



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**

**INOCUIDAD Y ANTIGENICIDAD DE UNA CEPA
DE VIRUS RABICO INOCULADA EN FELINOS
POR VIA ORAL E INTRAMUSCULAR**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A:
JUAN MANUEL VELAZQUEZ VILLAGRAN**

DIRECTOR: Q.B.P. JUDITH MARTINEZ ZAMITIZ

ASESOR: M.V.Z. DAVID AVILA FIGUEROA

CUAUTITLAN, IZCALLI, EDO. DE MEX.

1986.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

C O N T E N I D O

	PAGINA
1.0 OBJETIVOS	1
2.0 INTRODUCCION	2
3.0 MATERIAL	25
4.0 METODOLOGIA	28
5.0 RESULTADOS	31
6.0 DISCUSION	37
7.0 CONCLUSIONES	40
8.0 ANEXO I	41
9.0 APENDICE	43
10.0 BIBLIOGRAFIA	53

1.0 O B J E T I V O S

Los ideales que han iluminado mi camino y que una y otra vez me han infundido valor para enfrentarme a la vida con buen ánimo han sido: la bondad, la belleza y la verdad...

1.0 O B J E T I V O S

En el presente trabajo se pretende:

- 1.- Administrar una cepa de virus rábico de calle de origen canino, C-23, por vía oral a felinos y determinar su patogenicidad.
- 2.- Administrar una cepa de virus rábico de calle de origen canino, D-479, por vía intramuscular a felinos y determinar su patogenicidad.
- 3.- Comparar los resultados obtenidos mediante las dos vías de administración y observar si existe alguna diferencia en la susceptibilidad de especie al virus rábico de calle.

2.0 I N T R O D U C C I O N

Ten pensamientos de paz, valor,
salud y esperanza porque nuestras
vidas son el resultado de nuestros
pensamientos...

2.0 I N T R O D U C C I O N

ANTECEDENTES

La rabia es una enfermedad a la cual son susceptibles todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre, pero con una sensibilidad muy variada a la enfermedad según la especie, pudiéndose diferenciar en: a) muy sensibles: carnívoros de fauna silvestre, gatos y bovinos, b) medianamente sensibles: perros, caballos y primates, c) poco sensibles como el hombre (32). El virus se encuentra presente en la saliva de los animales enfermos y en consecuencia su transmisión se lleva a cabo regularmente por mordedura. Esta enfermedad recibe varios sinónimos entre los que se encuentran: hidrofobia, derriengue, mal de caderas, Tolwut ó Wut, Le Rage, Encefalomiélitis bovina y rabia paresiante ó parálitica (7, 27, 32, 70).

El período de incubación es usualmente de 1 a 3 meses pero puede variar de 10 a 240 días siendo la mortalidad en el hombre de casi el 100% (4, 32). La historia de esta enfermedad ha sido asociada primariamente con las especies caninas y su antigüedad data de hace más de 2000 años A.C. ya que las civilizaciones que florecieron en las márgenes de los ríos Nilo, Eufrates e Indo ya la conocían y la atribuían a condiciones meteorológicas, castigos mítológicos ó a la ingestión de alimentos prohibidos (4, 47, 59). Demócrito 550 años A.C. describió la rabia en perros y animales domésticos. Aristóteles 322 años A.C. escribió en su libro "Historia Natural de los Animales" la descripción de la transmisión de la rabia por mordedura de perros enfermos a otros animales. Celso en el año 100 A.C. reconoció la relación entre la rabia humana y canina recomendando cauterizar las heridas provocadas por animales rabiosos. Galeno 200 años A.C. sugería la resección quirúrgica del área afectada como medida terapéutica (4, 32, 47, 59). En América no existía la hidrofobia canina an--

tes de la llegada de los españoles conquistadores, sin embargo, hay referencias individuales indirectas de la rabia en vampiros como quedó consignado en la Crónica de la Conquista de Darión de Fernández y Oviedo del año 1514 y en la Historia del Descubrimiento y Conquista de Yucatán de Francisco Molina de Solís de 1527, en las que se relaciona el ataque de vampiros a hombres y animales con la aparición posterior de la enfermedad. Aldrovandus en 1680, prevenía a hombres y animales contra la ingestión de estiércol de murciélago, su lengua ó corazón porque producían horror al agua y muerte (56, 59).

En los años 1714 y 1741 aparecen los primeros registros en Antillas y Barbados respectivamente (59). En 1753 esta enfermedad fué diagnosticada por primera vez en Norteamérica en los Estados Unidos y en lo que respecta a Sudamérica fué en el año de 1803 en Perú en la cual surgió una epidemia violenta en la cual tan solo en la Ciudad de Ica murieron 42 personas (56, 59). En Cabo San Lucas, en Baja California Sur, en el año de 1870 se señala la presencia de rabia en el zorrillo manchado.

Pero a pesar de todo lo anterior, la investigación de carácter científico acerca de su transmisión y prevención comienza con los estudios de Pasteur junto a Chamberlain, Roux y Thuillier que demuestran su virulencia en el Sistema Nervioso Central de los animales enfermos de rabia e inoculan el material sospechoso para reproducir la enfermedad y postulan la naturaleza microscópica del virus la cual no fue establecida sino hasta 1903 por Remlinger que comprobó que el virus pasa a través de filtros Berkefield (4, 49, 56, 59). Durante los años 1884-1888 Pasteur y sus asociados alteraron la patogenicidad viral por pasaje intracerebral seriado en conejos hasta que en el año de 1885 se realiza la primera vacunación humana en la persona del niño Joseph Meister con un virus atenuado por la desecación de la médula espinal durante 14 días y empleando inyecciones en días sucesivos durante 15 a 20 días con el virus

desechado, con intervalos progresivos menores (18, 49, 56). Roux en 1887 introdujo el uso del glicerol como un preservativo para mantener la viabilidad del virus en el tejido infectado. Esto fué aplicado a la producción de vacuna por Calmette en 1891 por lo que el tejido de médula espinal desecado de infectividad variada pudo ser almacenado en glicerol. Fermi en 1908 fué el primero en usar el tratamiento químico en suspensiones de virus fijo para la preparación de vacuna. Semple en 1910 modificó este método con fenol y demostró que la suspensión viral tratada así no era infecciosa y retenía su capacidad inmunizante; más tarde Umeno y Doi en 1921 iniciaron posteriores modificaciones (32, 49).

En 1903 se logró un avance en el diagnóstico de la rabia ya que Negri descubrió los cuerpos de inclusión intracitoplásmicos en las neuronas de animales infectados y posteriormente en 1930 Hoyt's y Junge Hut's utilizan la inoculación intracerebral en ratones albino suizos como técnica de diagnóstico. En 1939 se adapta el virus al embrión de pollo y pato obteniéndose cepas avianizadas para inmunizar a hombres y animales y ya en el año de 1968 Sellers aplicó el método de tinción directa e histopatología en el diagnóstico de rabia (27, 49).

En la década de los 50s se inicia la observación de las reacciones Ag-Ac mediante el uso del microscopio de fluorescencia por Coons y Kaplan y en 1958 Goldwasser y Kissling aplican esta técnica al diagnóstico de la rabia. El procedimiento consiste en marcar el Ac deseado con un fluorocromo como el Isotioscianato de Fluoresceína (FITC) ó tetrametilrodamina dejando que el Ag específico cuya presencia se quiere determinar y observar en el microscopio de fluorescencia; esta prueba bien realizada es rápida, tiene bajo costo y es más exacta que la prueba biológica ó que el exámen de extensiones ó cortes con los procedimientos ya conocidos (25, 39). Ya en 1969 Schneider reporta el

método que utilizó Levaditti en 1935 usando colorantes inespecíficos para detectar los corpúsculos de Negri en improntas de epitelio corneal, que pueden ser aplicadas al diagnóstico de rabia in vivo utilizando los anticuerpos fluorescentes (45).

ETIOLOGIA

El virus de la rabia ha sido asignado al grupo Rabdovirus en base a semejanzas bioquímicas y morfológicas que tiene en común con el virus de la estomatitis vesicular del ganado y designado dentro de la especie Lyssavirus - (9, 22, 24, 30). Se considera que no tiene serotipos aunque en años recientes se han aislado en Africa 3 virus relacionados serológicamente al de la rabia, el Mokola, Lagos y Duvenhage que bien pudieran ser serotipos ya que - comparten el Ag interno nucleoproteínico y se ha propuesto clasificarlos en 4 serotipos, de los cuales el virus clásico rábico fijo (CVS) es el serotipo 1. A la cepa murciélagos Lagos (Lagos Bat Virus) aislado de quirópteros frugívoroa de Nigeria (Eidolan helvum) se le designa como serotipo 2 y a la cepa prototipo Mokola (MOK) aislada de musarañas africanas (Crocida spp) y de dos casos humanos como serotipo 3. Las cepas aisladas de mosquitos (Culicoides spp) y de un caballo en Nigeria y de mosquitos Mansonia uniformis en Sudán constituyen el serotipo 4. Los estudios comparativos de patogenia realizados en hámsters y empleando cepas de los serotipos 1 al 3 demuestran que - los 3 virus son similares en cuanto a tropismo y al curso de la infección -- (32, 64).

El virus rábico tiene un genoma RNA de cadena única y cuya nucleocápside es helicoidal. El virión es cilíndrico, en forma de bala y mide aproximadamente de 75 a 80 nm de diámetro por 180 nm de longitud. La nucleocápside se halla envuelta por una cubierta glicoproteica que posee púas de 10 nm de

de largo (40). La densidad de flotación del virión es de 1.20 g/ml en CsCl (4, 27, 49, 63).

CARACTERISTICAS BIOLOGICAS

El virus rábico es lábil al éter, a soluciones ácidas y básicas con pH 3-11 (39), es inactivado a altas temperaturas y a las radiaciones ultravioleta, al igual que con bicloruro de mercurio. Resiste la desecación y puede ser estable también a la congelación y descongelación repetidas a la liofilización y a la acción de algunos desinfectantes como el etanol al 45-70%, preparados y dados al 0.1%, compuestos de amonio cuaternarios 1:500 y 0.5% de formalina. Es resistente al fenol hasta en suspensiones 0.5% de éste por varios meses a 4°C (4, 32, 35). Su ácido nucleico se inactiva con betapropiolactona en una concentración de 1:6000 en 2 horas (32, 35).

Posee dos antígenos principales, uno el interno que es de composición nucleoproteínica y el otro es de composición glicoproteínica que está en la envoltura y que es el responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes y fijadores de complemento (35).

Se conocen dos tipos de cepas rábicas que son:

a) Las clásicas conocidas como cepas de "virus de calle" aisladas en animales infectados naturalmente que se caracterizan por tener un período de incubación prolongado y variable lo que les dá la capacidad de invadir glándulas salivales y otros órganos del cuerpo además del cerebro (4, 39).

b) Las cepas fijas o de laboratorio a las que pertenece el CVS (Challenge Virus Standard) que fué modificada por Pasteur y que se caracteriza por haber sido adaptada al tejido cerebral de ratones presentando un período de incubación constante y corto lo que le imposibilita invadir glándulas salivales u otros órganos. El Comité de Expertos de la OMS en Rabia (1973) ha señalado --

que en ciertas condiciones el virus fijo puede ser patógeno para el hombre y los animales (39). El virus puede ser cultivado in vitro en diferentes líneas celulares en las cuales forma inclusiones acidofílicas con localización intracitoplásmica (4, 39, 55, 58).

