

88.
2 y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Medicina Veterinaria y Zootecnia

PRUEBAS DE INMUNIDAD, VIABILIDAD Y NEUROTROPICIDAD DE ALGUNAS VACUNAS ANTIRRABICAS UTILIZADAS EN MEXICO.

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

JOSE IGNACIO MADRID CISNEROS

en colaboración con:

VICTOR HUGO ATALA SESIN
ANTONIO DELARUE HAWK

Director: M.V.Z., M.s., Ph.D. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

INTRODUCCION-----	1
ETIOLOGIA-----	4
TRANSMISION-----	4
PATOGENIA-----	6
DISTRIBUCION GEOGRAFICA-----	8
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO-----	9
BIOLOGICOS EXISTENTES-----	12
VACUNACION DE PERROS Y GATOS -----	15
LA RABIA EN EL HOMBRE-----	16
PRUEBAS DE POTENCIA PARA LAS VACUNAS ANTIRRABICAS-----	17
PRUEBAS DE INOCUIDAD Y POTENCIA DE LA VACUNA V- 319 ACATLAN EN PERROS Y GATOS-----	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO-----	27
DATOS ESTADISTICOS A NIVEL NACIONAL EN LOS AÑOS 1964 - 1971 - 1974-----	28
MATERIAL Y METODOS. INMUNIDAD CONTRA VACUNAS ANTIRRABICAS-----	31
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNIDAD CONTRA VACUNAS ANTIRRABICAS-----	45
CUADROS DE VACUNACIONES EN PERROS DE CLINICAS PARTICULARES Y ANTIRRABICOS-----	50-54

RESULTADOS DEL DESAFIO A LAS DIFERENTES VACUNAS TRABAJADAS POR INOCULACION EN RATONES-----	55-58
SINTESIS DE LOS CUADROS SOBRE TITULACION DE VACUNAS(de los cuadros 1 al 9)-----	59
RESULTADOS SOBRE LA PRUEBA DE NEUROTROPICIDAD DEL VIRUS RABICO-----	60-67
DISCUSION-----	68
CONCLUSIONES-----	71
BIBLIOGRAFIA-----	73

INTRODUCCION:

Resumen Histórico de la Rabia.

La rabia, se conoce desde tiempos remotos y probablemente te ha existido desde antes que la especie humana.

En imágenes grabadas sobre piedra se le representó, con la forma de perros rábidos, en Egipto, Grecia y Roma; hay referencia a ella en la mitología griega y Plutarco afirmaba que según Atenodoro, se le observó por primera vez en el -- hombre en los tiempos de los Usclepiades, los descendientes de Esculapio, el padre de la Medicina. Acteón, hijo de Aristeo, murió por ese mal en el siglo XIII A. de C., y en el si glo IV de la misma época, Aristóteles escribió que "Los pe-- rros suelen sufrir de rabia, la cual los pone en estado de - furia y cuando están en tal condición, todos los animales a- los que muerden son atacados por la enfermedad(24)

Celso, en el siglo I A. de C., hizo por primera vez una descripción de la enfermedad, a la cual llamó "hidrofobia". Preconizó el lavado y la cauterización de las heridas hechas por el animal rábido como medio para evitarla y afirmó que - cuando se presentan ya los síntomas de ella no hay posibilidad de curarla y termina siempre con la muerte (24).

Celso Aureliano, en su tratado sobre las enfermedades - agudas escrito en el siglo II A. de C., trató extensamente - de ésta enfermedad, sin añadir mayor cosa a su conocimiento, hasta que en la famosa obra(sobre los contagios), dada a la luz a mediados del siglo XVI por su autor Jerónimo Francastoro. Se afirma que la rabia no puede ser contraída por ninguna clase de contacto, ni por medio de fomites, ni a distancia,

sino " solo cuando la piel ha sido rota por la mordedura de unperro y de la cual salga sangre". Se reconoce que el período de incubación puede tomar mucho tiempo, seis u ocho meses y hasta un año , pero se conocen períodos de incubación tan cortos como diez días (24).

Francastoro afirmó que " todo perro mordido por un rabido adquiere siempre la enfermedad, lo cual no sucede igualmente con el hombre " , y explicó ésta diferencia por "la que hay entre la especie perro y la especie hombre". Atribuyó éstos efectos a "causas psicológicas".(24).

Desde fines del siglo XVII se fueron adquiriendo nuevos conocimientos. En 1770 Van Switen describió la forma paralítica de la enfermedad; en 1804 Zinke demostró experimentalmente la virulencia de la saliva de los perros rabidos, y en 1881 Gruner recomendó la inoculación experimental de esa saliva a animales receptivos, como medio de diagnóstico.

En ese mismo año Magendie y Breshet identificaron la rabia humana con la canina reproduciendo la enfermedad en un perro inoculado con la saliva de una persona enferma de ese mal. Hertwig, en 1829, demostró que su transmisión se hace comúnmente por medio de la saliva de perros rabiosos al morder a animales susceptibles. En 1881, Pasteur comunicó a la Academia de Ciencias haber encontrado que el virus de la rabia está no sólo en las glándulas salivales, sino sobre todo en los órganos del sistema nervioso central y utilizaron por primera vez la técnica de inoculación intracerebral como una forma confiable de producir la enfermedad (2). En 1884, Pasteur dió a conocer los últi-

mos resultados de sus investigaciones entre los cuales --- nombraba a el virus fijo obtenido a partir del " virus de calle", que obtuvo por medio de pases sucesivos en conejos-

En octubre del mismo año Pasteur presentó lo que denominó " método para prevenir la rabia después de la mordedura ", con el cual consideraba resuelta la cuestión que se había propuesto y sólo esperaba la oportunidad , para - llevarlo a la práctica y estar completamente seguro de que la inoculación virulenta a los animales vacunados no les - daría la enfermedad (24).

Theodor Vonne, mordido por su propio perro el 4 de julio de 1885, Joseph Meister, de nueve años de edad, mordido el mismo día solicitaron que se les aplicara el método preventivo desarrollado por Pasteur. El seis de julio se -- les inyectó en un pliegue hecho en la piel de uno de los - hipocondrios una suspensión de médula de 15 días en deseca- ción, otras dos inyecciones le fueron hechas el día 7, dos el día 8 y después una cada día hasta el 16 , con médulas- cada vez más recientes hasta llegar a la de un día , o sea 13 inyecciones en 10 días de tratamiento. Tres meses des--- pués Meister y Vonne estaban sanos y Meister vivió hasta - 1940 (24).

Después de los trabajos de Pasteur, se fundó por do-- nativo del pueblo francés un instituto que lleva su nombre y que posteriormente se extendió a las colonias francesas- en tanto que en el resto del mundo se instituyeron los cen- tros antirrábicos (24).

Posteriormente Semple y Fermi desarrollaron vacunas -

inactivadas con formol y fenol como substitutos de la inactivación por desecación de Pasteur y conservaron el mismo programa de vacunación, con la diferencia de que todas las dosis de vacuna eran iguales, lo cual simplificó su producción y manejo. Estas mismas vacunas fueron las primeras en emplearse en animales.

No fue sino hasta 1946 que koprowski y colaboradores desarrollaron la primera vacuna de virus vivo modificado contra la rabia. Esta era una vacuna producida en embrión de pollo (4). Posteriormente Kissling desarrolló una vacuna viva en cultivos celulares, que fue rápidamente seguida por otros (5).

ETIOLOGIA:

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda causada por un virus de la familia Rhabdoviridae, del género *Lyssa virus*, del grupo RNA, que afecta a todos los animales de sangre caliente incluyendo al hombre (15-17).

TRANSMISION:

La rabia es transmitida generalmente por la mordedura de un animal rabioso a un animal sano (16). Sin embargo, se han ensayado también métodos que intenten imitar las condiciones naturales de la infección como la inoculación intradérmica, subcutánea e intramuscular. Ocasionalmente la inoculación intradérmica se efectúa por escarificación procurando imitar las condiciones de una mordedura, otras vías de inoculación empleadas son: el cojinete plantar de las

extremidades anteriores o posteriores; instilación en el -
saco conjuntival; inoculación intraocular; intralingual; in -
tranasal; ya sea por instilación de gotas de virus en la -
nariz o por aerosol, la vía endovenosa, y la vía oral (16).-

Los animales experimentales empleados han probado ser
susceptibles por todas éstas vías, si bien arrojando resul
tados diferentes y a menudo contradictorios sobre la sus--
ceptibilidad por determinada vía (16).

Zunker y colaboradores inocularon virus de la rabia -
de la calle a ratones parabióticos. La inoculación de uno -
de los parabióticos provocó la enfermedad en el otro. De 26
pares inoculados 24 enfermaron, lo que muestra que la dise
minación del virus ocurrió únicamente por la vía venosa (1),

Los cricetos de 6 semanas de edad inoculados por la -
vía intramuscular con el virus de la rabia de la calle, pre
sentan en la fase de estado de la enfermedad, tanto en las
glándulas salivales como en los músculos y testículos, títu
los de virus que a veces son más elevados que los que se -
encuentran en el cerebro (1).

La inoculación del virus por la vía aérea en animales
recien nacidos, ratones o cricetos, demuestra que el virus
se multiplica primero en las células de la tráquea y luego
alcanza el sistema nervioso central (SNC). En los ratones --
contaminados por ingestión oral, el virus rábico se multi
plica en las células epiteliales de la lengua antes de ga
nar el sistema nervioso central (SNC) (9).

Constantine motivado por la muerte de dos personas --
por rabia, y que no habían sido mordidas, pero habían fre-

cuentado grutas contaminadas con virus, lo llevó a realizar la experiencia siguiente: ubicó 12 zorros y 10 coyotes en jaulas especiales a fin de protegerlos de las mordeduras de quirópteros y picaduras de insectos. Estos animales se dejaron inhalando la atmósfera de las cavernas durante 27 a 30 días. Todos los animales murieron de rabia después de un período de incubación que se prolongó hasta por 6 meses. Estos hechos confirman la presencia del virus en el aire y la posibilidad de la transmisión aerógena(8).

PATOGENIA:

La patogenia de la rabia empieza con la penetración del virus rábico al cuerpo del animal susceptible, generalmente por la mordedura de un animal rabioso, y de éste punto, el virus progresa hasta el sistema nervioso central (SNC) invadiéndolo. La tercera fase de desarrollo de la enfermedad es la generalización de la infección, que consiste en la diseminación del virus rábico del sistema nervioso central (SNC) a otros órganos. Finalmente ocurre la sintomatología rábica y la muerte del animal, a veces después de que ha mordido a otros animales sanos(16).

Experimentalmente, con virus fijo, se ha observado -- que el virus persiste en el sitio de la inoculación de 4 a 96 horas y después viaja por los troncos nerviosos hasta -- llegar a los ganglios espinales que proporcionan inervación al sitio inoculado, en donde el virus se multiplica.

Después invade el sistema nervioso central(SNC)(ya -- que se trata de un virus neurotrópico),y desde aquí la in-

fección se generaliza, o sea se disemina del sistema nervioso central(SNC) a otros órganos, incluyendo a las glándulas salivales, al final aparecen los signos clínicos y la muerte (9).

Los virus fijos, por su corto período de incubación, casi no se diseminan al resto del organismo y no se les encuentra en la saliva(22). El virus de calle, por su mayor período de incubación, sí produce infección generalizada.

El 75% de los perros, el 53% de los bovinos y el 87% de las zorras muertas por rabia, presentan virus en las glándulas salivales(9).

El virus puede estar presente en la saliva de los perros rabiosos hasta 5 días antes de la presentación de los primeros signos(4). Por ésta razón a los perros sospechosos que han mordido se les observa de 10 a 15 días. A causa de la parálisis el animal no puede alimentarse y deja de tomar agua, manteniéndose así hasta la muerte(9).

