

RABIA

RESUMEN

La rabia es una zoonosis importante para la cual se han estandarizado internacionalmente las técnicas de diagnóstico. Como en la rabia no existen lesiones patognomónicas visibles, el diagnóstico solo se puede hacer en el laboratorio. Las técnicas de laboratorio se realizan preferiblemente con tejido del sistema nervioso central (SNC) extraído a través del cráneo. Se debe probar un conjunto de muestras del SNC, y el tallo cerebral es el componente más importante de las muestras.

Identificación del agente: La identificación del agente se hace preferentemente por la prueba de inmunofluorescencia (FAT). Se añade una gota de inmunoglobulina purificada, previamente conjugada con isotiocianato de fluoresceína, a un frotis de tejido cerebral fijado con acetona, a ser posible hecho de varias partes del cerebro y que incluya el hipocampo, el cerebelo y la médula oblonga. Para gran número de muestras, como en el caso de análisis epidemiológicos, la técnica inmunoenzimática puede proporcionar resultados rápidos (el inmunodiagnóstico enzimático rápido para rabia [RREID]). Si se utiliza un conjugado potente, la prueba FAT proporciona un diagnóstico fiable en el 98-100% de los casos para todos los genotipos, mientras que la prueba RREID solo detecta el virus de genotipo 1.

Las células neuronales infectadas se evidencian por pruebas histológicas y estos procedimientos revelan agregados de material vírico en el citoplasma de las neuronas (los cuerpos de Negri). Sin embargo, la sensibilidad de las técnicas histológicas es mucho menor que la de los métodos inmunológicos, especialmente si en la muestra hay autólisis. Por tanto, las técnicas histológicas ya no se recomiendan.

Como una prueba negativa única con muestras frescas no elimina la posibilidad de la infección, se deben realizar simultáneamente pruebas de inoculación, u otras. Se inoculan intracerebralmente ratones recién nacidos o de 3-4 semanas con varios tejidos del SNC, incluyendo el tallo cerebral, y se mantienen en observación durante 28 días. Para cualquier ratón que muera entre los 5 y los 28 días debe confirmarse la causa mediante FAT. Alternativamente, se inocula una monocapa de células susceptibles con el mismo material utilizado para los ratones. Tras una incubación apropiada la prueba FAT demostrará la presencia o ausencia del antígeno vírico. Cuando sea posible, el aislamiento del virus en cultivo celular debe reemplazar las pruebas de inoculación en ratones.

La identificación del agente puede mejorarse en laboratorios especializados identificando variantes de las cepas víricas mediante utilización de anticuerpos monoclonales, sondas específicas de ácido nucleico o la reacción en cadena de la polimerasa y seguido de la secuenciación del ADN de áreas del genoma. Tales técnicas permiten distinguir entre las cepas de campo y las vacunales e identificar posiblemente el origen geográfico de las cepas naturales. Estas técnicas tan sensibles deben llevarse a cabo por personal bien entrenado en laboratorios especializados.

Pruebas serológicas: Las pruebas de neutralización de los virus (NV) en cultivos celulares son las prescritas para el comercio internacional. Alternativamente, se puede usar una prueba que se correlacione con ésta, como un ensayo de inmunoenzima con anticuerpo contra la proteína G o la prueba de neutralización en ratones. Los resultados se expresan en Unidades Internacionales o en unidades equivalentes relativas a un antisuero estándar internacional.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: Las vacunas contra la rabia para usar en animales contienen virus vivos atenuados para la especie animal concreta (como el Flury de pocos pases en huevo, el Flury de muchos pases en huevo, el Street-Alabama-Dufferin o el Kelev),

o virus inactivados por medios químicos o físicos, o bien vacunas recombinantes. El virus se cultiva en tejido del SNC de animales recién nacidos, en huevos embrionados o en cultivos celulares.

Normalmente las vacunas contra la rabia están liofilizadas, pero las vacunas con virus inactivados se pueden mantener en forma líquida, preferiblemente con adyuvante.

Antes de autorizar nuevas vacunas se debe determinar la duración de la inmunidad derivada de su empleo en animales vacunados de la especie concreta.

Para las vacunas con virus vivos, debe establecerse el mínimo de contenido vírico que proporcione una respuesta inmune adecuada.

La potencia de las vacunas con virus inactivados se establece y controla por vacunación en ratones y por posterior inoculación intracerebral de desafío mediante pruebas establecidas en los EEUU, en América por el Departamento de Agricultura de los EE. UU. y en otras partes por la Farmacopea Europea. Los productos finales de ambos tipos de vacunas se someten a pruebas de inocuidad y ausencia de toxicidad.

En las vacunas vivas que se preparan para vacunación oral de animales silvestres (o domésticos) se debe demostrar seguridad y eficacia para los animales a los que van dirigidas y seguridad para otras especies.

A. INTRODUCCIÓN

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

En el género *Lyssavirus* se pueden distinguir siete líneas genéticas por pruebas de protección cruzada y por análisis de biología molecular (5, 14, 21), a saber, el virus de la rabia clásica (RABV, genotipo 1, serotipo 1), el virus del murciélago de Lagos (LBV, genotipo 2, serotipo 2), el virus Mokola (MOKV, genotipo 3, serotipo 3) y el virus Duvenhage (DUUV, genotipo 4, serotipo 4). Los lyssavirus del murciélago europeo (EBLV), que se subdividen en dos biotipos (EBLV1, genotipo 5 y EBLV2, genotipo 6), y el lyssavirus del murciélago australiano (ABLV, genotipo 7), recientemente aislado en Australia (24), también son miembros del género *Lyssavirus*, pero aún no se han clasificado en serotipos. Los virus de los serotipos 2–4, los EBLV y el ABLV se designan como virus relacionados con la rabia. El uso de anticuerpos monoclonales (MAbs) dirigidos contra los antígenos víricos de la nucleocápsida o la glicoproteína, o la secuenciación de fragmentos genómicos determinados ha hecho posible la definición de numerosos subtipos dentro de cada serotipo. Los lyssavirus causan una enfermedad clínica indistinguible de la rabia clásica. Los sitios antigénicos conservados en la nucleocápsida permiten el reconocimiento de todos los lyssavirus con recientes preparaciones comerciales de anticuerpos antirrábicos conjugados, que se utilizan en pruebas de diagnóstico con muestras de cerebro. Los sitios antigénicos conservados en RABV, DUUV, EBLV y ABLV permiten la neutralización cruzada y la inmunidad cruzada mediante vacunación contra la rabia. Existe poca o nula protección cruzada contra MOKV o LBV por vacunación contra la rabia, y la mayoría de los antiseros antirrábicos no neutralizan estos lyssavirus.

El personal que trabaja con material sospechoso debe vacunarse contra los lyssavirus y otros patógenos que pueden estar presentes en las muestras utilizadas para diagnóstico. El laboratorio debe cumplir con la normativa nacional de biocontención y de bioseguridad, para proteger al personal del contacto con los patógenos; también debe cumplir las directrices señaladas en el Capítulo I.1.6. *Seguridad humana en el laboratorio veterinario de Microbiología.*

La OMS recomienda la inmunización preventiva del personal expuesto. El protocolo de inmunización incluye tres inyecciones en los días 0, 7 y 28. La evaluación serológica de la inmunización se realiza 1-3 semanas después de la última inyección y se comprueba cada 6 meses en el caso de trabajadores de laboratorio o cada 2 años en otro personal. Se debe suministrar vacunación de refuerzo cuando el título desciende por debajo de 0,5 Unidades Internacionales (IU) por ml. En ausencia de control serológico, el régimen de vacunación debe consistir en una vacunación de refuerzo inicial después de 1 año y a continuación cada 1-3 años.

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

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

La observación clínica solo puede conducir a la sospecha de rabia, porque los síntomas de la enfermedad no son característicos y pueden variar mucho de un animal a otro (36). El único modo de hacer un diagnóstico fiable de la rabia es identificar el virus o alguno de sus componentes específicos mediante pruebas de laboratorio.

Como el virus de la rabia se inactiva rápidamente, las muestras refrigeradas para diagnóstico deben enviarse al laboratorio por el medio más rápido posible. Las condiciones de envío deben considerarse parte de la “cadena de diagnóstico de la rabia”.