PATOGENESIS

La relación que existe entre los signos motores y sensoriales tempranos en el sitio de exposición es evidencia de la invasión del SNC por el virus vía nervios periféricos (8, 31, 32). Una vez que ha ocurrido la infección por virus rábico este se puede detectar en sangre dos horas después de la inoculación de grandes dosis pero se debe solamente a un simple fenómeno de dilución de carácter físico.

Tipos de infección:

a) Es el tipo más simple, 3 horas después de la infección se observa una fase negativa ó sea un período de eclipse durante el cual el virus no puede ser detectado ni tampoco se multiplica (4, 32).

b) El virus se fija a la membrana celular y se multiplica pero no llega a completar el ciclo de maduración y por lo tanto no se libera de la célula infectada.

c) El virus se fija y completa el ciclo de maduración, se multiplica localmente pero no llega a encontrarse en la sangre durante el período de incubación.

d) El virus se fija y completa el ciclo de maduración en el lugar de entrada (en donde la célula infectada puede ser el miocito) y luego hay una invasión sistémica pero sin síntomas clínicos de la enfermedad (4, 32).

e) El virus penetra en la célula (miocito y neurona) y completa su ciclo e invade el organismo afectando el SNC produciendo la enfermedad y un desenla-

ce fatal. Este es el tipo más común de infección rábica en los caninos aun- que hay excepciones ya que después de haber padecido la enfermedad hay algu- nos que se recuperan totalmente y en forma espontánea debido a la formación de anticuerpos neutralizantes, síntesis de interferón ó por invasión de célu- las T (2, 4, 11, 12, 16, 32, 65).

La patogénesis rábica puede segmentarse en dos fases primordiales:

1.- Fase de conducción centrípeta.

2.- Fase de transporte centrífugo (4, 8, 20, 55).

La primera fase se describe siguiendo la mordedura del animal rabioso ó la entrada del virus a través de una abrasión en la piel, vía nasal por el nervio olfatorio ó vía oral a través de las papilas gustativas por las cuales penetra el virus in situ y permanece durante 2 horas. Después pene- tra al citoplasma y se eclipsa por un período de 18 horas después de las cua- les inicia su multiplicación en los miocitos, alcanzando su máximo a las 72 horas (23). De aquí comienza la invasión del SNC vía un flujo axonal por los nervios periféricos a una velocidad aproximada de 3 mm/h semejante a la del - poliovirus (38, 39). Una vez que ha llegado al SNC se multiplica masivamente y se distribuye en forma centrífuga de la cual resulta la invasión de aque- llos tejidos que tienen un nivel metabólico elevado (47) y tejido glandular - de secreción mucosa para encontrarse por lo tanto en tejido nervioso (SNC y - SNP), músculo esquelético, saliva, glándulas salivales, líquido cerebroespinal, folículo piloso, páncreas, pulmón, humor acuoso, glándula lagrimal, humor vi- treo, epitelio corneal, corazón, riñón, útero, placenta (17), feto, vejiga, - testículo, glándulas suprarrenales, lengua, raramente se presenta en los fluj- dos del cuerpo (4, 23, 41, 47).

PATOGENIA EN HUMANOS

La especie humana es una de las más resistentes a la rabia y la vía de entrada puede ser una solución de continuidad de la piel ó de alguna mucosa ó por vía oral y respiratoria ó por medio de trasplante corneal (4, 32).

El período de incubación oscila de 1 a 3 meses aunque puede ser hasta de un año por regla general (4, 60).

Las lesiones de la rabia son microscópicas y extremadamente variables en extensión y con necrosis neuronal incluyendo cuerpos de inclusión citoplásmicos. En algunos casos la encefalitis es demostrada por infiltración perivascular, nódulos neurofágicos y por supuesto los corpúsculos de Negri, aunque no siempre están presentes en una infección rábica (4, 7, 27, 32).

PATOGENIA EN CANINOS

El perro es la principal fuente de infección humana. El animal mordido puede desarrollarla en 10 días aunque en forma natural ocurre de 21 a 60 días que es el período de incubación y depende de la cantidad de virus inoculado y de la patogenicidad de la cepa. Los perros mayores de 2 meses y menores de 1 año son los más susceptibles a la infección ya que el porcentaje desciende conforme avanza la edad y además el macho es el más afectado debido a su mayor exposición a la calle. En cuanto al comportamiento estacional se ha observado un aumento de la población infectada durante primavera y verano y una disminución en otoño e invierno lo cual se asocia al estro de las hembras. La transmisión se lleva a cabo por mordeduras que penetran a nivel subcutáneo e intramuscular y oralmente. Las lesiones características son encefalitis generalizada con corpúsculos de Negri (22, 41).

PATOGENIA EN GATOS

Existe alguna evidencia de que los gatos pueden ser más resistentes que los perros a una infección experimental por vía intramuscular con virus rábico de calle pero más susceptibles que los perros cuando se inocula virus fijo intracerebral. El período de incubación es de 2 a 4 semanas con una media de 18 días mientras que los períodos de enfermedad clínica desde la aparición de los primeros síntomas hasta la muerte varían de 1 a 11 días con una media de 5. Se ha visto que aproximadamente el 70% de los animales infectados experimentalmente sufren rabia furiosa y en el 80% de los casos el virus se aísla de glándulas salivales comenzando la excreción 1 a 3 días antes de que aparezcan los síntomas, continuando hasta la muerte e incrementándose la cantidad de virus excretado conforme la enfermedad progresa. Generalmente a los 2 ó 4 días de presentarse los síntomas de excitación sobreviene la parálisis del tren posterior (5, 21, 53, 60).

PATOGENIA EN BOVINOS

En esta especie la rabia es transmitida por vampiros y el período de incubación es largo, fluctuando entre 25 y 150 días. Recibe diferentes nombres en cada país como "mal de caderas y rabia paresiante" en Argentina; "peste das cadeiras" en Brasil; "huequera y renguera" en Colombia y Costa Rica; "derriengue y tronchado" en México; "huequera" en Panamá; "mal de caderas" y "tumbi baba" en Paraguay ó rabia desmodina como la denominó Téllez Girón (4).

CUADRO CLINICO

El cuadro clínico de la rabia ha experimentado modificaciones pero se pueden encontrar 3 períodos de manifestación que son el prodrómico ó me-

lancólico, el excitativo ó furioso y el paralítico ó depresivo (4, 34).

a) Período Prodrómico.- Generalmente dura de 2 3 días pero hay ocasiones que pasa inadvertido pues los síntomas son poco marcados. Se manifiesta un cambio en la conducta y existe midriasis, miosis, nistagmo e hiperexcitabilidad que se hace patente por sobresalto por motivo de estímulos externos ó ruido. La parestesia en el punto de la mordedura causa prurito. La ingestión de alimentos cesa (34).

b) Período Excitativo ó Furioso.- La duración de este período es de medio día a 3 días y se caracteriza por inquietud, nerviosismo, irritabilidad, excitabilidad, fotofobia e hiperestesia. Hay parálisis de cuerdas vocales y espasmos musculares los cuales provocan alteraciones en los sonidos -- emitidos. La pupila se dilata, salivación, trastornos de la micción, estreñimiento, convulsiones y muerte (34).

c) Período Paralítico.- Dura algunas horas y se caracteriza por paro bulbar, parálisis laríngea, estrabismo, nistagmo, ataxia que aumenta hasta llegar la parálisis total y finalmente la muerte por parálisis respiratoria. En el ser humano los 3 períodos se presentan invariablemente hasta llegar la parálisis, mientras que en los animales hay ocasiones en que la enfermedad - se presenta en forma atípica (34).

SIGNOS CLINICOS

EN HUMANOS

Se inicia con una sensación de angustia, cefaleas, hipertermia en 1 a 1.5^oC que puede llegar hasta 41^oC, anorexia, náuseas, inflamación de garganta, sensaciones extrañas en la herida. Este período dura 3 a 4 días y posteriormente pasa a la fase de excitación la cual se manifiesta como ansiedad, nerviosismo, hiperestesia, fotofobia, hipersensibilidad al sonido,

midriasis, ptialismo, contracciones espasmódicas laringofaríngeas, tics faciales, lagrimeo, hiperpnea, aumento de tonicidad muscular, espasmos de músculos respiratorios y convulsiones. Finalmente, se pasa a la fase de parálisis que desencadena la muerte al individuo por un paro cardiorespiratorio -- (4, 32).

EN PERROS

En la fase prodrómica manifiestan un cambio de conducta, hiperexcitabilidad, anorexia, prurito en la región mordida, estimulación de las vías genitourinarias y un ligero aumento en la temperatura corporal. A los dos ó tres días se acentúan los síntomas de agitación y excitación, salivación --- abundante ya que el animal no deglute la saliva por la parálisis de músculos faríngeos, alteración del ladrido por parálisis de cuerdas vocales. En las fases finales puede haber convulsiones generalizadas, incoordinación muscular y parálisis de los músculos del tronco y de las extremidades. La fase muda se caracteriza por síntomas paralíticos predominantemente, estando la fase de excitación muy corta ó ausente (1, 4, 32).

EN GATOS

La sintomatología es similar a la de los perros aunque la mayor parte de las veces la enfermedad es de tipo furioso (74%) mientras que la de tipo paralítico es menor (26%). A los 2 ó 4 días de presentarse los síntomas -- excitativos sobreviene la parálisis del tren posterior. En todas las especies se encuentran casos con signos alternantes de excitación y quietud -- (10, 32). El período prodrómico dura de 2 a 3 días y existe elevación de la temperatura, dilatación pupilar y disminución del reflejo corneal. El período excitativo dura de 3 a 7 días, se incrementa la excitabilidad y exci-

tación a estímulos externos, fotofobia, araña el piso, atrapa objetos imaginarios con el hocico y come objetos inusuales, parálisis de músculos de deglución por lo cual hay salivación, convulsiones y en la mayoría de los casos la muerte (5).

La fase paralítica incrementa la salivación y se generaliza la parálisis a todo el cuerpo y la muerte ocurre al 2o. ó 4o. día de aparecer los síntomas clínicos sobreviniendo coma y muerte (5, 62).

EN BOVINOS

Predominan los síntomas paralíticos, los animales afectados se alejan del grupo y algunos presentan pelo erizado y pupilas dilatadas, somnolencia y depresión. Ocurre lagrimeo, catarro nasal, ataxia, priapismo e hipersensibilidad en la zona mordida por el murciélago hematófago, los accesos de furia son raros, al avanzar la enfermedad se observan contracciones tónicoclónicas de grupos musculares del cuello, tronco y extremidades, dificultad de deglución, dejan de rumiar y finalmente llega la muerte. Los signos paralíticos suelen presentarse entre el 2o. y 3o. día después de iniciarse los síntomas. La enfermedad dura 2 ó 3 días extendiéndose hasta 8 ó 10 días (4,32).

EN OVINOS, CAPRINOS Y EQUINOS

Se presenta anorexia, dificultad de deglución, hiperestesia, mirada fija, actitud de alerta, aleteo auricular, constante movimiento de cabeza, atonía ruminal, trismos, nistagma, choque con cosas, temer, espasmos musculares, incoordinación motora, postración, salivación, convulsiones, dificultad respiratoria y muerte con bramidos (1, 4, 32, 47).

