CRL. Se utilizó la prueba de seroneutralización para obtener el título de anticuerpos, con resultados muy satisfactorios; ya que los títulos obtenidos estaban arriba de 1:25 (0.5 UI/ml), que es el parámetro establecido por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como referencia (López, 2002).



2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Historia de la rabia

La rabia es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad y su conocimiento se remonta aproximadamente 4 mil años A.C. Sólo se identificaba con las especies silvestres como zorros, lobos, mapaches, tejones y al transcurrir los años, estos animales fueron difundiendo el virus por el mundo; más tarde llegó a las especies domésticas, y en consecuencia al hombre que convive con ellas. Hasta la fecha, aún es motivo de diversos estudios dirigidos al combate de esta grave zoonosis.

En las civilizaciones del mundo antiguo, como la egipcia, la rabia fue catalogada como "castigo de los dioses", porque cuando un perro atacaba a un individuo, la muerte llegaba en pocos días. También en Italia la rabia se presentó frecuentemente, lo que aterrorizaba a la población de muchas aldeas.

Demócrito, filósofo griego, la describió como una enfermedad terrible que se presentaba en perros y otros animales domésticos. Hacia el año 550 A.C., Aristóteles en sus escritos, habla acerca de la rabia y la forma de cómo se transmite, por mordedura de animales rabiosos.

En el continente americano, el problema comenzó cuando los conquistadores españoles e ingleses pisaron las costas del nuevo mundo, pues ellos trajeron animales infectados. Sin embargo, algunos datos históricos señalan que la rabia ya existía en América, y que los vampiros, cuya presencia se detectó en zonas del nuevo continente, eran causa de transmisión del mal, según relatos de las crónicas de los conquistadores en 1514 y 1527, principalmente en tierras mexicanas.

La descripción de su historia natural se mantiene de la misma manera hasta hoy, identificándose el concepto de transmisibilidad a través de la saliva de los perros, utilizando la palabra *virus* (veneno en latín) para definir el material infeccioso.

En el siglo XIX, con el avance en el descubrimiento microbiano se llega a las investigaciones científicas sobre el tratamiento para la rabia, y en 1804 el investigador alemán G. Zinke, demostró que ésta se podía transmitir a perros sanos por inoculación de saliva de animales rabiosos. Posteriormente, Galtier (1879) utilizó inicialmente el conejo como modelo experimental inoculándolo con saliva de un perro rabioso demostrando su transmisión.

Estos estudios sirvieron de base al mayor descubrimiento de la medicina, efectuado por el químico francés **Louis Pasteur** en la década de los ochenta del siglo pasado, quien sugirió que el agente etiológico de la rabia no era una bacteria, sino un virus y que no solo se encontraba en la saliva, sino en el sistema nervioso central (Bracamonte y Plaza 2005).

2.2 Virus de la Rabia

2.2.1 Taxonomía

La familia *Rhabdoviridae* (incluidos en el orden de los Mononegavirales) al igual que las familias *Paramixoviridae* y *Flavoviridae* son familias que agrupan a virus ARN no segmentados, de cadena simple y polaridad negativa.

Los rhabdovirus de los mamíferos se dividen en base a sus diferencias antigénicas y bioquímicas en tres géneros: 1) Vesiculovirus, con el virus de la estomatitis vesicular como prototipo, 2) Lyssavirus, con el virus de la rabia como prototipo, y 3) Ephemerovirus que tiene como prototipo al de la fiebre efímera de los bovinos en Australia. (Loza y Aguilar, 1998).

Con base en su reactividad a anticuerpos monoclonales, los Lyssavirus se han subdividido en cuatro serotipos, que son:

Serotipo 1.

Rabia clásica. Incluye la mayor parte de los virus hallados en el campo y de las cepas de laboratorio de los distintos países.

Serotipo 2.

Lagos. Aislado por primera vez de una mezcla de encéfalos de murciélagos de la República Centroafricana.

Serotipo 3.

Mokola. Aislado por primera vez en musaraña de Nigeria, posteriormente en el hombre, animales salvajes y domésticos de países africanos.

Serotipo 4.

Duvenhage. Aislada por primera vez en un hombre de Sudáfrica, después en murciélagos de la misma región y Europa Central.

A esta clasificación se han agregado otros virus recientemente reportados:

EBL 1, *Lyssavirus* de murciélago europeo tipo 1 que se han aislado de humano y murciélagos insectívoros *Epseticus* y *Pipistrellus*. EBL 2, *Lyssavirus* de murciélago europeo tipo 2 aislado de humano y murciélagos insectívoros *Myotis*.

Con base en estudios de secuenciación de los genes de la nucleocápside, actualmente se puede emplear la terminología de genotipos, o bien sero-genotipos para clasificar a los diferentes *Lyssavirus*.

Cabe mencionar que a la fecha, en el continente Americano, solo se ha encontrado el sero-genotipo 1 o sea la rabia clásica. (Loza y Aguilar, 1998) (OMS, 1992).

2.2.2 Estructura viral:

Los viriones o partículas víricas tienen una estructura en forma de bala, con una longitud promedio de 180 nm y un diámetro de 75 nm. Cada partícula tiene un nucleocapsidia helicoidal rodeada de una doble capa de lípido. La cubierta exterior consta de proyecciones en forma espigada de 10 nm de longitud, anclada en una doble capa de lípido. Se han identificado cinco proteínas. La ribonucleoproteína contiene el ARN genómico asociado con tres proteínas internas, la *transcriptasa* (L), la nucleoproteína (N) y una fosfoproteína (NS). Estas proteínas, juntamente con el ARN, forman un complejo activo de RNA, que controla tanto la transcripción como la replicación. Las otras proteínas estructurales son la proteína matriz (M), que está

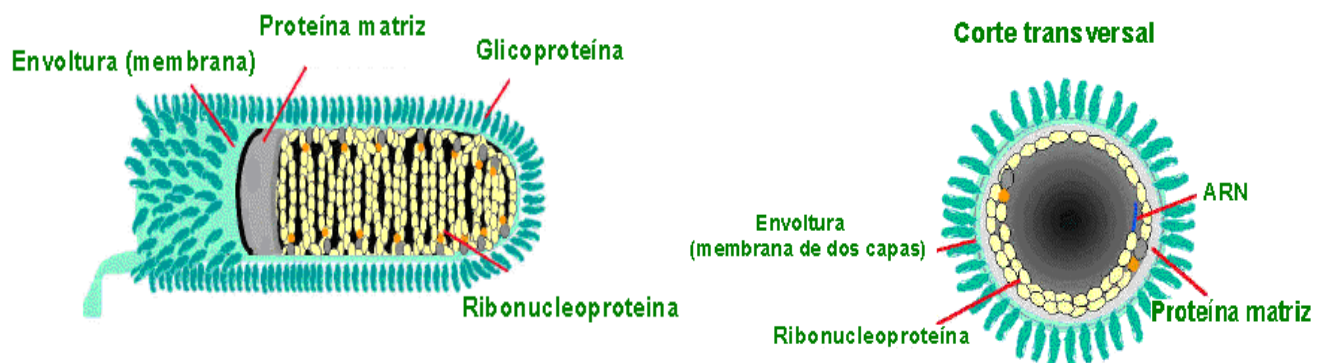
ubicada en la parte interior de la cobertura del virus, y la glicoproteína (G), la cual forma las proyecciones de la superficie.

Tanto el virus de la rabia como los virus relacionados con ella tienen la misma estructura genómica.

De las cinco proteínas la G y la N son las más extensamente caracterizadas. La G constituye el único antígeno que induce anticuerpos neutralizantes de virus. La proteína N es un antígeno importante capaz de inducir las células T de ayuda que reaccionen en forma cruzada entre diferentes virus de la rabia y el virus relacionado con él.

Ambas son los principales antígenos capaces de inducir inmunidad contra una infección rábica letal, por lo que sería lógico incluirlas en la elaboración de vacunas manipuladas genéticamente. (OMS, 1992) (Loza y Aguilar, 1998)

Figura 1. Composición molecular del virus de la rabia.



2.2.3 Propiedades del virus:

La infectividad viral es estable a pH entre 5 a 10 e inestable a pH 3.

Se inactiva rápidamente a 56° C por 30 a 60 minutos; sensible a ebullición de 15 minutos de calentamiento a 70° C, muere con la luz ultravioleta, rayos X, éter, cloroformo, detergentes, etanol 45-70%, preparados yodados, cloruro mercúrico,

amonio cuaternario; así como con hipoclorito de sodio. (Loza y Aguilar, 1998)
(Merchant y Packer, 1975)

2.2.4 Virus fijo de Laboratorio.

Es el virus que Luis Pasteur obtuvo en su laboratorio a través de pasajes sucesivos del virus calle en cerebros de conejo. Se le llama así porque, cuando es inoculado por vía intracerebral a ratones o conejos, los mata en un período fijo de 7 días. Entre sus atributos se pueden mencionar:

- Es prácticamente apatógeno por Sistema Nervioso Periférico (factor muy importante en la elaboración de vacunas).
- No produce cuerpos de inclusión de Negri en las neuronas.
- Inoculado por vía intracerebral a ratones adultos los mata en 7 días.
- No invaden las glándulas salivales. (Bernal, 2005)
- Se multiplica más rápidamente en el cerebro y se encuentra mayor cantidad de virus.
- Se hace menos virulento para otros hospedadores distintos del que ha servido para la fijación.
- Es de uso casi exclusivo de la producción de vacuna. (Merchant y Packer 1975).

Cuadro 1. **Diferencias entre el virus fijo y el virus calle**

Virus calle	Virus fijo
Se encuentra circulando entre los animales sin modificaciones por laboratorio	Cepas adaptadas al laboratorio
Periodo de Incubación: Variable	Período de Incubación: corto(4-6 días)
Invade glándulas salivales	No invade glándulas salivales

2.3 GENERALIDADES DE LAS VACUNAS

Las vacunas son productos biológicos obtenidos de bacterias o virus debilitados o muertos, sustancias sintetizadas por los mismos microorganismos (toxinas), productos obtenidos por ingeniería genética o por unión de sustancias (proteínas y polisacáridos), etc. (Blanco y Jiménez, 2003).

La vacuna típica proporciona al sistema inmunitario copias inocuas de un antígeno, que es una porción de la superficie de una bacteria o un virus que el sistema inmunitario reconoce como “extraña”. Los antígenos (fracción antigénica) a menudo tienen alguna función en el desencadenamiento de la enfermedad, por ejemplo facilitando que el virus o la bacteria se adhiera a las células. Otras vacunas inoculan una versión inactiva de una toxina (una sustancia tóxica producida por una bacteria) para que el organismo pueda organizar una defensa contra ella. (OMS, 2005).

2.4 HISTORIA DE LAS VACUNAS

La búsqueda de tratamientos para prevenir las enfermedades infecciosas ha sido un objetivo de los médicos desde tiempos remotos. Se considera que las vacunas son sustancias generalmente fabricadas a partir de microorganismos patógenos para el hombre que, al ser administradas, producen defensas frente a la enfermedad que se quiere prevenir.

La primera evidencia escrita relacionada con los procesos de vacunación data del siglo XI y se encuentran en la literatura china. A una monja budista se le atribuye un texto llamado “El tratamiento adecuado de la viruela”, otro libro chino “El espejo dorado de la Medicina” describe diferentes formas de inoculación antivariólica en la que se explica como se puede prevenir el contagio de viruela inoculándose con pus proveniente de pacientes que habían contraído la enfermedad.

Esta práctica fue conocida en Gran Bretaña hasta 1721 pues Lady Mary Wortley Montagu, esposa de un embajador, la introdujo a este país tras su regreso de Constantinopla. (López, 2000).

Posteriormente el médico británico rural Edward Jenner inventó en Inglaterra la primera vacuna contra la viruela en 1796, su famoso experimento de inmunización con linfa de viruela vacuna, condujo a la era de la vacunación. La palabra “vacuna” proviene del latín *vacca* que significa vaca. (Valdés, 2005).

Después de Jenner, el siguiente eslabón en la historia de las vacunas es Louis Pasteur (1822-1895), artífice del desarrollo de la Bacteriología como nueva rama de la ciencia médica en las postrimerías del siglo XIX. El mayor avance desde el invento de la vacuna contra la viruela fueron los estudios de Pasteur sobre la atenuación del cólera de las aves. Según Pasteur, al administrar una forma debilitada o atenuada del mismo microorganismo que produce la infección se conseguirían unas defensas más puras que si introducimos un germen productor de otra enfermedad similar a la que se quiere prevenir. (López, 2000).

2.5 TIPOS DE VACUNAS ANTIRRÁBICAS

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

1. Vacunas inactivadas: No se puede determinar la presencia del virus residual. Se distinguen en este grupo las elaboradas con virus fijo en tejido nervioso y elaboradas en cultivos celular (Chang, 1989).

Las ventajas de las vacunas a base de microorganismos inactivados, consiste en que son seguras con respecto a la virulencia residual, y relativamente fáciles de almacenar, toda vez que los microorganismos ya estén muertos.