Se pueden utilizar varias técnicas, que han sido detalladas y estandarizadas en la cuarta edición de *Técnicas de Laboratorio para la Rabia* de la OMS (37). Estos métodos varían en eficacia, especificidad y fiabilidad. Normalmente se aplican a tejido cerebral, pero pueden también aplicarse, aunque con menor eficacia, a otros órganos (como las glándulas salivares). En el cerebro, el virus de la rabia es particularmente abundante en el tálamo, puente y médula. El hipocampo (asta de Ammon), cerebelo y distintas partes del cerebro se han descrito como zonas negativas en el 3.9-11,1% de los cerebros positivos. La estructura de elección es el tálamo, pues fue positivo en todos los casos. Para pruebas se recomienda disponer de un conjunto de tejidos cerebrales que incluya el tallo cerebral (12). Para alcanzar estas partes del cerebro, es necesario extraer el órgano completo después de abrir el cráneo en una sala de necropsias. Bajo algunas condiciones (como en el campo, o en el muestreo de estudios epidemiológicos amplios), se puede emplear un método simplificado de muestreo a través del agujero occipital (11) o de la cavidad orbital (26).

a) Envío de muestras

Durante el envío de muestras sospechosas para el diagnóstico (cabezas de animales, cerebro y otras muestras tisulares) no debe existir riesgo alguno de contaminación para el hombre: los cerebros deben colocarse en contenedores herméticos rígidos (las cabezas animales deben envolverse en material absorbente) y seguir las regulaciones que indica la Normativa sobre Materiales Peligrosos de la Asociación Internacional para el Transporte Aéreo (IATA). Estas indicaciones se resumen en el Capítulo I.1.1. *Métodos de muestreo*.

Cuando no es posible enviar muestras refrigeradas, se pueden utilizar otras técnicas de conservación. La elección de conservantes está estrechamente ligada al tipo de prueba que se va a usar en el diagnóstico:

- La formalina inactiva el virus, por lo que no se pueden utilizar pruebas de aislamiento. El diagnóstico depende entonces de la utilización de una prueba modificada y menos sensible como la inmunofluorescencia directa (FAT), inmunohistoquímica o histología (33, 37).
- Si el material cerebral se mantiene en una mezcla de glicerol al 50% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), la infectividad puede durar varios días a temperatura ambiente. La mezcla glicerol/PBS reduce la actividad bacteriana y protege por tanto contra los efectos químicos y biológicos de la putrefacción. No protege contra el descenso del título provocado por las condiciones térmicas y, en consecuencia, como la rabia es termolábil, el título vírico descenderá durante el almacenamiento en glicerol/PBS. Bajo condiciones normales de transporte en los trópicos, esta protección solo puede ser eficaz unos cuantos días. Así, siempre que sea posible, las muestras en glicerol/PBS deben mantenerse refrigeradas. Como el virus no se inactiva en glicerol/PBS, con estas muestras se pueden utilizar todas las pruebas de laboratorio.

b) Recogida de muestras

Normalmente se recoge el cerebro por apertura del cráneo en una sala de necropsias y se toman las muestras apropiadas. Este paso puede ser arriesgado si el técnico de laboratorio no está entrenado o se realiza en condiciones de campo. En tales casos existen dos métodos posibles de tomar algunas muestras de cerebro sin abrir el cráneo.

- **Ruta del foramen occipital para muestreo del cerebro**

Se introduce en el foramen occipital en dirección al ojo una pajita de beber de 5 mm (11) o una pipeta desechable de plástico de 2 ml (16). Pueden tomarse muestras del bulbo raquídeo, la base del cerebelo, el hipocampo, el córtex y la médula oblonga. Debe tenerse en cuenta la encefalopatía bovina espongiforme (BSE) en el diagnóstico diferencial de todo ganado bovino considerado “sospechoso de rabia”. Para ambas enfermedades se pueden tomar muestras del cerebro utilizando la “espátula de cerebro o herramienta” desarrollada para muestreos de tejidos para BSE, en vez de una pajita o una pipeta. Las muestras tomadas son relativamente fáciles de reconocer, dependiendo del área del cerebro muestreada.

- **Ruta retro-orbital para muestreo del cerebro**

En esta técnica se utiliza un trócar para hacer un agujero en la parte posterior de la cavidad ocular y luego se introduce una pipeta de plástico a través de este hueco. Las partes del cerebro muestreadas son las mismas que en la técnica anterior, pero se toman en la dirección opuesta.

c) **Pruebas normales de laboratorio**

El diagnóstico de laboratorio puede realizarse utilizando tres tipos de procedimientos.

- **Identificación histológica de lesiones celulares características**

Los cuerpos de Negri se corresponden con agregados de proteínas víricas, pero las técnicas clásicas de tinción solo detectan la afinidad de estas estructuras por colorantes acidófilos. Las pruebas inmunohistoquímicas son la única prueba histológica específica para la rabia.

Un frotis de tejido no fijado se puede teñir por el método de Seller y obtener el diagnóstico en 1 hora. En general, las pruebas histológicas, como la de Mann, se realizan con material fijado después de su inclusión en parafina, y el resultado se obtiene en 3 días. Estas técnicas tienen la ventaja de que el equipo de laboratorio que se requiere es barato y se evita la necesidad de mantener las muestras frías una vez fijadas. Cualquiera que sea el método de tinción empleado, la evidencia de infección reside en la presencia de cuerpos acidófilos intracitoplásmicos. Estos métodos histológicos, especialmente el de Seller, no se siguen recomendando porque tienen muy baja sensibilidad y deben ser abandonados.

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

i) *Prueba de inmunofluorescencia*

La prueba más utilizada en el diagnóstico de la rabia es la FAT, que recomiendan tanto la OMS como la OIE. La prueba puede hacerse directamente sobre un frotis, y puede utilizarse también para confirmar la presencia del antígeno de la rabia en cultivo celular o en tejido cerebral de ratones que se han inoculado para el diagnóstico. La FAT produce resultados fiables en pocas horas en el 95-99% de los casos. La sensibilidad de la FAT depende de la muestra (grado de autólisis y calidad de muestreo del cerebro, ver Sección B.1) (1, 9), del tipo de lyssavirus y de la eficacia del personal del equipo de diagnóstico. La sensibilidad puede ser más baja en muestras de animales vacunados debido a la localización del antígeno, que se limita al tallo cerebral. Para el diagnóstico directo de la rabia, se preparan frotis de una mezcla compuesta por tejido cerebral que incluya el tallo cerebral, se fijan con acetona fría de grado alto y se tiñen con una gota del conjugado específico. Los conjugados fluorescentes contra la rabia se pueden preparar en el laboratorio. Los comercializados son conjugados policlonales específicos para el virus completo o para la proteína de la nucleocápsida vírica, o pueden contener diferentes MAbs. En la prueba, los agregados específicos de proteínas de la nucleocápsida se identifican por su fluorescencia. Antes de su utilización se debe comprobar la especificidad y sensibilidad de estos conjugados fluorescentes contra la rabia respecto a las variantes del virus predominante a nivel local.

La FAT se puede utilizar en muestras conservadas en glicerol. Si la muestra se ha conservado en formalina, solo se puede emplear FAT después de que la muestra se haya tratado con un enzima proteolítico (6, 7, 32, 33). No obstante, con muestras fijadas con formalina y digeridas, la FAT siempre resulta menos fiable y más lenta que cuando se realiza con muestras frescas.

ii) *Pruebas inmunoquímicas*

El anticuerpo puede conjugarse con una enzima como la peroxidasa en vez de con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este conjugado se puede utilizar para el diagnóstico directo con la misma sensibilidad que el FAT (22) pero debe tenerse cuidado del riesgo de resultados positivos falsos inespecíficos. Este riesgo se reduce mucho con una cuidadosa formación de los técnicos. Debe resaltarse que esta técnica requiere un paso de incubación más que la FAT.

El conjugado con peroxidasa puede emplearse con cortes finos de tejidos fijados con formalina para pruebas inmunohistoquímicas.

Una variación de la prueba inmunoquímica es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que detecta el antígeno de la rabia. Esta prueba rápida de inmunodiagnóstico enzimático (RREID) está comercializada (28). La correlación entre FAT y RREID está entre 96-99% (8, 15). La versión "normal" de esta prueba no es sensible a virus relacionados con la rabia ya que RREID sólo detecta lyssavirus de genotipo1.