EN ANIMALES SILVESTRES

La duración de la enfermedad es de 2 a 9 días ó de 2 a 6 semanas dependiendo de la especie afectada, la mayoría presenta la forma furiosa y algunos la muda y parálitica. En los murciélagos hematófagos y - los no hematófagos se observan las dos indistintamente. Los zorros, chacales, lobos, coyotes son los más susceptibles. Las mofetas, mapaches, murciélagos y mangostas manifiestan un menor grado de susceptibilidad, mientras que las zarigüeyas son poco susceptibles (1, 4, 32, 47).

EN CERDOS

En esta especie la presentación es más dramática y muy violenta ya que dejan de comer, tienen hipersensibilidad a los estímulos externos, ansiedad, mirada perdida, salivación, dificultad para beber, parálisis faríngea, muerden todas las cosas móviles, dificultad para caminar, emiten ruidos roncacos, dificultad respiratoria, se azotan y presentan convulsiones y mueren. Algunos tienen cuadros pasivos (1, 4, 32, 47).

EN AVES

La rabia adquirida naturalmente en esta especie es excepcional aunque si se llega a presentar. Esencialmente las rapaces son susceptibles en forma natural a la rabia, aunque su resistencia a la infección es muy grande, de tal forma que por inoculación experimental intracerebralmente (con 1 cepa de virus de calle), solo se provocan síntomas clínicos en un 70% de los inoculados y su mortalidad no es más del 50%. El virus rábico solo se encuentra en el cerebro de las aves muertas y aunque no se observan corpúsculos de Negri al hacer la prueba de inmunofluorescencia resulta positiva (60).

PRESENTACION CLINICA

Se han catalogado tres formas de presentación de la rabia basando su identificación en la sintomatología predominante y son las siguientes:

- 1.- Rabia furiosa.- Período de excitabilidad prolongado (4).
- 2.- Rabia muda ó paralítica.- Asociada con los bovinos y el murciélagu hematófago (vampiro) (4, 39, 47).
- 3.- Rabia abortiva.- De la cual se recuperan algunos animales (4, 39, 47).

EPIDEMIOLOGIA Y EPIZOOTIOLOGIA

Los problemas epidemiológicos de transmisión de rabia en la actualidad cubren un amplio espectro biológico que incluye todos los animales homeotermos y algunos artrópodos abarcando diferentes regiones geográficas cuya fauna característica puede ser afectada (incluso la región Antártica). En la actualidad se encuentran algunos países libres de la enfermedad como: Guyana, Jamaica, Uruguay, Japón, Gran Bretaña, Países Escandinavos, Portugal, España, Oceanía, Hawai e Islas Vírgenes (4, 47).

La enfermedad se puede presentar en brotes epizooticos ó enzooticos. En la región Artica actúa como reservorio el zorro ártico (Alopex lagopus) el cual puede transmitirla en forma ocasional por mordedura a los lobos (Canis lupis), coyotes y perros de trineo e incluso a los osos polares. Ahora se cuestiona si la comadreja (Mustela spp de cola larga) y el armiño (Mustela erminae y frenata) pueden actuar como reservorios, al igual que el mapache (Procyon lotor), la civeta (Civettictis civetta) y la mofeta moteada de la URSS (Vormela peregusma).

En la zona templada hay múltiples reservorios naturales lo que la diferencia epidemiológicamente de la zona del Artico. En estos sitios pueden

ser afectados el zorro rojo (Vulpes fulva) y el zorro gris (Urocyon cinereo-argenteus) al igual que el zorrillo manchado (Spilogale putorius) y el rayado (Mephitis mephitis). Pueden actuar como reservorios los murciélagos hematófagos de las siguientes especies (vampiros): Desmodus rotundus, Diaemus youngi y Diphyla ecaudata al igual que la mangosta (Herpestes nyula) y los murciélagos insectívoros y frugívoros (Artibeus, Tadarida brasiliensis y Myotis lucifugus). También se han encontrado las infecciones por vía respiratoria en el Kudu (Tragelopus streptosiceros), (6, 33, 47, 52).

Desde el punto de vista epidemiológico se ha clasificado a la rabia en dos tipos: a) Silvestre; que ocurre en forma enzoótica y natural y afecta a animales silvestres y b) de tipo urbano la cual afecta a animales domésticos (4, 49). Por otro lado se le puede clasificar epizootiológicamente en tres tipos:

a) Rabia urbana.- Que afecta al perro y al gato y a las mascotas de origen doméstico y es de tipo enzoótico y que son los principales vectores de la enfermedad para el hombre (1).

b) Rabia rural.- Que afecta a la fauna silvestre y pueden ser vectores y reservorios muy importantes.

c) Rabia silvestre.- Afecta a los murciélagos hematófagos y también a los murciélagos insectívoros y frugívoros (47, 52).

DIAGNOSTICO

1.- CLINICO.- Se basa en síntomas clínicos y en la situación epizootiológica. Son muy importantes los datos aportados por la anamnesis (situación epizootiológica, género de vida, destino del animal, duración de síntomas, viajes precedentes, antecedentes de mordeduras, vacunación y si sale a la calle). En caso de duda se puede sacrificar al animal después de tener-

lo en observación durante 10 días y enviarlo a un centro de Diagnóstico (4, 34).

2.- LABORATORIO.- Se debe tomar en cuenta la toma de muestra correcta y su manejo adecuado. Las técnicas empleadas para realizar el Diagnóstico son las siguientes:

a) Diagnóstico Histopatológico. Se fija un corte de corteza, hipocampo y cerebelo no mayor de 0.5 cm y se hacen inclusiones en parafina para hacer cortes en el microtomo, se monta la laminilla, se añade un colorante adecuado mediante las tinciones de Sellers, Giemsa, Mann, Hematoxilina, Eosina y Fucsina y se observa al microscopio los corpúsculos de Negri: tiene una -- efectividad del 70% (39, 48).

b) Prueba biológica.- El ratón lactante albino suizo es el más susceptible a la inoculación intracerebral, aunque también se emplea el ratón albino suizo de 21 días de edad. Se aplica siempre que sea negativa la búsqueda de corpúsculos de Negri pues ha resultado positiva en un 20% de estos casos. Los síntomas de la enfermedad se manifiestan de 8 a 10 días pero el período de observación debe prolongarse a 21 días. Su efectividad es del 100% observando los cerebros de ratones sospechosos por investigación histopatológica ó por anticuerpos fluorescentes (26, 39).

c) Prueba de Anticuerpos Fluorescentes.- Bien ejecutada es superior a las demás pruebas en rapidez, precisión y sencillez y generalmente se recomienda como técnica de elección si existe microscopio de luz UV. Se basa en el examen microscópico de improntas ó cortes de tejido que emiten fluorescencia específica en presencia de suero antirrábico con un colorante fluorescente específico. La fluorescencia constituye la prueba visual de la reacción específica Ag-Ac y su efectividad es del 99.8% (26, 39). Un resultado positivo indica la existencia de infección mientras que un resultado negativo no

la excluye (13, 19, 37, 42, 50).

d) Prueba de Índice de neutralización viral.- Es el método más exacto para la determinación específica del virus y sirve como prueba cuantitativa de anticuerpos; es preferible la técnica de dilución de suero y cantidades constantes de virus (39, 49).

e) Prueba de fijación del complemento.- Se basa en el empleo de cerebro sospechoso como antígeno y no es muy útil como diagnóstico, aunque tiene una considerable eficacia en investigación.

f) Inhibición de microfocos fluorescentes.- Que puede dar un diagnóstico en 24 horas y que se realiza en cultivo celular basado en el efecto citopático producido por el virus (39).

3.- DIFERENCIAL.- Puede ser difícil ya que el cuadro puede ser atípico y manifestarse tan solo por problemas intestinales, cambio de voz ó contracciones espasmódicas y se deben excluir enfermedades infecciosas agudas del SNC como el moquillo (Enfermedad de Carré) en su fase nerviosa, meningitis, encefalitis o afectando el SNP como parestia del nervio trigémino y la fase convulsiva del tetanos y de los cambios de conducta y voz, cuerpos extraños en la boca y faringe. Si los síntomas persisten después de 10 días se debe excluir la posibilidad de rabia (34, 60).

Como pudo verse los métodos se basan en la búsqueda de los elementos siguientes de diagnóstico: a) Búsqueda de anticuerpos presentes en suero, líquido cerebroespinal y tejido cerebral mediante la técnica de seroneutralización y anticuerpos fluorescentes y b) Partículas virales infecciosas y el cual se hace por aislamiento del virus inoculando ratones lactantes ó de 21 días ó infectando cultivos celulares (BHK, PK ó ERA) ó por exámen histopatológico observando cuerpos de Negri, Inmunoabsorbencia enzimática, Inmunofluorescencia, Anticuerpos monoclonales e Inmunoperoxidasa (4, 11, 14, 15, 26, -

29, 39, 47, 54, 57, 66, 67, 68).

Para las pruebas ya descritas es necesario que la muestra llegue al laboratorio en buenas condiciones de conservación ya que el estudio realizado en tejidos putrefactos ó con etapas de algún deterioro progresivo demostrará que la técnica de detección de Corpúsculos de Negri es la primera afectada siguiendo la de Inmunofluorescencia y finalmente la inoculación en ratones (26, 44).

PREVENCIÓN

La vacunación es el método preventivo más importante a seguir y para tal efecto desde la época de Pasteur se han desarrollado diferentes productos biológicos: a) Tratando al virus por medios físicos ó químicos para la elaboración de una vacuna de virus inactivado (Fuenzalida y Palacios) ó b) Elaboración de una vacuna de virus vivo modificado obtenida mediante pases de adaptación bajando con esto la patogenicidad del virus utilizando cepas ERA, Phi --llips-Roxane, Acatlán V-319 (71). Estas vacunas se pueden preparar en cultivos celulares de origen animal y humano ó también prepararse en tejido nervioso cerebral de rata, ratón, conejo ó cordero y tejido aviar de embrión de pollo y pato (4, 32, 47).

Actualmente se puede realizar la inactivación del virus empleando luz UV, calor o betapropiolactona (74). Las vacunas de origen nervioso ó aviar pueden ocasionar una encefalitis alérgica (autoinmune) cuando se obtienen de animales adultos debido a la reacción contra la mielina y es debido a esto la utilización de animales lactantes que todavía no han desarrollado la vaina de mielina. Entre las vacunas de virus vivo modificado se consideran la cepa Acatlán V-319, ERA, Flury (LEP y HEP), (17, 39, 46, 47, 51).

La vacuna que recomienda la OMS para uso humano es la Fuenzalida-Palacios tanto para uso preventivo como profiláctico y se elabora en 3 cepas de virus fijo: CVS, Cepa 51 de origen canino y la cepa 91 de origen humano (39, 48). La vacunación en humanos debe ser muy controlada ya que la aplicación de tratamientos vacunales innecesarios puede traer consecuencias produciendo una encefalitis e incluso provocar la muerte del individuo protegido (4, 5, 32). Además de la inmunización activa y dependiendo del caso, se puede practicar la inmunización pasiva con suero hiperinmune ó gamma globulina específica de origen humano, la que es siempre obligada cuando no existan mordeduras graves y con una dosis única de 20 UI/Kg y 50% de las cuales se infiltra localmente alrededor de la herida ó tejido subcutáneo y el resto por vía I.M. (36).