Otros investigadores en diversas especies animales, además de haber encontrado virus rábico en el sistema nervioso central(SNC) y en las glándulas salivales, también han encontrado virus en el hígado y riñón, bazo, glándulas adrenales y páncreas, testículos, epitelio de la córnea, córnea, retina, cristalino y humor vítreo, costras de piel, ganglios linfáticos, grasa café y músculo de murciélago, pulmón, sangre, orina, glándula mamaria y en otros tejidos(9)

SINTOMATOLOGÍA:

La sintomatología de la rabia, consiste en ligeros --

cambios en el temperamento. En los humanos hay inquietud, inseguridad y aprensión. En el perro, en la forma furiosa, a veces sólo se observa excitación, convulsiones y muerte; - ésto corresponderá a una presentación sobreaguda de la enfermedad. En otras ocasiones se observan cambios prodrómicos que consisten en cambios ligeros en el comportamiento

Después hay agresividad, etapa que corresponde al mayor peligro de transmisión de la rabia, ya que al morder transmiten la enfermedad. También se puede observar que los animales dan la impresión de que están atrapando objetos imaginarios(9).

En la forma parálitica hay parálisis muscular en la cabeza y en el cuello. Los animales no mastican ni beben, presentan ptialismo y la mandíbula colgada, pudiendo dar la impresión de que tienen un "hueso atorado", por lo cual muchas personas incautas corren el riesgo de infectarse al explorar la cavidad bucal. Después habrá parálisis generalizada y la muerte puede sobrevenir aproximadamente en 48 hrs. En gatos generalmente se presenta la rabia furiosa(9).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA:

La rabia está distribuida en casi todo el mundo y se presenta en cualquier clima. En 1971 se mencionó que no existía la rabia en algunas áreas tales como Australia, Nueva Zelanda, Inglaterra, España, otros países del continente Europeo y en otras muchas áreas delimitadas e islas (9).

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO:

A) Alteraciones anatómicas a la necropsia.

El cadáver puede estar emaciado y deshidratado -- por la falta de alimento y de líquidos. También puede haber traumatismos y soluciones de continuidad en diferentes áreas de la piel, fracturas, etc. Se pueden encontrar piedras, maderas y materia fecal en el estómago; congestión en las meninges(9).

B) Histopatología.

Si el animal ha muerto de rabia suele ser fácil descubrir las lesiones específicas, pero si el animal ha sido sacrificado, es posible que los corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos (corpúsculos de Negri) no estén presentes aún(22).

En los cortes se buscarán:

a) signos de meningoencefalomielitis, es decir meningitis, - infiltración parenquimatosa, formación de tubérculos rábicos (tubérculos de Babés o manguitos perivasculares) e infiltración ganglionar con satelitosis y neuronofagia.

Estas lesiones pueden observarse con cualquier método de tinción (hematoxilina-eosina, azul de metileno, Mann, floxina, Romanowski, Schiefstein, etc).

Lesiones específicas:

En los distintos tipos de Neuronas se buscarán Corpúsculos de Negri.

Cabe mencionar que la técnica de Saller es muy útil en el diagnóstico ya que es una técnica rápida sencilla y de buen contraste, que permite realizar un examen histopatológico.

gico de gran precisión, y de manera que es posible observar in situ en las células los Corpúsculos de Negri y queda excluida toda posibilidad de error(dura entre 2 y 10 minutos) (8-21).

C) Inmunofluorescencia.

Este método está basado en la observación de la fluorescencia de corpúsculos fluorescentes(probablemente Corpúsculos de Negri) impregnados con fluorocromo y excitados por exposición a una luz de 400 nm (4000 Å) de longitud de onda. Aquí se marca el anticuerpo con el fluorocromo para que el anticuerpo marcado reaccione con el antígeno específico, reacción que se observa con un microscopio de fluorescencia (11).

D) Prueba Biológica y Seroneutralización.

En encuestas hechas con gran cantidad de casos de rabia, se ha mostrado que en el 10 a 15% de los casos que resultaron positivos a la rabia en la inoculación del ratón no se habían observado Corpúsculos de Negri en el examen microscópico directo de la impronta. En consecuencia es muy recomendable que los laboratorios de diagnóstico de la rabia estén en condiciones de efectuar pruebas de inoculación en animal con los tejidos encefálicos Negri-negativos. Los animales usados en la prueba biológica son ratones Suizos blancos de 21 días; se inoculan intracerebralmente para observarlos posteriormente durante un lapso de 21 días mínimo pudiéndose observar, en casos positivos: pelo erizado, arqueamiento, incoordinación de las patas, parálisis, postración, etc (9-21).

Para identificar el virus desconocido por la prueba -- del índice de neutralización del virus, se titula con suero normal y con suero inmune conocido. Si el suero antirrábico neutraliza el virus problema y el suero normal no, se puede concluir que se trata de una cepa de virus rábico. Es importante someter todas las colecciones standard de virus rábico a la prueba del índice de neutralización del virus para determinar si esas colecciones contienen contaminantes víricos procedentes de los animales o de los sistemas de cultivo tisular usados para contener el virus. Se mezcla suero y virus para inocular a los ratones para su posterior chequeo (9-21).

Es conveniente citar que los diagnósticos de rabia deben comprender:

- La historia clínica (Anamnesis).
- Signos y síntomas (observación).
- Histopatología mediante la técnica de Seller.
- Inmunofluorescencia.
- Prueba biológica: inoculación en ratón lactante de 21 días.
- Prueba de seroneutralización con suero monotípico (monoclonal) conocido.

Esto para que sea un resultado definitivamente confiable. Se ha detectado que en los laboratorios de diagnóstico de la zona de influencia del estudio no se manejan todas sino que sólo se practica la técnica de inmunofluorescencia, y sólo en caso necesario se practica la prueba biológica.

E) Técnica de microfocos fluorescentes.

Esta técnica requiere menos tiempo, menos equipo y por lo tanto es más accesible a laboratorios poco equipados. Se usa para titular niveles de anticuerpos en sueros de animales vacunados. Es una nueva técnica *in vitro* para titulación y seroneutralización del virus rábico. Además es de duración corta (30 horas). Consiste en infectar cultivos celulares con la mezcla de virus y suero, tiñéndolos 30 horas después con fluoresceína (17).

BIOLOGICOS EXISTENTES.

1).- Suero hiperinmune.

Se recomienda aplicar el suero antes del tercer día -- postinoculación y funciona mejor cuando se combina con varias dosis de vacuna inactivada. Se aplica la mitad de la -- dosis alrededor de las áreas lesionadas por la mordedura y el resto por vía intramuscular

El suero antirrábico es obtenido de caballos hiperin-- munizados y después se refina y se concentra, se emplean 20 U.I. por kg de peso.

Actualmente se está usando suero hiperinmune a partir de humano, pero es muy caro. Es importante hacer mención que el suero hiperinmune sólo debe ser usado en humanos y no en perros ya que un perro no vacunado que es mordido por un perro rabioso se debe sacrificar (18).

2) Vacunas.

Existen tres tipos de vacunas antirrábicas según el -- modo de preparación:

- a) Tejido nervioso.
- b) Vacunas avianizadas preparadas en embrión de pollo.
- c) Vacunas preparadas en cultivos celulares.

Con excepción de las vacunas de tejido nervioso que sólo existen como vacunas inactivadas, los otros tipos de vacuna existen en variedades de virus vivo modificado y de virus inactivado(16).

A) Vacunas de virus vivo modificado.

- a) Vacuna avianizada Flury Lep(de bajo pasaje).

se elaboró con virus adaptado a pollitos por vía intracerebral durante 136 pases. Se encontró que protegía a los perros hasta por 3 años.

En algunos estados de Estados Unidos se prohibió porque ocasionó casos de rabia en perros.

- b) Vacuna avianizada Flury Hep(de alto pasaje).

Esta vacuna recibió 178 pases en embrión de pollo (y algunas veces hasta 227-230); estaba suficientemente atenuada por lo cuál podría ser recomendada para vacunar bovinos y todas las demás especies animales. Actualmente en México se ha demostrado que estas vacunas no confieren inmunidad satisfactoria(9).

- c) Cepa Kelev (con más de 100 pases).

cultivada en huevos embrionados y utilizada en perros y bovinos.

- d) Cepa Kissling de alto pasaje.

Cultivada en una línea de células de Hámster y recomendada para vacunar perros.

e) Cepa KAW (90-100 pases de 32°C).

Producida en cultivos celulares de riñón de Hamster y utilizada para todas las especies domésticas(9).

f) Vacuna V 319-Acatlán.

Vacuna desarrollada a partir de murciélago vampiro. Es una cepa de virus vivo atenuado y posee características adecuadas para una potencial vacuna, demostrando títulos rutinarios de 10^9 UFP (unidades formadoras de Placa) por ml. Se usa para la prevención de la rabia en bovinos, caninos, felinos y otras especies domésticas como cabras y caballos(6-9)

g) Vacuna ERA .

Es una vacuna de virus vivo producida en cultivos celulares (5)..

B) Vacunas de virus inactivado.

a) Vacunas fenoladas. La vacuna Simple se prepara inactivando el virus con 1.25% de fenol. Ha sido utilizada para proteger a los humanos previamente expuestos. Hay riesgo de causar accidentes neuro-paralíticos (reacción autoinmune -- contra la mielina). En los perros se puede aplicar una sola dosis de la vacuna Umeno Doi(9).

b) Vacuna elaborada en embrión de pato.

Elaborada con virus fijo, inactivado con Beta-propionolactona recomendada para la prevención de la rabia en la especie humana. Produce menos reacciones sistémicas que las vacunas tipo Semple y Fermi. En la mayoría de los pacientes vacunados hay dolor, eritema e induración en el punto de vacunación; en algunos hay fiebre, malasia y mialgia(en el 33%)

Existen reacciones neuroparalíticas en una de cada 30

000 personas vacunadas(9).

c) Vacuna Fuenzalida.

Esta vacuna fue recientemente elaborada a partir de cerebro de ratón lactante e inactivada con luz ultravioleta. Tiene una capacidad inmunogénica muy superior (mil o más veces) al compararla con las vacunas Fermi o Semple. Tiene gran garantía de inocuidad lo cual reduce la presentación de casos de paraplejia debido a la ausencia de mielina demostrable en el tejido nervioso central del ratón recién nacido(9).

VACUNACION DE PERROS Y GATOS.

Las vacunas antirrábicas en perros se aplican por vía intramuscular o subcutánea, la vía intramuscular es la más recomendada debido a que tiene mayor inervación e irrigación que a nivel subcutáneo, por lo tanto la vía intramuscular produce una mayor tasa de anticuerpos contra la enfermedad(29).

Se aplica en la cantidad de 2 ml, puede ser a partir de los 3 meses de edad, que es cuando el sistema inmunocompetente ya está debidamente desarrollado, para después proceder a las revacunaciones anuales.

El manejo de la vacuna debe procurar que esta se mantenga en refrigeración (2 a 4 C) hasta poco antes de su aplicación para obtener el máximo de su potencia.

Se recomienda no vacunar a las gatas gestantes con vacunas de virus vivo modificado. La vacuna Flury LEP no debe aplicarse en gatos porque les puede producir rabia(9).

La forma más efectiva para combatir la rabia consiste en establecer medidas encaminadas al control de las poblaciones de perros callejeros y de los murciélagos vampiros, y medidas encaminadas a la vacunación de los animales domésticos en contra de la rabia. Se debe realizar la vacunación masiva de la población canina; captura de perros callejeros para mantenerlos en custodia y ser entregados a sus dueños, previa vacunación, de no ser reclamados por los dueños deben ser sacrificados.

Otro detalle importante es que en caso de que si un perro no vacunado es mordido por un rabioso, se debe sacrificar inmediatamente sin importar su valor, ya sea, económico o estimativo. Si el animal mordido estaba vacunado se observará durante seis meses para mayor seguridad de su resistencia a la exposición de la enfermedad(9).

LA RABIA EN EL HOMBRE.

Se puede presentar en la forma furiosa o en la forma paralítica. El período de incubación puede variar desde los 12 días hasta 6 o 9 meses(20-60 días PROMEDIO).

El curso es de unos cuantos días con 100% de mortalidad. Sólo se conoce un caso en el que se hicieron suficientes pruebas para demostrar que no se trataba de ningún otro problema de tipo encefalítico. Pero se sospecha de otros casos de rabia abortiva en humanos(16). El riesgo de contraer la enfermedad aumenta en cuanto más cerca sea la mordedura a la cara, ya que estas áreas están mucho más innervadas y muy cerca del SNC(9).