Es importante que desde el punto de vista antigénico, los microorganismos inactivados sean lo mas similares posible a los microorganismos vivos. Los agentes

alquilantes producen uniones cruzadas en las cadenas de los ácidos nucleicos, también son suficientes para matar a los microorganismos, ya que no interfieren con su antigenicidad. Por ejemplo, el óxido de etileno, etilenoimina, acetiletienoimina y propiolactona beta. (Tizard, 1998).

2. Vacunas Atenuadas o de Virus Vivo Modificado (VVM)

Requieren necesariamente una concentración determinada de virus viable para poder ser consideradas como tales.

Entre las vacunas de virus vivo se encuentran las preparadas en embrión de pollo mediante un reducido número de pases, o de alto número de pases, y la elaborada en riñón de cerdo (Cepa ERA).

Las vacunas según el tipo de tejido se dividen en:

1. Vacuna de Encéfalo de Rata Lactante: se utilizan ratas lactantes de 4-8 días de edad; para la infección se emplea la Cepa Pasteur de virus fijo, que ha sido sometida a 3249 pases por cerebro de conejo.

2. Vacuna de Tipo Simple: Es una emulsión al 10% de cerebro de conejo infectado con virus de rabia inactivado con fenol, que presenta el riesgo de producir una encefalomielitis alérgica, en el 0.01-3% de los casos, de los cuales el 20% mueren y otro 30% sufre secuelas permanentes.

3. Vacuna de Tipo Fermi: Consiste en una suspensión acuosa al 5% de tejido encefálico de cordero o de cabra inoculado con virus rábico fijo.

Aunque esta vacuna se suele clasificar como una vacuna inactivada, contiene una cantidad precisamente determinada de virus activo y, por lo tanto, es una vacuna mixta atenuada e inactivada.

La ventaja de este tipo de vacuna es su facilidad de preparación; sin embargo existe la evidencia de los accidentes ocurridos en Brasil donde se presentaron 18 casos de rabia en personas tratadas con vacuna de este tipo y en consecuencia la Organización Mundial de la Salud no recomendó su uso en seres humanos.

4. Vacuna de Cerebro de Ratón Lactante (CRL) tipo Fuenzalida y Palacios: es una suspensión de virus rábico al 1% de CRL infectado con virus fijo centrifugado y completamente inactivada.

Actualmente ya no se utilizan las vacunas tipo Fermi, Semple y de Cepa ERA. Hoy en día las vacunas más difundidas son la CRL, las de cultivos celulares y las recombinantes.

Las de cultivos celulares son:

- Vacuna HDCV (*Human Diploide Cell Vaccine*).
- Vacuna RVA (*Rabies Vaccine Adsorbed*).
- Vacuna BHK (*Baby Hamster Kidney*).
- Vacuna PCEV (*Purified Chick Embryo Vaccine*).
- Vacuna PDEV (*Purified Duck Embryo Vaccina*).
- Vacuna PVRV (*Purified Vero cell Rabies Vaccine*).

La vacuna disponible en España es la HDCV (*Human Diploide Cell Vaccine*).

Es una vacuna de cultivos celulares constituida por una suspensión concentrada, estabilizada y liofilizada, de virus de la rabia, cepa Wistar Pitman-Moore L503-3M cultivados en células diploides humanas e inactivadas con beta-propiolactona contiene neomicina y agua destilada como disolvente.

Las ventajas de la vacuna HDCV es que está libre de proteínas heterólogas, induce una elevada inmunidad y presenta una muy buena eficacia. El principal inconveniente es su elevado precio.

Todas las vacunas de cultivos celulares tienen una eficacia parecida y están libres de reacciones alérgicas importantes. Si es necesario, pueden intercambiarse en el mismo paciente cuando se utilizan por vía intramuscular. (Blanco y Jiménez, 2003).

Las vacunas recombinantes se usan solo las partes específicas del virus que necesita el animal para quedar protegido y se eliminan todas las partes patógenas o

sea todo aquello que pueda causar algún daño al animal incluso llegar a producir la enfermedad.

Existen tres categorías de vacunas recombinantes.

Tipo 1: vacuna de sub-unidades.

Tipo 2: vacuna con remoción de genes.

Tipo 3: vacuna con un vector viral.

En el mercado hay varias vacunas disponibles; incluso en Estados Unidos y Europa se utiliza una vacuna **contra la Rabia vía oral** que se administra mediante cebos a zorros o mapaches jóvenes y adultos, provoca títulos elevados de anticuerpos neutralizantes de virus y confiere protección contra una prueba de desafío. Gracias a éste tipo de tecnología segura y efectiva se está eliminando el gran problema que existe de rabia en esos países. (Fernández. 2006). (OMS, 1992).

2.6 HISTORIA DE LA VACUNA DE CEREBRO DE RATON LACTANTE

La elaboración de la vacuna contra la rabia ha despertado mucho interés en diversos científicos, siendo Pasteur uno de los principales pioneros quien administró la vacuna en humanos por primera vez el 6 de julio de 1885, por vía subcutánea y, consistía de extractos de médula espinal de conejos conservada en un frasco abierto durante 15 días, con la cual se obtuvieron resultados favorables en la prevención de la rabia en humanos (Baer, 1975).

Para la elaboración de la vacuna CRL, se utilizan como materia prima cerebros de ratones lactantes de 5-6 días de nacidos; ya que desde 1947 Kabat y Col., demostraron que los agentes encefalitogénicos presentes en los cerebros de animales adultos, no existían o no se detectaban en los cerebros de los mismos animales recién nacidos. Posteriormente en 1962, Svet Moldavsky realizó un estudio similar en diferentes especies de animales y a diferentes días de nacidos para determinar la fecha de aparición de estos componentes encefalitogénicos; en el caso de los ratones se comprobó su presencia a partir del noveno día de nacidos (Chang, 1989).

La vacuna de Cerebro de Ratón Lactante (CRL) se preparó por primera vez en el Instituto Bacteriológico de Chile en 1954. Al principio esta vacuna se aplicó a los perros y el uso en el hombre empezó a título experimental en 1960. De 1960 a 1962 se hicieron 2400 tratamientos controlados en humanos y desde entonces, la vacuna CRL ha sido la única utilizada en Chile, tanto en el hombre como en el perro. Se usa también en la mayor parte de los demás países sudamericanos y en México para la profilaxis de la rabia humana. En Argentina, Chile y Uruguay se emplea comúnmente en los programas de lucha contra la rabia canina o para humano (Kaplan y Koprowski, 1976).

Hasta la década de los 60, la vacuna que elaboraba y aplicaba el Instituto Pasteur de tejido nervioso de conejos adultos inactivada con formol, era una vacuna más segura que la original desarrollada por Pasteur, por haberse reemplazado el proceso de atenuación del virus por desecación, a una inactivación química por acción del formol; sin embargo el valor antigénico era reducido (Baer, 1975).

Fuenzalida y Palacios en el año de 1954 se basaron en estas experiencias y en la comprobación de que los cerebros de los ratones lactantes actuaban como mejores antígenos que los adultos, por presentar una mayor concentración del virus al final del periodo de incubación, por lo cual prepararon una nueva vacuna antirrábica. Con el fin de minimizar el riesgo de la presencia de la mielina en el material cosechado para la producción de vacuna, se introdujo dicha modificación en el método original, descrito por Fuenzalida y Palacios. Al compararla con las primeras vacunas de tejido nervioso, la CRL tiene una mayor concentración de antígenos en un menor volumen de tejido nervioso.

América Latina y el Caribe elaboraron durante 1985 más de 5,200,000 dosis de vacuna de CRL en 19 laboratorios productores oficiales para la vacunación de los tres millones de personas que anualmente requieren tratamiento antirrábico, según la información enviada por los países al Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO). Las vacunas de uso veterinario son elaboradas por laboratorios oficiales y algunos privados. En 1985, los primeros produjeron alrededor de 25

millones de dosis, de las cuales 87% fueron de vacuna CRL. (Datos inéditos Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, 1986).

Actualmente esta vacuna se encuentra mas difundida en América Latina, tanto para el control de la rabia canina, como para su uso en el tratamiento antirrábico humano (Acha y Szyfres, 2003).

Según el Comité de Expertos en Rabia se destaca la importancia de verificar la actividad de cada lote de vacuna antes de autorizar su empleo. En nuestro país, a los comienzos de los años de producción (1994) el nivel mínimo establecido de potencia para este tipo de vacuna es de 0.6 UI para vacuna humana y, 0.8 UI para uso canino, aunque los expertos en rabia de la OMS recomiendan que la potencia mínima de la vacuna debe de ser de 1.3 UI al menos para uso humano (Guarnera, 1993). Y en los últimos años se ha tenido que alcanzar esos valores exigidos.

PRODUCCION DE VACUNA CRL

En El Salvador en el año 1994 se inició un proyecto en el Laboratorio de Productos Biológicos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, con la ayuda de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Instituto de Salud Publica de Roma, para la elaboración de la vacuna de tipo CRL. Anteriormente la vacuna era obtenida por donaciones de organizaciones y países amigos.

A partir de ese mismo año se inicio la producción de la vacuna en nuestro país, y es elaborada de la siguiente manera:

Se utiliza como materia prima ratones albinos suizos, **linaje n: NIH (s)**, provenientes del Laboratorio del **Instituto Nacional de Salud (NIH)** de Virginia de los Estados Unidos de Norte América desde el año 1993, cepas de virus fijo 51 de origen canino y **CVS** de Pasteur que se le utiliza también para el control de calidad antigénica de vacunas antirrábicas.

2.7.1 Preparación del virus semilla y virus trabajo.

VIRUS SEMILLA: La cepa liofilizada certificada, se diluye con **suero de carnero al 2%**, el cual se prepara filtrando en un embudo de porcelana y papel filtro e inactivando el suero a 56° C para congelarlo a ultrabaja temperatura en alícuotas de 10 ml hasta el día de su uso; posteriormente se descongela y se afora 2ml de suero a 100 ml de solución fisiológica más antibiótico al 0.1%. Luego se hacen diluciones hasta 10^{-3} que es la que contiene aproximadamente unas 1000 DL₅₀ y la que se ocupa para la inoculación, con la cual se procede a inocular los ratones.

Estos se mantienen en observación y cuando se encuentran en estado de postración se sacrifican con éter ó cloroformo; se realizan varias lavadas con agua y enseguida se desinfectan con fenol al 5% por 10 minutos; se dejan escurrir por un tiempo prudencial y en una cámara de flujo laminar se les extrae manualmente el cerebro asépticamente; utilizando tijeras y pinzas de disección estériles. El tejido cerebral cosechado se coloca en frascos estériles y se prepara una suspensión al 20%, siempre con diluyente de suero de carnero al 2% refrigerado (este puede ser además de equino y conejo) y se procede a la molienda en 3 tiempos de 1 minuto cada uno intercalando 1 minuto de reposo entre cada molienda.

Esta suspensión al 20% se somete a centrifugación a una velocidad de 2500 RPM durante 5 minutos.

El sobrenadante obtenido se distribuye en viales con alícuotas de 0.5 mL cada uno y se identifican como “virus semilla”.

Estos frascos se guardan a ultra baja temperatura (-65 a -70⁰ C) y posteriormente se procede a las diferentes pruebas de control de calidad.

VIRUS TRABAJO: Para la elaboración de este virus se siguen los mismos pasos que el anterior, a partir de un vial de virus semilla.

NOTA: El título mínimo que debe tener el “virus trabajo” es 10^6 ; para ser considerado como satisfactorio para la producción de vacuna antirrábica en las diferentes etapas (preparación de inóculos, desafíos de vacunas, y también en las pruebas de

sueroneutralizaciones del personal de laboratorio). La titulación se repite necesariamente cada 6 meses.

2.7.2 Método de producción de vacuna antirrábica.

Los tipos de virus que se utilizan en este laboratorio para la producción de vacuna antirrábica son:

CVS solo para vacuna humana (Monovalente) y **CVS** con cepa **51** se utiliza en vacuna de uso canino (Bivalente).

2.7.2.1 Preparación del inóculo.

A partir de un vial de “virus trabajo” (CVS y 51) se preparan diluciones que contengan entre **750 y 1000 DL₅₀/0.01ml** con diluyente de suero de carnero al 2%, El volumen de este inóculo se prepara de acuerdo al número estandarizados de ratones a inocular.

1. Inoculación de los ratones.

Los ratones lactantes utilizados para la fabricación de vacuna humana deben tener como máximo 1 día de nacido y para la fabricación de vacuna canina de 5 a 6 días.

La inoculación se hace intracerebralmente inyectando 0.01 ml de la dilución previamente determinada, y para ello se utiliza jeringa de 1 ml. Finalizada la inoculación de cada camada de ratones, se reintegran al estante donde permanecerán con sus respectivas nodrizas hasta el día de cosecha (3 días).