Actualmente se utiliza una nueva vacuna de mayor potencia y seguridad que ha sido preparada a partir de virus rábico cultivado en células diploides humanas (WI38) e inactivado con tri-n-butilfosfato ó con beta propiolactona. La inmunogenicidad de esta preparación es tal que los anticuerpos séricos se desarrollan en todas las personas que reciben 4-6 inyecciones y fué autorizada en USA en 1980 (36).

TRATAMIENTO

En los animales no existe un tratamiento específico una vez que la enfermedad se ha desarrollado. Para el caso de los humanos una vez mordidos y si no se han presentado los primeros síntomas nerviosos el tratamiento puede ser de dos tipos:

a) Local.- Consta de 1) Lavar la herida perfectamente con jabón detergente y agua, 2) Desinfección a fondo de las heridas con sales de amonio --cuaternarias al 0.1%, alcohol yodado, tintura de yodo y alcohol al 40-70% -

(4, 32, 39), 3) Aplicar suero hiperinmune o gammaglobulina específica alrededor de la herida ó vía parenteral (25, 35, 60).

b) Sistémico.- Consiste en la administración combinada de suero y vacuna como se mencionó en profilaxis (4).

Es recomendable asimismo aplicar dosis de refuerzo 10, 20 y 90 días subsiguientes a la terminación del tratamiento inicial. Actualmente también se recomienda la aplicación de interferón que puede ser opcional y que se cree puede proteger al timo contra la citólisis por un mecanismo aún no establecido y con el cual se han salvado algunas personas (2, 44, 44).

CONTROL

Los programas de control de rabia se dirigen a la protección de la gente contra la infección y se puede dividir en:

a) Programas de control y erradicación de la rabia urbana. Consiste principalmente en la vacunación y erradicación de la infección en animales domésticos. Puede practicarse la inmunización primaria de todos los perros que tengan entre tres meses y un año de edad y revacunar dependiendo del tipo de vacuna que se emplee ya que por ejemplo la de la cepa Flury LEP y HEP (pollo) brinda protección por más de 39 meses en perros vacunados con una sola dosis, cepa ERA elaborada en células renales de cerdo que protege por más de 36 meses (1, 3, 46, 48) Los gatos pueden ser vacunados con una cepa inactivada ó de virus vivo modificado con excepción de la cepa Flury LEP -- que les puede resultar patógena y la edad es la misma que para el perro, la revacunación debe hacerse cada año ya que no existen datos confiables. En cuanto al control de perros vagabundos puede hacerse mediante esterilización selectiva ó vacunación masiva.

b) Control de la rabia silvestre.- Aquí encontramos la rabia transmi-

tida por quirópteros y por animales carnívoros. Para los primeros incluye reducción de la población de vampiros, vacunación del ganado en zonas expuestas o aplicaciones de anticoagulantes vía IM. Mientras que para los segundos se incluye la reducción selectiva de la población con cebos tóxicos utilizando fluoroacetato de sodio, sulfato de talio, estricnina y fumigación con fosfato de hidrógeno ó aplicación de cebos vía oral, conteniendo vacuna de virus vivo modificado.

c) Transporte interno de animales.- Prohibición de la entrada de animales a otros países ó establecer una cuarentena prolongada de 6 meses y simultáneamente aplicar una vacuna inactivada.

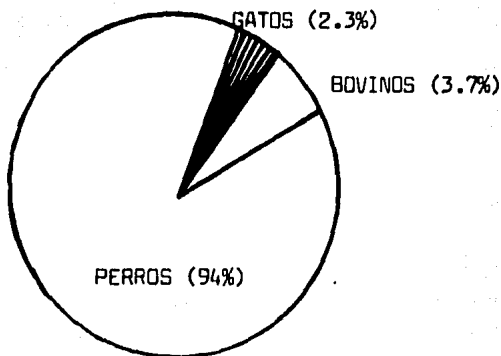
d) Prevención de la rabia humana.- Como se especificó en profilaxis y aplicando una inmunización activa con una vacuna de virus inactivado como la Fuenzalida-Palacios que se inactiva mediante luz UV ó por células diploides humanas que se inactiva con betapropiolactona (1, 36, 39).

En las siguientes páginas aparecen datos de 1984 acerca de los porcentajes de rabia silvestre y urbana en nuestro país tomados del Boletín de la Comisión MexicoAmericana para la prevención de la fiebre aftosa: No. 22; páginas 14-17. Agosto de 1986.

RABIA EN MEXICO
ANIMALES DOMESTICOS Y DE GRANJA

En México en 1984 se incrementó el número de reportes de rabia en perros, 9274 comparados con los 3176 en 1983. En cuanto a felinos se reportaron 222 casos que resultó ser un número importante.

RABIA EN MEXICO
DOMESTICOS / DE GRANJA



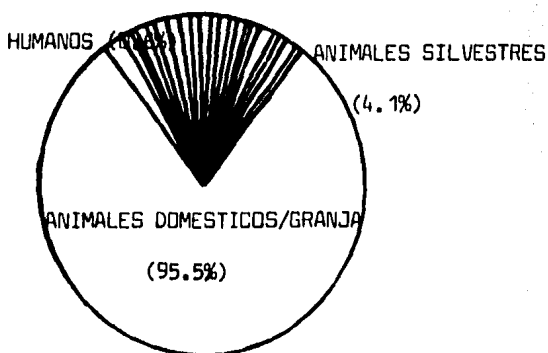
LA RABIA EN MEXICO - SUMARIO

México notificó 10 346 casos de rabia en 1984, un aumento marcado comparado con los 3487 casos del año anterior. A diferencia con los Estados Unidos y Canadá donde los animales silvestres representan el problema principal, la mayoría de los casos en México fueron perros.

Casos notificados

Animales Silvestres	431
Animales domésticos/ granja	9857
Humanos	58

LA RABIA - MEXICO



3.0 M A T E R I A L

Contar con un buen amigo constituye el más puro entre todos los dones del Señor porque es un amor que con nada se puede pagar. Es algo que no se hereda como ocurre con una familia; no es apremiante como un hijo y carece de los medios para brindarnos un placer físico como el cónyuge. Es así un lazo indescriptible que implica una dedicación más honda que todas las demás.

Frances Farmer

3.0 MATERIAL

A.- MATERIAL BIOLÓGICO

1.- Conjugado de Isotiocianato de Fluoresceína para detección del Ag del virus rábico, elaborado en el Departamento de Epizootiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Ver A - péndice.

2.- Suspensiones de CVS (Challenge Virus Standard y SCN (Suspensión de Cerebro Normal) al 20%.

a) Suspensión de CVS al 20%: Se seleccionan 600 a 1000 ratones al bino suizos de 21 días de una cepa conocida y se colocan 10 en cada caja en el Bioterio. Se prepara CVS con título elevado a una dilución 10^{-3} y se inoculan 0.03 ml por vía intracerebral a cada ratón. Se mantienen en observación eliminando los muertos durante los primeros 4 días ya que se debe a -- traumatismo por inoculación. Durante el 5 y 7 día se colectan los ratones -- paráliticos en estado agónico y se sacrifican. Se obtienen los cerebros en forma estéril y se pesan. Por cada gramo de cerebro se agregan 4 ml de Solución de Albúmina Bovina Fosfatada (BAPS) y se homogeniza para hacer una -- suspensión al 20%. Se centrifuga a 3500 rpm por 10 a 15 minutos a 4°C , se se para el sobrenadante y se envasa en frascos viales de 1 ml colocando 0.8 ml en cada uno y se almacenan a -20°C .

b) Suspensión de SCN al 20%: Se seleccionan 600 ó 1000 ratones al bino suizos sanos y se sacrifican. Se obtienen los cerebros en forma estéril y se pesan. Por cada gramo de cerebro se agregan 4 ml de BAPS y se homogeniza. Se centrifuga a 3500 rpm por 10 a 15 minutos a 4°C , se separa el sobrenadante y se envasa en frascos viales de 1 ml colocando 0.8 ml en cada uno y almacenando a -20°C .

3.- Ratones albino suizos de 21 días de edad de una cepa mantenida en el Bioterio del INIFAP.

4.- Gatos (26) seronegativos a rabia por la técnica de seroneutralización. Ver Apéndice.

5.- Suero hiperinmune equino heterólogo con un título obtenido por seroneutralización en ratón albino mayor a una dilución de 1: 78125. Lote NIH-82.

6.- Cepa de virus rábico de calle C-23 seleccionada de muestras de cerebros caninos obtenidas en el Antirrábico de Culhuacán con un título de $10^3/0.03$ ml DL50% IC en ratón.

7.- Cepa de virus rábico de calle D-479 mantenida a -196°C obtenida del tejido cerebral de un perro en 1982 con un título de $10^6/0.03$ ml --- DL50% IC en ratón.

B.- MATERIAL DE LABORATORIO

I.- Material de vidriería:

- 1.- Pipetas de 1, 5, 10 ml.
- 2.- Vasos de precipitado de 50, 150 y 250 ml.
- 3.- Jeringas de insulina de 1ml con agujas de calibre 26 y 27.
- 4.- Matraces de 250 ml.
- 5.- Jarras de Copli.
- 6.- Portaobjetos y cubreobjetos.

II.- Aparatos:

- 1.- Espectrofotómetro de luz Ultravioleta y Visible.
- 2.- Estufa de Incubación a 37°C y 56°C .
- 3.- Ultracentrífuga a 4°C .
- 4.- Columna de separación de 30 cm de longitud.

5.- Balanza Analítica y Granataria.

6.- Congelador a -20°C .

7.- Refrigerador a 4°C .

C.- SOLUCIONES Y REACTIVOS.

1.- Acetona (Reactivo Analítico).

2.- BAPS al 0.75%. Ver Anexo I-11.

4.0 M E T O D O L O G I A

! Acepta los riesgos !
Toda la vida no es sino una oportu-
nidad, el hombre que llega más
lejos es generalmente el que quiere
y se atreve a hacerlo...

4.0 METODOLOGIA

A.- SELECCION DE LA CEPA RABICA DE TRABAJO.

I.- COLECCION DE MUESTRAS.

Se colectaron 40 cerebros de perros positivos a rabia procedentes del Centro Antirrábico de Culhuacán en la Cd. de México a los cuales se les aplicó la técnica de Inmunofluorescencia directa, realizando cortes del Asta de Ammon, corteza cerebral y cerebelo, congelándose a -20°C .

II.- PREPARACION DE SUSPENSIONES.

Se hicieron suspensiones de cada cerebro al 20% en BAPS y se distribuyeron en frascos viales de 1 ml para su posterior utilización conservándose a -20°C .

III.- TITULACION DE CEPAS.

Se prepararon diluciones logarítmicas de cada cepa, desde 10^{-1} a 10^{-7} en BAPS (colocando 0.5 ml de cada suspensión + 4.5 ml de BAPS en el primer tubo y teniendo la dilución de 10^{-1} , al siguiente tubo se pasan 0.5 ml - del primero y se agregan 4.5 ml de BAPS obteniendo la dilución 10^{-2} y así sucesivamente) y se inoculan en ratones albino suizos de 21 días intracerebralmente con un volumen de 0.03 ml y utilizando 6 por cada dilución. La prueba se observó durante 21 días y el cálculo del título se hizo por el Método de Reed y Muench (Ver Apéndice).