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

Estas pruebas detectan la infectividad de una suspensión de tejidos en cultivos celulares o en animales de laboratorio. Deben emplearse si la FAT da resultados inciertos o cuando la FAT es negativa en el caso de exposición conocida al hombre.

i) *Prueba de inoculación en ratón*

Se inoculan intracerebralmente de cinco a diez ratones de 3-4 semanas (12-14 g), o una camada de ratones recién nacidos de 2 días. Se recomienda, aunque no es esencial, utilizar ratones libres del patógeno específico (SPF). El inóculo es el sobrenadante clarificado de un homogenado de material cerebral al 20% (p/v) (córtex, asta de Ammon, cerebelo, médula oblonga) en una solución isotónica tamponada con antibióticos. Los ratones deben anestesiarse para reducir el dolor de la inoculación. Los ratones jóvenes se observan diariamente durante 28 días, y cada ratón muerto se examina para rabia mediante FAT. Con cepas callejeras de la rabia de zorra, la muerte comienza generalmente a los 9 días de la inoculación. Para resultados más rápidos con ratones recién nacidos, es posible analizar por FAT un ratón a los 5, 7, 9 y 11 días post-inoculación.

Esta prueba *in-vivo* es cara, particularmente si se usan ratones SPF, y debe evitarse cuando sea posible. No proporciona resultados rápidos (en comparación con las pruebas de inoculación *in-vitro*), pero cuando la prueba resulta positiva se puede aislar una gran cantidad de virus de un único cerebro de ratón para identificación de la cepa. Otra ventaja de esta prueba de baja tecnología es que puede aplicarse fácilmente en situaciones en que no se dispone del entrenamiento y la infraestructura requerida para otras pruebas (por ejemplo, cultivos celulares).

ii) *Prueba de cultivos celulares*

Para el diagnóstico rutinario de la rabia se utilizan líneas celulares de neuroblastoma, como la CCL-131 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC)¹. Las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 5% de suero fetal bovino (FCS) y se incuban a 36 C° con 5% de CO₂. Su sensibilidad es comparable a la de las células de riñón de hámster neonato (BHK-21) (29). Esta línea celular es adecuada para aislamientos de cepas de la calle sin ningún paso de adaptación, pero debe ser analizada, antes de su empleo, para comprobar su susceptibilidad a variantes predominantes del virus local. La presencia del virus de la rabia en las células se revela por FAT. El resultado de la prueba se obtiene después de 18 horas, por lo menos (un ciclo replicativo del virus en las células); generalmente la incubación se prolonga hasta 48 horas (10) y en algunos laboratorios hasta 4 días.

Esta prueba es tan sensible como la de inoculación en ratón. Si existe en el laboratorio una unidad de cultivos celulares, esta prueba debería sustituir a la de inoculación en ratón ya que evita el uso de animales vivos, es menos costosa y da resultados más rápidos.

Con frecuencia es deseable realizar más de un tipo de prueba con cada muestra, por lo menos cuando ha existido exposición al hombre.

d) **Otras pruebas de identificación**

Las pruebas anteriores pueden completarse en laboratorios especializados (como los laboratorios de referencia de la OIE o de la OMS) utilizando MABs, sondas de ácido nucleico, o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida por secuenciación de ADN de áreas genómicas para tipificar el virus (16). Esto permite hacer distinciones entre los virus vacunales y una cepa natural de campo, y posiblemente determinar el origen geográfico de ésta última.

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se usan muy poco en estudios epidemiológicos debido a la seroconversión tardía y al bajo porcentaje de animales que sobreviven a la enfermedad con anticuerpos post-infección. El método de elección para el control de la rabia silvestre es la inmunización oral de los reservorios de rabia. Para investigaciones de seguimiento de campañas de vacunación oral, las pruebas de neutralización vírica (NV) en cultivo celular son las preferibles. Sin embargo, si se dispone de sueros de baja calidad, las pruebas NV en cultivo celular resultan sensibles a la cito toxicidad, lo que puede conducir a resultados positivos falsos. Se ha comprobado que la utilización para tales muestras de una prueba ELISA indirecta con placas donde se usa como antígeno la glicoproteína del virus de la rabia es tan sensible y específica como la prueba NV con células (19).

a) **Prueba de neutralización vírica en cultivo celular: neutralización con anticuerpo fluorescente (prueba prescrita para el comercio internacional)**

El principio de la prueba de neutralización vírica con anticuerpo fluorescente (FAVN) (18) es la neutralización *in vitro* de una cantidad constante del virus de la rabia (cepa de "virus estándar de desafío" [CVS] adaptada a cultivo celular) antes de inocular células susceptibles al virus de la rabia: células BHK-21 C13.

¹ American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE. UU.

El título del suero es la dilución a la que el 100% del virus resulta neutralizado en el 50% de los pocillos. El título se expresa en IU/ml comparándolo con la dilución neutralizante de un suero estándar en las mismas condiciones experimentales (suero de la OIE de origen canino o estándar de la OMS para inmunoglobulina [humana] No. 2, o ambos). Puede usarse un control interno calibrado frente a un control internacional.

Este método en microplaca utiliza placas de 96 pocillos y es una adaptación de la técnica de Smith *et al.* (30), modificada por Zalan *et al.* (38) y por Perrin *et al.* (27). Varias publicaciones (17, 18) describen que la prueba FAVN y la prueba rápida de inhibición de foco fluorescente (RFFIT) proporcionan resultados equivalentes.

- **Equipo básico**

Incubador a 37°C con humedad y con 5% de CO₂; incubador seco a 37°C; cabina de contención; microscopio de fluorescencia adecuado para fluorescencia con FITC y equipado con ocular x10 y objetivo x10. El aumento global del microscopio varía de x100 a x125 debido al aumento adicional de algunos sistemas de epifluorescencia.

- **Reactivos y materiales**

Tampón PBS, pH 7,2, sin Ca⁺² ni Mg⁺², mantenido a 4°C;

Tripsina con etilén diamino tetra-acético (EDTA):

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

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

Conjugado anti-rabia con FITC;

Células: BHK-21 C13 (ATCC CCL-10);

Virus: cepa CVS-11 (ATCC VR 959), que está disponible en la ATCC o en el laboratorio de referencia de la OIE para la Rabia, en Nancy, Francia (ver Cuadro en la parte 3 de este *Manual*). Los viales se mantienen a -80°C;

Inmunoglobulina (humana) estándar de la OMS para la rabia No.2, 30 IU por ampolla² (reconstituida con 5 ml de agua estéril desionizada o destilada, mantenida a -20°C, y diluida a 0,5 IU/ml con agua desionizada antes de uso), o preferiblemente Suero Estándar de la OIE de origen canino (laboratorio de referencia de la OIE para la Rabia, Nancy, Francia [ver Cuadro en la parte 3 de este *Manual*] mantenido a -20°C y diluido a 0,5 IU/ml con agua estéril desionizada o destilada según el título del lote). Se aconseja que, para control interno rutinario, los laboratorios utilicen un suero positivo o un conjunto de sueros caninos que se hayan calibrado frente al suero estándar internacional de la OIE;

Suero control: Conjunto de diez sueros caninos liofilizados, se mantiene a 4°C y se reconstituye con 0,5 ml de agua estéril desionizada o destilada.

- **Producción de CVS**

- Cultivo celular*: Las células BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) para producir el virus CVS (ATCC VR 959 CVS-11) se tripsinizan durante la fase de crecimiento rápido, es decir, cuando están en fase exponencial de crecimiento. Si la confluencia de la capa es completa, debe hacerse un nuevo pase. Las células en suspensión no deben agregarse; se utilizan 2 x 10⁷ células por cada botella de cultivo de 75 cm². Las células se recogen en un volumen de 20-30 ml de medio de cultivo con 10% de FCS inactivado por calor.
- Infección de las células*: Se ajusta la multiplicidad de infección (número de partículas infecciosas por célula) ente 0,1 y 0,5. La botella de vidrio con la suspensión virus/células se incuba 60 minutos a 35,5-37°C. El contenido de la botella se agita suavemente cada 10-15 minutos.
- Crecimiento vírico*: La suspensión virus/células se centrifuga a 800 **g** durante 15 minutos y el precipitado se resuspende en medio de cultivo mezclado con 10% de FCS inactivado por calor. El virus se recoge 2 días después.