2. Cosecha de Cerebros.

Al finalizar el tiempo de incubación de 72 horas después de su inoculación, se recolectan solo los animales vivos y se sacrifican con éter o cloroformo, específicamente para vacuna canina que rutinariamente se hace los días lunes y jueves de cada semana. Para la vacuna humana, los ratones se sacrifican por congelación a ultra baja temperatura y se van acumulando hasta tener un número adecuado para poder producir entre 10,000 y 12,000 dosis por lote.

Los ratones colectados se desinfectan con fenol al 5%, sumergiéndolos durante 10 minutos; se escurren y se mantienen a temperatura de refrigeración hasta el momento de la extracción.

La cosecha de los cerebros se realiza mediante succión por vacío, y dicha extracción se realiza dentro de cámara de flujo laminar utilizando aguja de calibre No. 18 x 1 ½ de largo

Todos los frascos con tejido cerebral se almacenan a ultra baja temperatura (-58 a -62 °C) hasta el momento de su uso previamente identificado.

2.7.2.2 Fabricación de la vacuna.

Para la fabricación de la vacuna se esteriliza el cubículo de trabajo durante 6 horas mediante nebulizaciones con soluciones desinfectantes y encendido de lámpara ultravioleta, previo a la fabricación de la vacuna.

En el día anterior por la tarde se descongelan los frascos con tejido a ser utilizado en la fabricación y se guardan en refrigeración entre 2- 8 °C.

Posteriormente se realiza la molienda del tejido nervioso que contienen dichos frascos sumando 600 gramos de cepa 51 e igual cantidad de cepa CVS. Se decantan a un frasco especial para su respectiva molienda a una concentración del 50% (p/v), o sea, utilizando 600 ml de diluyente para vacuna.

Dicha molienda se realiza en frascos de 2 Litros en 3 tiempos alternos de 1 minuto y ½ minuto de descanso; finalmente se deja reposar por 10 minutos, manteniéndose durante todo el proceso de molienda en agua con hielo.

CENTRIFUGACION: PREPARACION DE LA SUSPENSION AL 20% PARA USO CANINO Y AL 10% PARA USO HUMANO.

a) La suspensión al 20% en el caso de vacuna canina y al 10% en el proceso de vacuna humana, se distribuye en 4 frascos de centrífuga de 1,000 ml, a una velocidad 2,800 R.P.M durante 15 minutos.

b) Se separa el sobrenadante por decantación.

- c) Se compensa la pérdida ocasionada en la centrifugación de la suspensión al 20%, específicamente en la elaboración de vacuna canina y en seguida se duplica el volumen para obtener una concentración al 10%. Si al final se obtiene una potencia próxima a la establecida (1UI), se diluirá finalmente conforme al sobrenadante obtenido al 20%. En el caso de vacuna de uso humano, no se recupera el precipitado y se lleva a su dilución final a partir del cálculo según sobrenadante.
- d) De la concentración al 10% se toma una muestra para elaborar las pruebas de recuento bacteriano, titulación viral y un volumen para memoria que se guarda a ultra baja temperatura. El título mínimo de virulencia debe ser $10^{6.5}$ DL₅₀/0.03 ml en ratones de 11-15 g
- e) Para los primeros controles de calidad las vacunas se dejan en las siguientes concentraciones: vacuna canina al 10% y vacuna humana al 5%.

FASE DE INACTIVACION.

En el Laboratorio se utiliza la inactivación química con el reactivo β -Propiolactona en una proporción de 1:4000 utilizando una pipeta y se toma el volumen predeterminado de β -Propiolactona diluyéndola en un beaker que contenga diluyente para vacuna; refrigerado en una proporción de 1:10, y se agita hasta lograr hidrolizar el químico.

La β -Propiolactona diluida se agrega a la suspensión viral, agitándola a temperatura ambiente por 30 minutos; se agrega también Fenol (1:1000) el cual se diluye 1:10 y se utiliza mertiolate al 10%(1:1000).

Se controla el PH de la vacuna que debe estar entre los rangos de 7.2-7.4, especialmente durante los primeros 3 días, utilizando solución tampón GLICOCOLA; de la siguiente manera:

1^{er} control: Se hace en las primeras 24 horas, ya que en esta fase es donde la vacuna concentrada se acidifica más significativamente por la acción de la β -Propiolactona.

2^o control: Se hace a las 72 horas, y se toma una muestra representativa de 2 ml, para la prueba de potencia (NIH). Después de este control se deja en reposo hasta su dilución final.

Si se obtienen los resultados satisfactorios, se procede a la dilución final hasta obtener una concentración del 2% para uso humano y del 4% para uso canino; completándose la cantidad de fenol y tiomerosal a cada una de las vacunas sin perder la relación de 1:1000; quedando lista para su respectivo envase.

ENVASE

Para la distribución de la vacuna a granel se utiliza una pipeteadora automática y frascos de 10 ml (10 dosis) para vacuna humana y de 50 ml (50 dosis) para uso canino.

En la identificación de los frascos se detalla el nombre del Laboratorio productor, Tipo de vacuna, concentración, N° de ml por dosis, número de lote y la fecha de expiración.

Del total de frascos se obtienen al azar 5 frascos de 50 ml para uso humano y 5 de 250 ml de uso canino con el fin de efectuar controles de esterilidad.

Producción de lotes y dosis de vacunas del Laboratorio de biológicos del MSPAS:

En el 2004 y 2005 se fabricaron 38 lotes y cada uno de ellos contenía 30,000 dosis haciendo un total de 1, 140,000 dosis de vacuna. Y el 2006 produjo 49 lotes con también 30,000 dosis haciendo un total de 1, 470,000.

El Laboratorio Nacional de Control de calidad será el primer ente verificador de la vacuna antirrábica fuera del Laboratorio Productor.

2.7.2.3 Requisitos de potencia

El Comité recomendó que no se autorice el uso de vacunas inactivadas de uso veterinario con una potencia de menos de 1,0 IU por dosis, medida por la prueba NIH, a menos que se haya demostrado, mediante un experimento adecuado, que la inmunidad que confieren esas vacunas dura un año, como mínimo, en las especies en las cuales ha de ser empleada la vacuna. (OMS, 1992).

3. DESCRIPCION DEL PROBLEMA

La rabia es un problema de salud pública muy importante de los países en desarrollo, principalmente por el mantenimiento del ciclo tanto urbano (perros, gatos), como silvestre (murciélagos y otros animales como zorro y el mapache) (MSPAS, 2006).

Por ser considerada una de las principales zoonosis a nivel mundial, y carecer de tratamiento, la única forma de controlar esta enfermedad es a través de un plan preventivo.

En nuestro país, una de las formas de prevenir la rabia es a través de la aplicación de una vacuna de buena calidad a aquellos animales de compañía mayormente involucrados en la transmisión de la rabia, principalmente la especie canina. Por lo cual el MSPAS realiza campañas de vacunación a nivel nacional para tratar de reducir los problemas de rabia.

A pesar de los esfuerzos que realiza la Institución, según registros año con año se presentan numerosos casos de rabia canina, incluso en aquellas áreas donde se han desarrollado campañas de vacunación. Esta situación puede obedecer a diferentes causas entre las cuales podría destacarse el diseño de las campañas de vacunación (cobertura), manejo inadecuado (como cadena de frío, mala aplicación) o la calidad inmunogenica de la misma ya que a la fecha no se han realizado estudios en donde se determine la eficiencia de la vacuna aplicada a los caninos mediante la prueba de seroneutralización, para determinar si los niveles de protección que confiere la vacuna tipo CRL son los valores que establece la OMS.

4. JUSTIFICACION

La rabia es una zoonosis que afecta al sistema nervioso central (SNC), que se observa en todos los animales de sangre caliente. Se transmite por la inoculación de virus rábico contenido en la saliva de un animal infectado, principalmente por mordedura. Según estadísticas de la Organización Panamericana de la Salud, en el año 2000, el principal animal transmisor de esta enfermedad a nivel mundial fue el perro con el 73,1% de los casos; los demás se distribuyeron en murciélagos, gatos, zorros y monos (MSPAS, 2006).

Para la prevención y control de la rabia en nuestro país se realizan campañas de vacunación periódicas donde se aplica la vacuna tipo CRL al 4%, con dosis de 1 mL por animal (MSPAS, 2006).

En El Salvador, según datos del MSPAS, en los últimos cinco años se registraron numerosos casos de humanos mordidos por animales transmisores de rabia, entre los cuales se implica principalmente al perro (MSPAS, 2006).

Cuadro 2. Casos de personas mordidas por animales transmisores de la rabia

Casos/Años	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Personas mordidas por animales transmisores de Rabia	21,650	23,365	38,202	33,562	28,381	29,919	4,435*

*Hasta el 22 de febrero del 2007. (Mena y Zúñiga, 2001) (MSPAS, 2004-2007).

Cuadro 3. Casos de Rabia Humana

Casos/Años	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Rabia Humana		3	6	4	1	2	1

(Mena y Zúñiga, 2001) (MSPAS, 2004-2007).

Así mismo, los casos de rabia en caninos continúan siendo los mas significativos, tal y como se demuestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 4. Casos de rabia, por especie animal y año, diagnosticados por MSPAS y MAG

Año/ Especie	CANINA	FELINA	BOVINA	M.H *	PORCINA	FAUNA SALVAJE **	OTROS	TOTAL
2003	207	31	5			1	1	244
2004	195	34	21		1	1		252
2005	128	11	28	6		2		175
2006	178	33	342	1	3		1	240
TOTAL CUATRIENIO	708	99	88	7	4	4	2	912

*: Murciélagos Hematófagos.

** : Animales en cautiverio como Mapache, Criseto y Zorrino.

En el cuatrienio 2003 - 2006 el MSPAS ha vacunado un promedio de 785,202 caninos anualmente contra la rabia con coberturas variables. Los casos de dicha enfermedad en esa especie se han reducido de 207 a 128 del 2003-2005, lo cual

demuestro que en alguna medida las campañas de vacunación han tenido un efecto positivo, sin embargo, en el 2006 los casos aumentaron a 178, de ahí la importancia de la adecuada y eficaz vacunación en dicha especie (Ver Gráfico A N° 1).

Por otro lado, en el año 2005 se constató por primera vez la existencia del virus rábico en murciélagos hematófagos (vampiros), lo cual confirmó la presencia de rabia aérea, lo que se relaciona con un incremento en número de casos registrados en los bovinos (Vargas, 2005). Registros del año 2006 señalan la presencia del virus en dicha especie en el sur del departamento de La Paz.

Cuadro 5. Casos de rabia en zona urbana y rural

ORIGEN	2004		2005		2006	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
RURAL	122	48.4	120	68.2	131	53.9
URBANO	130	51.6	56	31.8	112	46.1
TOTAL	252	100	176	100	243	100

Esto nos demuestra que en los últimos tres años, y probablemente desde mucho tiempo atrás, el perro es el animal con mayor número de casos de rabia y el principal transmisor de la enfermedad. Además como lo muestra el cuadro N° 5 la frecuencia de casos de rabia tanto a nivel urbano como rural es similar.

Sin embargo el problema que se plantea en el presente estudio obedece a que existen reportes oficiosos de casos confirmados de rabia en perros con historial de vacunación reciente, lo que crea dudas sobre la eficacia y la calidad de la misma.

Debido a que en nuestro país no se han realizado investigaciones sobre los niveles de protección que confiere directamente a los caninos la vacuna elaborada en el MSPAS, el presente estudio contribuirá a complementar su evaluación.

En la investigación se observará la respuesta serológica en caninos de dos a seis meses de edad vacunados por primera vez contra la rabia, lo que evita la posibilidad que los cachorros presenten títulos de anticuerpos por vacunaciones anteriores; como es el caso de los perros adultos. De esta manera, se conocerá si ésta proporciona un nivel de protección adecuado a dichos caninos al momento de enfrentarse a una exposición al virus calle de la rabia, brindando de esta manera una mayor confianza a las campañas de vacunación del MSPAS.

5. HIPOTESIS DE LA INVESTIGACIÓN.

H₀: La vacuna antirrábica de Cerebro de Ratón Lactante proporciona niveles satisfactorios de protección a los perros vacunados, comprobado con la respectiva titulación de anticuerpos.

6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

General:

Medir los títulos de anticuerpos que produce la vacuna antirrábica para caninos elaborada en El Salvador, para verificar el nivel de protección inmunológica que proporciona a dicha especie.

Específicos:

- Establecer la metodología para el uso de la técnica de seroneutralización en caninos con el fin de evaluar la efectividad de la vacuna.
- Comparar la respuesta inmunitaria con respecto a la edad de los caninos en estudio para evaluar la respuesta óptima.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Generalidades.

7.1.1. Ubicación del estudio:

Los lugares donde se llevó a cabo nuestra investigación fueron:

1. Las instalaciones del Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Control de Calidad específicamente en el área de Diagnóstico de Rabia de la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería, ubicado en El Cantón Matazano, municipio de Soyapango, en el cual se realizó la prueba de seroneutralización.