IV.- SELECCION DE LA CEPA DE TRABAJO.

Se seleccionó la cepa con mayor título para realizar la infección experimental en felinos seronegativos a rabie y que alcanzó un título de 10^3 / 0.03 ml DL50% IC en ratón.

V.- SELECCION DE FELINOS SERONEGATIVOS A RABIA.

Se recolectaron varios felinos procedentes de antirrábicos, de la calle y domésticos, cuyas edades fluctuaban entre 4 y 6 meses de edad los cuales se sangraron de la yugular una vez sedados con 0.2 ml de Rompun por vía intraperitoneal, corriéndose la prueba de seroneutralización en ratón en el Bioterio del Depto. de Epizootiología del INIFAP (Ver Apéndice).

B.- INOCULACION POR VIA ORAL A FELINOS.

Se utilizaron 10 gatos en el experimento más 3 que sirvieron como controles, siendo un total de 13 gatos. La inoculación por vía oral se realizó con una cepa de origen canino de virus de calle en suspensión al 20% en BAPS cuyo título fué de $10^3 / 0.03$ ml DL50% IC en ratón, administrando 0.9 ml de la suspensión en un cebo a base de carne conteniendo 30 000 DL50%. Se observó el comportamiento felino durante un lapso de 2 meses esperando que manifestaran signos clínicos de la enfermedad.

C.- INOCULACION A FELINOS VIA INTRAMUSCULAR.

I.- OBTENCION DE UNA CEPA RABICA DE CALLE CON ELEVADO TITULO VIERAL.

Se descongeló una cepa de origen canino que se encontraba en nitrógeno líquido (-196°C) desde 1982 pasándola después al congelador de -70°C luego al de -20°C y por último se coloca al chorro de agua de la llave. Se tituló mediante la inoculación intracerebral de ratones de 21 días de edad - encontrándose una cifra elevada de $10^6 / 0.03$ ml DL50% IC en ratón lo cual la hizo adecuada para el experimento.

II.- SELECCION DE FELINOS.

Se utilizaron 12 gatos jóvenes de ambos sexos los cuales se san-

graron para determinar su título de anticuerpos por la prueba de seroneutralización resultando negativos. Los 7 gatos sobrevivientes a la infección -- por vía oral se utilizaron a manera de desafío, teniendo 4 gatos sanos como controles. A los 3 gatos muertos se les realizó la prueba biológica e Inmunofluorescencia directa.

III.- INOCULACION INTRAMUSCULAR A FELINOS.

Se hace una dilución decimal del virus , con título 10^6 / 0.03ml DL50% IC en ratón, tomándose 0.5 ml que se diluyen 1:1 en BAPS y se inoculan vía intramuscular en músculo masetero lo cual equivale a una dosis de 1 666 666 DL50%. Se observa su comportamiento durante 30-45 días.

IV.- TITULACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

Se sangraron los felinos y se calculó el título por la técnica de seroneutralización aplicando el Método de Reed y Muench. Se realizan así mismo improntas corneales probándose su negatividad ó positividad mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes directa. También se realiza la prueba biológica de saliva a cada gato.

D.- INOCULACION INTRAMUSCULAR A CANINOS.

Para comprobar la patogenicidad de la cepa de origen canino se inoculó a 3 perros jóvenes seronegativos a rabia. Se utilizó la misma cepa y dosis observándose el comportamiento de los perros durante 30 a 45 días. En caso de resultar patógena a éstos últimos se realizará la prueba de anticuerpos fluorescentes y la prueba biológica.

5.0 R E S U L T A D O S

Solo con el corazón se puede ver
bien, lo esencial es invisible para
los ojos.

Antoine de Saint Exupery

5.0 RESULTADOS

Los títulos obtenidos para cada cepa colectada se encuentran en la tabla I que nos indica valores muy bajos por lo cual se escogió la de mayor título y se nombró C-23 con $10^3/0.03$ ml DL50% IC en ratón.

Los gatos seleccionados tuvieron títulos negativos menores de 1:5 -- equivalentes a $10^{-0.7}$ y solo uno de ellos tuvo un título de 1:14.35 equivalente a $10^{-1.12}$ los cuales se aprecian en la tabla II.

Después de la administración por vía oral de la cepa de virus rábico de calle a cada felino equivalente a 30 000 DL50% en ratón, no se observó na da que indicara la posibilidad de una infección durante los 2 meses que duró la observación de su comportamiento por lo cual se les volvió a sangrar por punción intracardíaca y se les hizo la prueba de seroneutralización encontrándose títulos positivos con un promedio de 1:10.10 equivalente a 1 título de $10^{-1.0042}$ los cuales aparecen también en la tabla II.

La cepa D-479 seleccionada, con título de $10^6/0.03$ ml DL50% IC en ra tón, no resultó patógena al ser inoculada intramuscularmente a los felinos utilizados a pesar de que la dosis administrada fué equivalente a 1 666 666 DL50% IC en ratón; se encontró también en éstos que su título de anticuerpos resultó ser el mismo lo que indica que no sufrieron infección rábica.

Se hicieron improntas corneales de los gatos inoculados por vía intra muscular después del período de observación mediante la técnica de inmuno fluorescencia directa al igual que la prueba biológica de saliva obteniendo se resultados negativos que aparecen en la tabla III.

En cuanto a los gatos que murieron en cautiverio durante la infección por vía oral debido a una enteritis mucoide se les hizo la prueba de inmuno fluorescencia directa en impronta cerebral (cerebelo, corteza cerebral e hi

pocampo) y la prueba biológica resultando ambas negativas a rabia como se aprecia en la tabla II.

Para verificar la patogenicidad de la cepa D-479 en caninos se inoculó la misma dosis por vía intramuscular a 3 perros obtenidos en el Centro Antirrábico de Culhuacán y los cuales eran seronegativos a rabia por la técnica de seroneutralización en ratón. La inoculación se hizo también en músculo masetero y se siguió su comportamiento durante 1 mes. Los 3 perros murieron a los 21, 23 y 24 días con signos previos de hiperexcitabilidad, fotofobia, alteración del ladrido y emisión de sonidos anormales, babeo, pupila dilatada, parálisis de extremidades y finalmente la muerte por paro respiratorio.

A los 3 perros se les extrajo el cerebro, tomándose impresiones del Ag ta de Ammon y se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa a la cual resultaron positivos los 3 perros. Para verificar el diagnóstico se hizo la prueba biológica también resultando positiva muriendo los ratones en un lapso de 10 días, estos resultados aparecen en la tabla IV.

Se observó un hecho importante al sangrar nuevamente a los gatos infectados por vía oral a los 7 meses post-inoculación: su título de anticuerpos disminuyó hasta un nivel muy bajo.

TABLA I. Títulos obtenidos de cada cepa de origen canino mediante la inoculación intracerebral en ratones albino suizos de 21 días y expresada como la más alta dilución en la cual 0.03 ml de cada preparación que mata al 50% de la población.

C E P A	TITULO DL50%/0.03ml	C E P A	TITULO DL50%/0.03ml
1	$10^{1.2}$	21	$10^{1.7}$
2	$10^{1.4}$	22	$10^{1.5}$
3	$10^{2.1}$	23	$10^{3.0}$
4	$10^{2.4}$	24	$10^{2.5}$
5	$10^{2.5}$	25	$10^{2.9}$
6	$10^{0.7}$	26	$10^{2.7}$
7	$10^{2.8}$	27	$10^{1.4}$
8	$10^{2.6}$	28	$10^{1.7}$
9	$10^{2.0}$	29	$10^{1.7}$
10	$10^{1.4}$	30	$10^{1.2}$
11	$10^{1.5}$	31	$10^{1.4}$
12	$10^{1.7}$	32	$10^{1.8}$
13	$10^{1.7}$	33	$10^{2.1}$
14	$10^{1.0}$	34	$10^{1.7}$
15	$10^{1.4}$	35	$10^{2.4}$
16	$10^{2.1}$	36	$10^{2.4}$
17	$10^{2.6}$	37	$10^{2.3}$
18	$10^{1.4}$	38	$10^{2.9}$
19	$10^{0.7}$	39	$10^{2.0}$
20	$10^{0.9}$	40	$10^{1.8}$

* Cepa de trabajo seleccionada para la inoculación vía oral a felinos.

TABLA II. Títulos séricos obtenidos por la técnica de seroneutralización en ratón de cada uno de los felinos utilizados, antes y después de la administración de 30 000 DL50% por vía oral de la cepa rábica C-23.

FELINO	EDAD (MESES)	SEXO	TITULOS	
			ANTES INOCULACION	DESPUES INOCULACION
1	4	M	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:8.95 = 10^{-1.092}$
2	4.3	H	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:6.95 = 10^{-0.8422}$
3	5	H	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:14.97 = 10^{-1.12}$
4	5	H	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:13.33 = 10^{-1.12}$
5	6	M	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:25.12 = 10^{-1.4}$
6	4	M	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:5.012 = 10^{-0.7}$
7	4	M	$1:14.35 = 10^{-1.12}$	$1:18.05 = 10^{-1.256}$
* 8	4	H	$1:5 = 10^{-0.7}$	-----
* 9	5	M	$1:5 = 10^{-0.7}$	-----
* 10	5	M	$1:5 = 10^{-0.7}$	-----

TESTIGOS

A	5	M	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:5 = 10^{-0.7}$
B	5	H	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:5 = 10^{-0.7}$
C	6	H	$1:5 = 10^{-0.7}$	$1:5 = 10^{-0.7}$

* Murieron en cautiverio a la 3a, 4a, 5a semanas, resultando negativas las pruebas de diagnóstico de rabia.

TABLA III. Títulos séricos obtenidos por la prueba de seroneutralización en ratón, de felinos antes y después de la inoculación intramuscular de 1 666 666 DL50% de la cepa rábica D-479.

FELINO	EDAD (MESES)	SEXO	ANTES INOC.	DESPUES INOC.	A	B
* 1	8	M	1:8.95	1:5	-	-
* 2	8.3	H	1:14.97	1:5.2	-	-
* 3	9	H	1:6.95	1:6.0	-	-
* 4	9	H	1:13.33	1:5	-	-
* 5	10	M	1:25.12	1:5	-	-
* 6	9	M	1:5.012	1:5	-	-
* 7	9	M	1:14.35	1:11.1	-	-
8	4	M	1:5	1:5	-	-
9	4	M	1:5	1:5	-	-
10	4	M	1:5	1:5	-	-
11	5	H	1:5	1:5	-	-
12	6	H	1:5	1:5	-	-
13	5	M	1:5	1:5	-	-
14	7	H	1:5	1:5	-	-
15	5	H	1:5	1:5	-	-
16	5	H	1:5	1:5	-	-
17	5	H	1:5	1:5	-	-
18	4	H	1:5	1:5	-	-
19	4	H	1:5	1:5	-	-

* Sobrevivientes a la infección vía oral.

A = Prueba biológica en saliva.

B = Inmunofluorescencia directa en impronta corneal.

TABLA IV. Resultados obtenidos al administrar a 3 perros una cepa de virus rábico de calle con un título de $10^{6.0}$ /0.03 ml IC en ratón por la vía intramuscular equivalente a una dosis de 1 666 666 DL50%.

CANINO	EDAD (MESES)	PRUEBA BIOLÓGICA (CEREBRO)	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (CEREBRO)
A ₁	4	+	+
B ₂	4	+	+
C ₃	4	+	+

A₁ Murió a los 21 días con signos de parálisis.