Laboratorios y centros regionales de diagnóstico.

1.- Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias

INIP (SARH)

Km 15.5, carretera México -Toluca.

2.- Centro Antirrábico de Atizapán

Boulevard Adolfo López Mateos S/N Ciudad López Mateos.

Atizapán, Edo. de México.

3.- Centro antirrábico de Ecatepec

Ecatepec, Edo. de México.

4.- Centro antirrábico de Cuautitlán.

Cuautitlán de Romero Rubio, Edo de México.

Pruebas de potencia para las vacunas antirrábicas.

MÉTODOS:

- A) Directo. Se reproduce experimentalmente el fenómeno de protección, pues se vacuna y se desafía al animal.
- B) Semidirecto. Incluye vacunación, pues evalúa la protección por medio de la determinación del título de anticuerpos desarrollados en el suero.
- C) Indirecto. Por éste método no se vacuna ni se desafía al animal de prueba (es un método in vitro).

A).- DIRECTOS:

- 1 - Prueba de Habel. Es una prueba cuantitativa y en ella todos los animales reciben la misma dosis de vacuna.

mientras se varía la dosis de desafío(19).

En ésta prueba se llama también de ruptura de la inmunidad. Se usan ratones blancos Suizos de 4 a 6 semanas de edad.

2.- Prueba del NIH .También es una prueba cuantitativa y más exacta que la de Habel, es del tipo de "extinción de antígeno . En ellos se emplean cantidades variables de vacuna y todos los ratones reciben igual cantidad de virus

En esta prueba se utiliza una vacuna de referencia -- por lo cual es la más aceptada(28).

3.- Prueba de Koprowski.Tiene un carácter cualitativo y se emplea para vacunas elaboradas con virus atenuados; - se utilizan cobayos por vía intramuscular con una vacuna - conteniendo 5% de suspensión tisular, 3 semanas después se desafían los animales con CVS(virus rábico standard de confrontación) o virus de calle(21).

B).- SEMIDIRECTOS:

i. Seroneutralización.Esta prueba indica la cantidad de anticuerpos rábicos desarrollados por un animal.Es una prueba cuantitativa en la cual se prueban diferentes diluciones de suero con una cantidad constante de virus, se -- puede emplear la técnica de inoculación a ratones o por -- el método de reducción de placas(3).

C).- INDIRECTOS:

Son los menos utilizados.

1.- Fijación de Complemento.

2.- Pruebas de Hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación.

Requerimientos Míminos de Calidad en las Vacunas Antirrábicas.

En general, se realizan pruebas de pureza que consisten en determinar que el producto vacunal esté libre de cualquier contaminante vivo o activo demostrable distinto al que debe de contener(27).

Las pruebas de viabilidad difieren un poco de acuerdo al tipo de vacuna:

a) En el caso de vacuna de virus activo modificado para caninos(cepa Flury) bajo pasaje producida en embrión de pollo, la vacuna se diluye de 10^{-1} a 10^{-6} y con cada dilución se inoculan intracerebralmente 10 ratones de 21 días, con 0.03 ml y se observan por un período de 21 días.

Al finalizar la observación se realiza el cálculo de acuerdo al método de Reed and Muench.

La prueba será adecuada cuando se obtengan títulos de más de 10^3 DLR 50% / 0.03 ml (27).

b) En la vacuna de virus activo modificado para caninos y felinos en cultivos de tejidos, se reconstituyen dos frascos de la vacuna con una dosis cada uno, con el diluyente que los acompaña. Se extrae media dosis de cada frasco para completar una dosis total considerada como 10^0 . Posteriormente se hacen diluciones logarítmicas decimales utilizando agua destilada estéril(conteniendo 2% de suero de caballo, exento de anticuerpos contra rabia). Se inoculan grupos de 10 ratones por dilución por vía intracerebral, con 0.03 ml y se observan durante 21 días. Los cálculos se realizan con el mismo método de Reed and Muench(25).

La vacuna probada deberá tener un título mínimo de 10^3 DLR 50%/0.03 ml(27).

En las pruebas de potencia para las vacunas de virus inactivado producidas en cerebro de ratón lactante para caninos y felinos se utiliza la prueba de Habel(19).

El resultado final expresado como: DL 50% de protección, se obtiene restando el logaritmo del punto final 50 % de los animales de prueba.

La vacuna probada deberá contener 1,000 DL_{50} de protección como mínimo(27).

En las vacunas de virus vivo activo modificado los títulos mínimos aceptables son de 10^3 DLR 50%/ 0.03 ml(27)

En las pruebas de seguridad o inocuidad, se aplica una dosis de vacuna por la vía que el laboratorio indica a 2 perros y 2 gatos en caso de que esté indicada para éstos y se observan durante 20 días. Terminado este tiempo e observación, si el animal no muere o presenta signos de rabia, la prueba es satisfactoria(27). Esta prueba se aplica a las vacunas vivas.

Para vacunas inactivadas, se inoculan 2 cuyes adultos con 1 ml de la vacuna por vía subcutánea; 2 ratones blancos adultos con 0.5 ml de la misma vacuna y por la misma vía de inoculación y 10 ratones de 21 días de edad con 0.03 ml intracerebralmente. Se observan durante 14 días. La prueba se considera satisfactoria cuando los animales permanecen sanos pasado el tiempo de observación(27).

PRUEBAS DE INOCUIDAD Y POTENCIA DE LA VACUNA

V319 ACATLAN EN PERROS Y GATOS.

Se realizaron estudios de patogenicidad en perros -- con un lote grande de semilla maestra de virus. Un grupo -- de 10 perros Beagle adultos serológicamente negativos se metió en habitaciones de aislamiento y se inoculó cada uno con 10 dosis (10^{10} UFP), en la región cervical dorsal de la semilla maestra del virus. Se inyectó el virus en -- cuatro o cinco sitios. Se sacrificó entonces un perro en el día primero post-inoculación, siendo sacrificados otros animales los días 3, 10, 15 y 30. En cada caso, se tomaron muestras de músculos del cuello, médula espinal cervical, cerebelo, cerebro y médula para pruebas de inoculación en ratón y exámenes de anticuerpos fluorescentes. Los restantes cinco perros se observaron durante seis meses.

En los animales sobrevivientes, se observaron altos niveles de anticuerpos dentro de la primera semana post-inoculación. Sólo se encontró el virus en forma localizada en el tejido muscular de la región del cuello en el primer día por medio de la prueba de anticuerpos fluorescentes y de inoculación en ratones lactantes. No se detectó mayor crecimiento de virus; las muestras de médula espinal y encéfalo fueron negativas en todos los muestreos. Los 5 perros que se conservaron en observación durante más de 6 meses, permanecieron saludables durante este período cuando el experimento terminó (6).

Posteriormente, se realizaron pruebas de inocuidad y excreción del virus en perros. Para ello se vacunó un lote

de perros con $10^{6.7}$ UFP/dosis a cada animal manteniéndolos en observación durante seis meses; se tomaron periódicamente muestras de saliva y lágrimas. Las muestras obtenidas fueron examinadas en cultivos celulares a fin de determinar la presencia del virus rábico. Ninguno de los animales del estudio presentó síntomas de rabia, no excretaron virus de rabia en lágrimas ni en saliva (6).

Tiempo después se realizó un estudio sobre inocuidad y evaluación serológica de la vacuna antirrábica V319 ACATLAN en perros. Este trabajo se realizó mediante pruebas serológicas y de desafío. Se vacunaron con una dosis ($10^{6.7}$) a 10 perros adultos de raza Beagle serológicamente negativos a rabia; se sangraron a 1, 2, 3 meses post-vacunación, momento en el cual se llevó a cabo la prueba de desafío, conjuntamente con un grupo de 8 perros seronegativos a rabia que actuaron como testigos. El desafío se realizó empleando una cepa de virus de calle de origen canino previamente titulada. La dosis de desafío fué de 3,000000 DL-50 ratón por animal. Los resultados indicaron que la vacuna fue inocua para los perros vacunados, ya que no mostraron sintomatología clínica de rabia durante el experimento. En cuanto a la respuesta, el 100% de los animales respondieron con niveles de anticuerpos desde 1:38 hasta más de 1:125 al mes; elevándose estos niveles hasta un máximo de 1:1585 a los 3 meses. Cinco de 8 testigos desafiados murieron de rabia, lo cual arroja un valor de 62% de mortalidad. La prueba de desafío no se considera válida, porque la mortalidad de los testigos no fue igual o superior

al 80%; esto pudo deberse a que se emplearon perros calle-
ros sin historia clínica de vacunación, los cuales pudie-
ron tener niveles de anticuerpos rábicos serológicamente
no detectables o bien inmunidad celular. Por lo que respec-
ta a los perros vacunados, ninguno murió a consecuencia -
del desafío lo que indica que la vacuna es adecuada para
perros(10).

Un estudio semejante reveló que la inmunidad provoca-
da en perros Beagle vacunados y desafiados a los 12 meses
post-vacunación, arrojando resultados satisfactorios(14).

Con base a estos antecedentes se evaluó la inmunidad
inducida con esta vacuna en perros a los 30 meses de la -
vacunación. Se formó un grupo de perros Beagle testigo no
vacunado y un grupo vacunado con cepa V 319 Acatlán con -
título $10^{7.3}$ UFP/ml. La vacuna se aplicó intramuscularmen-
te en la región de la pierna con 2ml de la vacuna y el o-
tro grupo permaneció sin vacunar.

El grupo vacunado se sangró antes de la vacunación y
a 1,13,14,17 y 30 meses. Los testigos sólo se sangraron an-
tes de la vacunación y del desafío. Los sueros se sometie-
ron a pruebas de seroneutralización(SNT) en ratones.

La cepa de exposición consistió en una mezcla de ---
glándulas salivales en suspensión de perros rabiosos con
un título de $10^{5.75}$ DL₅₀/0.03ml (cepa 77-1).

A los 30 meses de la vacunación ambos grupos fueron
expuestos con 6 ml de la suspensión con glándulas saliva-
les, 3 ml en los músculos cervicales, a ambos lados del -
cuello.

La evolución clínica del grupo de animales control - después de la exposición, consistió en anorexia, aparecida al séptimo día, posteriormente al octavo y noveno días se observaron signos como tremor, nistagmus, parálisis, - somnolencia (agresividad en un sólo perro), hiperexcitabilidad, aerofobia, disfagia, postración y muerte. Los 10 perros murieron entre el 10^o y 15^o día post-inoculación, resultando positivos a rabia en las pruebas biológicas y de anticuerpos fluorescentes.

Ninguno de los animales desafiados del grupo vacunado mostró alteraciones atribuibles a la exposición, permaneciendo todos los animales normales durante los 120 días de observación.

El título sérico de 1:125 detectado 30 días post-vacunación, permaneció poco variable hasta los 30 meses.

En resumen los resultados observados, demostraron -- que la cepa V 319 Acatlán, fue capaz de proteger en un -- 100% de los animales vacunados expuestos con virus rábico de calle, que mató al 100% del grupo testigo no vacunado (14).

En conclusión, la vacuna V-319 Acatlán es un biológico confiable y altamente inmunogénico, capaz de proteger a los perros contra la rabia por más de 30 meses (14).

Las vacunas antirrábicas de virus vivo han demostrado producir una inmunidad más prolongada que las vacunas inactivadas, debido al permanente estímulo antigénico provocado por la multiplicación del virus en el organismo animal.

En un estudio comparativo, se observa que la cepa - Flury de bajo pasaje en embrión de pollo (LEP) ha demostrado protección por más de 39 meses en perros vacunados con una sola dosis; la cepa ERA elaborada en células renales de cerdo los protege por más de 36 meses y la cepa Flury de alto pasaje (HEP) en células renales de perro -- que estimula inmunidad de 24 meses(14).