2. Casas particulares ubicadas en tres municipios del área metropolitana del Departamento de San Salvador y La Libertad donde habían nacido y permanecido los animales de experimentación a todo lo largo de su vida. Los sitios fueron los siguientes: San Salvador, 11 caninos en los barrios La Vega y San Jacinto; colonias Santa Marta, La Campiña y La Cima. De Mejicanos 3 caninos en Zacamil. De Soyapango 1 canino en Reparto Santa Cecilia. De Nueva San Salvador 5 caninos en Pinares de Suiza, Hacienda San José y Jardines de Merliot.

Duración de la Investigación:

La investigación se realizó durante los meses de mayo a diciembre de 2006.

El tiempo que duró el proyecto de investigación es de aproximadamente 7 meses, finalizando con la presentación del informe final en el mes de marzo de 2007.

El estudio se dividió en dos fases: una de campo (registro de caninos, toma de muestras y vacunaciones) y otra de laboratorio (prueba de seroneutralización).

Descripción de las unidades en estudio:

Para el estudio se utilizaron caninos no vacunados contra la rabia con edades entre 2 y 6 meses, seleccionados sin especificación de razas, posteriormente vacunados contra la rabia con vacuna CRL y manejados en condiciones similares.

7.3 METODOLOGIA DE CAMPO:

7.3.1 Toma de datos:

Para la toma confiable de datos se utilizó una ficha de registro de los caninos con la información siguiente: nombre del propietario, dirección, teléfono, identificación del perro, número, nombre, sexo, fecha de nacimiento, peso, color, raza, tamaño, fecha de vacunación, lote de vacuna, fecha de toma de muestra de sangre del día 0 y día 21 postvacunación y también el título obtenido terminada la prueba de laboratorio (ver Anexo 1).

7.3.2 Toma de muestra.

Se colectaron muestras de sangre de 20 caninos aparentemente sanos y de diferentes razas, con edades entre 2 a 6 meses; el día 0, 5 mL de sangre de la vena safena o cefálica y se administró 1 mL por vía subcutánea de la vacuna antirrábica CRL, la cual fue obtenida de los lotes 07 y 11 escogidos al azar, de la producción del laboratorio de biológicos del MSPAS. Para tal fin los perros se distribuyeron en dos grupos de 10 cachorros cada uno, el grupo 1 fue inoculado con vacuna del lote 07 y el grupo 2 con el lote 11. Se proporcionó una cartilla de vacunación a los dueños. Los perros se mantuvieron por 21 días en sus domicilios y se les administró una ración diaria de concentrado durante dicho periodo. Así mismo se instauró un plan profiláctico previo al estudio, el cual consistió en la aplicación de un desparasitante a base de Ivermectina por vía subcutánea en dosis de 0.06 µg por Kg de peso vivo, incluyendo además una desparasitación vía oral (Prazicuantel, Pirantel y Febantel) a razón de una tableta por cada 10 Kg. de peso vivo, la cual se inició un mes antes de comenzar la investigación. Además se aplicó una vacuna múltiple, compuesta por los siguientes antígenos virales: Parvovirus, Adenovirus tipo 2, Parainfluenza, Distemper y bacteria inactivada de *Leptospira*, a dosis de 1 ml por vía subcutánea, dieciséis días antes de administrar la vacuna antirrábica.

A los 21 días de la primovacunación se realizó otra toma de sangre a cada perro, obteniendo así un total de 40 muestras.

7.3.3 Materiales utilizados:

- Desparasitantes: Prazicuantel, Pirantel, Febantel e Ivermectina.
- Vacuna Múltiple.
- Vacuna antirrábica CRL.
- Concentrado comercial.
- Tubos de ensayo.
- Jeringas de 5 ml.
- Hieleras.
- Hielo.
- Bozales.
- Alcohol.
- Algodón.

7.4 METODOLOGIA DE LABORATORIO

7.4.1 Inmunización de personal involucrado

Antes de iniciar la fase de laboratorio, las personas involucradas en el presente estudio se sometieron a la prueba de seroneutralización, resultando que todas poseían títulos mayores al de referencia; por lo cual, por razones de seguridad solamente se aplicó una dosis de refuerzo. Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Productos Biológicos del MSPAS anexo a la DGSVA.

7.4.2 Prácticas de Manejo

Durante un periodo de cuatro semanas se realizaron prácticas de manejo proporcionadas por personal especializado en los laboratorios del MSPAS y del MAG como lo fueron: organización de un bioterio de ratones, aspectos reproductivos, normas de bioseguridad, sujeción e inoculación intracerebral, manejo de equipo de laboratorio y diluciones de virus a partir de un título conocido.

7.4.3 Procedimiento de Laboratorio

El suero sanguíneo obtenido fue inactivado en baño maría a 56° C por 30 minutos, para suprimir la actividad del sistema del complemento (Rovozzo y Burke, 1973), luego fue almacenado en congelación a -76 y/o -80° C, en el área de Diagnóstico de Rabia hasta el día de su análisis.

Se dispuso de un bioterio de ratones albinos, en los cuales se realizaron 7 cruces de reproductores cada 15 días, con 30 hembras y 10 machos por cruce y se ubicaron tres hembras por macho, se llevó un registro de los cruces y partos (ver Anexo 2 y 3); 15 días después las hembras evidentemente preñadas fueron separadas en jaulas individuales para controlarlas al momento del parto; 21 días después los ratones nacidos con peso de 11 a 14 g, fueron distribuidos en número de ocho por jaula para la inoculación intracerebral de cada una de las diluciones según técnica descrita mas adelante.

Los ratones fueron manejados en jaulas que estuvieron en el Laboratorio de Diagnóstico de Rabia bajo un ambiente controlado, alimentación de concentrado especial y agua *ad libitum*.

Se realizaron 7 pruebas de seroneutralización cada 15 días hasta finalizar con las 40 muestras.

Por cada muestra sanguínea se utilizaron cuatro jaulas de siete a ocho ratones cada una identificada con los datos del canino y su respectiva dilución 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, y tres jaulas más para los testigos identificados con la dilución respectiva del virus; (Palomo y Aguila, 1981) (Chang, 1989); utilizando un total de 216 ratones de 21 días para seis muestras problema.

La observación de los ratones inoculados se realizó diariamente hasta cumplir 14 días que es cuando finaliza la lectura de la prueba, se llevó un registro en el cual se detallaron los cambios que sufrieron los ratones tales como: erizamiento (sospechosos), parálisis del tren posterior, postración y muerte (ver Anexo 4 y 5).

Posteriormente se evaluaron los resultados con el cálculo de Reed y Muench para obtener la titulación de cada suero.

7.4.3.1 Técnica de Seroneutralización para determinar anticuerpos contra la rabia.

Seroneutralización: prueba utilizada para determinar la cantidad de anticuerpos neutralizantes presentes en un suero.

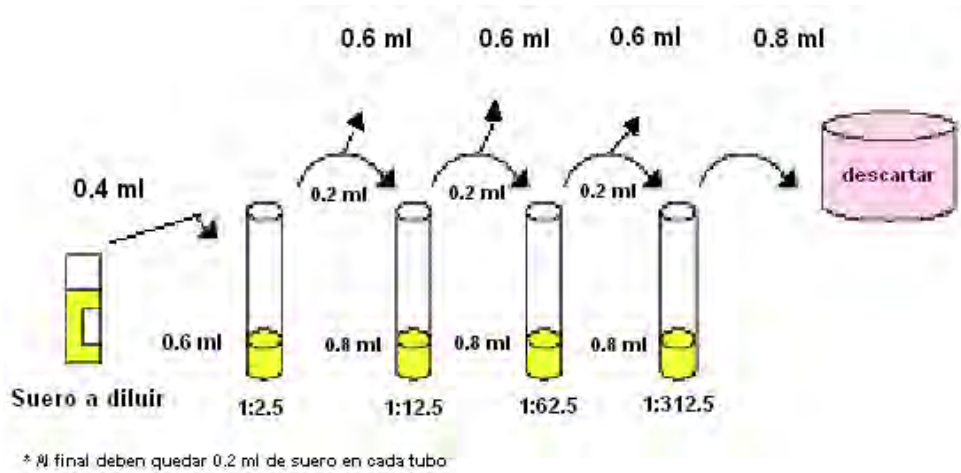
Dilución del suero problema frente a virus constante (Se calcula entre 20 a 64 DL_{50})*¹.

1. Se inactivaron los sueros por 30 minutos a 56° C y se mantuvieron en congelación a -76 y/o -80° C hasta el día en que se realizó cada prueba.
2. Se rotularon cuatro tubos de ensayo 13 x 100 mm con las diferentes diluciones, el primer tubo con la identificación 1:5, el segundo 1:25, el tercero 1:125 y el cuarto 1:625.
3. Se distribuyó el diluyente (suero equino al 2%) en tubos de 13 x 100 mm colocando 0.6 ml. en el primer tubo y 0.8 ml con pipeta de 1 ml en los siguientes.
4. La dilución del suero se realizó de la siguiente manera:
 - a. Se agregó 0.4 ml del suero a los 0.6 ml de diluyente del primer tubo y se descartó la pipeta y resultó la dilución 1:2.5.
 - b. Se agitó después con una nueva pipeta, y se tomó 0.8 ml del primer tubo que contenía 1ml y se agregó 0.2 ml al segundo tubo (que contiene 0.8 ml de diluyente) y se descartó la pipeta con el resto, y formó la dilución 1:12.5.
 - c. Se agitó con una nueva pipeta el segundo tubo, y se tomó 0.8 ml, y se agregó 0.2 ml al tercer tubo y se descartó la pipeta con el resto, la dilución quedó en 1:62.5.

¹ *DL: Dosis letal.

- d. Se repitió la misma operación con el siguiente tubo hasta alcanzar la dilución deseada, dilución 1:312.5. Se descartó 0.8 ml del último tubo de manera que todas las diluciones quedaron en un volumen de 0.2 ml.

Figura 1. Esquema de dilución del suero de referencia y los sueros problema.



5. Se hizo la dilución del virus CVS al 20% suponiendo que tenga 40 DL₅₀ y el título donde estaban contenidas 1 DL₅₀ fue de 10^{7.1} en la forma siguiente:

$$\text{Log } 40 = 1.6$$

$$7.1 - 1.6 = 5.5$$

Es la dilución 10^{-5.5} donde estén contenidas las 40DL₅₀.

Dilución 10^{-5.5} – Dilución 10^{-4.0}

$$5.5 - 4.0 = 1.5$$

$$^{2**}\text{Antilog } 1.5 = 31.6 \text{ ml}$$

Expresado así:

1 ml de la dilución 10^{-4.0}

30.6 ml de diluyente

31.6 ml de la dilución 10^{-5.5}

^{2**} **ANTILOG**: Antilogaritmo.

La cantidad que se preparó para confrontar el suero fue de 10 ml y se realiza de esta manera:

$$\begin{array}{rcl} 31.6 \text{ ml de dilución } 10^{-5.5} & \text{—————} & 1 \text{ ml de dilución } 10^{-4.0} \\ 10 \text{ ml de dilución } 10^{-5.5} & \text{—————} & \text{X} \end{array}$$

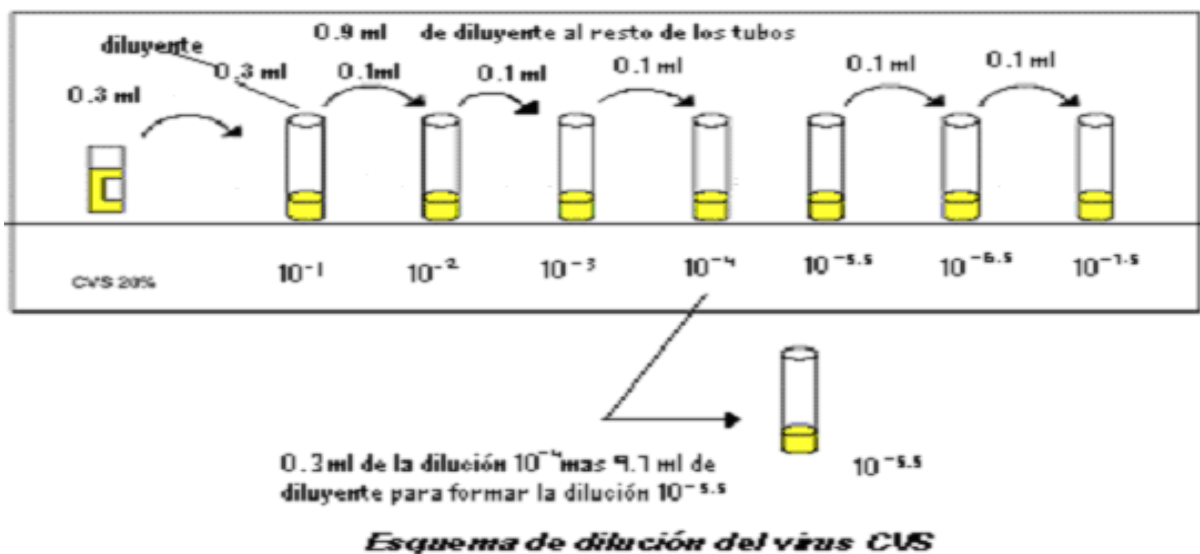
= 0.3 ml de la dilución $10^{-4.0}$, para formar la dilución $10^{-5.5}$ y 9.7 ml de diluyente.