² National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Inglaterra.

iv) *Recogida y almacenamiento*: El sobrenadante se centrifuga a 800 **g** durante 15 minutos a 4°C. Si se han usado varias botellas, se mezclan los distintos sobrenadantes, se reparten después en alícuotas y se congelan a –80°C. El título infectivo del material se establece 3 días después de la congelación.

• **Titulación del virus en DICT50 (dosis infectiva del 50% en cultivo de tejidos)**

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

Diferentes pasos de este procedimiento se pueden adaptar a los sistemas de seguridad y los métodos de trabajo del laboratorio, pero los siguientes no deben cambiarse:

- inoculación de una capa celular de 24 horas,
 - diluciones decimales preparadas con 0,9 ml de diluyente y 0,1 ml de suspensión vírica,
 - seis réplicas de 50 µl por dilución,
 - incubación durante 72 horas,
 - lectura cualitativa (es decir, el pocillo es negativo o positivo),
 - en cada sesión de titulación se titula un vial de un lote control de virus y este título se integra en una tarjeta control para validar el proceso de titulación.
 - el cálculo se hace por el método gráfico neoprobit o por el de Spearman-Kärber.
- i) *Suspensión celular*: El día antes de la titulación se prepara una suspensión celular con 10⁵ células/ml en medio de cultivo con 10% de FCS inactivado por calor y se distribuye en las placas de microtitulación de 96 pocillos, con 200 µl por pocillo. Las placas se incuban durante 24 horas a 35.5-37°C con 5% de CO₂.
- ii) *Dilución del virus*: Las diluciones seriadas se realizan en tubos de 5 ml usando como diluyente un medio de cultivo sin FCS. Se preparan diluciones de 10⁻¹ a 10⁻¹² (0,9 ml de diluyente con 0,1 ml de la dilución previa).
- iii) *Infección de las células*: El medio de las placas de titulación se elimina con un sistema aspirante. En cada pocillo se distribuyen 50 µl de cada dilución del virus. Se usan seis réplicas por cada dilución. A continuación se incuba la placa de microtitulación durante 1 hora a 35.5-37°C con 5% de CO₂. Después se añaden 200 µl de medio de cultivo con 5% de FCS.
- iv) *Incubación*: Se incuba durante 3 días a 35.5-37°C en 5% de CO₂.
- v) *Tinción y cálculo del título*: Las células se tiñen mediante FAT como se indica más adelante. La lectura es cualitativa y cada pocillo con fluorescencia se considera positivo. La determinación del título se hace empleando:
- el método gráfico neoprobit (2) o
 - a fórmula de Spearman-Kärber:

$$\log_{10}(\text{dilución a punto final}) = -\left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i}\right)$$

x_0 = – (log₁₀ de la dilución menor con todos los pocillos positivos)

d = log₁₀ de los saltos de dilución, uno en este caso

n_i = número de réplicas, seis en este caso

r_i = número de pocillos positivos

Fig. 1. Utilización propuesta de las microplacas para la prueba de neutralización vírica con anticuerpo fluorescente. Los pocillos a los que se debe añadir suero sin diluir se llenan con los "50 µl" indicados. Los pocillos a los que se debe añadir 50 µl del virus estándar de desafío diluido se muestran en sombreado. Las diluciones se expresan como \log_{10} .

		H	G	F	E	D	C	B	A	
Titulación virus estándar de desafío										1
										2
										3
										4
Suero estándar OMS u OIE (0.5 IU/ml)	50 µl						50 µl			5
	50 µl						50 µl			6
	50 µl						50 µl			7
	50 µl						50 µl			8
Control positivo Interno	50 µl									9
	50 µl									10
	50 µl									11
	50 µl									12
log (dilución)	0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	2.87	3.35	Células		

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

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Las microplacas se utilizan según el modelo indicado en la Figura 1. La placa 1 se usa para la titulación de CVS (filas 1 a 4), y para los controles se emplean sueros estándar y suero canino control. La placa 2 y las siguientes se utilizan para los sueros que se van a probar.
- ii) El medio se añade a los pocillos del siguiente modo: placa 1, filas 1 a 4 y pocillos A9 a A12: añadir 150 µl por pocillo; placa 2 y siguientes: filas 6 y 12: añadir 200 µl por pocillo; resto de los pocillos: añadir 100 µl.
- iii) Los sueros probados se inactivan por calor durante 30 minutos a 56°C. Como indica la Figura 1, se añaden 50 µl de cada suero probado sin diluir a cuatro pocillos adyacentes.
- iv) La dilución de los sueros se lleva a cabo en las microplacas del siguiente modo:

Suero de la OIE, suero de la OMS, control interno y control de suero canino: con una pipeta multicanal de 50-200 µl mezclar los pocillos de la primera dilución aspirando y expeliendo al menos ocho veces, transferir 50 µl de una fila a la siguiente, hasta alcanzar la última. Eliminar 50 µl de la última fila.

Sueros problema (todas las placas): como antes, transferir sucesivamente 50 µl de una fila a la siguiente hasta las filas 5 y 11 (dil. $10^{-2,39}$). Con una pipeta multicanal de 5-50 µl, transferir 10 µl de las filas 5 y 11 a las filas 6 y 12, respectivamente (de la dil. $10^{-2,39}$ a la dil. $10^{-4,23}$). Utilizando una pipeta multicanal ajustada a 100 µl, mezclar las filas 6 y 12 y eliminar 180 µl. Luego añadir a estas filas 70 µl de medio. Este paso final no lleva por sí mismo a mayor rendimiento de la prueba. Para alcanzar o superar la dilución final recomendada pueden usarse procedimientos alternativos. Esto puede requerir modificaciones en la distribución de la placa.

- **Adición del virus estándar de desafío**

- i) El stock de CVS se guarda en microtubos de 1 ml a -80°C . Un tubo se descongela rápidamente con agua corriente fría y se coloca en hielo.
- ii) Se prepara una dilución de este tubo para obtener 100 DICT₅₀ en 50 µl. De esta dilución se añaden 50 µl a cada pocillo con suero (ver Figura 1). Para titulación del virus se añaden 50 µl a los pocillos H1 a H4 (placa 1). A continuación, transferir 50 µl de fila a fila (placa1, líneas 1-4). Eliminar 50 µl de la última fila (placa 1, pocillos A1 a A4). A los pocillos A9 a A12 de la placa 1 (controles) no se añade virus.
- iii) Incubar las microplacas a 37°C en un incubador con humedad y 5% de CO_2 durante 1 hora.
- iv) *Adición de células:* Tripsinizar un cultivo subconfluyente de células BHK-21 de 3 días. Resuspender las células para obtener una suspensión de 4×10^5 células/ml en DMEM suplementado con 10% de FCS inactivado por calor. Añadir 50 µl de la suspensión celular a cada pocillo.
- v) Incubar las microplacas durante 48 horas a 37°C en un incubador con humedad y 5% de CO_2 .

- **Fijación y tinción**

- i) Después del período de 48 horas de incubación, se elimina el medio, y las microplacas se lavan una vez con PBS, pH 7,2, y una vez con 80% de acetona. Luego se fijan con 80% de acetona a temperatura ambiente durante 30 minutos (sin tapadera) y se secan a temperatura ambiente durante al menos 1 hora.
- ii) A cada pocillo se añaden 50 µl de la dilución de trabajo del conjugado anti-rabia con FITC se agitan las microplacas ligeramente y se incuban a 37°C durante 30 minutos. Se elimina el conjugado fluorescente y las microplacas se lavan dos veces con PBS. Se elimina el exceso de PBS invirtiendo brevemente las microplacas sobre papel absorbente.