En lo referente a gatos domésticos, se realizaron - pruebas de inocuidad y respuesta serológica a la vacuna - antirrábica V-319 con título de $10^{6.5}$ UFP/ml. Los gatos - fueron sangrados 30 días antes de la vacunación para ve - rificar que estuvieran libres de anticuerpos contra el - virus rábico.

Se formaron 2 grupos de gatos, 10 gatos que fueron - vacunados con una dosis por animal (2 ml), vía intramuscu - lar en la región de la pierna con la cepa V- 319, quedan - do en otro grupo 5 gatos testigos sin vacunar.

A ambos grupos se practicó muestreo serológico a -- los 30, 60, 90, 240 y 365 días post-vacunación para determi - nar título de anticuerpos circulantes.

En los sueros obtenidos de los gatos vacunados de - encontraron títulos de anticuerpos contra el virus rábi - co en grado variable; mientras que el grupo testigo perman - neció sin anticuerpos.

Todos los animales se mantuvieron clínicamente sa - nos durante la prueba. Desde el punto de vista serológico la vacuna resultó poseer buena antigenicidad en gatos, -- hasta un año post-vacunación(13).

Aunque la prueba de desafío será lo concluyente para demostrar la protección de la vacuna en gatos, se han observado en otras especies animales que han sido estimulados con esta cepa vacunal y habiendo presentado anticuerpos detectables, han sobrevivido al desafío con virus rábico(15).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO.

Como ya se ha mencionado, la rabia es una enfermedad infecciosa que afecta a todos los animales de sangre caliente incluyendo al hombre. En nuestro país, la rabia ha tomado un curso alarmante ya que datos reales nos demuestran un incremento considerable tanto en rabia humana, como en rabia canina y otras especies susceptibles.

Los datos estadísticos anivel nacional en los años de 1964, 1971 y 1974 indican lo siguiente:

En el año de 1964 se presentaron 103 casos de defunciones por rabia en humanos, causados en un 89.4% por perros, 1.9% por gatos y en un 8.7% por otras especies susceptibles(26).

En el año de 1971 se presentaron 139 casos de defunciones por rabia en humanos, causados en un 82.2% por perros, 2.8% por gatos y en un 15% por otras especies susceptibles(26).

En el año de 1974 se presentaron 157 casos de defunciones por rabia en humanos, causados en 89.9% por perros, 0.6% por gatos y en un 9.5% por otras especies susceptibles(26). (ver cuadro A.-).

DATOS ESTADISTICOS A NIVEL NACIONAL EN LOS AÑOS

1964, 1971 y 1974.

CUADRO A.-

Año	Nº defunciones por rabia en humanos.	causados por perros(%).	causados por gatos(%).	causados por otros(%).
1964	103	89.4	1.9	8.7
1971	139	82.2	2.8	15.0
1974	157	89.9	0.6	9.5
total	399	261.5	5.3	33.2

Algunos estados de la República Mexicana presentan mayor incidencia de rabia en relación a otros estados; en lo que se refiere al Estado de México, algunos de los datos estadísticos obtenidos en los años de 1974 a 1979 indican que:

Del año de 1974 al año de 1978 se presentaron 41 defunciones por rabia en humanos(26).

En los años de 1977 y 1978, se utilizaron 8,273-tratamientos completos para humanos, y 1,021 tratamientos incompletos(constando el tratamiento de 14 días), para los cuales se utilizaron un total de 121,540 dosis de vacuna(26).

En el año de 1979 en los meses de enero a julio a su vez se detectaron un total de 202 casos positivos a rabia en perros(26).

Toda esta recopilación de datos, despertó en nosotros un interés acerca de la rabia en México.

Enfocando el problema a nivel de la prevención de la rabia, decidimos iniciar un estudio de algunos de los productos profilácticos utilizados para el control de la rabia en nuestro país. Basamos nuestro estudio en una muestra representativa de los productos utilizados en México y comprobar el grado de protección que pueden dichos productos conferir a los animales vacunados.

En lo que se refiere al estudio de neurotropicidad de la vacuna V- 319 Acatlán, decidimos estudiarlo debido a que era una fase del estudio de esta vacuna

en perros, que no estaba completo. Se había efectuado la prueba de neurotropicidad utilizando la vía de inoculación en la salida de los nervios cervicales pero no se había efectuado la inoculación en nervio ciático quizá debido a la gran cantidad de trabajo involucrado en esta prueba. La oficina de Control de Medicamentos no exige esta prueba ni muchas otras que testifiquen la calidad de las vacunas antirrábicas empleadas en México, quizá porque son vacunas desarrolladas en otros países y ya las han efectuado cuando solicitan registro en México. Este no es el caso con la vacuna V-319 Acatlán que se desarrolló en el proyecto FAO-INIP en nuestro país dado que se intenta utilizar esta vacuna a nivel internacional, esta prueba estaba pendiente e intentamos que nuestra colaboración ayude a este fin.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

Inmunidad Contra Vacunas Antirrábicas.

1.- Animales experimentales.

a) Se seleccionaron 57 perros de diferentes edades, vacunados por primera vez o hasta un año antes-- contra la rabia. 32 de estos perros se muestrearon - en clínicas particulares y 25 en los Centros Antirrábicos de Atizapán, Cuautitlán y Ecatepec.

b) Ratones lactantes de 1 a 3 días de nacidos, albinos suizos CD-1 procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías, SARH.

2.- Vacunas empleadas: Se colectaron muestras de las vacunas más empleadas en las clínicas particulares y centros antirrábicos con el fin de determinar su calidad y tener una idea del manejo a que han estado sujetas, para este fin se obtuvieron muestras en los laboratorios productores, muestras de los mismos lotes en las farmacias veterinarias y en los consultorios particulares en donde se colectaron también las muestras de sangre de los perros.

Las vacunas colectadas fueron:

a) Vacuna de virus inactivado con 2.5% de suspensión de cerebro de ratón lactante tipo Fuenzalida (Gortie).

b) Vacuna de virus vivo modificado producida en cultivos celulares, cepa V 319 (Pronabive).

c) Vacuna de virus vivo modificado producida en -

cultivos celulares, cepa Roxane(Anchor).

d) Vacuna de virus vivo modificado producida en embrión de pollo, cepa Flury bajo pasaje(Hoechst).

Las vacunas liofilizadas fueron reconstituidas con agua destilada y diluída con Baps * para efectuar la prueba de Habel(19).

1.- Métodos experimentales.

El criterio de selección de los perros tanto en clínicas particulares como en los antirrábicos fué el que se tratara de perros clínicamente sanos, con una historia de vacunación antirrábica reciente y de preferencia animales vacunados solamente una vez. Debido a que en las clínicas particulares sólo se sangraron perros sanos, esto restringió la selección de animales de los que iban a peluquería, limpieza, revacunación antirrábica o alguna otra causa. En los antirrábicos también la selección eliminó a un gran número de animales pues sólo se sangraron los perros que tenían historia de vacunación reciente y datos específicos del animal, generalmente el propietario presentaba el certificado de vacunación y aportaba los datos sobre el animal.

A cada animal seleccionado para incluirse en el estudio se le elaboró una hoja clínica, anotando también la historia de vacunación antirrábica del animal.

* Solución salina fosfatada 0.1 M ph 7.0 conteniendo 0.5% de albúmina bovina fracción V adicionada de 50 U.I. de penicilina y 5 mg de estreptomycinina por ml.

Se efectuó un examen clínico del perro incluyéndose en el estudio solamente los que se encontraron clínicamente sanos.

De cada perro se obtuvo una muestra de sangre de 10 ml, utilizando un tubo Vacutainer y aguja desechable nuevos para cada animal. Esto último como precaución para evitar transmisión de enfermedades de un animal a otro.

Cada animal fue asignado a un grupo de acuerdo con su edad, tipo de vacuna empleada en él y el tiempo transcurrido desde su última vacunación.

Cada muestra de sangre se dejó coagular con el fin de que se retrajera el coágulo. Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos y se decantó el suero.

Cada muestra fue etiquetada y congelada a -20°C hasta el momento de efectuar las pruebas subsecuentes.

2.-Prueba de seroneutralización.

Para determinar la tasa de anticuerpos en las muestras de suero, se efectuó una prueba de seroneutralización con diluciones de suero y virus constante (3). Brevemente explicaremos que se efectúan diluciones quíntuples de suero, incluyendo 4 diluciones 1:5, 1:25, 1:125 y 1:625 de cada uno de los sueros que se probaran, estas diluciones de suero se mezclan con un volumen igual de una dilución de virus rábico estándar de confrontación (CVS)* que contenga entre 200 y 2000 dosis letales 50 (DL 50) para ratón en 0.03 ml, --

* Obtenido del Instituto Wistar de Filadelfia E. U. U.

según se determina por una titulación previa.

La mezcla suero-virus se mezcla por agitación,-- se incuba en baño María a 36°C durante media hora. Al término de este lapso se transfiere a un baño de hielo y se inoculara un grupo de 6 ratones por vía intracerebral con 0.03 ml de cada muestra virus-suero. En cada lote de 10 sueros incluidos en una prueba típica,-- se agregan los siguientes controles: un control de -- suero positivo conocido, un control de suero negativo conocido y 2 titulaciones de virus, una con las diluciones de virus mantenidas en hielo hasta el momento de la inoculación y otra en la que las diluciones de virus se incuban en baño María junto con las diluciones de suero. Los ratones se observan diariamente durante 21 días anotándose las muertes después del sexto día post-inoculación como específicas de rabia. El título del suero se expresa como dilución de suero capaz de proteger al 50% de los ratones de la dosis --- constante de virus CVS(3).

3.-Preparación del lote de trabajo del CVS.

Con la finalidad de partir siempre de un mismo lote de virus CVS en las pruebas de seroneutralización(SN), se preparó un lote de trabajo siguiendo el siguiente procedimiento:

El contenido de las ampollas de virus de referencia se descongeló bajo el grifo del agua fría y diluirse al 1:2 con el diluyente de suero de caballo al -

2% con el cual se obtiene una suspensión al 10%, esta se considera 10^{-1} . El líquido sobrenadante se lleva a una dilución 10^{-3} del virus y se inoculó por vía intracerebral 0.03 ml de una dilución a 300 ratones de 21 días. Para obtener una preparación de trabajo de título elevado a partir del virus de referencia liofilizado, conviene efectuar 2 pases en ratón y emplear como CVS de trabajo el producto del segundo pase. Los signos de parálisis aparecerán entre los 6-10 días. Cuando el ratón inoculado está totalmente paralizado pero aún respira, se sacrifica, se extrae el encéfalo y se congela inmediatamente con nieve carbónica en un recipiente pequeño. Una vez terminada la cosecha, al 10º día de la inoculación se descongelan todos los cerebros, se pesan y se trituran en un homogenizador frío efectuando ciclos de homogenización de 1 minuto seguidos de 3 minutos de reposo para evitar calentamiento. En el curso de la trituración se añade poco a poco el diluyente frío de suero de caballo al 2% necesario para obtener una suspensión al 20%. Se da a la suspensión un número de lote y, sin agitar ni centrifugar se distribuye en ampollas, que se cierran a la flama, se congelan con rapidez y se conservan a temperatura de la nieve carbónica (a -70°C aproximadamente) (28).

4.- Titulación del lote de trabajo del virus CVS.

Una vez preparado el lote de trabajo de CVS, se-

descongeló una ampollita, se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos para sedimentar partículas gruesas y se recuperó el sobrenadante con una pipeta. Este sobrenadante se diluyó 1:2 o sea 10^{-1} por contener el 10% de tejido nervioso, a partir de esta primera dilución se efectuaron diluciones decimales de 10^{-2} hasta 10^{-8}

Con cada dilución se inoculó un lote de seis ratones de 21 días por vía intracerebral con 0.03 ml y se observaron durante 21 días como se mencionó anteriormente. El título de virus se calculó por el método de Reed and Muench(25), y sirvió de base para calcular la dilución que contenía 2000 DL_{50} para el ratón con 0.03 ml para la prueba de SN.

5.-Titulación de las vacunas.

Las muestras de vacunas obtenidas en los laboratorios productores, en las farmacias veterinarias y los consultorios fueron tituladas de manera diferente según el tipo de vacuna de que se trató.