Se utilizó el procedimiento siguiente:

- a. Se descongeló la ampolla de virus CVS al 20 % a temperatura ambiente, que se encuentra envasado en una alícuota de 0.5 ml.
- b. Se rotularon siete tubos de 13x 100, el primer tubo 10^{-1} , el segundo 10^{-2} , el tercero 10^{-3} , el cuarto 10^{-4} , el quinto $10^{-5.5}$, el sexto $10^{-6.5}$ y el séptimo $10^{-7.5}$.
- c. Se distribuyó con pipeta de 1ml, 0.3 ml de diluyente al primer tubo y desde el segundo tubo hasta el séptimo 0.9 ml de diluyente en cada tubo de 13x 100 colocados en una gradilla sumergida en un baño de agua con hielo.
- d. Se agitó en un vórtex (remolino eléctrico) la alícuota de CVS, con una pipeta de 1 ml se tomó el contenido de virus y descargó 0.3 ml por la pared del primer tubo con diluyente y se descartó la pipeta. Dilución 10^{-1} .
- e. Se agitó el primer tubo en el vórtex, con una nueva pipeta se transfirió 0.1 ml del primer tubo al segundo tubo con diluyente, con las mismas precauciones anteriores y se descartó la pipeta. Dilución 10^{-2} .
- f. Se repitió el mismo procedimiento hasta el cuarto tubo al cual corresponde la dilución 10^{-4} .
- g. Luego se preparó la dilución $10^{-5.5}$ rotulando un frasco de 10 ml como $10^{-5.5}$ según el cálculo logarítmico realizado anteriormente y se descargó con una pipeta de 10 ml 9.7 ml de diluyente y 0.3 ml de la dilución 10^{-4} , para formar la dilución $10^{-5.5}$ donde están contenidas las 40DL₅₀.
- h. De esta dilución se tomó 0.1 ml y se transfirió al sexto tubo quedando la dilución $10^{-6.5}$ y del mismo tubo se transfirió 0.1 ml al séptimo tubo dilución $10^{-7.5}$. Luego el frasco de la dilución $10^{-5.5}$ se agitó nuevamente y se selló el

frasco, para luego inocular a los ratones. Estas últimas tres diluciones de CVS $10^{-5.5}$, $10^{-6.5}$ y $10^{-7.5}$, son las que se inocularon a los ratones que sirven como testigos, para saber que se ha utilizado una dosis letal suficiente para confrontar los sueros y así obtener una respuesta.

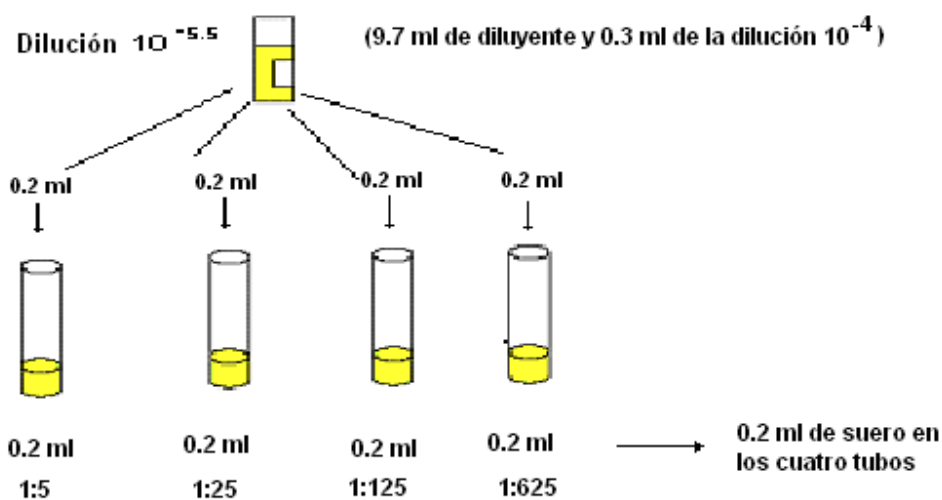
Figura 2. Esquema de dilución del virus CVS



6. **Confrontación del suero con el CVS.**

- a. Se distribuyó la dilución de virus que contenía $40DL_{50}$ teóricas que es la dilución $10^{-5.5}$ y con una pipeta de 2 ml se distribuyó en volúmenes de 0.2 ml en cada uno de los tubos que contenían las diluciones del suero con 0.2 ml. De esta manera, las diluciones del suero se elevaron al doble (1:2.5 a 1:5, de 1:5 a 1:25 así sucesivamente) y las dosis de virus bajaron a la mitad (40 a 20 DL_{50}).

Figura 3. Confrontación del suero con dilución $10^{-5.5}$



7. Se dejó incubando, previa agitación de los tubos, a 37.5° C en estufa durante 90 minutos.
8. Se enfriaron los tubos después de la incubación, colocando la gradilla en agua con hielo durante 10 minutos.
9. Posteriormente se prepararon cuatro jaulas con siete u ocho ratones cada una para cada dilución de suero virus previamente rotuladas y tres jaulas con igual cantidad de ratones para los testigos que fueron inoculados con virus. En nuestro caso por prueba se están evaluando 6 sueros de cachorros, tres no inmunizados y los otros ya inmunizados, por tal motivo se utilizaron un total de 27 jaulas y 216 ratones de 21 días de nacidos y un peso de 11-14 g.
10. Se inocularon, por vía intracerebral a los ratones con 0.03 ml de cada mezcla de suero y virus. Empezamos la inoculación por la mezcla que contenía la dilución más baja del suero.
11. Los testigos se inocularon con otra jeringa ratones del mismo tipo con las diluciones de virus, empezando por la dilución más baja.
12. Se observaron diariamente, durante 14 días, los síntomas de rabia que presentaban los ratones inoculados y se llevó un registro en hojas controles (ver Anexo 4 y 5).
13. Mediante la fórmula de Reed y Muench, se ordeno y calculó el título del virus control, para encontrar con cuantas dosis letales fue confrontado el suero.

14. Se calculó mediante la misma fórmula, la dilución del suero que al ser mezclada con el virus, ha protegido el 50% de los ratones.

Nota: Todo el procedimiento de laboratorio se realizó en una cámara de flujo laminar, para evitar contaminación del medio ambiente.

7.4.3.2 Fórmula de Reed y Muench.

$$\text{Log DE}_{50} = \log \text{ dilución} \pm (\text{DP} \times \log \text{ factor de dilución})$$

% de positivos (en este caso sobrevivientes) inmediatamente mayor al 50 % - 50%

$$\text{DP} = \frac{\text{\% de positivos (en este caso sobrevivientes) inmediatamente mayor al 50 \% - 50\%}}{\text{\% de positivos inmediatamente mayor al 50 \% - \% de positivos inmediatamente menor al 50 \%}}$$

DE: Dosis efectiva.

DP: Distancia proporcional.

Log: Logaritmo.

7.4.3.3 Materiales, equipo y reactivos.

- ✓ Guantes de látex (cajas),
- ✓ Papel toalla (rollos).
- ✓ Gabacha blanca.
- ✓ Mascarillas.
- ✓ Tubos de ensayo 13 x 100 mm
- ✓ Gradillas para tubos 13 x 100 mm
- ✓ Jeringa (tuberculina) de 1 ml (una jeringa por suero) con aguja 27 x ½"
- ✓ Recipiente para descartar agujas
- ✓ Pipeta de 1ml
- ✓ Jaulas de polipropileno para ratones con sus respectivas rejillas

- ✓ Baño María regulado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Vórtex.
- ✓ Propipeta.
- ✓ Cámara de flujo laminar.
- ✓ CVS. (Virus rábico fijo)
- ✓ Diluyente (agua destilada con 2% suero equino)
- ✓ Suero de referencia internacional (Suero equino al 2%).
- ✓ Suero problema.
- ✓ Hielo.

7.4.4 Ensayo de la técnica de seroneutralización

Se realizó la prueba de seroneutralización en el perro N° 03- 2M con el suero no inmunizado y el inmunizado.

Para esto se utilizó la fórmula de Reed y Muench con los datos que resultaron de la observación de los ratones inoculados con las diferentes diluciones suero virus y los testigos.

En este caso se hizo la dilución del virus CVS al 20% el cual contenía 64 DL_{50} y el título donde estaban contenidas 1 DL_{50} fue de $10^{6.9}$ en la forma siguiente:

$$\text{Log } 64 = 1.8$$

$$6.9 - 1.8 = 5.1 = 10^{-5.1} = 64\text{DL}_{50}$$

$$\text{Dilución } 10^{-5.1} - \text{Dilución } 10^{-4.0}$$

$$5.1 - 4.0 = 1.1$$

$$\text{Antilog } 1.1 = 12.6 \text{ ml}$$

Expresado así:

$$1 \text{ ml de la dilución } 10^{-4.0}$$

11.6 ml de diluyente

$$12.6 \text{ ml de la dilución } 10^{-5.1}$$

La cantidad que se preparó para confrontar el suero fue de 5 ml y se realiza de esta manera:

$$\begin{array}{rcl} 12.6 \text{ ml de dilución } 10^{-5.1} & \text{—————} & 1 \text{ ml de dilución } 10^{-4.0} \\ 5 \text{ ml de dilución } 10^{-5.1} & \text{—————} & X \end{array}$$

= 0.4 ml de la dilución $10^{-4.0}$, para formar la dilución $10^{-5.1}$ y 4.6 ml de diluyente.

Se descongeló la ampolla de virus CVS al 20 % a temperatura ambiente, que se encuentra envasado en una alícuota de 0.5 ml.

Se rotularon siete tubos de 13x 100, el primer tubo 10^{-1} , el segundo 10^{-2} , el tercero 10^{-3} , el cuarto 10^{-4} , el quinto $10^{-5.1}$, el sexto $10^{-6.1}$ y el séptimo $10^{-7.1}$. El procedimiento que continúa es el mismo que el descrito en la técnica.

a) Título de suero: Suero N° 03- 2M Nim.

Dilución Suero	Acumulados		%		
	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Sobrevivientes
1:5	1	7	1	16	94
1:25	4	4	5	9	64
1:125	6	2	11	5	31
1:625	5	3	16	3	16

Fórmula de Reed y Muench

$$\text{Log DE}_{50} = \text{Log dilución} \pm (\text{DP} \times \text{log factor de dilución})$$

% de positivos (en este caso sobrevivientes) inmediatamente mayor

DP = al 50 % - 50%

% de positivos inmediatamente mayor al 50 % - % de positivos
inmediatamente menor al 50 %

$$\begin{aligned} \text{Log DE}_{50} &= -1,4 - \left[\frac{64 - 50}{64 - 31} \times 0,7 \right] = \\ &= -1,4 - \left[\frac{14}{33} \times 0,7 \right] = \\ &= -1,4 - (0,4 \times 0,7) = \\ &= -1,4 - 0,28 = \\ &= -1,68 \end{aligned}$$

$$\text{DE}_{50} = \frac{1}{\text{Antilog } 1,68} = \frac{1}{48} = 1:48 \text{ (título de suero)}$$

1:48 = 0.96 UI/ml.

b) Título de suero: De suero N° 03- 2M Inm.

Dilución			Acumulados		%
	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Sobrevivientes
1:5	1	7	1	26	96
1:25	1	6	2	19	91
1:125	2	6	4	13	77
1:625	1	7	5	7	58

No se realizó la fórmula porque la sobrevivencia estaba arriba del 50% en la dilución 1:625

$$DE_{50} = \frac{1}{\text{Antilog } 2.8} = \frac{1}{> 631} = > 1: 631 \text{ (titulo de suero)}$$

> 1: 631 = > 12.62 UI/ml.

c) Calcular la DL_{50} en el control de virus y las dosis letales efectivamente que fueron usadas en la prueba de seroneutralización.

Dilución de Virus	Dilución de		Acumulados		% Mortalidad
	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	
$10^{-5.1}$	7	1	20	1	95
$10^{-6.1}$	8	0	13	1	93
$10^{-7.1}$	5	3	5	4	56

No se realizó la formula porque la mortalidad estaba arriba del 50% en la dilución $10^{-7.1}$ y la dilución donde estaban contenidas las $64DL_{50}$ era la dilución $10^{-5.1}$, por lo tanto se hace una resta de 7.1 menos 5.1 = 2

Antilog de 2 = 100.

Es decir que 100 fueron las dosis letales reales confrontadas con los sueros, $DL_{50} = 100/0.03 \text{ ml}$.

Luego se realizaron las demás pruebas de seroneutralización con los sueros de los cachorros no inmunizados e inmunizado (Ver Cuadro A N° 1 – 6).

Nuestro seminario consistió en la manipulación de dos variables experimentales no comprobadas, en condiciones rigurosamente controladas (Grajales, 2000).

Nuestras variables a considerar fueron la edad y el título de anticuerpos que confirió la vacuna; ambas variables tienen un carácter independiente.