- **Lectura e interpretación de los resultados**

- i) Se observa la superficie total de cada pocillo. La lectura de evaluación es cualitativa (más o menos): si no hay fluorescencia en las células, se asigna un – al pocillo; si hay fluorescencia en las células (una o más células), se asigna un + al pocillo.
- ii) Se leen primero los controles. Para las células control, titulación de CVS, suero control, y sueros estándar (estándar de la OMS y/o de la OIE), los títulos se calculan por el método de Spearman-Kärber o por el método gráfico neoprobit (2).
- iii) Los resultados de la titulación de CVS (DICT₅₀), suero control (D₅₀ [dosis media]) y estándar positivo (D₅₀) se reflejan en una tarjeta de control en cada caso. Los resultados del control de la prueba actual se comparan con los resultados de las pruebas de control de pruebas anteriores utilizando el mismo lote de control. La prueba se valida si los valores obtenidos para los tres controles de la prueba actual no son estadísticamente diferentes de la media de los valores obtenidos en pruebas anteriores según esta técnica.
- iv) El resultado de la prueba corresponde a los virus no neutralizados tras la incubación con el suero de referencia o con el suero problema. Estos títulos se calculan con el método gráfico neoprobit (2) o con la fórmula de Spearman-Kärber (37). La comparación del título medido en los sueros probados con el del suero estándar positivo de título neutralizante conocido permite la determinación del título neutralizante de los sueros problema en IU/ml.

b) Prueba rápida de inhibición de foco fluorescente (RFFIT) para la determinación de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia (prueba obligatoria para el comercio internacional)

• **Procedimiento estándar (tomado de *Técnicas de Laboratorio para la Rabia* de la OMS, 1996; [ref. 37])**

• **Preparación de la suspensión de virus de inóculo**

- i) Tripsinizar un cultivo de 3 días de células de neuroblastoma de ratón (MNA)³ en botella de 150 ml. Estas células prefieren un medio ácido suplementado con vitaminas (34). Puede obtenerse una línea celular similar (CCL-31) por petición a la ATCC (ver nota 1 a pie de página).
- ii) En un tubo cónico de centrifuga de 50 ml, resuspender 3×10^7 células en 2,7 ml de medio mínimo esencial de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino (EMEM-10).
- iii) Con procedimientos estándar de seguridad contra la rabia, añadir 1×10^7 unidades infecciosas del virus de la rabia CVS-11 (ATCC, VR959) y mezclar con el vórtex una vez. Incubar las células y el virus durante 15 minutos a 37°C; durante este tiempo, someter una vez las células al vórtex.
- iv) Añadir 10 ml de EMEM-10, mezclar con vórtex, y centrifugar las células a 500 g durante 10 minutos.
- v) Eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en 30 ml de medio de cultivo y transferir a una botella de 150 ml.
- vi) Agitar el recipiente suavemente para mezclar la suspensión celular y después preparar tres portas con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos pipeteando 0,2 ml de la suspensión celular en un pocillo de cada porta.
- vii) Incubar las botellas y los portas a 37°C en un incubador con humedad con 0,5% de CO₂. La botella debe incubarse como cultivo cerrado (tapón ajustado).
- viii) A las 20, 40 y 60 horas después de la infección, fijar con acetona y teñir un porta por la técnica de inmunofluorescencia (23) para determinar la infectividad vírica. 24 horas después de que las células muestren un 100% de infectividad (generalmente a las 40 horas de la infección), debe recogerse el sobrenadante.
- ix) Transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 50 ml y centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos.
- x) Distribuir y guardar el sobrenadante a -70°C en alícuotas de 0,5 ml.

• **Titulación de la suspensión vírica de inóculo**

- i) Descongelar una alícuota del virus de inóculo y preparar diluciones decimales seriadas (de 10⁻¹ a 10⁻⁸) en EMEM-10.
- ii) Distribuir 0.1 ml de cada dilución de virus en un pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. Añadir a cada pocillo 0,2 ml de células MNA suspendidas en EMEM-10 (concentración de 5×10^4 células por 0,2 ml).
- iii) Mezclar las células y el virus moviendo suavemente el porta e incubar después durante 40 horas a 37°C en un incubador con humedad y 0,5% de CO₂.
- iv) Fijar con acetona y teñir el porta por la técnica de inmunofluorescencia. Se debe observar infección vírica con la dilución 10⁻⁶ del virus, lo que indica que el stock de la suspensión vírica contiene al menos 1×10^6 unidades infecciosas por 0,1 ml. Preparar suficiente virus de inóculo para que no sean necesarios frecuentes pases seriados del virus.

• **Preparación de la suspensión stock de virus**

- i) Infectar 3×10^7 células MNA con 1×10^7 unidades infecciosas de la preparación de virus de inóculo (ver anteriormente).
- ii) Recoger el sobrenadante 24 después de que las células alcancen el 100% de infectividad (generalmente a las 40 horas de la infección).
- iii) Distribuir y guardar el sobrenadante a -70°C en alícuotas de 0,5 ml.

³ Disponible previa solicitud al Rabies Laboratory, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centres for Disease Control and prevention, Atlanta, Georgia, EE.UU.

- **Titulación de la suspensión stock de virus**

- i) Descongelar una alícuota del virus de inóculo y preparar diluciones decimales seriadas (de 10^{-1} a 10^{-8}) en EMEM-10.
- ii) Distribuir 0,1 ml de cada dilución de virus en un pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. Añadir a cada pocillo 0,2 ml de células MNA suspendidas en EMEM-10 (concentración de 1×10^5 células por 0,2 ml).
- iii) Mezclar las células y el virus moviendo suavemente el porta e incubar después a 37°C en un incubador con humedad y 0,5% de CO_2 durante 20 horas.
- iv) Fijar con acetona y teñir el porta por la técnica de inmunofluorescencia.

Cada pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos contiene 25-50 campos microscópicos distintos cuando se observan a $\times 160$ -200 aumentos. Una unidad de virus por la prueba RFFIT se expresa como la dilución a la que el 50% de los campos microscópicos observados contiene uno o más focos de células infectadas (dosis formadora de focos, FFD_{50}). La suspensión stock de virus debe contener al menos 1×10^4 FFD_{50} por 0,1 ml (es decir, el pocillo con la dilución 10^{-4} de virus debe contener por lo menos un foco de células infectadas en el 50% de los campos microscópicos observados). Una suspensión stock de virus con este título se puede diluir luego a $10^{-2,3}$ para obtener una suspensión de virus que contenga 50 FFD_{50} .

- **Sueros de referencia**

En cada prueba debe incluirse un suero estándar de referencia nacional o internacional diluido a una potencia de 2,0 IU/ml. El suero de referencia utilizado en los Centros para Control y Prevención de Enfermedades es el primer estándar internacional de inmunoglobulina antirrábica (35) y puede obtenerse del NIBSC (ver nota 2 a pie de página). El suero de referencia debe mantenerse en alícuotas congeladas en cantidad suficiente para 1 semana de pruebas. También deben prepararse por el laboratorio, e incluirse en cada prueba, un suero control estándar positivo diluido a una potencia de 0,1 IU/ml y un suero control estándar negativo.

- **Sueros problema**

Antes de la prueba los sueros problema deben calentarse a 56°C durante 30 minutos para inactivar el complemento. Si están congelados, deben ser recalentados después de la descongelación. Se pueden preparar diluciones seriadas de los sueros problema en un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. El análisis de las diluciones 1/5 y 1/50 es suficiente para una evaluación rutinaria de la eficacia vacunal y se hacen como se indica:

- i) Preparar una dilución 1/2,5 añadiendo a uno de los portas 0,1 ml del suero inactivado y 0,15 ml de EMEM-10. Mezclar por agitación suave del porta.
- ii) Transferir 0,05 ml de la dilución 1/2,5 a un segundo pocillo que contenga 0,45 ml de EMEM-10. Desechar todo excepto 0,1 ml del pocillo que contiene la dilución 1/2,5.
- iii) Mezclar el segundo pocillo y desechar todo excepto 0,1 ml.
- iv) Añadir a todas las diluciones de suero 0,1 ml de la preparación de stock de virus (que contenga 32-100 FFD_{50}).
- v) Mezclar e incubar a 35°C durante 90 minutos en un incubador con humedad y 5% de CO_2 .

- **Adición de células**

- i) Durante el período de incubación, tripsinizar un cultivo de 3-5 días de células MNA.
- ii) Resuspender las células en EMEM-10 a una concentración final de 1×10^5 células por 0,2 ml.
- iii) Distribuir 0,2 ml de la suspensión celular en cada pocillo del porta e incubar a 35°C en un incubador con humedad y 5% de CO_2 durante 20 horas.