La vacuna cepa V 319 se tituló en prueba de viabilidad utilizando ratones lactantes de 1-3 días.

La vacuna Flury de bajo pasaje y la cepa Roxane se titularon en ratones de 21 días y a la vacuna inactivada tipo Fuenzalida se le determinó el índice de protección conferido de acuerdo a la prueba de Habel (19).

La prueba de Habel consiste, brevemente en vacunar a 20 ratones de 21 días por vía intraperitoneal--

con 6 dosis de 0.25 ml conteniendo 0.5% de tejido nervioso. Los animales se vacunan: lunes, miércoles y ---viércoles durante 2 semanas y se mantiene un lote de 15 ratones no vacunados como testigos. 14 días después de la última vacunación se desafía a los ratones vacunados con diluciones del virus CVS que van de 10^{-3} a 10^{-6} usando 5 ratones por dilución. Los ratones testigos se inoculan con las diluciones 10^{-5} a 10^{-7} . Se observa a los ratones durante 21 días más, anotándose diariamente la mortalidad por rabia. El índice de protección conferido por la vacuna se calcula por la diferencia de título observada en ratones vacunados en comparación con los testigos. Por ejemplo si el virus titula 10^7 DL₅₀ en los testigos y 10^3 DL₅₀ en ratones vacunados, restando un título del otro ($10^7 - 10^3$) nos arroja un índice de protección de $10,000(10^4)$.

Prueba de neurotropidad de la semilla maestra V 319-

Material:

1.-Equipo quirúrgico.

Se empleó un equipo de cirugía blanda, campos, -batas y guantes quirúrgicos. Se utilizaron 2 tipos de material de sutura (catgut para tejido muscular y fascias y nylon para piel). La anestesia se efectuó con un aparato de entubación con Halotano.

2.-Material de conservación de muestras.

Las muestras para histopatología se fijaron en --

formol boferado al 10%. Las muestras para cortes por -- congelación fueron congeladas rápidamente en Freón 22- (monoclorodifluorometano), previamente enfriado con -- nitrógeno líquido a -90°C. Las muestras se colocaron en cajas de Petri desechables de plástico de 60 mm de diámetro, se sellaron, etiquetaron y se transportaron sobre un bloque de hielo seco en una caja aislada hasta el congelador REVCO a -70°C donde se conservaron hasta el momento de hacer el estudio de las mismas.

3.-Otros materiales:

La inoculación se efectuó con jeringas de tuberculina, se contó con equipo de necropsias incluyendo una sierra eléctrica recíprocante para cortar hueso.

VIRUS.

Se emplearon 9 ampolletas de semilla maestra de - vacuna V 319 proporcionadas por el laboratorio de investigación sobre producción de biológicos del INIP.

Animales experimentales.

1.- Perros: Se seleccionó un lote de 15 perros raza Beagle procedentes de la colonia de perros del INIP, SARH.

Estos perros no habían sido vacunados contra rabia y eran serológicamente negativos a anticuerpos rábicos. La edad de los perros fluctuaba entre los 3-6 meses. Los animales fueron separados en corrales de madera en unidades de aislamiento. Dada la naturaleza de la prueba y la poca disponibilidad de unidades de aislamiento, los 15 perros se alojaron en una sola unidad, subdivididos en 3 corrales con 5 perros cada uno y se-

identificaron individualmente por tatuaje en la oreja.

2.- Ratonés: Los ratones empleados para la prueba biológica de las muestras fueron albinos cepa CD-1 de 21 días de edad con 11 gramos de peso corporal procedentes del bioterio del INIP..

Procedimiento Experimental..

1.- Los animales fueron divididos en 2 grupos. Un grupo testigo compuesto por 6 perros y un grupo tratado formado por 9 perros..

2.- Se sometió a todos los animales a una preparación preoperatoria.

a) Examen clínico e identificación (tatuaje).

b) Aplicación de preanestésicos (atropina) e inducción con pentotal sódico para su posterior intubación para Halotano.

c) Asepsia de la región quirúrgica.

3.- El nervio ciático se expuso quirúrgicamente y se infiltró con una ampollita de semilla maestra V319 Acatlán reconstituída en 0.3 ml de solución salina boferada. Este procedimiento se aplicó al lote de perros tratados.

Al lote testigo, sólo se le infiltró 0.3 ml de solución salina boferada.

4.- Obtención de muestras:

En los días 1, 3, 5, 10 y 15 post-inoculación, se sacrificó un perro tratado y un testigo; obteniéndose las siguientes muestras de cada animal:

- Nervio ciático del lado inoculado.

- Médula espinal porción lumbar.
- Médula espinal porción toráxica.
- Médula espinal porción cervical.
- Cerebelo.
- Corteza cerebral.
- Asta de Ammón.

A las muestras obtenidas se les dividió en 2 partes, una de las cuales se fijó en formol boferado al 10% y la otra se congeló en Freón 22 a -90°C para histopatología e inmunofluorescencia respectivamente. Se tomó una muestra adicional para inoculación de ratones, la cual se guardó en fresco en el congelador.

Los perros restantes (4 inoculados y un testigo) se observaron durante 6 meses, con el fin de determinar si desarrollaban la enfermedad. Terminado dicho lapso, se sacrificaron, se colectó el mismo tipo de muestras, las cuales se trabajaron de manera similar a las anteriores.

5.-Estudio de las muestras.

Las muestras fueron estudiadas de acuerdo a 3 métodos diferentes: Inmunofluorescencia, Histopatología e inoculación de ratones (prueba biológica para detección del virus)

a) Inmunofluorescencia.

Esta prueba fue incluida por su especificidad ya que se lleva a cabo utilizando anticuerpos rábicos mo-
noespecíficos separados de un suero hiperinmune y marcados con un fluorocromo, en este caso fue el Isotiocia

nato de fluoresceína al cual se denomina conjugado. El conjugado está constituido por anticuerpos rábicos funcionales (principalmente IgG) marcados con el colorante fluorescente también funcional. Cuando los anticuerpos encuentran el antígeno rábico en la preparación, se adhieren a él, marcándolo de esta manera con el fluorocromo que puede detectarse en un microscopio equipado con un sistema de iluminación especial. El microscopio empleado para la detección de la fluorescencia en las laminillas, está equipado con una lámpara de vapor de -- mercurio de alta presión cuya emisión de luz es especialmente rica en luz ultravioleta. A continuación se -- coloca un filtro excitador BG 12 que deja pasar solamente luz azul y ultravioleta que se hacen coincidir -- sobre la muestra mediante un condensador cardioide de campo oscuro. Antes de que la luz llegue a los ojos -- del operador del microscopio se intercala un filtro barrera VG 52 que absorbe la luz azul y ultravioleta, pero deja pasar la luz generada en la preparación por el fluorocromo y que es de mayor longitud de onda.

Los antígenos que reaccionan con el conjugado aparecen a la luz ultravioleta como partículas brillantes de color verde manzana o amarillo verdoso sobre un fondo oscuro que puede o no contener material fluorescente no específico. El conjugado puede adquirirse liofilizado en el INIP y se conserva en refrigeración mucho tiempo sin deteriorarse, antes de ser reconstituido.

La calidad de la fluorescencia depende sobre todo

siempre que se disponga del equipo microscópico adecuado, de la calidad del conjugado.

Con las muestras congeladas en Freón 22 se efectuaron cortes de 8 a 10 micras de grosor en un criostato mantenido a -20°C , se recuperaron 10 cortes de cada muestra, tomando 2 cortes por laminilla, se dejaron secar al aire y se fijaron durante 15 minutos en acetona a -20°C . Las laminillas fijadas se dejaron secar al aire y llegar a temperatura ambiente, se delimitó el área del tejido con barniz para uñas.

El conjugado liofilizado se reconstituyó hasta su volumen inicial añadiéndole agua destilada estéril. Se añade la cantidad deseada del conjugado reconstituido al volumen apropiado de suspensión de encéfalo de ratón normal o infectado. Por ejemplo si la coloración obtenida con una dilución final del conjugado al 1:40 es satisfactoria, se añade 0.1 ml de conjugado a 3.9 ml de suspensión de encéfalo de ratón. El conjugado no diluido restante se conserva a 4°C hasta que se utilice de nuevo.

El conjugado diluido se puede conservar en refrigeración y utilizarse durante una semana.

La técnica que se utilizó es la tinción directa y la función del CVS es la de absorber los anticuerpos específicos, con lo cual será posible determinar el grado de tinción inespecífica que produce el conjugado en la muestra en estudio.

La mezcla de conjugado con CVS se coloca en el ---

corte más alejado de la etiqueta del portaobjetos y la mezcla de cerebro normal con conjugado en la más cercana. Con cada serie de pruebas se incluyen testigos positivos y testigos negativos conocidos. Se tiñeron y examinaron 4 laminillas de cada muestra.

Para considerar como positiva una muestra, los testigos negativos deben ser negativos en ambos cortes los testigos positivos deben ser negativos en el lado teñido con CVS y conjugado y deben ser positivos en el lado teñido con cerebro normal y conjugado. De la misma manera la muestra debe ser positiva sólo en el lado teñido con cerebro normal y conjugado. Es importante aplicar este criterio de manera estricta debido a que la fluorescencia inespecífica es más alta en cortes de tejido que en improntas.

Con las muestras fijadas en formol, se procedió a su inclusión en parafina corte de 5 a 10 micras de espesor y tinción con Hematoxilina-eosina o con floxina.

Esta parte del trabajo fue realizada por el Sr. Guillermo Barreto, en el departamento de histología del INIP, SARH. En estos cortes se buscaron las siguientes características:

a) Signos de meningoencefalomielitis, es decir, meningitis, infiltración meníngea, manguitos perivasculares, infiltración parenquimatosa, formación de nódulos rábicos (nódulos de Babés o probables manguitos perivasculares) e infiltración ganglionar con satelitosis y neuronofagia (lesiones de Van Gehuchten y Nélis).

estas lesiones son demostrativas de encefalomiелitis.

b) Lesiones específicas. En los distintos grupos de Neuronas se buscarán corpúsculos de Negri.

Los corpúsculos de Negri se hallan sobre todo en la capa piramidal del cuerno de Ammón o Hipocampo en la circunvolución inferior y en la capa media de las Neuronas ganglionares del cuerno de Ammón y, con menor frecuencia en las células de Purkinje del cerebelo, la zona motora de la corteza cerebral y los núcleos bulbares.

La presencia de los corpúsculos de Negri permiten establecer un diagnóstico seguro de rabia.

Con las muestras congeladas en fresco se hizo la prueba biológica de inoculación en ratón.

Cada muestra se pesó: agregándole un volúmen en mililitros, igual a 4 veces su peso en gramos, de Baps las muestras se trituraron manualmente utilizando un mortero estéril y pistilo para cada una. La suspensión así obtenida se centrifugó, se colectó el sobrenadante y con este se inoculó un lote de 6 ratones de 21 días por vía intracerebral con 0.03 ml.

Los ratones inoculados se observaron diariamente durante 21 días, registrándose los resultados.

Si ocurrieran muertes de ratones con síntomas de rabia, se colecta asépticamente el encéfalo y se efectúa una prueba de IF con conjugado monoespecífico de rabia para asegurar la presencia de virus rábico en la muestra.

Resultados de las pruebas de inmunidad contra vacunas
antirrábicas

Los resultados obtenidos de las pruebas de seroneutralización para determinar la tasa de anticuerpos en las - - muestras de suero obtenidas de los perros vacunados en -- consultorios particulares y centros antirrábicos se muestran en los Cuadros N° 1,2,3 y Cuadros N°4 y 5 respectivamente.

Los datos obtenidos de la titulación de vacunas por medio de la prueba de virus viable para vacunas de virus vivo y la prueba de potencia de Habel para vacunas inactivadas, se observan en los cuadros N°6,7,8 y 9.