B₂ Murió a los 24 días con signos de parálisis.

C₃ Murió a los 23 días con signos de parálisis.

S.O D I S C U S I O N

Nadie fué ayer ni va hoy
ni iré mañana hacia Dios
por este mismo camino
que yo voy
para cada hombre guarda
un rayo nuevo de luz el sol
y un camino virgen Dios.

León Felipe

6.0 DISCUSION

Los títulos obtenidos en los cerebros caninos resultaron muy bajos debido probablemente al problema de transporte desde el Centro Antirrábico de Culhuacán hasta la Unidad Central del INIFAP y su posterior congelamiento a -20°C durante meses.

La inoculación de la cepa C-23 seleccionada por la vía oral resultó no ser patógena para todos los felinos utilizados pero sucedió algo muy importante ya que tomando en consideración el bajo título viral de la cepa fué capaz de producir una infección subletal que provocó la formación de anticuerpos neutralizantes. Lo relevante de estos resultados es que ya se ha logrado lo mismo experimentalmente en otras especies pero con cepas cuyo título está arriba de 10^8 y 10^9 / 0.03ml IC ratón (expresadas como DL50%) además de que en forma natural se ha encontrado que en USA el 4% de los zorros tiene un elevado título de anticuerpos sin haber sido inmunizados previamente al igual -- que el 40% de los murciélagos frugívoros lo cual nos haría pensar en una infección rábica latente pero no es así ya que no se recobró el virus de los -- animales utilizados (5, 58). Actualmente estos descubrimientos se emplean en Suiza, Francia y Alemania Oriental y Occidental para inmunizar las zorras que han provocado un problema bastante serio de rabia al migrar año con año y diseminar el virus rábico en los animales a los que muerden, provocando serios problemas económicos y de salud.

La cepa rábica canina D-479 resultó ser inocua al administrarla por la vía intramuscular a los felinos pero no resultó antigénica en éstos ya que no provocó la formación de anticuerpos neutralizantes. Al administrarse en las mismas condiciones a caninos de 4 meses de edad si fué patógena en un período

muy corto lo cual podría explicarse por: a) La menor susceptibilidad de los felinos a una infección experimental por la vía IM (5), b) debido a que el virus fué inactivado en el sitio de inoculación por mecanismos de defensa naturales ó inducidos (54, 55, 58) ó c) porque la dosis administrada fué insuficiente para desarrollar la infección en la especie felina.

La protección que podría haber provocado la infección subletal por vía oral en los felinos no resultó permanente porque a los 7 meses que se repitió la titulación se obtuvieron títulos bajos casi negativos a rabia pero abre la posibilidad de la utilización de cepas de virus de calle con bajo título que resulten inocuas y antigénicas lo cual sería de utilidad para realizar un -- control efectivo de la rabia silvestre y urbana, siendo ésta última un gran problema en nuestra Ciudad de México aunque el porcentaje de 1984 resultó ser un 2.3% para los gatos con 222 casos reportados en todo el país como se ve en los diagramas de estadísticas en la introducción, utilizando cebos que podrían inmunizar a los animales callejeros aunque todavía falta mucho para hablar de una verdadera inmunización.

Como ya se vió, en este trabajo no se podría hablar de una infección rábica latente debido a que no se aisló el virus y de que las pruebas para de-- tectarlo resultaron negativas por varias técnicas. Todo lo anterior nos hace suponer que hubo una infección rábica subletal por vía oral y en base a los resultados decir que la cepa C-23 es inocua y antigénica al ser administrada por vía oral en las condiciones señaladas anteriormente pero en cambio la administración de la cepa D-479 por vía intramuscular a felinos resultó ser --- inocua pero no antigénica; en los perros resultó ser patógena al ser adminis-- trada intramuscularmente en las mismas condiciones. Lo anterior nos indica que existe diferente susceptibilidad de caninos y felinos a una misma cepa rábica ó a la especificidad de especie ya que se ha comprobado que entre las --

distintas cepas de virus rábico hay diferencias notables en cuanto a la capacidad infectante, propagación por el organismo y la de provocar enfermedad (5).

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

Es en los recuerdos donde nos encontramos a nosotros mismos y aquellas partes de nuestro yo que nos hacen ser lo que somos. En el amor al pasado hallamos nuestro compromiso con el presente... y nuestras esperanzas para el futuro.

7.0 CONCLUSIONES

1.- Los títulos obtenidos para las diferentes cepas rábicas provenientes del Centro Antirrábico de Culhuacán resultaron muy bajos lo cual se explica por el transporte y manejo de las mismas hasta la Unidad Central -- del INIFAP.

2.- Se observó que una cepa de virus de calle de bajo título viral fué capaz de resultar innocua para los felinos al ser administrada por vía oral pero que provocó antigenicidad al elevar notablemente el título de anticuerpos aunque por un período corto de tiempo.

3.- La inoculación por vía intramuscular a los felinos resultó ser innocua pero no antigénica.

4.- La inoculación por vía intramuscular a caninos resultó ser patógena en corto tiempo.

5.- Se verificó la diferente susceptibilidad de especie a una misma cepa rábica de calle al ser inoculada en las mismas condiciones a felinos y caninos.

6.- Se observó la diferencia en cuanto a capacidad infectante de una cepa rábica dependiendo de la vía de inoculación ó entrada del virus, especie inoculada y la dosis utilizada en cada caso.

B.O A N E X O I

El ascenso a la cima de la montaña
cuesta trabajo e implica sacrificios
que son pequeños frente a la grandeza
de la conquista de un ideal.

L.A.S.T.

8.0 A N E X O I

PREPARACION DE REACTIVOS

1.- SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA (0.85%)

Cloruro de Sodio 8.5 g
Agua destilada cbp..... 1000 ml

2.- AMORTIGUADOR DE BORATOS pH 7.8

Acido Bórico 6.184 g
Tetraborato de Sodio 9.536 g
Cloruro de sodio 4.384 g
Agua destilada cbp 1000 ml

3.- SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA DE BORATOS

Solución Salina Fisiológica al 0.85% 95 partes V
Solución amortiguadora de boratos pH 7.8 5 partes V

4.- AMORTIGUADOR DE FOSFATOS-SALINO (PBS)

Fosfato monopotásico anhidro 4.08 g
Fosfato dipotásico anhidro 26.2 g
Solución Salina Fisiológica al 0.85% cbp 18 l

5.- SOLUCION NEUTRA SATURADA DE SULFATO DE AMONIO

Sulfato de amonio 78 g
Agua destilada cbp 100 ml
Ajustar a pH 7 con NaOH 0.1 N a temperature ambiente.

6.- CLORURO DE BARIO ($BaCl_2$) al 0.5%

Cloruro de Bario 0.5 g
Agua destilada cbp 100 ml

7.- AZIDA DE SODIO 0.5%

Azida de sodio 0.5 g
Agua destilada cbp 100 ml

8.- AMORTIGUADOR DE CARBONATOS pH 9.5 - 9.8

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 2.1 g
Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 2.65 g
Agua destilada cbp 100 ml

9.- REACTIVO DE BIURET

Sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).... 1.5 g
Tartrato doble de sodio y potasio 6.0 g
Hidróxido de Sodio al 10% 300 ml
Agua destilada cbp 1000 ml

10.- SOLUCION ESTANDAR DE ALBUMINA BOVINA FRACCION V

Disolver 10 mg de Albúmina bovina en 1000 ml de agua destilada ó
1 mg en 100 ml de agua destilada.

11.- SOLUCION FOSFATADA DE ALBUMINA BOVINA (BAPS)

Preparar un litro de PBS (Ver hoja anterior).

Disolver 5 ml de antibióticos (1560 UI de estreptomicina/ml más
500 UI de penicilina/ml) en 895 ml de PBS.

Agregar 100 ml de Albúmina Bovina Fracción V al 7.5% previamente
filtrada por membrana de 0.22 micras (75 g de Albúmina en 1000 ml
de agua destilada.

9.0 A P E N D I C E

Lo único que mantiene vivo al
hombre es la energía... ¿ y qué es
la energía sino el amor a la vida ?

9.0 APENDICE

A.- ELABORACION DE CONJUGADO

I.- OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE Y TITULACION.

Se inmunizó una yegua de 2 años de edad con CVS por vía intramuscular utilizando adyuvante completo de Freund. Posteriormente se sangró el caballo mediante una punción en la yugular y se recolectó la sangre en un matraz esté- ril sin anticoagulante. El suero se obtuvo dejando reposar el coágulo toda - la noche a temperatura ambiente y decantando, después se centrifuga durante - 10 minutos a 2500 rpm. Se inactiva el suero colocándolo en un baño María a - 56°C durante 30 minutos. Se realizan diluciones quíntuples seriadas de 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125, 1:15625, 1:78125 en BAPS y se titula por seroneu- tralización en ratón obteniendo un título mayor de 1: 78125.

II.- FRACCIONAMIENTO DEL SUERO.

1.- Se coloca el suero en un vaso de precipitado de 100 ml a 4°C, se agrega la solución saturada de sulfato de amonio 2:1 por espacio de 15 minu- tos, dejar en agitación constante a 4°C durante 2 horas (este precipitado -- tiene todas las gammaglobulinas y trazas de albúmina).

2.- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, decantar el sobrena- dante, disolver el precipitado en 15 ml de SSF.

3.- Repetir el paso 1 al 2 con el pp en 2 ocasiones más.

4.- Disolver el precipitado de la tercera precipitación en un amorti- guador de boratos-salina a 4°C cambiando el volúmen final a la mitad del vo- lúmen original del suero.

5.- Transferir a una membrana de diálisis de origen vegetal.

6.- Dializar en una solución de boratos-salina a 4°C cambiando cada 4 horas la solución dializadora.

7.- Determinar si el dializado contiene iones sulfato cada 2 ó 3 horas y después de cada cambio hacer lo siguiente:

a) A una pequeña cantidad de dializado se le añade un volúmen igual de $BaCl_2$ al 0.5%.

b) Si aparece un precipitado continuar la diálisis, si no aparece precipitado continuar la técnica ya que las globulinas son satisfactorias para la determinación de proteína y conjugación.

8.- Se retira la globulina de la membrana de diálisis, se centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos a $4^{\circ}C$ y deshechar el sedimento.

III.- DETERMINACION DE PROTEINA.

Se hacen diluciones dobles de las globulinas en PBS de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 y se leen en el espectrofotómetro a 280 nm y se determina la concentración proteica de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mg proteína/ml} = \frac{OD \times DILUCION}{1.5}$$

ó mediante la reacción de Biuret, trazando una curva patrón con Albúmina y leyendo a 545 nm.

IV.- CONJUGACION.

Ajustar a 10 mg proteína/ ml para conjugar. Se necesitan 0.025 a 0.033 mg de Isotiosocianato de Fluoresceína Isómero I (FITC) por mg de proteína. La conjugación se realiza a $4^{\circ}C$ agregando lentamente primero la proteína, luego solución salina fisiológica y al último el amortiguador de carbonatos y se deja en agitación constante y lenta durante 24 horas.