- **Fijación con acetona y tinción por inmunofluorescencia**

- i) Después de 20 horas, sacar los portas del incubador y eliminar el medio vertiéndolo sobre una solución virucida.
- ii) Lavar los portas una vez con PBS y luego fijar con acetona fría (-20°C) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- iii) Dejar secar los portas durante 10 minutos antes de añadir el suero antirrábico conjugado con FITC. El conjugado se puede preparar en EMEM-10 o PBS; no hay necesidad de adsorber el conjugado con

papel o células. La dilución del conjugado debe determinarse por titulación. Los portas se tiñen durante 20-30 minutos a 37°C y después se lavan con PBS y agua destilada, respectivamente.

iv) Observar los portas con un microscopio de fluorescencia.

- **Determinación de los títulos de anticuerpo neutralizante**

Los virus residuales se detectan mediante un microscopio normal de fluorescencia. El título de neutralización a punto final del suero se define como el factor de dilución de la dilución más alta de suero a la que el 50% de los campos microscópicos observados contiene una o más células infectadas (es decir, un 97% de reducción en el inóculo vírico). Este valor se puede obtener por interpolación matemática. Alternativamente se puede determinar un título del 100% de neutralización anotando la dilución más alta de suero a la que se neutraliza el 100% del inóculo y no hay células infectadas en ninguno de los campos de observación. Por ambos métodos de titulación, se puede obtener el título de anticuerpo en el suero problema (en IU/ml) mediante comparación con el título del estándar nacional de referencia incluido en cada prueba. Debe señalarse que también resulta válido realizar la prueba RFFIT utilizando células BHK-21 en lugar de células de neuroblastoma. Para tal fin se ha publicado un protocolo modificado (37).

c) Neutralización del virus en ratones

El principio de esta prueba es la neutralización *in vitro* de una cantidad constante del virus de la rabia (50 LD₅₀ [dosis letal del 50%] por 0,03 ml de la cepa CVS) mediante cantidades variables del suero que se va a titular durante un paso de incubación de 90 minutos a 37°C. La mezcla virus/suero (0,03 ml) se inocula en el cerebro de ratones de 3 semanas. El título del suero es la dilución final del suero en la mezcla virus/suero que protege al 50% de los ratones (la mortalidad es del 100% en ausencia de neutralización). El título se puede expresar en IUs mediante comparación con la dilución neutralizante de un suero estándar bajo las mismas condiciones experimentales.

Para realizar la prueba se descongela una ampolla de virus CVS y se prepara una suspensión con 100 LD₅₀/0,03 ml (teniendo en cuenta que se diluye a la mitad por adición del mismo volumen del suero de prueba antes de la inyección). La cantidad de virus realmente utilizado durante la prueba (límites permisibles: 30-300 LD₅₀/0,03 ml) se comprueba titulado cuatro diluciones de la preparación vírica, cada una de las cuales se inocula a cinco ratones. El suero problema se calienta a 56°C durante 30 minutos para inactivar el complemento.

Para comprobar las condiciones de la titulación se debe incluir un suero estándar. La máxima diferencia permitida entre la capacidad neutralizante esperada y la medida durante la titulación es 10^{0,5}. La mayor dilución no debe neutralizar el virus. El diluyente es el mismo que el que se utiliza para la preparación vírica.

A cada dilución de suero se añade un volumen igual de la preparación vírica con 100 LD₅₀/0,03 ml. Las mezclas se incuban en un baño a 37°C durante 90 minutos y a continuación en un baño con hielo para reducir la inactivación de los virus debida a la temperatura. La reacción se detiene por inmersión en hielo. Durante la inoculación, los tubos que no se usan de inmediato se mantienen a 4°C.

Para cada dilución se inoculan intracerebralmente cinco ratones con 0,03 ml de la mezcla suero/virus. Se registra la mortalidad durante 21 días después de la inoculación, pero las muertes que ocurren durante los primeros 4 días se consideran inespecíficas (debidas a estrés, infección, etc.). El título del suero se puede calcular por comparación con un suero estándar internacional.

d) Enzimoinmunoensayo

Esta prueba ELISA indirecta permite la detección cualitativa de anticuerpos contra la rabia en muestras de sueros individuales de perros y gatos después de la vacunación. De acuerdo con las recomendaciones de la OMS (36), el título mínimo medible de anticuerpos frente a la rabia que se considera que representa un nivel de inmunidad que correlaciona con la capacidad de proteger contra la infección es 0,5 IU por ml. Aunque el ELISA indirecto tiene menor sensibilidad que FAVN o RFFIT, puede utilizarse como una prueba rápida de ensayo (en 4 horas), que no requiere manejar el virus vivo de la rabia, para determinar si los perros y los gatos presentan seroconversión. Debido a la menor sensibilidad de la prueba, los resultados negativos deben confirmarse por FAVN o RFFIT.

La reacción comprende tres pasos:

1. Cada muestra de suero problema se coloca en un pocillo de una placa de microtitulación pre-llenada con antígenos inactivados del virus de la rabia. Los anticuerpos presentes en la muestra se unen a los antígenos víricos de la superficie del plástico.

2. Después de lavar, se añade el conjugado proteína A/peroxidasa, que se une a las inmunoglobulinas (anticuerpos) previamente capturadas formando un complejo: (antígeno de la rabia)-(anticuerpo antirrábico)-(proteína A/peroxidasa).
3. El exceso de conjugado se elimina por lavado. El enzima unido al complejo se detecta añadiendo un sustrato que se transforma en un producto coloreado. Después de detener la reacción, se miden las densidades ópticas.

- **Preparación del antígeno**

La cepa G5, 25 Wistar del virus de la rabia (derivada de la cepa Pasteur) se obtiene en células NIL2 con pocos pasajes, originadas de cultivos celulares de embrión de hámster. El virus recogido se clarifica para eliminar restos celulares por filtración en gel y la suspensión vírica se inactiva con beta-propiolactona. Para la reacción en las placas se utiliza un stock de antígeno de 4,1 µg/ml.

- **Reactivos⁴**

Microplaca con seis filas de 16 pocillos sensibilizados con antígenos de la rabia. Se deben usar en 4 semanas después de abrir la bolsa, que se debe cerrar después de cada uso;

Conjugado (CJ): Proteína A/peroxidasa (concentrada x10). Diluir 10 veces con el diluyente del conjugado (CD) y usar dentro de las 24 horas que siguen a la dilución;

Sustrato de la peroxidasa tamponado (PS): 3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina;

Suero control negativo (N), sueros libres de patógenos diluidos en Stabilzyme, un estabilizador comercial suministrado por Surmodic Inc., MN 55344-3523 EE.UU.;

Suero control positivo (P), sueros hiperinmunes de perros vacunados diluidos en Stabilzyme, un estabilizador comercial suministrado por Surmodic Inc., MN 55344-3523 EE.UU.;

Diluyente de la muestra (SD), tampón PBS, pH 7,8, que incluye caseína al 0,28% (p/v) y Triton X100 al 0,055% (v/v);

PEG al 0,55% (p/v), SDS al 0,056% (p/v), PVP al 1% (p/v), Tetronic al 0,42% (p/v) y suero bovino inactivado por calor al 1% (v/v);

Solución de lavado (N), tampón Tris/NaCl, pH 7,5 con Tween 20 al 1%;

Diluyente del conjugado (CD), tampón Tris, pH 8;

Solución de parada (S), solución de ácido sulfúrico 4N + tiomersal al 0,02% (p/v).

Los reactivos diluidos deben guardarse a 5°C ± 3°C. Al menos 1 hora antes de uso, todos los reactivos se pasan a temperatura ambiente.

- **Muestras**

La reacción se realiza con sueros individuales inactivados por calor (30 minutos a 56°C) diluidos a 1/100. Es necesario probar las diluciones apropiadas del suero estándar de referencia de la OIE que contiene 6,7 IU/ml (disponible en el laboratorio de referencia de la OIE para Rabia, Nancy, Francia).

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

- **Pasos preliminares de predilución**

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

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

⁴ Disponibles en Synbiotics Europe S.A.S., 2 rue Alexander Fleming, 69367 Lyon Cedex 07, Francia.