Haciendo un análisis general de estos cuadros, observaremos una variedad de resultados, por ejemplo, en perros vacunados en consultorios particulares con el tipo de vacuna Gortie los resultados independientemente de la edad del animal, el número de vacunaciones y el tiempo transcurrido desde la última vacunación se observan títulos bajos como por ejemplo: menor a 1:5. 1:25 y 1:56 (Cuadros N°1 - y 2) Por otro lado, se observan sólo 5 casos de 20 estudiados de buenos títulos con esta vacuna en un perro de 3.6 años con tres vacunaciones y título mayor a 1:125 (Cuadro N°1), otro perro de 4.4 años con 3 vacunaciones y título de mayor a 1:125 y un perro de 5.7 años con 4 vacunaciones y título de 1:125 (Cuadro N°2). Un perro de 10.3 años con una vacunación y título mayor a 1:125; así como, otro perro de 12 años con 12 vacunaciones y título de 1:125 (Cuadro N°3).

Estos resultados se asocian a los obtenidos en la --- prueba de potencia de esta vacuna obteniendo títulos de $10^{1.11}$ I.P. (Índice de Protección), $10^{0.31}$ I.P. y $10^{0.91}$ I.P. Cuadro N°9.

En perros vacunados también en consultorios particulares con el tipo de vacuna Pronabive, se observa que los 11 sueros obtenidos, arrojan títulos que van desde 1:125- hasta mayor a 1:625. Cuadros N°1,2 y 3. Asociándose estos resultados a los obtenidos en la titulación de la vacuna se observan títulos de $10^{5.38}$ D1₅₀/ ml, $10^{5.35}$ D1₅₀/ ml y $10^{5.45}$ D1₅₀/ ml. (Cuadro N°6).

Otro suero obtenido de un animal vacunado con Sanfer (cepa ERA), se obtuvo un título mayor a 1:625. Cuadro N° 1.

En perros vacunados en centros antirrábicos, se utiliza generalmente el tipo de vacuna Anchor, cuyos títulos difieren por las características particulares de cada -- caso (Cuadros N° 4 y 5) se observan títulos que van desde 1:125 hasta mayor a 1:625.

Sólo en dos perros de 22 muestreados con este tipo de vacuna, arrojaron valores de SN de 1:40 de un perro de 1 año con 1 vacuna aplicada intramuscularmente (Cuadro N°4); y un perro de 4 años con dos vacunaciones por vía intra-- muscular con un título de 1:75 (Cuadro N° 5).

Los resultados de la titulación de la vacuna son de : $10^{3.97}$ D1₅₀/ ml, $10^{4.81}$ D1₅₀/ml y $10^{4.81}$ D1₅₀/ ml (Cua - dro N°7).

Otros datos son de un perro de 3 años con tipo de vacuna IB (Industria Biológica) y título de 1:625 (Cuadro N°5). Perro de un año vacuna tipo Pronabive con título de 1:125 (Cuadro N°4), perro de 2 años, vacuna tipo Gortie - con título de 1:625 (Cuadro N°4).

Otra de las vacunas tituladas fue la vacuna tipo Hoechst, cuyos títulos son de $10^{3.72}$ D₁₅₀/ml y $10^{3.97}$ D₁₅₀/ml (Cuadro N°8). No se incluyeron sueros de perros vacunados debido a que es una vacuna poco utilizada en clínicas particulares y centros antirrábicos,

El número de muestras obtenidas así como sus respectivos títulos, se resúmen en el cuadro N°10.

Resultados de la prueba de neurotropicidad de la semilla maestra V-319.

En la selección de 15 perros utilizados en la prueba, los resultados obtenidos de las pruebas de seroneutralización para detectar anticuerpos rábicos, se obtuvieron títulos negativos (menores a 1:2 y menores a 1:5)

En el exámen coproparasitoscópico por flotación (7), se detectó la presencia de Ascaris (Toxocara canis) en tres perros del lote utilizado: por razones de manejo, se desparasitó todo el lote con Dietil Carbamazina (Caricide) a razón de 40 mg/Kg de peso (20)

En el exámen clínico pre-operatorio, se observaron resultados homogéneos en cuanto a edad (3 y 6 Meses), peso (7 a 10Kg.), temperaturas normales (38.4°C y 39 °C) y con un buen estado general de carnes en todos ellos. En la revisión de ojos, boca, nariz, orejas, mucosas, piel y pa-

tas, no se observaron cambios patológicos aparentes. En la auscultación del aparato cardiovascular así como, el respiratorio, no se detectó alteración alguna, obteniendo constantes normales (86 - 185 /minuto y 16 - 24 /minuto - respectivamente (12).

El aparato digestivo y urinario no mostraron alteración alguna, observandose un excremento pastoso en todos los perros y una orina clara sin cambios patológicos aparentes.

Durante el acto quirúrgico, se expuso el nervio ciático de los animales con el mínimo trauma quirúrgico que esto suponga, así como, la lesión provocada al nervio ciático al aplicar 100 dosis de semilla maestra ($10^{8.5}$) en 0.3 ml de diluyente; que a la postre, provocara la claudicación del miembro intervenido durante 5 a 10 días post-intervención quirúrgica, tanto en los tratados como en los testigos. Este síntoma fué atribuido al trauma quirúrgico.

En la etapa post-operatoria, se observaron todos los animales in situ diariamente hasta el término de la prueba. Esta observación se limitó a su comportamiento en general, consistencia de heces fecales y estado de carnes.

El sacrificio de los perros (previo exámen clínico completo) se realizó aplicando una sobre - dosis de Pentobarbital Sódico por vía intravenosa hasta producir paro respiratorio, procediendose posteriormente al desangrado en blanco por sección del paquete arterio -venoso cervical por degollamiento.

En ninguno de los animales de la prueba se encontró al-

teración alguna durante su exámen clínico post-quirúrgico y pre-sacrificio para la necropsia.

En la necropsia de todos los animales de la prueba, la única alteración que se encontró, fueron las reacciones - inflamatorias del nervio ciático en el sitio de la inoculación sólo en los perros sacrificados al 1°, 3°, 10° y 15° día post - inoculación.

Por razones de identificación, se inoculó el nervio - ciático del miembro derecho; y se dejaron las suturas de nylon hasta el momento del sacrificio.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, es como sigue:

Prueba de Inmunofluorescencia.

En ésta prueba, de cada muestra de tejido, se hicieron 4 cortes por congelación a - 20°C, aplicando la técnica de tinción descrita anteriormente, observamos algunos datos - de fluorescencia dudosa; la cuál, fue evaluada al momento por más de una persona capacitada en esta prueba, desmintiendo nuestras sospechas. Sin embargo, observamos fluorescencia positiva en las muestras siguientes:

- Médula espinal lumbar. Perro N°03 sacrificado - 24 horas post-inoculación. Cuadro N°11.
- Nervio ciático, médula espinal cervical y cerebelo, Perro N°28 sacrificado al 15° día post - - inoculación. Cuadro N°15.
- Cerebelo. Perro N°7 sacrificado a los 6 meses - post- inoculación. Cuadro N°17.

Estos resultados positivos fueron reevaluados por per

sonal con experiencia en éste tipo de prueba.

En las muestras restantes, no se detectó fluorescencia específica. Cuadros N°11 al Cuadro N°18.

Prueba de Histopatología.

Para esta prueba diagnóstica, se realizaron dos cortes histológicos por muestra de tejido aplicando las tinciones de Hematoxilina Eosina (H.E.) y Floxina (F1). Además de tener una laminilla positiva como referencia en los cortes histológicos de la prueba; los cuales arrojaron resultados negativos en todas las muestras trabajadas. Se observaron un total de 105 laminillas tenidas con Hematoxilina Eosina (H.E.) y 105 teñidas con Floxina (F1). Cuadro N°11 al Cuadro N°18.

Prueba biológica de inoculación en ratones.

En ésta última prueba, con cada muestra de tejido se inocularon 6 ratones de 21 días y se observaron diariamente durante 21 días. En el transcurso de esta prueba, murieron algunos ratones a partir del 4° día post-inoculación. A estos ratones se les extrajo el cerebro y se sometieron a exámenes de inmunofluorescencia arrojando resultados negativos; por lo tanto, la causa de su muerte se atribuyó a encefalitis diferentes a rabia.

Todos los ratones al final de la observación demostraron una negatividad absoluta. Cuadro N°11 al Cuadro N°18.

Cuadro N° 1

PERROS VACUNADOS EN CONSULTORIOS PARTICULARES

EDAD	TIPO DE VACUNA *	N° DE VACUNACIONES	VIA DE APLICACION	TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ULTIMA VACUNACION	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION
10 meses	Pronabive	2	Subcutánea	6 meses	1:625
1 año	Gortie	1	Subcutánea	9 meses	menor a 1:5
1.3 años	Gortie	1	Subcutánea	1 año	menor a 1:5
1.3 años	Pronabive	2	Subcutánea	3 meses	1:625
1.5 años	Gortie	1	Subcutánea	11 meses	menor a 1:5
1.10 años	Gortie	1	Subcutánea	3 meses	menor a 1:5
1.10 años	Pronabive	2	Subcutánea	7 meses	mayor a 1:625
2 años	Gortie	2	Subcutánea	6 meses	menor a 1:5
2 años	Gortie	1	Subcutánea	4 meses	mayor a 1:25
2.9 años	Gortie	2	Subcutánea	8 meses	menor a 1:5
3 años	Sanfer	3	Intramuscular	5 meses	mayor a 1:625
3 años	Gortie	3	Subcutánea	11 meses	menor a 1:5
3 años	Pronabive	3	Intramuscular	4 meses	mayor a 1:625
3.6 años	Gortie	3	Subcutánea	4 meses	mayor a 1:125

* Esta columna se refiere solo a la última vacuna empleada en estos animales.

PERROS VACUNADOS EN CONSULTORIOS PARTICULARES

EDAD	TIPO DE VACUNA *	N° DE VACUNACIONES	VIA DE APLICACION	TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ULTIMA VACUNACION	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION
3.6 años	Gortie	2	Subcutánea	2 meses	menor a 1:5
4 años	Pronabive	3	Intramuscular	9 meses	mayor a 1:625
4 años	Gortie	4	Subcutánea	4 meses	menor a 1:5
4 años	Pronabive	4	Intramuscular	11 meses	1:625
4 años	Pronabive	4	Subcutánea	7 meses	1:400
4 años	Pronabive	5	Subcutánea	6 meses	1:131
4.4 años	Gortie	3	Subcutánea	1 año	mayor a 1:125
5.7 años	Gortie	4	Subcutánea	11 meses	1:125
5.9 años	Gortie	5	Subcutánea	10 meses	menor a 1:5
6 años	Pronabive	6	Subcutánea	2 meses	1:125
7 años	Gortie	8	Subcutánea	1 año	menor a 1:5
8 años	Gortie	8	Subcutánea	7 meses	1:56
9 años	Gortie	9	Subcutánea	1 año	1:56
10 años	Gortie	10	Subcutánea	1 año	menor a 1:5

* la columna se refiere solo a la última vacuna empleada en estos animales.

Cuadro N-3

PERROS VACUNADOS EN CONSULTORIOS PARTICULARES

EDAD	TIPO DE VACUNA *	Nº DE VACUNACIONES	VIA DE APLICACION	TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ULTIMA VACUNACION	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION
10.3 años	Gortie	1	Subcutánea	9 meses	mayor a 1:25
12 años	Gortie	12	Subcutánea	11 meses	1:125
12 años	Pronabive	9	Subcutánea	2 meses	mayor a 1:625
12 años	Pronabive	10	Subcutánea	10 meses	1:625

* Esta columna se refiere solo a la última vacuna empleada en estos animales.