Centrifugar a 3400 rpm durante 15 minutos a $4^{\circ}C$, eliminar pp. Pasar el conjugado a través de una columna de Sephadex G-25 en PBS pH 7.2 pasando la globulina conjugada en un espacio de 1 1/2 a 2 horas, recolectando en --

frascos viales y eliminar los que están muy diluidos a simple vista. El conjugado se pasa a una membrana de diálisis contra PBS pH 7.2 en refrigeración a 4°C por 48 horas haciendo cambios cada 24 horas.

Centrifugar a 3400 rpm, 15 ' a 4°C para eliminar grumos y bacterias. - Añadir azida de sodio al 0.5% para llegar a una concentración final de 0.025% ó timerosal 1: 10 000 y congelar a -20°C.

V.- TITULACION DEL CONJUGADO Y LIOFILIZACION.

Se hacen diluciones dobles en PBS pH 7.2 de 1:0, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 y mezclar por separado con suspensiones al 20% de CVS y SCN (0.6ml) teniendo el Ag y haciendo impresiones positivas de CVS.

Se utiliza un conjugado de referencia proveniente de Atlanta y se dan grados de positividad de +, ++, +++ y ++++ para la fluorescencia específica, inespecífica y la cantidad de tinción de inclusiones y polvo antigénico de acuerdo a la intensidad de cada uno. Lo óptimo es tener 0 de fluorescencia inespecífica y ++++ para las dos restantes.

Se realiza la dilución final del conjugado de acuerdo a la dilución en contrada obteniendo 160 ml los cuales se envasan en frascos ampula de 5 ml - cada uno y se liofilizan. El título que se obtuvo para el conjugado fué de 1:8 y se almacena a -20°C donde puede durar doce meses ó más.

B.- PRUEBA BIOLÓGICA.

Se inoculan 10 ratones albino suizos de 21 días con 0.03 ml de una suspensión al 20% del material infectado. Las muertes ocurridas los primeros 4 días no se toman en cuenta ya que se pueden deber a traumatismo por la inoculación intracerebral. El período de observación se prolonga durante 21 días aunque los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse a los 8 ó 10 - días post-inoculación. El período de observación se puede acortar practican

do la técnica de anticuerpos fluorescentes en improntas de cerebro de ratones sacrificados a partir del 20. día de inoculación y al identificar el virus -- por esta técnica ó por la tinción de los corpúsculos de Negri, la efectividad de esta prueba es del 100%.

C.- TECNICA DIRECTA DE INMUNOFLUORESCENCIA.

1.- Las extensiones ó frotis testigo se preparan en encéfalos enteros de ratones jóvenes inoculados por vía intracerebral con virus rábico de calle y sacrificados cuando se encuentran agónicos los cuales serán el testigo (+), se trabaja asimismo con encéfalos de ratones sanos los cuales serán el testigo (-). Se fijan en acetona fría durante 30' a 4 horas y se secan.

2.- Se delimitan los frotis, por impresión, con lápiz marcador. Se colocan las preparaciones incluyendo los testigos positivos y negativos sobre varillas de vidrio.

3.- Se agrega a la zona superior 2 gotas de conjugado en suspensión de cerebro de ratón infectado y se extiende' con un palillo sin dañar la impresión. De la misma manera a la zona inferior se agregan dos gotas de conjugado en suspensión de cerebro de ratón normal.

4.- Los portaobjetos se colocan en una cámara húmeda a 37°C durante 30'.

5.- Después de la incubación se lavan las preparaciones sumergiéndolas en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, enjuagando en la misma solución en 2 inmersiones de 10 minutos cada una y finalmente se sumergen en agua destilada durante 10 minutos.

6.- Cuando ya estén secas se añade una gota de glicerina al 50% amortiguada a pH 7.6.

7.- Las extensiones controles y las extensiones problema que tengan antígeno rábico se podrán observar como partículas color verde manzana ó amaril

llo verdoso dotadas de una fluorescencia brillante. No se debe observar --
fluorescencia en las impresiones preparadas a partir de conjugado diluido con
suspensión de encéfalo de ratón infectado; este procedimiento de comprobación
es importante para determinar la especificidad de la fluorescencia y reducir
el número de falsas positivas.

ESQUEMA DE LA TECNICA DIRECTA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

3 laminillas histológicas
conteniendo impresiones de ...

Cerebro Normal



Cerebro rábico



Impresión examinada



Fijación en Acetona fría 30' a -20°C

Agregar

Gammaglobulina marcada (0.2 ml)
antirrábica mezclada con 0.8 ml
de suspensión de cerebro de ra-
tón rábico 20% (CVS)



Gammaglobulina marcada
antirrábica (0.2ml) con
0.8 ml de suspensión de
cerebro de ratón normal
al 20%.

Mantener en estufa de incubación en
cámara húmeda, 30 ' a 37°C

Lavar

PBS 10'
pH 7.2

PBS 10'
pH 7.2

Agua destilada 5'

Secar

Agregar glicerina amortiguada 50%

Examinar

NEGATIVIDAD

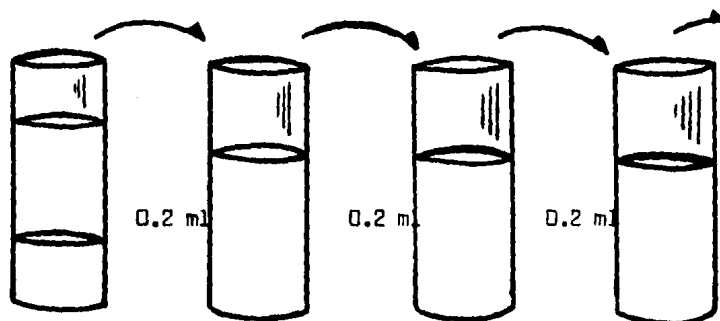
Ausencia de Fluorescencia ó fluorescencia
innespecífica -

POSITIVIDAD

Fluorescencia específica +

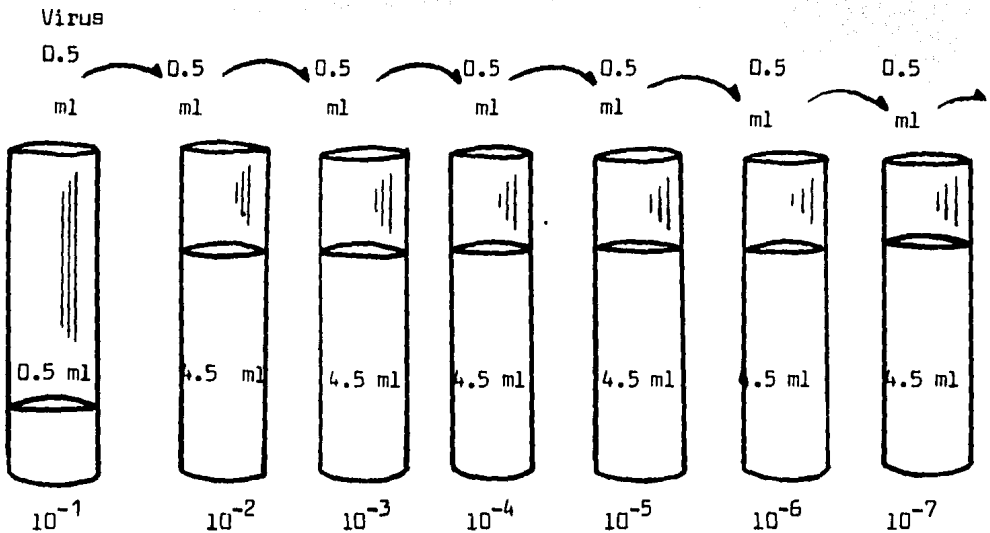
D.- PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION EN RATONES DE 21 DIAS.

1.- Se colectan los sueros y se inactivan durante media hora en un baño María a una temperatura de 56°C . Se realizan diluciones 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 utilizando 0.4 ml de suero y colocandolos en el primer tubo con 0.6 ml de BAPS, se agita y se toman 0.2 ml pasándolos al siguiente tubo con 0.8 ml de BAPS y así sucesivamente como lo indica el siguiente esquema:



BAPS	0.6 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
SUERO	0.4 ml	--	--	--
VIRUS	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
DILUCION FINAL	1:5	1:25	1:125	1:625

2.- El CVS de trabajo tuvo un título de $10^{5.4}$ / 0.03 ml IC en ratón, - se utiliza un frasco vial de 0.8 ml y se agregan 0.8 ml de BAPS obteniendo - una dilución de 10^{-1} . De aquí se toma 1 ml y se le agrega a un matraz erlenmeyer conteniendo 99 ml de BAPS quedando una dilución de 10^{-3} que será con - la que se infecten las diluciones séricas. Se toman 0.5 ml del CVS restante y se preparan diluciones logarítmicas desde 10^{-2} hasta 10^{-7} como lo indica - el esquema siguiente:



3.- Una vez preparadas las diluciones virales de 10^{-2} hasta 10^{-7} se dividen en dos en otros tubos colòcando uno a 4°C y otro a 37°C , se incuban una hora y media durante la infecci3n, las cuales nos servirán como un control positivo y para titular el CVS empleado.

4.- El suero hiperimmune utilizado con un titulo de 1:78125, obtenido mediante esta misma t3cnica, se diluye igual que los demás sueros y nos servirá como control negativo.

5.- A cada diluci3n del suero se agregan 0.8 ml de la soluci3n viral - 10^{-3} mediante una jeringa automática y se incuba durante una hora y media a - 37°C . Se incuba igualmente la diluci3n de CVS a 37°C y la otra a 4°C . Una vez transcurrido el tiempo se coloca la gradilla con los sueros en hielo y se inoculan ratones albino suizos de 21 días intracerebralmente con 0.03 ml. Se registran los animales vivos y muertos pero eliminando los muertos durante los primeros 4 días debido a traumatismo. El titulo se calcula por REED y MUENCH.

E.- METODO DE REED Y MUENCH.

Este método determina matemáticamente la DL50% que es la dosis viral que mata al 50% de la población. Se toman en cuenta las diluciones empleadas, proporción de muertos, vivos, total de muertos, total de vivos y proporción de mortalidad y porcentaje de mortalidad.

El valor exacto que se debe tomar se determina de la manera siguiente:

Ejemplo: Titulación de una suspensión de virus.

Supóngase que en la prueba de potencia de Habel la titulación de una suspensión de virus en los ratones testigo dá los siguientes resultados:

Dilución del suero	Supervivientes	Muertos	Totales Acumulativos		Mortalidad en porcentajes
			Supervi- vientes	Muertos	
10^{-5}	0	10	0	17	$17/17 = 100$
10^{-6}	4	6	4	7	$7/11 = 64$
10^{-7}	9	1	13	1	$1/14 = 7$

Se acumulan los totales de 10^{-5} a 10^{-7} para los animales supervivientes y de 10^{-7} a 10^{-5} para los ratones que se consideran muertos por rabia.

En el presente ejemplo, el factor de dilución es 10 y la dilución de partida (con una mortalidad inmediatamente inferior al 50%) es 10^{-7} .