Los datos obtenidos fueron analizados por medio de una estadística descriptiva, la cual consistió en promedios, cuadros y gráficos ilustrativos de estos.

8. RESULTADOS

De los 20 caninos utilizados como animales de experimentación 16 fueron machos y 4 hembras. A todos se les administró la vacuna CRL elaborada en el Laboratorio de Productos Biológicos del MSPAS en dosis de 1 ml vía subcutánea.

Para determinar el título de anticuerpos, se examinaron 40 sueros caninos, 20 fueron recolectados el día 0 (prevacunación), y los 20 restantes a los 21 días de la inmunización. Todos los sueros fueron analizados mediante la prueba de seroneutralización contra la rabia.

Los 20 caninos investigados con excepción de 1, tuvieron incrementos satisfactorios de los títulos de anticuerpos contra la rabia, arriba de la normativa internacional de OMS para la evaluación in vivo que es de 0.5 UI/ml (título 1:25).

De los 20 sueros obtenidos al día 0, 15 de los 20 caninos (75%) presentaron títulos de anticuerpos por debajo del nivel de protección. En los 5 restantes pertenecientes a los grupos de 2, 3 y 4 meses se encontraron títulos arriba de dicho nivel (ver cuadro A N° 7 y gráfico A N° 2).

Los resultados obtenidos a los 21 días de aplicada la vacuna fueron satisfactorios, ya que el 95% de los perros sobrepasaron el nivel mínimo de protección y el 100% incrementaron títulos (ver gráfico A N° 3).

Los incrementos en promedio para cada grupo fueron los siguientes: 7.08UI/ml (2 meses), 3 UI/mL (3 meses), 4.01 UI/mL. (4 meses), 3.06 UI/mL (5 meses) y 3 UI/mL. (6 meses) (Ver gráfico A N° 4).

De todos los sueros examinados el día 0, los grupos de 2, 3 y 4 meses de edad presentaron títulos promedios de anticuerpos iguales o superiores al título mínimo de referencia. Los otros 2 grupos de 5 y 6 meses de edad fueron inferiores.

Los resultados después de la inmunización correspondiente a los 5 grupos fueron satisfactorios, debido a que el promedio menor de anticuerpos fue de 3 UI/mL en los grupos de 3 y 6, siendo el nivel mayor de 7.08 UI/mL de los cachorros de 2 meses. (Ver grafico A N° 4).

9. DISCUSION DE RESULTADOS

La edad en la cual se obtuvieron las mejores respuestas después de la vacunación en promedios fue la de 2 meses, aunque es un dato fehaciente, también es discutible, debido a que en teoría los anticuerpos maternos interfieren disminuyendo la cantidad de antígeno viral disponible.

El 41.66% de los cachorros entre los 2 y los 4 meses (5 de 12), presentaron títulos de anticuerpos contra la rabia al día 0, cuyo origen es todavía la inmunidad pasiva proporcionada por la madre. Aparentemente en ninguno hubo evidencia de interferencia de anticuerpos maternos en la producción de anticuerpos postvacunales.

En términos generales de acuerdo a nuestro estudio, los anticuerpos maternos después de los 4 meses caen por debajo del nivel de protección (Ver gráfico A N° 5). Si tomamos en cuenta esto y el hecho de que los anticuerpos maternos no han interferido en la respuesta inmunogénica, es que se puede reducir perfectamente la

edad de vacunación a los dos meses debido a los niveles de incidencia de rabia canina en el país.

En relación a la respuesta 21 días después de aplicada la vacuna, los resultados en la inmensa mayoría (95%) fueron satisfactorios, ya que los valores obtenidos para los diferentes grupos en estudio oscilaron entre 0.8 UI/ml y 12.62 UI/ml, todos superiores a 0.5 UI/ml (OMS). La excepción fue un sujeto del grupo de 5 meses de edad que no alcanzó el nivel de protección (ver gráfico A N° 3, cuadro A N° 7). Esto confirma que un porcentaje mínimo de los individuos a los que se les aplica la vacuna no responden igual que la generalidad, hecho que no hace a una vacuna ineficaz. Esto se atribuye a que el sistema inmunológico de cada animal responde en forma diferente a las vacunas ya que estas no confieren una protección absoluta y única; aunque las respuestas se encuentran dentro de la distribución normal en una población de animales vacunados.

Otro factor relacionado con la calidad de la vacuna CRL estudiada, fue que no se detectó ningún tipo de reacción indeseable en los caninos al ser aplicada vía subcutánea.

10. CONCLUSIONES

- La vacuna CRL producida por el MSPAS es eficaz ya que indujo títulos mayores al nivel mínimo de referencia establecido para conferir protección contra dicha enfermedad en el 95% de los caninos del estudio.
- Según los resultados de este estudio la edad óptima para vacunar caninos contra la rabia con vacuna CRL es a los 2 meses de edad, ya que fue este grupo el que a los 21 días alcanzó los mayores títulos después de la inmunización.
- La vacunación fue efectiva en los grupos de 2 y 3 meses no obstante la presencia significativa de anticuerpos maternos. Esto es importante ya que estudios previos han demostrado que a pesar de la presencia de estos anticuerpos, siempre existen grados de susceptibilidad a la rabia.

11. RECOMENDACIONES

- Implementar como prueba de rutina en el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, la técnica de seroneutralización en caninos y felinos para comprobar la efectividad de las vacunas antirrábicas producidas en el país.
- Realizar investigaciones futuras para determinar anticuerpos posvacunales contra la rabia en una población más representativa con respecto a la edad.
- Iniciar gestiones para fabricar vacunas de cultivos celulares, ya que hoy en día a nivel mundial son las más difundidas por su alta calidad inmunogénica.
- En virtud de que existen casos previsibles de no respuesta a la vacuna, para asegurar el éxito de las campañas contra la rabia, es necesario asegurar que las coberturas poblacionales de inmunización sean iguales o lo mas próximas al 100%.

14. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Acha Pedro N.; Szyfres Boris. 2003. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al Hombre y a los Animales. Tercera edición Volumen II. Clamidiosis, Rickettsiosis y Virosis. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C. Pp 371.
2. Baer, George M. 1975. The Natural History of Rabies. Volume II. ACADEMIS PRES. New Cork, San Francisco, London. Pp. 99-113, 221-238.
3. Beer, Joachim. 1987. Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. Tomo I. Editorial Acribia Zaragoza España. Pp 183.
4. Bernal, Julio C. 2005. Boletines Técnicos Merial. Argentina. Consultado en Enero 2007. Disponible en la World Wide Web: http://ar.merial.com/veterinary_professionals/vets_cage/rabtec1.htm#3
5. Blanco Quirós Alfredo, Giménez Sánchez Francisco. 2003. Madrid. Programa de Actualización en vacunas. Vacunas Contra la Rabia Modulo II b. Revista 3175, 21/11/03, Pp 40. Consultado en Noviembre 2006. Disponible en la World Wide Web: (www.aeped.es/vacunaspav/modulo1/01.html)
6. Bonilla Gómez Oscar. 1996. Modificación de Vacuna Antirrábica de Cerebro de Ratón Lactante disminuyendo el período de cosecha del virus. Universidad de El Salvador. Pp 2-3, 31, 32.
7. Bracamonte Magali y Plaza M. Noris. 2005. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. A los 120 años de la primera Vacunación Antirrábica.

8. Bracamonte Pérez Magali Beatriz. 2000. Determinación de Anticuerpos Maternales en corderos provenientes de madres vacunadas. Universidad Central de Venezuela. Consultado en Febrero 2006. Disponible en la World Wide Web: http://www.bibliofov.veter.ucv.ve/cgi-win/be_alex.exe?palabra=LEVAMISOLcNombrebd=BI.
9. Chang Chang Dora Elena. Febrero 1989. Comparación de los niveles de Anticuerpos antirrábicos, detectados por la técnica de Contrainmunolectroforesis (CIE), en perros inmunizados con vacuna de Cerebro de Ratón Lactante (CRL) 2% normal y 1% adsorbida con Hidróxido de Aluminio. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Pp 72, 73, 98, 99, 111.
10. Cliquet F. 2003. Búsqueda de anticuerpos neutralizantes en 25,000 sueros de perros y gatos vacunados contra la rabia en Francia, en el marco de una nueva reglamentación alternativa a la cuarentena. Francia. Consultado en Marzo 2006. Disponible en la World Wide Web: http://www.oie.int/esp/pubicat/RT/2003/E_R2236.htm
11. Favi C, Miryam Yung C, Verónica, Roosk Orietta et al. 2004. Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida-Palacios (CRL) y de la vacuna antirrábica de cultivo celular Verorab[®]. Consultado en Abril 2006. Disponible en la World Wide Web: http://scielo-test.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872004000100006&lng=pt&nrm=
12. Fernández, Mónica. 2006. Argentina. Vacunas Recombinantes. Material genético modificado en forma artificial o recombinado. Consultado en Enero 2007. Disponible en la World Wide Web: http://www.foyel.com/cartillas/5/vacunas_recombinantes.html

13. Grajales T. 2000. Tipos de investigación. Consultado en Diciembre 2006. Disponible en el World Wide Web: <http://www.file:///A\investipos.htm>. (1 of 4)
14. Guarnera Eduardo A. 1993 Guía para el tratamiento de la Rabia en el hombre. Adaptación para El Salvador de la publicación especial N° 11. Programa de Salud Pública Veterinaria OPS. Editorial Druck S.A. de C.V. El Salvador. Pp 41.
15. Jawetz. Melnick. Adelberg. Brooks. Butel. Ornston. 1990. Microbiología Médica. Decimotercera edición. Editorial el Manual Moderno, S. A de C. V. México, D. F. Pp. 100, 104-107.
16. Kaplan M.M. Koprowski H. 1976. La Rabia Técnicas de laboratorio. Tercera edición. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Pp: 229.
17. López Piñero JM. 2000. Breve Historia de la Medicina. Madrid, Medicina y Salud. Alianza Editorial. Consultado en Junio 2006. Disponible en el World Wide Web: http://www.todosvacunados.com/historia/historia_vacunasa.PDF
18. López Ingunza, Ricardo, 2002. Manual de Procedimientos para el diagnóstico de la Rabia. Serie de Normas Técnicas. Lima Perú. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 46 p. Consultado en Marzo 2006. Disponible en el World Wide Web: <http://www.ins.gob.pe/downloads/publicaciones/MANUAL%20RABIA.pdf>
19. Loza Rubio, Elizabeth y Aguilar Setién, Álvaro. 1998. México. Estudio de la Variabilidad Molecular del virus de la Rabia en México.
20. Merchant, I y Packer, R. 1975. España. Microbiología y Virología Veterinaria 3ª edición, Editorial Acribia. Pp 599-605,728-735
21. Mena Solís, Zúñiga Somoza, 2001. El Salvador. Determinación de la calidad y eficacia de la vacuna nacional antirrábica tipo CRL en la producción de anticuerpos

suficientes para la protección contra el virus rábico. Trabajo de graduación Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer facultad de Química y Farmacia-Biología. Pp: 25, 26, 38.

22. Ministerio de Salud y Asistencia Social 2004. Incidencia de las Principales Enfermedades en Vigilancia Epidemiológica Especial. Consolidado Nacional de Reporte Epidemiológico Diario. Consolidado Nacional del día: del 29 de Diciembre 2002 al 3 de Enero de 2004 Consultado 22 de marzo 2006. Disponible en la World Wide Web: http://www.mspas.gob.sv/vigi_epide2003/edad_consolidado2003.asp

23. Ministerio de Salud y Asistencia Social 2006. Boletín Epidemiológico semana N° 12 del 2006. Consultado 22 de Marzo de 2006. Disponible en la World Wide Web: http://www.mspas.gob.sv/vigi_epide2006/boletin_diario2006.pdf

24. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Consultado Marzo de 2006. Disponible en el World Wide Web: <http://www.mspas.gob.sv/>

25. Mogollón Elvia de, delgado Horacio, Barroeta Martín, Diamante Aquiles y Gómez Germán. 1976. Valores Serológicos Obtenidos por Titulación de Anticuerpos Rábitos en Sueros Humanos. Veterinaria Tropical Vol. 1. Venezuela. Pp 41-50. Consultado en Mayo 2006. Disponible en el World Wide Web: <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/VeterinariaTropical/vt1/texto/emogollon.htm>

26. Organización Mundial del Comercio. 2004. Comité de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias. Consultado en Diciembre 2006. Disponible en la World Wide Web: http://www.ipfsaph.org/cds_upload/kopool_data/WTOSPSNF_0/es_njpn125.doc

27. Organización Mundial de la Salud, 1992. Ginebra. Comité de expertos de la OMS sobre Rabia. Serie de informes técnicos. Octavo Informe. Pp 2, 11, 15, 19, 29, 65,31.
28. Organización Mundial de la Salud. Marzo de 2005. Inmunización contra enfermedades de importancia para la salud pública, Nota informativa N° 288.
29. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 2000. Boletín Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas. División de Prevención y control de Enfermedades. Programa de Salud Pública Veterinaria. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Volumen XXXII. P13.
30. Palomo Fernando Richter Federico, Águila B. Carlos. 1981. Inmunoprofilaxis antirrábica humana con vacuna de Cerebro de Ratón Lactante (CRL) usando esquemas reducidos de vacunación. Serie de separatas anuario N° 55. Revista Universidad de San Carlos, II época volumen 12. Guatemala. Pp 7, 8, 18, 19.
31. Ribas, Maria de los A, Rebull, Arlene, Torres, Gifsset et al. Mayo- Agosto 2003. Detección de anticuerpos antirrábicos en personal de riesgo con el empleo de la técnica de Neutralización por Reducción de Numero de Placas. Revista Cubana Medicina Tropical. Volumen 55, N° 2 Pp 91-95. Consultado en Diciembre 2006. Disponible en la World Wide Web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-7602003000200005&script=sci_arttext
32. Rovozzo Grace C.; Burke Carroll N. 1973. A Manual of Basic Virological Techniques. USA New Jersey. Pp 94-98.
33. Tizard Ian R. 1998. Inmunología Veterinaria. México D.F. Quinta Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. Pp 7, 9, 82, 83, 85, 91, 205, 227, 233, 255, 261, 266, 287, 288, 290, 296.