PERROS VACUNADOS EN CENTROS ANTIRRABICOS

EDAD	TIPO DE VACUNA *	N° DE VACUNACIONES	VIA DE APLICACION	TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ULTIMA VACUNACION	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION
5 meses	Anchor	1	Subcutánea	13 días	1:400
5 meses	Anchor	1	Subcutánea	3 meses	1:240
5 meses	Anchor	1	Subcutánea	3 meses	1:125
8 meses	Anchor	1	Intramuscular	7 meses	mayor a 1:625
11 meses	Anchor	1	Subcutánea	11 meses	1:125
11 meses	Anchor	1	Subcutánea	5 meses	mayor a 1:625
1 año	Anchor	1	Subcutánea	10 meses	1:625
1 año	Anchor	1	Subcutánea	10 meses	1:625
1 año	Anchor	1	Intramuscular	7 meses	1:40
1 años	Pronabive	1	Subcutánea	5 meses	1.125
1.1 años	Anchor	1	Intramuscular	7 mes	1.154
1.6 años	Anchor	2	Intramuscular	1 meses	1:154
2 años	Gortie	1	Intramuscular	4 meses	1:625
2 años	Anchor	2	Intramuscular	11 meses	1:625

* Esta columna se refiere solo a la última vacuna empleada en estos animales.

Cuadro N°5

PERROS VACUNADOS EN CENTROS ANTIRRABICOS

EDAD	TIPO DE VACUNA *	Nº DE VACUNACIONES	VIA DE APLICACION	TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ULTIMA VACUNACION	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION
2 años	Anchor	2	Intramuscular	6 meses	mayor a 1:625
2.6 años	Anchor	2	Subcutánea	1.2 meses	1:240
3 años	I.B.	5	Subcutánea	9 meses	1:625
3 años	Anchor	2	Subcutánea	6 meses	1:625
3.5 años	Anchor	4	Subcutánea	6 años	1:400
4 años	Anchor	2	Intramuscular	5 meses	1:75
5 años	Anchor	2	Intramuscular	10 meses	1:200
6 años	Anchor	4	Intramuscular	2 meses	mayor a 1:625
7 años	Anchor	2	Intramuscular	10 meses	1:625
7 años	Anchor	4	Intramuscular	1 mes	mayor a 1:625
8 años	Anchor	1	Subcutánea	5 meses	menor a 1:125

* Esta columna se refiere solo a la última vacuna empleada en estos animales.

Cuadro N°6

Vacuna Pronabive, cepa V-319/ Acatlán, de virus vivo atenuado en cultivos celulares.

	LABORATORIO	FARMACIA	CONSULTORIO
LOTE	139-9-80	81-80-6-80	81-59-4-80
TITULO	$10^{5.38} D_{150}/ml$	$10^{5.35} D_{150}/ml$	$10^{5.45} D_{150}/ml$.

Animales Inoculados: Ratones lactantes de 1 a 3 días.

Vía Inoculación : Intracerebral.

Cantidad Inoculada : 0.02 ml.

Diluyente : BAPS

Cuadro N°7

Vacuna Anchor, cepa Roxane, de virus vivo modificado de alto pasaje, producida en cultivo de tejidos celulares, estabilizada y liofilizada.

	LABORATORIO	FARMACIA	CONSULTORIO
LOTE	D-0580-3	D-0580-3	D-0580-3
TITULO	$10^{3.97} D_{150}/ml.$	$10^{4.81} D_{150}/ml.$	$10^{4.81} D_{150}/ml.$

Animales Inoculados: Ratonés de 21 días.

Vía de Inoculación : Intracerebral.

Cantidad Inoculada : 0.03 ml.

Diluyente : BAPS.

Cuadro N°8

Vacuna Hoescht, cepa Flury de bajo pasaje, de virus vivo atenuado cultivado en embrión de pollo.

	LABORATORIO	FARMACIA	CONSULTORIO*
LOTE	64-2-79	64-2-79	- o -
TITULO	$10^{3.72} D_{150}/ml$	$10^{3.97} D_{150}/ml$	- o -

Animales Inoculados : Ratonés de 21 días.

Vía de Inoculación : Intracerebral.

Cantidad Inoculada : 0.03 ml.

Diluyente : BAPS.

*Las vacunas para titulación de esta sección, no fueron posibles de localizar debido a la pobre demanda a que son efecto.

Cuadro N°9

Vacuna Gortie, de virus inactivado con 2.5% de suspensión de cerebro de ratón lactante tipo Fuenzalida.

	LABORATORIO	FARMACIA	CONSULTORIO
LOTE	09	09	07
TITULO	$10^{1.11} D_{50}/ml.$	$10^{0.31} D_{50}/ml.$	$10^{0.91} D_{50}/ml.$

A estas vacunas se les determinó el índice de protección conferido de acuerdo a la prueba de Habel (18).

El título del CVS de desafío fué de $10^{7.3} D_{50}/ml.$

Cuadro N°10

Síntesis de los cuadros N°1 al N°9.

		TIPO DE VACUNA				
		ANCHOR	GORTIE	PROVABIVE	SANFER	I.B.
TOTAL DE ANIMALES MUESTREADOS		22	21	12	1	1
TITULOS OBTENIDOS	MENOR 1:5	0	12	0	0	0
	MAYOR 1:25	1	2	0	0	0
	MAYOR 1:50	1	1	0	0	0
	1:125	2	2	2	0	0
	MAYOR 1:125	7	3	2	0	0
	1:625	6	1	4	0	1
	MAYOR 1:625	5	0	4	1	0
	TITULO DE LA VACUNA (D1 50/ ml.)	$10^{4.81}$	$10^{0.91}$	$10^{5.45}$	- 0 - *	- 0 - *

* Estas vacunas no se incluyeron para ser tituladas en el presente trabajo.

La vacuna Hoechst no se incluye en este cuadro debido a que no se obtuvieron sueros.

Cuadro N° 11

PERROS SACRIFICADOS 24 HORAS POST-INOCULACION

TIPO DE MUESTRA							
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO	NERVIO CIATICO	MEDULA ESPINAL LUMBAR	MEDULA ESPINAL TORAXICA	MEDULA ESPINAL CERVICAL	CEREBELO	CORTEZA CEREBRAL	ASTA DE AMMON
PERRO N°58				TESTIGO NO INOCULADO			
(1) INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
(2) PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
(3) HISTO - PATOLOGIA H.E.	-	-	-	-	-	-	-
(4) HISTO - PATOLOGIA F1	-	-	-	-	-	-	-
PERRO N°03				INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	+	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA. H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA F1	-	-	-	-	-	-	-

- (1) De cada muestra de tejido, se hicieron cuatro cortes por congelación a - 20°C.
- (2) Con cada muestra de tejido, se inocularon 6 ratones de 21 días y se observaron durante un período de 21 días antes de dar resultados.
- (3) En esta prueba se realizó un corte histológico por muestra de tejido aplicando la tinción de Hematoxilina Eosina (H.E.).
- (4) En esta prueba, se utilizó la tinción de Floxina (F1).

Cuadro N° 12

PERROS SACRIFICADOS AL 3°DIA POST - INOCULACION

TIPO DE MUESTRA							
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO *	NERVIO CIATICO	MEDULA ESPINAL LUMBAR	MEDULA ESPINAL TORAXICA	MEDULA ESPINAL CERVICAL	CEREBELO	CORTEZA CEREBRAL	ASTA DE AMON
PERRO N° 62				TESTIGO NO INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H. E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA FL	-	-	-	-	-	-	-
PERRO N°122				INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H. E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA FL.	-	-	-	-	-	-	-

* Estas pruebas de diagnóstico, se realizaron en la forma que lo explica el pie de página del cuadro N°10.

Cuadro N° 13

PERROS SACRIFICADOS AL 5°DIA POST - INOCULACION

TIPO DE MUESTRA							
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO *	NERVIO CIATICO	MEDULA ESPINAL LUMBAR	MEDULA ESPINAL TORAXICA	MEDULA ESPINAL CERVICAL	CEREBELO	CORTEZA CEREBRAL	ASTA DE AMMON
PERRO N° 09				TESTIGO NO INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA FL.	-	-	-	-	-	-	-
PERRO N° 19				INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA FL.	-	-	-	-	-	-	-

* Estas pruebas de diagnóstico se realizaron en la forma que lo explica el pie de página del cuadro N°10.

Cuadro N° 14

PERROS SACRIFICADOS AL 10°DIA POST - INOCULACION

TIPO DE MUESTRA							
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO	NERVIO CIATICO	MEDULA ESPINAL LUMBAR	MEDULA ESPINAL TORAXICA	MEDULA ESPINAL CERVICAL	CEREBELO	CORTEZA CEREBRAL	ASTA DE AMMON
PERRO N° 42				TESTIGO NO INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA FL.	-	-	-	-	-	-	-
PERRO N° 01				INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA FL	-	-	-	-	-	-	-

* Estas pruebas de diagnóstico, se realizarón en la forma que lo explica el pie de página del cuadro N° 10.

PERROS SACRIFICADOS AL 15°DIA POST - INOCULACION

TIPO DE MUESTRA							
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO*	NERVIO CIATICO	MEDULA ESPINAL LUMBAR	MEDULA ESPINAL TORAXICA	MEDULA ESPINAL CERVICAL	CEREBELO	CORTEZA CEREBRAL	ASTA DE AMMON
PERRO N° 26				TESTIGO NO INOCULADO			
INMUNO FLUORESCENCIA -	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO PATOLOGIA - H.E	-	-	-	-	-	-	-
HISTO PATOLOGIA - F1	-	-	-	-	-	-	-
PERRO N° 28				INOCULADO			
INMUNO FLUORESCENCIA -	+	-	-	+	+	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO PATOLOGIA - H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO PATOLOGIA - F1.	-	-	-	-	-	-	-

* Estas pruebas de diagnóstico, se realizaron en forma que lo explica el pie de página del cuadro N° 10.

PERROS SACRIFICADOS A LOS 6 MESES POST - INOCULACION
(Término del período de observación)

TIPO DE MUESTRA							
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO *	NERVIO CIÁTICO	MEDULA ESPINAL LUMBAR	MEDULA ESPINAL TORAXICA	MEDULA ESPINAL CERVICAL	CEREBELO	CORTEZA CEREBRAL	ASTA DE AMMON
PERRO N° 24				TESTIGO NO INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES **	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H .E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA F1.	-	-	-	-	-	-	-
PERRO N° 40				INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H. E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA F1.	-	-	-	-	-	-	-

* Estas pruebas de diagnóstico, se realizaron en la forma que lo explica el pie de página del cuadro N°10.

** Todos los ratones inoculados con las muestras de éste perro, murieron con síntomas similares a rabia, pero resultaron negativos a inmunofluorescencia.

PERROS SACRIFICADOS A LOS 6 MESES POST - INOCULACION

TIPO DE MUESTRA							
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO *	NERVIO CIATICO	MEDULA ESPINAL LUMBAR	MEDULA ESPINAL TORAXICA	MEDULA ESPINAL CERVICAL	CEREBELO	CORTEZA CEREBRAL	ASTA DE AMMON
PERRO N° 07				INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	+	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO PATOLOGIA H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO PATOLOGIA F1	-	-	-	-	-	-	-
PERRO N° 22				INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO PATOLOGIA H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO PATOLOGIA F1	-	-	-	-	-	-	-

* Estas pruebas de diagnóstico, se realizaron en la forma que lo explica el pie de página del cuadro N° 10.

Cuadro N° 18

PERRO SACRIFICADO A LOS 6 MESES DE OBSERVACION

TIPO DE MUESTRA							
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO *	NERVIO CIATICO	MEDULA ESPINAL LUMBAR	MEDULA ESPINAL TORAXICA	MEDULA ESPINAL CERVICAL	CEREBELO	CORTEZA CEREBRAL	ASTA DE AMMON
	PERRO N°11			TESTIGO NO INOCULADO			
INMUNO - FLUORESCENCIA	-	-	-	-	-	-	-
PRUEBA EN RATONES	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA H.E.	-	-	-	-	-	-	-
HISTO - PATOLOGIA FL.	-	-	-	-	-	-	-

* Estas pruebas de diagnóstico, se realizaron en la forma que lo explica el pie de página del cuadro N°10.

D I S C U S S I O N

D I S C U S I O N .

En el análisis de resultados de las pruebas realizadas en "Inmunidad contra vacunas antirrábicas". Se observó que sólo el 25% de los sueros obtenidos de perros vacunados en consultorios particulares con el tipo de vacuna Gortie, - demuestran un título de anticuerpos aceptable; mientras - que el 75% restante los títulos demuestran una inmunidad - muy pobre en algunos sueros y nula en muchos otros.