- ii) Preparar los sueros problema. Las diluciones se realizan con el diluyente de muestras (SD) del modo siguiente: primero se prediluyen las muestras a 1/10 en una microplaca en blanco (10 µl de muestra en 90 µl de SD).
- iii) Para titulación del suero, debe hacerse un conjunto de seis diluciones del Suero Estándar de la OIE en tubo o en una microplaca en blanco, comenzando con la dilución inicial 1/10, luego 1/30, 1/100, 1/300, 1/1.000 hasta la dilución final 1/3000. Estas diluciones del Suero Estándar de la OIE deben incluirse en cada prueba y/o microplaca con una dilución inicial de 1/10, 1/30, 1/100, 1/300, 1/1.000 y 1/3.000.

Se recomienda el siguiente esquema para preparar las diluciones apropiadas:

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

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

• **Procedimiento de la prueba**

- i) *Distribución de control:* depositar 90 µl de diluyente de muestra, y en los pocillos A1 y A2 añadir 10 µl del control negativo y en los pocillos B1 y B2 10 µl del control positivo.
- ii) *Distribución de muestras y diluciones del suero estándar de la OIE:* en los pocillos problema depositar 90 µl de diluyente de muestra, añadir 10 µl de la predilución 1/10 de la muestra o de cada una de las diluciones de 1/10 a 1/3.000 del suero OIE y mezclar cuidadosamente.

Las diluciones de la muestra y del suero estándar de la OIE deben probarse por duplicado. Se recomienda la siguiente distribución (que recoge las diluciones finales de prueba):

Cuantificación de anticuerpos (dilución final)

	1	2	3	4
A	N 1/10	N 1/10	S1 1/100	S1 1/100
B	P 1/10	P 1/10	S2 1/100	S2 1/100
C	OIE 1/100	OIE 1/100	S3 1/100	S3 1/100
D	OIE 1/300	OIE 1/300	S4 1/100	S4 1/100
E	OIE 1/1000	OIE 1/1000	S5 1/100	S5 1/100
F	OIE 1/3000	OIE 1/3000	S6 1/100	S6 1/100
G	OIE 1/10000	OIE 1/10000	S7 1/100	S7 1/100
H	OIE 1/30000	OIE 1/30000	S8 1/100	S8 1/100

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

- iii) Incubar las placas de microtitulación durante 1 hora ± 5 minutos a 37°C ± 3°C.
- iv) Dilución del reactivo:
 - Tampón de lavado:* diluir la solución de lavado concentrada (W) a 1/10 con agua destilada o desmineralizada.
 - Conjugado:* diluir el concentrado (CJ) a 1/10 con el diluyente del conjugado (CD); se necesitan 2 ml para una fila, es decir, 20 µl de CJ en 1,88 ml de CD.
- v) Retirar con cuidado la cinta adhesiva y lavar cuatro veces
- vi) Añadir 100 µl de conjugado diluido a todos los pocillos y cubrir con una tira nueva de cinta adhesiva.

- vii) Incubar el conjugado durante 1 hora \pm 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- viii) Retirar con cuidado la cinta adhesiva y lavar cuatro veces.
- ix) Añadir 100 μl por pocillo de substrato tamponado para la peroxidasa (PS). No cubrir con cinta adhesiva en esta fase. Mezclar por agitación manual suave de la placa o mediante un agitador de placas para asegurar una correcta homogenización.
- x) Incubar durante 30 ± 5 minutos a la temperatura del laboratorio ($20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) y protegida de la luz.
- xi) Añadir 50 μl de solución de parada (S) por pocillo. Mezclar por agitación manual suave de la placa o mediante un agitador de placas. Comprobar la ausencia de burbujas en los pocillos. Secar cuidadosamente el fondo de los pocillos.
- xii) Medir la densidad óptica (OD) bicromáticamente a 450 y 630 nm o monocromáticamente a 450 nm (en el espectro amarillo).

• **Cuantificación de anticuerpos: expresión e identificación de los resultados**

Cálculo del título utilizando la curva de regresión

- i) Calcular el valor medio de la OD para cada muestra problema y cada dilución del suero de la OIE.
- ii) Calcular el valor del logaritmo natural (\ln) de cada OD media y el valor \ln de la concentración de anticuerpo para cada dilución de la OIE (de 6,7 a 0,0223 IU/ml, sin tener en cuenta el factor de dilución 1/100 de la prueba).
- iii) Representar el \ln de la OD (en ordenadas, eje Y) en función del \ln de la concentración de Ab contra la rabia (en abscisas, eje X) para obtener la curva de referencia para el suero estándar de la OIE.
- iv) Con todos los resultados individuales obtenidos de las diluciones del suero estándar de la OIE se realiza una regresión lineal entre el \ln de la concentración de anticuerpo contra la rabia (expresada en Unidades ELISA/ml) y el \ln de la OD, para establecer el correspondiente modelo matemático:

$$\ln \text{ de la concentración de anticuerpo contra la rabia} = a + b \times \ln \text{ OD}$$

- v) Para cada muestra probada, calcular el valor medio de la OD y después la concentración de anticuerpo contra la rabia de la muestra expresada como “unidades equivalentes por ml” (EU/ml) a partir del modelo establecido:

$$\text{Concentración de Ab contra la rabia en la muestra (EU/ml)} = e^{(a+b \times \ln \text{ OD})}$$

• **Validación de la prueba**

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

- si la densidad óptica del control positivo (OD P) es mayor o igual a 0,300, y
- si la densidad óptica del control negativo (OD N) es menor que $0,50 \times \text{OD P}$.
- el coeficiente de correlación entre \ln ODs y \ln de la concentración de Ab contra la rabia en el Suero Estándar de la OIE es mayor que 0,95.

• **Ejemplos**

	Control positivo: OD en $B_1 = 0,610$	OD en $B_2 = 0,690$	\Rightarrow	$\overline{\text{OD P}} = 0,650$
	Control negativo: OD en $A_1 = 0,190$	OD en $A_2 = 0,210$	\Rightarrow	$\overline{\text{OD N}} = 0,200$
Muestra 1:	OD en 1 = 1,790	OD en 2 = 1,750	\Rightarrow	$\overline{\text{OD}} = 1,770$
Muestra 2:	OD en 1 = 0,350	OD en 2 = 0,390	\Rightarrow	$\overline{\text{OD}} = 0,370$

Validación de la prueba

$\text{OD P} = 0,650 > 0,300$ y $\text{OD N} = 0,200 < 0,50 \times 0,650 = 0,325$, por consiguiente la prueba es válida.

• **Resultados e interpretación (titulación cuantitativa de anticuerpos)**

Si el título calculado es $\geq 0,6$, se considera que el animal presenta seroconversión después de la vacunación.

Si el título calculado es $< 0,6$, se considera que el animal no presenta suficiente nivel de anticuerpo. Como el método ELISA es una prueba de ensayo, se deberían realizar pruebas confirmativas de tipo FAVN o RFFIT con las muestras de suero con título $< 0,6$.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

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

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

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

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

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

1. Control de inóculos

a) Características del inóculo

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

b) Método de cultivo

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

c) Validación como vacuna

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

La eficacia de la vacuna producida se determina por estudios con cada especie a la que va dirigida, vacunada previamente según se recomiende. La protección al final del período de inmunidad se controla midiendo los anticuerpos neutralizantes específicos y por desafío con el virus de la rabia. Las condiciones experimentales de este desafío deben reflejar las condiciones naturales de la infección, aunque, desde un punto de vista práctico, puede resultar más fácil obtener un 100% de mortalidad en los animales control con una cepa del virus de la rabia bien conocida que con una aislada localmente. En los animales vacunados con vacunas inactivadas, el porcentaje de seroconversión y el nivel medio de anticuerpos permiten una buena prognosis para superar el desafío (3).

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

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

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

2. Método de producción

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

a) En animales

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

b) En huevos

Se inyecta una cepa modificada de virus, adaptada a huevos, en huevos embrionados de pollo SPF, que se incuban a 38°C durante 5-6 días. El virus se recoge en forma de tejidos embrionarios infecciosos y normalmente se liofiliza y se emplea como una vacuna viva. Ejemplos de estas vacunas son las que contienen el Flury de pocos países en huevo (LEF), o la cepa variante más deseable de muchos países en huevo (HEP), que es más segura para algunas especies animales como el gato.

c) En cultivos celulares

Los cultivos se infectan con cepas del virus de la rabia adaptadas al cultivo celular y se incuban a 35-36°C. Éstos se pueden utilizar como vacunas con virus vivos (como en las vacunas Flury y SAD) o como vacunas inactivadas después de la adición de fenol (vacuna Semple) o cualquier otro compuesto, como la beta-propiolactona.