34. Valdés Bertha, 2005. Breve Historia de las vacunas. Consultado en Noviembre 2006. Disponible en el World Wide Web: <http://www.esmas.com>

35. Vargas Artiga María José. 2005. Determinación de la presencia del virus rábico en Cerebro y grasa parda de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*), capturados en los departamentos de Sonsonate, La Libertad, Chalatenango, La Paz y San Miguel. Tesis Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. P 4

36. Zarate Tinoco Erika Geraldine 2006. Rabia. Consultado en Septiembre 2006. Disponible en el World Wide Web: <http://www.monografias.com/trabajos12/rabia/rabia.shtml>

15 ANEXOS

ANEXO 1

Facultad de Ciencias Agronómicas
Departamento de Medicina Veterinaria.
Universidad de El Salvador.
Seminario de Graduación.

Ficha interna: **Investigación de vacuna CRL en caninos de 2- 6 meses de edad.**

Propietario: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Identificación del perro:

Nº: _____

Nombre: _____

Sexo: _____

Fecha de Nacimiento: _____

Color: _____

Raza: _____

Tamaño:

Pequeño

Mediano

Grande

Otras características: _____

Fecha de vacunación: _____

Nº de Lote: _____

Toma de muestra y Resultado:

Día **0** Fecha: _____

Título: _____

Día **21** Fecha: _____

Título: _____

ANEXO 4.

TESIS DE SERONEUTRALIZACION EN CANINOS DE 2 - 6 MESES DE EDAD.

FECHA: _____ PRUEBA: _____ N°: _____

MATERIAL INOCULADO: _____ VOLUMEN: _____

VIA: _____ ANIMAL: _____ EDAD/PESO: _____

CANTIDAD: _____ INICIO: _____ TERMINO: _____

1:5	Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Fecha														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
8															

1:25	Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Fecha														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
8															

1:125	Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Fecha														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
8															

1:625	Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Fecha														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
8															

V: Vivo. **S:** Sospechoso. **Pa:** Parálítico. **Po:** Postrado. **M:** Muerto.

ANEXO 5

TESIS DE SERONEUTRALIZACION EN CANINOS DE 2 - 6 MESES DE EDAD.

FECHA: _____ PRUEBA: _____ N°: _____

MATERIAL INOCULADO: _____ VOLUMEN: _____

VIA: _____ ANIMAL: _____ EDAD/PESO: _____

CANTIDAD: _____ INICIO: _____ TERMINO: _____

$10^{-5.5}$	Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Fecha														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
8															

$10^{-6.5}$	Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Fecha														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
8															

$10^{-7.5}$	Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Fecha														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
8															

V: Vivo. **S:** Sospechoso. **Pa:** Paralítico. **Po:** Postrado. **M:** Muerto

Cuadro A N° 1. Resumen de resultados de prueba N° 1

Suero N°	Dilución de suero	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Sobrevivencia	Titulo de suero
				Muertos	Vivos		
19- 6M Ninm.	1:5	5	3	5	3	37.5	1: 5 = 0.1 UI/ml.
	1:25	8	0	13	0	0	
	1:125	8	0	21	0	0	
	1: 625	8	0	29	0	0	
19- 6M Inm.	1:5	2	6	2	21	91	1:186 = 3.72 UI/ml.
	1:25	3	5	5	15	75	
	1:125	3	5	8	10	56	
	1: 625	3	5	11	5	31	
14- 5M Ninm.	1:5	0	8	0	9	100	1: 12 = 0.24 UI/ml.
	1:25	8	0	8	1	11	
	1:125	7	1	15	1	6	
	1: 625	8	0	23	0	0	
14- 5M Inm.	1:5	0	8	0	23	100	1:224 = 4.48 UI/ml.
	1:25	0	8	0	15	100	
	1:125	4	4	4	7	64	
	1: 625	5	3	9	3	25	
13- 5M Ninm.	1:5	7	1	7	8	53	1: 7 = 0.14 UI/ml.
	1:25	5	3	12	7	37	
	1:125	6	2	18	4	18	
	1: 625	6	2	24	2	8	
13- 5M Inm.	1:5	0	8	0	24	100	1:324 = 6.48 UI/ml.
	1:25	2	6	2	16	89	
	1:125	3	5	5	10	67	
	1: 625	3	5	8	5	38	

09-4M Ninm.	1:5	3	5	3	20	87	1:126 = 2.52 UI/ml.
	1:25	2	6	5	15	75	
	1:125	4	4	9	9	50	
	1: 625	3	5	12	5	29	
09-4M Inm.	1:5	0	8	0	25	100	1:501 = 10.02 UI/ml.
	1:25	1	7	1	17	94	
	1:125	2	5	3	10	77	
	1: 625	3	5	6	5	45	

Titulo de virus	Dilución de virus	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Mortalidad	DL ₅₀
				Muertos	Vivos		
7.1	10 ^{5.5}	6	2	20	2	91	DL ₅₀ = > 100/0.03 ml.
	10 ^{6.5}	7	1	14	3	82	
	10 ^{7.5}	7	1	7	4	64	

Cuadro A N° 2 Resumen de resultados de prueba N° 2

Suero N°	Dilución de suero	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Supervivencia	Titulo de suero
				Muertos	Vivos		
05- 3M Ninm.	1:5	2	6	2	16	89	1: 52 = 1.04 UI/ml
	1:25	4	4	6	10	63	
	1:125	5	3	11	6	35	
	1: 625	5	3	16	3	16	
05- 3M Inm	1:5	2	6	2	24	92	1: 302 = 6.04 UI/ml.
	1:25	0	8	2	18	90	
	1:125	1	7	3	10	77	
	1: 625	5	3	8	3	27	

06- 3M Ninm.	1:5	2	6	2	4	88	1: 36 = 0.72 UI/ml.
	1:25	4	4	6	8	57	
	1:125	5	3	11	4	27	
	1: 625	7	1	18	1	5	
06- 3M Inm.	1:5	0	8	0	22	100	1: 209 = 4.18 UI/ml.
	1:25	2	6	2	14	88	
	1:125	3	5	5	8	62	
	1: 625	5	3	10	3	23	
17- 6M Ninm.	1:5	4	4	4	8	66	1:10 = 0.2 UI/ml.
	1:25	5	3	9	4	31	
	1:125	7	1	16	1	6	
	1: 625	8	0	24	0	0	
17- 6M Inm.	1:5	1	7	1	19	95	1:107 = 2.14 UI/ml.
	1:25	0	7	1	12	92	
	1:125	5	3	6	5	45	
	1: 625	6	2	12	2	14	

Titulo de virus	Dilución de virus	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Mortalidad	DL ₅₀
				Muertos	Vivos		
7.1	10 ^{5.5}	5	2	17	2	89	DL ₅₀ =79
	10 ^{6.5}	7	1	12	3	80	DL ₅₀ /
	10 ^{7.5}	5	3	5	6	45	0.03 ml.

Cuadro A N° 3 Resumen de resultados de prueba N° 3

Suero N°	Dilución de suero	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Supervivencia	Titulo de suero
				Muertos	Vivos		
04- 2M Ninm.	1:5	6	1	6	4	40	1: 5 = 0.1 UI/ml
	1:25	6	1	12	3	20	
	1:125	6	1	18	2	10	
	1: 625	6	1	24	1	4	
04- 2M Inm.	1:5	0	7	0	17	100	1:102= 2.04 UI/ml
	1:25	1	6	1	10	91	
	1:125	4	3	5	4	44	
	1: 625	6	1	11	1	8	
02- 2M Ninm.	1:5	4	3	4	14	78	1: 63 = 1.26 UI/ml.
	1:25	4	3	8	11	58	
	1:125	2	5	10	8	44	
	1: 625	4	3	14	3	18	
02- 2M Inm.	1:5	0	7	0	24	100	> 1: 631 =>12.62 UI/ml.
	1:25	1	6	1	17	94	
	1:125	1	6	2	11	85	
	1: 625	2	5	4	5	55	
01- 2M Ninm.	1:5	4	3	4	8	67	1: 10 = 0.2 UI/ ml.
	1:25	5	2	9	5	36	
	1:125	5	2	14	3	18	
	1: 625	6	1	20	1	5	
01- 2M Inm.	1:5	3	4	3	14	82	1: 52 = 1.04 UI/ml.
	1:25	4	3	7	10	59	
	1:125	4	3	11	7	39	
	1: 625	3	4	14	4	22	

15- 5M Ninm.	1:5	6	1	6	1	14	1: 5 = 0.1 UI/ml
	1:25	7	0	13	0	0	
	1:125	7	0	20	0	0	
	1: 625	7	0	27	0	0	
15- 5M Inm.	1:5	4	3	4	10	71	1: 17 = 0.34 UI/ml.
	1:25	5	2	9	7	44	
	1:125	5	2	14	5	26	
	1: 625	4	3	18	3	14	

Titulo de virus	Dilución de virus	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Mortalidad	DL ₅₀
				Muertos	Vivos		
7.1	10 ^{-5.5}	6	1	15	1	94	DL ₅₀ = 51/0.03 ml.
	10 ^{-6.5}	5	2	9	3	75	
	10 ^{-7.5}	4	3	4	6	40	

Cuadro A N° 4 Resumen de resultados de prueba N°4

Suero N°	Dilución de suero	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Sobrevivencia	Titulo de suero
				Muertos	Vivos		
08-3M Ninm	1:5	8	0	8	2	20	1: 5 = 0.1 UI/ml.
	1:25	8	0	16	2	11	
	1:125	7	1	23	2	8	
	1: 625	7	1	30	1	3	
08-3M Inm	1:5	2	6	2	14	88	1: 40 = 0.8 UI/ml.
	1:25	3	5	5	8	62	
	1:125	7	1	12	3	20	
	1: 625	6	2	18	2	10	

07-3M Ninm	1:5	5	3	5	7	58	1: 8 = 0.16 UI/ml
	1:25	6	2	11	4	27	
	1:125	6	2	17	2	11	
	1: 625	8	0	25	0	0	
16-5M Ninm	1:5	6	2	6	4	40	1: 5 = 0.1 UI/ml.
	1:25	8	0	14	2	13	
	1:125	8	0	22	2	8	
	1: 625	6	2	28	2	7	

Titulo de virus	Dilución de virus	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Mortalidad	DL ₅₀
				Muertos	Vivos		
7.1	10 ^{-5.5}	8	0	16	0	100	44/ 0.03 ml.
	10 ^{-6.5}	4	4	8	4	80	
	10 ^{-7.5}	4	4	4	8	33	

Cuadro A N° 5 Resumen de resultados de prueba N°5

Suero N°	Dilución de suero	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Supervivencia	Titulo de suero
				Muertos	Vivos		
10-4M Ninm	1:5	5	2	5	6	55	1: 7 = 0.14 UI/ml.
	1:25	6	1	11	4	27	
	1:125	6	1	17	3	15	
	1: 625	5	2	22	2	8	
10-4M Inm	1:5	1	6	1	15	94	1: 59 = 1.18 UI/ml.
	1:25	3	4	4	9	69	
	1:125	6	1	10	5	33	
	1: 625	3	4	13	4	24	

11-4M Ninm	1:5	7	0	7	7	50	1: 5 = 0.1 UI/ml.
	1:25	4	3	11	7	39	
	1:125	6	1	17	4	19	
	1: 625	4	3	21	3	13	
11-4M Inm	1:5	0	7	0	18	100	1: 155 = 3.10 UI/ml.
	1:25	2	5	2	11	85	
	1:125	3	4	5	6	55	
	1: 625	5	2	10	2	17	
12-4M NInm	1:5	2	5	2	11	85	1: 18 = 0.36 UI/ml.
	1:25	7	0	9	6	40	
	1:125	3	4	12	6	33	
	1: 625	5	2	17	2	11	
12-4M Inm	1:5	1	6	1	16	94	1: 87 = 1.74 UI/ml.
	1:25	0	7	1	10	91	
	1:125	4	3	5	3	38	
	1: 625	7	0	12	0	0	