Estos datos son más ampliamente justificados al obtener un título de vacuna (ver Cuadro N°9) que no alcanza - los requerimientos mínimos de calidad que deben llenar los productos biológicos para uso veterinario; principalmente en lo que a título se refiere (27).

En nuestro estudio, se analizaron los lotes de vacuna antirrábica número 7 (procedente de consultorios particulares) y el número 9 (procedentes directamente del laboratorio productor y de farmacias veterinarias), de los laboratorios Gortie. Dicho laboratorio reporta que los títulos obtenidos mediante la prueba de potencia de Habel al lote N°7 en el mes de marzo de 1979 fue de 10^{-4} ; mientras que al lote N°9 realizada la prueba el mes de mayo del mismo año, el título obtenido fue de $10^{-4.2}$; es decir, reportan una protección de más de 1,000 D₅₀ %(*).

En perros vacunados con la vacuna tipo Pronabive se observó una protección en el 100% de los animales muestreados; corroborandose este dato con el título obtenido de -

* Fuente : Laboratorios Gortie.

esta vacuna ($10^{5.38}$, $10^{5.35}$, y $10^{5.45}$ D₅₀/ ml. (Cuadro N°6), rebasando así el requerimiento mínimo de 10^3 (27); también están dentro de los márgenes de título mínimo aceptable -- para el laboratorio productor ($10^{5.3}$ para perros).

En el tipo de vacuna Anchor cuyas muestras de suero -- fueron obtenidas en los centros antirrábicos se demuestra que más del 91% de estos animales demuestran títulos aceptables y sólo un 9% muestran poca o nula protección. Estos datos, se confirman al obtener un título de vacuna ligeramente arriba de los requerimientos mínimos (ver Cuadro N°7).

La vacuna tipo Hoechst demostró con sus títulos (Cuadro N°8) ser un biológico confiable; siendo una verdadera lástima no poder corroborar más su eficacia y potencia como -- en el caso de las vacunas anteriormente discutidas.

En los Cuadros N°1 y 5, aparecen títulos de vacuna tipo Sanfer e I B respectivamente, arrojando excelentes títulos en los sueros obtenidos.

Consideramos que el número de muestras obtenidas, incluidas, en este estudio, no son representativas, sin embargo, se incluyen con la intención de que sirvan de guía más que de criterio normativo en el amplio panorama de la "Rabia Canina en México".

Se considera que el título mínimo de protección es de 1:25; sin embargo, no se hizo una prueba de desafío por -- las condiciones de este ensayo.

En la prueba de neurotropicidad de la semilla maestra V 319, se encontraron resultados satisfactorios explicados anteriormente.

En el caso de diagnóstico por inmunofluorescencia, la positividad que mencionamos, creemos se deba a una fluorescencia inespecífica debido al alto riesgo de inespecificidad que presentan los cortes por congelación en comparación con improntas de tejido en cubre-objetos; corroborándose esta inespecificidad con los resultados negativos obtenidos en las pruebas histopatológicas y de inoculación en ratón; por lo tanto, se da por terminada esta importante prueba de neurotropicidad de la cepa madre V-319, demostrándose así la seguridad de la vacuna para su uso en los animales domésticos.

Los ratones inoculados con las muestras del perro N°-24, murieron dentro del período de observación y con síntomas parecidos a rabia; sin embargo, todos ellos fueron negativos a la prueba de inmunofluorescencia, por lo que suponemos que este perro tenía un virus neurotrópico que causó una infección inaparente en el perro pero mató a los ratones. Desafortunadamente no se tomaron otras muestras de este perro y las de tejido nervioso se desecharon después de haber inoculado los ratones, por lo que no fué posible continuar el estudio de este interesante agente infeccioso.

C O N C L U S I O N E S

C O N C L U S I O N E S .

1.- La respuesta serológica detectada en los sueros caninos obtenidos de consultorios particulares, demuestran que el tipo de vacuna Pronabive es un biológico confiable; ya que se detectaron títulos de anticuerpos rábicos suficientes para proteger a un animal en el 100% de los sueros muestreados.

2.- En el caso de la vacuna tipo Gortie, sólo el 25% de los sueros muestreados, confieren títulos aceptables; - mientras que el 75% de los sueros restantes, no demuestran títulos suficientes. Por tal motivo , en nuestro estudio, la vacuna tipo Gortie no satisface los requerimientos mínimos de calidad que deberán llenar los productos bioló--gicos para uso veterinario.

3.- En los sueros obtenidos en los centros antirrábicos, el 91% cubren los requerimientos mínimos de la dirección general de sanidad animal. Siendo este un biológico utilizado a nivel de caso todos los centros antirrábicos, creemos que el manejo de la vacuna deberá ser más estricto por parte de los departamentos y personal en general que la distribuyen a todos los centros antirrábicos así como el personal vacunador, para evitar el 9% de animales que no han sido protegidos con la vacunación anti--rrábica de esta cepa cuyos títulos en las pruebas reali--zadas tanto a sueros caninos como a la misma vacuna, demu--estran la buena calidad del biológico.

4.- La vacuna tipo Hoescht al ser titulada demostró ser un biológico confiable.

Con lo anteriormente escrito, queda determinado el --
daño que le puede ocasionar el mal manejo de la vacuna -
para poder controlar el problema de la rabia en México.

5. Resulta evidente que el problema de rabia canina
que existe en México, se debe más a falta de cobertura de
las campañas de vacunación que a baja calidad de los bio-
lógicos utilizados. Por tal motivo, consideramos que es -
necesario y urgente aumentar el número de perros vacunados
en las campañas ya que los biológicos que se están utili--
zando son de buena calidad.

6.- La prueba de neurotropicidad de la semilla madre
V 319, efectuando la inoculación en nervio ciático, es una
prueba concluyente que determinó la ausencia de neurotropi-
cidad del virus vacunal; obteniéndose con esto una prueba-
más de seguridad de la vacuna, testificando su calidad --
como biológico confiable en la prevención de la rabia en -
México y esperamos que nuestra colaboración ayude a utili-
zar esta vacuna a nivel internacional.

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Atanasiu. P. "Patogenia de la Rabia"; Salud Pública de México. Epoca V. Volúmen XVI - N°3 Mayo - Junio de 1974. p.p. 357-360.
- 2.- Atanasiu. P "El Virus de la Rabia"; Salud Pública de México. Epoca V. Volúmen XVI. N°3. Mayo - Junio de 1974. p.p. 345-350.
- 3.- Atanasiu. P. "Titulación y prueba de potencia del suero y la inmunoglobulina antirrábica". La Rabia: Técnicas de Laboratorio. Capítulo 40. 3^a Edición. 1975 p.p. 294-302
- 4.- Atanasiu. P. "Consideraciones Sobre Nuevos Tipos - de Vacunas Antirrábicas"; Salud Pública de México. Epoca V. Volúmen XVI. N° 3 . Mayo - Junio de 1974. p.p. 437-442.
- 5.- Abelseth. M.K. " An Atenuated Rabies Vaccine for Domestic Animals Produced in Tissue Culture." Can. Vet. J.5 - 1964.
- 6.- Bijlenga. C.and. " Adaptation, Atenuation and Placa Purification of a Rabies-Virus Isolate(V319) Hernández Baum- garten. EM. From a Vampire Bat (Desmodus Rotundus)". Cornell Vet. 70: 10-18, 1980.
- 7.- Borchert,Alfred."Parasitología Veterinaria" Editorial - Acribia. 3^a ed. p.p. 220-225 y 672.
- 8.- Constantine,D.G."Rabies Transmission by Air in Bat Caves". Public Health Service Publications 1617,

National Communicable Disease Center --
Atlanta Georgia, 1967.

- 9.- Correa, Girón P. "La Rabia, Manifestaciones Clínicas, --
transmisión, Prevención y Tratamiento".
Ciencia Veterinaria. Tomo 3, 1981. p.p.
104-138.
- 10.-Correa H, Hernán "Estudios Sobre Inocuidad y Evaluación
dez.E., Campos J. Serológica de la Vacuna Antirrábica V-
319/ Acatlán en perros". Reunión anual/
INIP. Mayo de 1976. pág. 35
11. Dean. D.J. y - "Prueba de los Anticuerpos Fluorescentes".
Abelsth. M.K. La Rabia: Técnicas de Laboratorio. Ca-
pítulo 6, 3^a Ed. 1975. p.p. 75-83.
- 12.-Ettlinger, Stephen, "Canine Cardiology", 1970 N V Saunders.
J. DBM. p.p. 8 - 9.
- 13.-González, D., - " Inocuidad y Respuesta Serológica a -
Batalla, D., - - la Vacuna Antirrábica V 319 en Gato Do
González, J., místico a los 30, 60, 90, 240 y 365 días-
post- Vacunación" Reunión Anual INIP.-
Diciembre 1981.
- 14.-Hernández Baum- "Inmunidad provocada por la cepa V 319/
garten E., Pérez Acatlán en perros a los 30 meses de la
H., González D., vacunación." Reunión Anual - INIP. Di-
Fernández M., - ciembre de 1978.
Oros D., Martell
M. y García Fco.
15. Hernández, Baum " La Rabia Paresiente Bovina Defini- -
garten, E., ción del problema y metodología de con

- trof". Ciencia Veterinaria. Tomo 1.--
UNAM. 1976.
- 16.-Hernández, Baum "Patogenia de la Rabia". Ciencia Vete
garten. E., rinary Tomo 2. UNAM p.p. 71 - 102.
- 17.-Hernández, Baum- "El Virus Rábico, Morfogénesis y Creci
garten, E., miento en cultivos celulares". Ciencia
Veterinaria Tomo 2. UNAM. p.p. 1-36.
- 18.-Herbert, W.J. "Inmunología Veterinaria" Editorial -
Acribia. 1972.
- 19.-Habel. K. "Prueba de Potencia de Habel". La Rabia:
Técnicas de Laboratorio. Capítulo 31,-
3^a ed. 1975. p.p. 290-293
- 20.-Kirk. "Current Veterinary Therapy". VI Ed.--
Saunders. pág. 1017. 1975.
- 21.-Koprowski, H. "Prueba de Inoculación al Ratón". La-
Rabia: Técnicas de Laboratorio, Capí--
tulo 7 3^a ed., 1975, p.p. 88 - 97.
- 22.-Lepine, P. "Diagnóstico Histopatológico". La Rabia:
Técnicas de Laboratorio". Capítulo 5, 3^a
ed. 1975. p.p. 58-74.
- 23.-Mancisidor Auja, "Aislamiento del Virus Rábico en Culti
N., y Arellano - vos Celulares a Partir de Saliva". Tec.
Sota, C." Pec. Méx. N°18 : 92-96 1971.
- 24.-Martínez Baez. " La Invención de la Vacunación Antirrá
M.MC. bica Obra Cumbre de Pasteur". Salud Pú-
blica de México. Epoca V. Volúmen XVI.-
N°3 Mayo-Junio de 1974. p.p. 337 -344.
- 25.- "Metodo de Reed y Muench". Apéndice I.-

- La Rabia: Técnicas de Laboratorio. 3^a
Ed. 1975. p.p. 348 - 351.
- 26.- Programa Nacional Antirrábico. Comité
Nacional de Lucha Contra la Rabia S.S.
A. México 1979. Departamente de Infor
mática del Estado de México.
- 27.- Requerimientos Mínimos de Calidad que
Deberán Llenar los Productos Biologi-
cos para uso Veterinario. SARH. Direc-
ción General de Sanidad Animal. México,
D.F., noviembre de 1977. p.p. C-1, C-2
y C-3.
- 28.-Seligman,Jr.EB. "Prueba de Potencia NIH". La Rabia: -
Técnicas de Laboratorio. Capítulo 33.
3^a Ed. 1975. p.p. 294 - 302.
- 29.-Soulvot,J.P.,- Influence de la Voie Dinoculation des
Stellman,Ch.,- Vacins Antirrábiques Ches de Chien".
Bornarel,Pater_ Service Documentation IFFA MERIEVX.
man AG,Lang,et,
R,Branche,R.--