La diferencia de logaritmos se calcula con la fórmula:

$$\frac{50\% - (\text{mortalidad inmediatamente inferior al } 50\%)}{(\text{mortalidad inmediatamente superior al } 50\% - \text{mortalidad inmediatamente inferior al } 50\%)} \times \log \text{ del factor de dilución}$$

De aquí,

$$\begin{aligned} \text{diferencia de logaritmos} &= \frac{50 - 7}{64 - 7} \times 1 \\ &= \frac{43}{57} \times 1 \\ &= 0.75 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta que en este ejemplo la mortalidad disminuye al aumentar la dilución, la última dilución positiva al 50% es inferior a la dilución de partida y para el cálculo se sustrae la diferencia de logaritmos del siguiente modo:

$$\begin{aligned} \log (\text{recíproco de la dilución final} \\ \text{del 50\%}) &= \log (\text{recíproco de la dilución} \\ &\quad \text{de partida}) - \text{diferencia de} - \\ &\quad \text{logaritmos.} \\ &= \log 10^7 - 0.75 \\ &= 7 - 0.75 \\ &= 6.25 \end{aligned}$$

De aquí,

$$\begin{aligned} \log (\text{dilución final del 50\%}) &= -6.25 \\ \text{dilución final del 50\%.} \\ (\text{título DL50\%}) &= 10^{-6.25} \end{aligned}$$

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

" Creo en Dios como el ciego
cree en el sol, no porque lo ve sino
porque lo siente. "

Hellen Keller

10.0 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Archivald, J. et al: Canine Medicine., American Veterinary Publications., USA., (1979).
- 2.- Atanasiu, P: Interferón y vacunación antirrábica., Salud Pública de México., 24: 123-128 (1982).
- 3.- Atanasiu, P: Datos nuevos sobre la prevención contra la rabia humana antes y después de la exposición., Salud Pública de México., 21, 3: - 331-340 (1980).
- 4.- Avila, David F: Estudio de la patogenia de la rabia en perros infectados naturalmente. Tesis FMVZ. Universidad de Guadalajara. pp 48 (1982).
- 5.- Baer, G.M: The Natural History of Rabies., Academic Press Inc., USA., (1975).
- 6.- Barnard, J.H.: Non-bite transmission of rabies in Kudu (Tragelaphus streptoceros)., Onderstepoort J. Vet. Res., 49: 191-192 (1982).
- 7.- Benirschke, R. et al: Pathology of Laboratory Animals., Benirschke Editores., USA., (1978).
- 8.- Bijlenga, G. et al: Post-exposure treatment of mice infected with rabies with two axonal flow inhibitors, colchicine and vinblastine., J. Gen. Virol., 64: 693-696 (1983).
- 9.- Bishop, David : Rhabdoviruses., CRC Inc., USA., (1975).
- 10.- Blenden, D.C.: Identification of rabies virus antigen in the skin of foxes., Zbl. Vet. Med. B., 27, 1: 698-704 (1980).
- 11.- Blenden, D.C.: Rabies in the domestic cat., Veterinary Medicine., - 56, 8: 339341 (1980).

- 12.- Blenden, D.C.: Rabies information exchange #2. Recovery of a dog - from an experimental infection (1980).
- 13.- Blenden, D.C.: Immunofluorescent Staining for rabies Ag in the skin of infected animals., Nigerian Veterinary Journal., 29, 2: 33- 39 - (1980).
- 14.- Blenden D.C.: The effect of post-exposure treatment on detection of rabies in the skin of mice experimentally inoculated with street - and fixed strains of rabies virus., Nigerian Veterinary Journal., - 9, 2: 43-46 (1980).
- 15.- Blenden, D.C.: Diagnosis of rabies by Immunofluorescent staining - of frozen sections of skin., JAVMA., 161, 11: 1495-1501 (1980).
- 16.- Blenden, D.C.: "Non fatal rabies in the dog., JAVMA., 179, 3: 265, (1981).
- 17.- Blenden, D.C.: Rabies in a litter of skunks predicted and diagnosed by skin biopsy., JAVMA., 179, 8: 789-791 (1980).
- 18.- Carpenter, Phillip: Microbiología., Interamericana., México, (1982),
- 19.- Closs, O. et al: Evans blue as counterstain in the demonstration of muscle antibodies by immunofluorescence in myasthenya gravis., J. - Clin. Path., 27: 162-167 (1973).
- 20.- Coulon, P. et al: Molecular basis of rabies virus virulence. II - Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with vi- rulence. J. Gen. Virol., 64: 693-696 (1983).
- 21.- Doolittle, R.R.: Homology between the glycoproteins of vesicular sto- matitis virus and rabies virus. J. Virol., 43, 4: 361-364 (1982).
- 22.- Diesch, D.L.: Antibody induced modulation of Rhabdovirus infection of neurons in vitro., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 3: 527 (1980).

- 23.- Duncan, Ronald et al: The fluorescent antibody test. Chapter 5 in Laboratory techniques in rabies, World Health Organization, Geneva, Switzerland. Serie # 23: 59-68., (1973).
- 24.- Fenner, D: Clasificación et nomenclature des virus., Annual of Microbiology (Ins. Pasteur)., 123: 323-332 (1976).
- 25.- Fudenbergh, Hugh et al: Inmunología Clínica., Manual Moderno., México, (1982).
- 26.- González, S.D.: Diagnóstico de rabia., Boletín de Información Pecuaria, 1, 15: 1-4 (1980).
- 27.- Hagan, W.A.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos., -- Prensa Médica Mexicana., 1: 689-705 (1975).
- 28.- Halbach, Michael: Rabies virus infection selectively impairs membrane receptor functions in neuronal model cells. J. Gen. Virol., 42: 627-632 (1979).
- 29.- Harvey, R.F: Fluorescent antibody staining of rabies infected tissues embedded in paraffin., Am. J. Vet. Res., 30, 7: 1213-1221 (1969).
- 30.- Holloway, Brian P. et al: Nucleotide sequence and host cell protein interaction of rabies virus leader DNA., J. of Virol., 50, 3: 777-778., (1984).
- 31.- Hope, D.W.: Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice., J. Gen. Virol., 56, 1: 371-382 (1981).
- 32.- Horstall, Frank et al: Viral and Rickettsial Infections of Man., Lippincott Company., USA., (1965).
- 33.- Howard, D.R. et al: Rabies virus titer from tissues of naturally infected skunks (*Mephitis mephitis*)., Am. J. Vet. Res., 42, 9: 1595 - 1597 (1981).
- 34.- Hutrya, Marek et al: Patología y Terapéutica especiales de los anima

- les domésticos., Labor., México., (1980).
- 35.- Jawetz, E. et al: Manual de Microbiología Médica., Manual Moderno., México., (1973).
- 36.- Jawetz, E. et al: Farmacología Clínica., Manual Moderno., México., (1982).
- 37.- Johnson, P: Enhancement of Fluorescent antibody staining of viral antigens in formalin-fixed tissues by trypsin digestion., J. Inf. Diss., 140, 5: 758-764 (1979).
- 38.- Jubb, K. et al: Patología de los animales domésticos., Edit. Labor., Barcelona, España., 1a. Ed. pp. 485-493 (1973).
- 39.- Kaplan, Martin et al: Técnicas de Laboratorio. OMS., Suiza., (1976).
- 40.- Kawai, A. et al: Production of spikeless particles of the rabies virus under conditions of low pH., Virology., 108, 2: 267-276 (1981).
- 41.- Kirk, W.R: Terapéutica Veterinaria., Continental., México., (1979).
- 42.- Kovacks, G et al: Laboratory diagnosis of rabies by the fluorescent antibody technique., Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae., 19, 4: 441-445 (1969).
- 43.- Lentz, Thomas: Is the acetylcholine a receptor a rabies virus receptor? ., Science., 215, 8: 182-184 (1982).
- 44.- Lewis, V. et al: Limitations of deteriorated tissue for rabies diagnosis., Health Laboratory Science., 11, 1: 8-12 (1974).
- 45.- Martell, M: La Rabia. Manuscrito., (1982).
- 46.- National Association of State Public Health Veterinariae., Compendium of animal rabies vaccine., JAVMA., 184, 1: 14-17 (1984).
- 47.- OMS/OPS: Centro Panamericano de Zoonosis. Primer seminario sobre rabia parálitica de las Americas., Argentina., (1967).
- 48.- Practitioner Special Reports., Feline Practice., 14, 1: 19 (1984).

- 49.- Prier, James: Basical Medical Virology., Williams and Wilkins Compa-
ny., USA., (1966).
- 50.- Reid, France et al: Increased immunofluorescent staining of rabies in
fected formalin fixed brain tissue after pepsin and tripsyn digestion,
J. Clin. Mic., 18, 4: 968-971 (1983).
- 51.- Rosenstein, E: Prontuario de Especialidades Veterinarias., Centro Pro-
fesional de Publicaciones., 33, 78: 179-224 (1981).
- 52.- Rossette, R: Bat rabies in Alberta 1972-1982. Can. Vet. Journal., 26,
2: 242-244 (1985).
- 53.- Rossette, R: Clinical observations on rabies in domestic animals, re-
port of 144 cases., Chinesse Journal of Vet. Med., 83, 9: 2 (1985).
- 54.- Siang, H. et al: Presence of specific antigens in Neuronal Cells in -
fected with fixed and street rabies virus strain., Acta Neuropathologi-
ca (Berlín)., 55:263-267 (1981).
- 55.- Siang, T et al: Mechaniam of rabies virus entry into CER cells., J.-
Gen. Virol. 65: 781-789 (1984).
- 56.- Silva Miguel: Infección accidental en el Hombre., Salud Pública de Mé-
xico., 16, 3: 429-435 (1974).
- 57.- Smith, J. et al: Immunofluorescent staining of rabies virus Ag in for-
malin fixed tissue after treatment with tripsyn., Bulletin WHO., 59,
5: 737-744 (1981).
- 58.- Smith, S: Mouse model for abortive rabies infection of the Central -
Nervous System., Inf. Imm., 31, 1: 297-308 (1981).
- 59.- Vilchis, Villaseñor: Epidemiología de la rabia en México., Salud Pú-
blica de México., 16, 3: 407-418 (1981).
- 60.- Voigh, A. et al: Zoonosis., Acribia., 150: 252-256., España., (1975).
- 61.- Voller, A.: The enzyme linked immunosorben assay and Barilletta (ELI-
SA)., (1979).

- 62.- Wilkinson, G, et al: Diseases of the cat., Pergamon Press., USA., (1966).
- 63.- Wiktor, T: Antigenic properties of rabies virus components., J. Immun., 110, 1: 269-275 (1973).
- 64.- Wiktor, T: Antigenic properties of rabies virus components., J. Immun., Exp. Med., 152: 99-112 (1980).
- 65.- Wiktor, T: Supression of cell mediated immunity by street rabies virus, J. Exp. Med., 145: 1617-1622 (1977).
- 66.- Wiktor, T: Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabie related virus proteins., I.- The nucleocapsid protein., J. Gen. Virol., 48: 97-104 (1980).
- 67.- Wiktor, T: II.- The glycoprotein., J. Gen. Virol., 48: 105-109 (1980).
- 68.- Wiktor, T: Monoclonal antibodies against rabies virus produce by somatic cells hybridization. Detection of antigenic variants. Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 8: 3938-3942., (1980).
- 69.- Wright, J. et al: A comparison of antigenicity and biological characteristics of 6 substrains os Pasteur fixed rabies virus., J. Immun., - 1: 503-515 (1949).
- 70.- Yamaguchi, Hiroshi et al: Distribution and virulence of rabies virus in animals inoculated with fixed rabies virus. Bulletin of the Faculty of Agriculture., 15, 2: 227-238 (1968).
- 71.- Yurkowsky, A: Hidrophobia following the site of apparently healthy dogs., J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 6: 73-78 (1962).