Titulo de virus	Dilución de virus	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Mortalidad	DL ₅₀
				Muertos	Vivos		
7.1	10 ^{-5.5}	7	0	20	0	100	> 100/ 0.03 ml.
	10 ^{-6.5}	6	1	13	1	93	
	10 ^{-7.5}	7	0	7	1	88	

Cuadro A N° 6 Resumen de resultados de prueba N° 6

Suero N°	Dilución de suero	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Sobrevivencia	Titulo de suero
				Muertos	Vivos		
18-6M Ninm	1:5	7	0	7	3	30	1: 5 = 0.1 UI/ml
	1:25	6	1	13	3	19	
	1:125	7	0	20	2	9	
	1: 625	5	2	25	2	7	
18-6M Inm	1:5	2	5	2	19	20	1: 204 = 4.08 UI/ml
	1:25	2	5	4	14	78	
	1:125	3	4	7	9	56	
	1: 625	2	5	9	5	36	
20-6M Ninm	1:5	3	4	3	9	75	1: 14 = 0.28 UI/ml
	1:25	6	1	9	5	36	
	1:125	5	2	14	4	22	
	1: 625	5	2	19	2	13	
20-6M Inm	1:5	0	7	0	17	100	1: 102 = 2.04 UI/ml
	1:25	2	5	2	10	83	
	1:125	4	3	6	5	45	
	1: 625	5	2	11	2	15	
16-5M Inm	1:5	2	5	2	13	87	1: 47 = 0.94 UI/ml
	1:25	3	4	5	8	62	
	1:125	4	3	9	4	31	
	1: 625	6	1	15	1	6	
07-3M Inm	1:5	2	5	2	14	88	1: 48 = 0.96 UI/ml
	1:25	4	3	6	9	60	
	1:125	5	2	11	6	35	
	1: 625	3	4	14	4	22	

Titulo de virus	Dilución de virus	Muertos	Vivos	Acumulados		% de Mortalidad	DL ₅₀
				Muertos	Vivos		
7.1	10 ^{-5.5}	6	1	14	1	93	40 / 0.03 ml
	10 ^{-6.5}	3	4	8	5	62	
	10 ^{-7.5}	5	2	5	7	42	

Todos los resultados fueron obtenidos mediante la:
Fórmula de Reed y Muench

$$\text{Log DE}_{50} = \text{Log dilución} \pm (\text{DP} \times \text{log factor de dilución})$$

% de positivos (en este caso sobrevivientes) inmediatamente mayor

DP = al 50 % - 50%

% de positivos inmediatamente mayor al 50 % - % de positivos inmediatamente menor al 50 %

Cuadro A N° 7 Títulos de anticuerpos antirrábicos de caninos al día 0 y 21

LOTE DE VACUNA	N° SUERO PROBLEMA	TITULO DIA 0		TITULO DIA 21		Promedio DIA 0 UI/ml	Promedio DIA 21 UI/ml
07	01-2M	1:10	0.2 UI/ml	1: 52	1.04 UI/ml	0.63	7.08
07	02-2M	1:63	1.26	> 1: 631	12.62		
07	03-2M	1:48	0.96	> 1: 631	12.62		
11	04-2M	1:5	0.1	1: 102	2.04		
07	05-3M	1:52	1.04	1: 302	6.04	0.51	2.99
07	06-3M	1:36	0.72	1: 209	4.18		
11	07-3M	1:8	0.16	1: 48	0.96		
11	08-3M	1:5	0.1	1:40	0.8		
07	09-4M	1:126	2.52	1: 501	10.02	0.78	4.01
11	10-4M	1:7	0.14	1:59	1.18		
11	11-4M	1:5	0.1	1:155	3.10		
11	12-4M	1:18	0.36	1:87	1.74		
07	13-5M	1:7	0.14	1: 324	6.48	0.11	3.06
11	14-5M	1:5	0.1	1: 224	4.48		
11	15-5M	1:5	0.1	1: 17	0.34		
11	16-5M	1:5	0.1	1: 47	0.94		
07	17-6M	1:10	0.2	1: 107	2.14	0.17	2.99
07	18-6M	1:5	0.1	1: 204	4.08		
11	19-6 M	1:5	0.1	1: 186	3.72		
07	20-6M	1:14	0.28	1: 102	2.04		

Grafico A 1. Casos de rabia canina en el cuatrienio 2003-2006 diagnosticado por MSPAS y MAG.

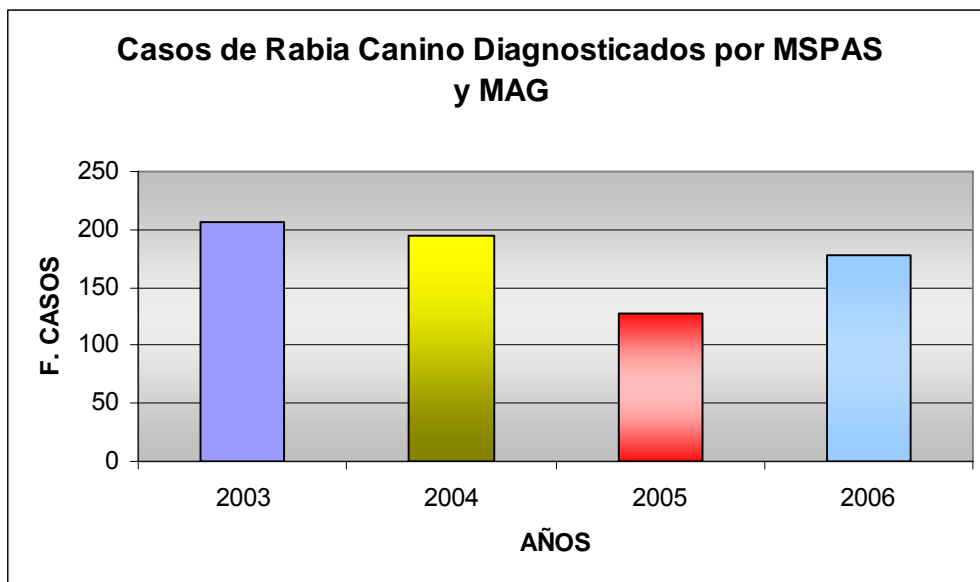


Gráfico A 2. Títulos de anticuerpos maternos antirrábicos al día 0, en los 20 caninos del estudio.

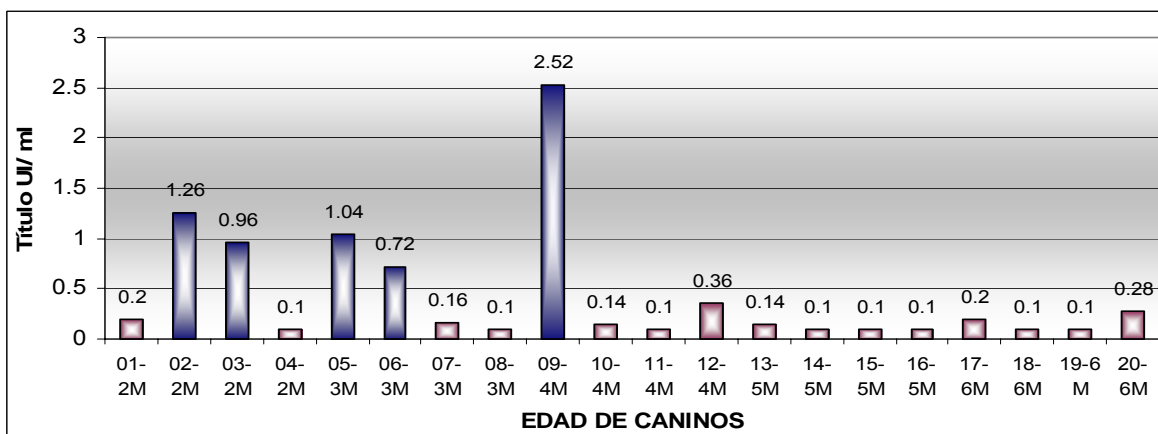


GRÁFICO A N° 3. Título de Anticuerpos Antirrábicos a los 21 días en los 20 caninos vacunados.

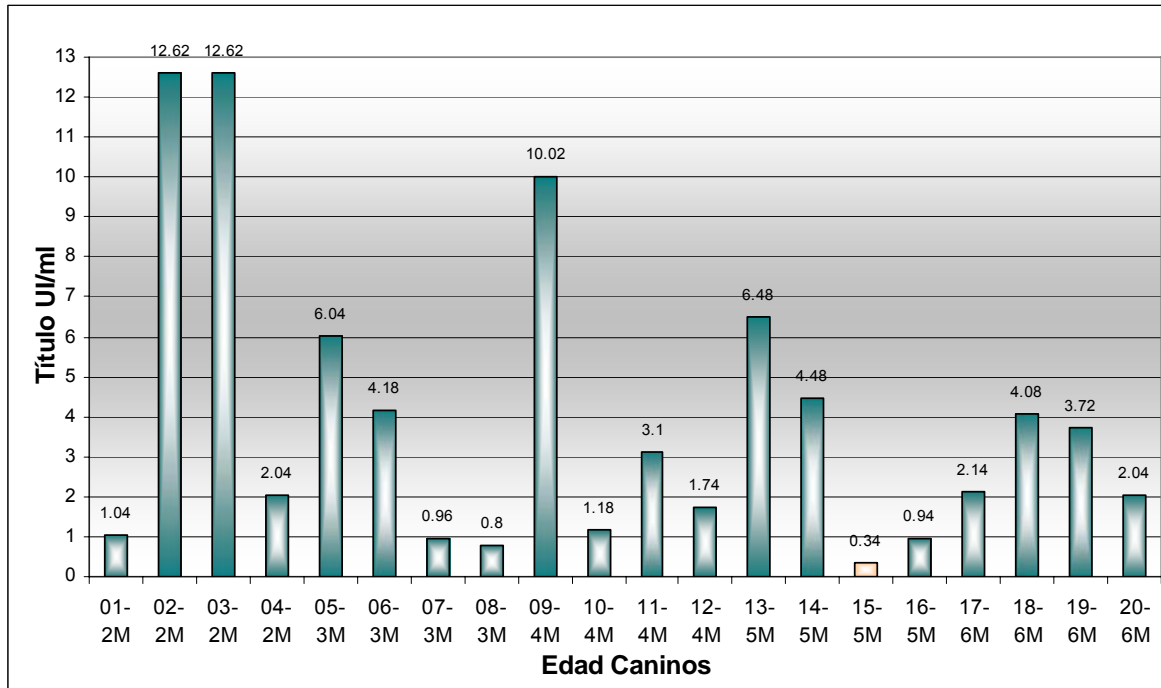


GRAFICO A N° 4. Promedio de títulos de Anticuerpos Antirrábicos según edad al día 0 y 21

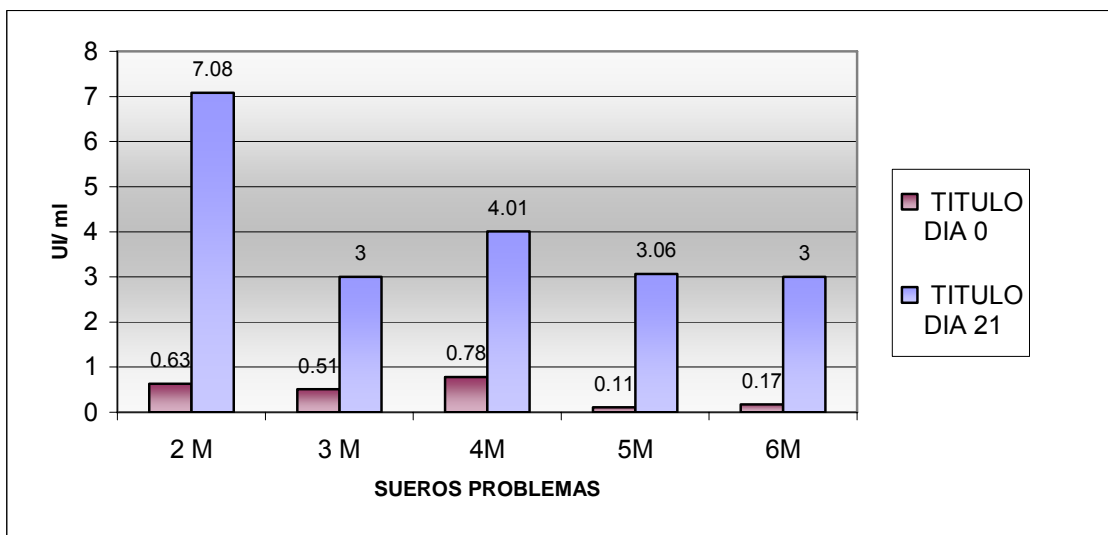


Gráfico A N°5. Promedio de títulos de Anticuerpos Antirrábicos maternos al día 0 según edad