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

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

3. Control del proceso

Consiste en el seguimiento del crecimiento vírico para obtener un título óptimo y asegurar la ausencia de contaminación microbiana indeseable.

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

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

4. Control de lotes

a) Esterilidad

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

b) Inocuidad

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

c) Potencia

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

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

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

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

- i) Tanto para la vacuna examinada y la preparación estándar, la PD_{50} (dosis de protección al 50%) se encuentre entre la mayor y la menor dosis dada a los ratones.
- ii) La titulación de la suspensión del virus de desafío muestre que 0,03 ml de la suspensión contenía al menos 10 LD_{50} . La dosis de desafío debe estar entre 12-50 LD_{50} para una prueba válida.
- iii) El intervalo de confianza ($p = 0,95$) para la prueba no debe ser menor del 25% ni superior al 400% de la potencia estimada: el análisis estadístico debe mostrar una notable pendiente sin desviaciones importantes de la linealidad o paralelismo de las líneas dosis-respuesta.

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

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

d) Duración de la inmunidad

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

e) Estabilidad

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

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

f) Conservantes

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

5. Pruebas sobre el producto final

a) Inocuidad

Ver Sección C.4.b.

b) Potencia

Ver Sección C.4.c.

REFERENCIAS

1. AUBERT M.F.A. (1982). Sensibilité et fidélité du diagnostic de rage au laboratoire. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **5**, 369–376.
2. AUBERT M.F.A. (1982). Une méthode simple de calcul des titres des suspensions virales, vaccinales ou séroneutralisantes: la méthode graphique. (A simple method for calculating titres of virus, vaccine or serum-neutralising suspensions: the graphic method.) *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **1**, 828–833.
3. AUBERT M.F.A. (1992). Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **11**, 735–760.
4. AUBERT M.F.A. & BLANCOU J. (1982). Test simplifié de contrôle d'activité des vaccins antirabiques à virus inactivés. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **1**, 811–822.
5. BAER G.M. (1991). The Natural History of Rabies, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 620 pp.
6. BARNARD B.J.H. & VOGES S.F. (1982). A simple technique for the diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **49**, 193–194.
7. BARRAT J. (1992). Experimental diagnosis of rabies. Adaptations to field and tropical conditions. Proceedings of the International Conference on Epidemiology, Control and Prevention of Rabies in Eastern and Southern Africa. Lusaka, Zambia, 2–5 June 1992, 72–83.
8. BARRAT J. (1993). ELISA systems for rabies antigen detection. Proceedings of the Southern and Eastern African Rabies Group International Symposium. Pietermaritzburg, South Africa, 29–30 April 1993, 152–155.

9. BARRAT J. & AUBERT M.F.A. (1995). Diagnostic de la rage animale en France de 1991 à 1993, bilan de CNEVA laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages en France. *Revue Méd. Vét.*, **146**, 561–566.
10. BARRAT J., BARRAT M.J., PICARD M. & AUBERT M.F.A. (1986). Diagnostic de la rage sur culture cellulaire, comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation à la souris. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **11**, 207–214.
11. BARRAT J. & BLANCOU J. (1988). Technique simplifiée de prélèvement, de conditionnement et d'expédition de matière cérébrale pour le diagnostic de rage. *Doc. WHO/Rab. Res./88.27*.
12. BINGHAM J. & VAN DER MERWE M. (2002). Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Methods*, **101**, 85–94.
13. BLANCOU J., SORIA BALTAZAR R., MOLLI I. & STOLTZ J.F. (1991). Effective postexposure treatment of rabies-infected sheep with rabies immune globulin and vaccine. *Vaccine*, **9**, 432–437.
14. BOURHY H., KISSI B. & TORDO N. (1993). Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*, **194**, 70–81.
15. BOURHY H., ROLLIN P.E., VINCENT J. & SUREAU P. (1989). Comparative field evaluation of the fluorescent antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzymes immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 519–523.
16. BOURHY H. & SUREAU P. (1991). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage; Metodos de laboratorio para el diagnosticos de la rabia; Laboratory methods for rabies diagnosis. Commission des Laboratoires de référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur, Paris, France, 197 pp.
17. BRIGGS D.J., SMITH J.S., MUELLER F.L., SCHWENKE J., DAVIS R.D., GORDON C.R., SCHWEITZER K., ORCIARI L.A., YAGER P.A. & RUPPRECHT C.E. (1998). A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals*, **26**, 347–355.
18. CLIQUET F., AUBERT M. & SAGNE L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*, **212**, 79–87.
19. CLIQUET F., SAGNE L., SCHEREFFER J.L. & AUBERT M.F.A. (2000). ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*, **18**, 3272–3279.
20. COUNCIL OF EUROPE (1997). Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium. Inactivated Rabies Vaccine for Veterinary Use. European Pharmacopoeia, Third Edition. Monograph 0451. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1776–1777.
21. FEKADU M., SHADDOCK J.H., SANDERLIN D.W. & SMITH J.S. (1988). Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies virus and rabies-related viruses. *Vaccine*, **6**, 533–539.
22. GENOVESE M.A. & ANDRAL L. (1978). Comparaison de deux techniques utilisées pour le diagnostic de la rage: l'immunofluorescence et l'immunoperoxydase. *Rec. Med. Vet.*, **154** (7–8), 667–671.
23. GOLDWASSER R.A. & KISSLING R.E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**, 219–223.
24. HOOPER P.T., LUNT R.A., GOULD A.R., SAMARATUNGA H., HYATT A.D., GLEESON L.J., RODWELL B.J., RUPPRECHT C.E., SMITH J.S. & MURRAY P.K. (1997). A new lyssavirus – the first endemic rabies-related virus recognised in Australia. *Bull. Inst. Pasteur*, **95**, 209–218.
25. KIENY M.P., LATHE R., DRILLIEN R., SPEHNER D., SKORY S., SCHMITT D., WIKTOR T., KOPROWSKI H. & LECOCQ J.P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, **312**, 163–166.
26. MONTANO HIROSE J.A., BOURHY H. & SUREAU P. (1991). Retro-orbital route for brain specimen collection for rabies diagnosis. *Vet. Rec.*, **129**, 291–292.

27. PERRIN P., LAFON M., VERSMISSE P. & SUREAU P. (1985). Application d'une méthode immunoenzymatique au titrage des anticorps antirabiques neutralisants en cultures cellulaires. *J. Biol. Stand.*, **13**, 35–42.
28. PERRIN P., ROLLIN P.E. & SUREAU P. (1986). A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID) useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. *J. Biol. Stand.*, **14**, 217–222.
29. RUDD R.J. & TRIMACHI C.V. (1987). Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 145–168.
30. SMITH J.S., YAGER P.A. & BAER G.C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO*, **48**, 535–541.
31. VON TEICHMAN B.F., DE KOKER W.C., BOSCH S.J., BISHOP G.C., MERIDITH C.D. & BINGHAM J. (1998). Mokola virus infection: description of recent south African cases and a review of the virus epidemiology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **69**, 169–171.
32. UMOH J.U. & BLENDE D.C. (1981). Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin fixed tissue after treatment with trypsin. *Bull. WHO*, **59**, 737–744.
33. WARNER C.K., WHITFIELD S.G., FEKADU M. & HO H. (1997). Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome *in situ* in formalin-fixed tissues. *J. Virol. Methods*, **67**, 5–12.
34. WIKTOR T.J., DOHERTY P.C. & KOPROWSKI H. (1977). In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 334–338.
35. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDS. THIRTY-FIFTH REPORT (1985). World Health Organisation Technical Report Series No. 725. WHO, Geneva, Switzerland.
36. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON RABIES. EIGHTH REPORT (1992). World Health Organisation Technical Report Series No. 824, 84 pp.
37. WORLD HEALTH ORGANISATION (1996). Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. WHO, Geneva, Switzerland.
38. ZALAN E., WILSON C. & PUKITIS (1979). A microtest for quantitation of rabies virus. *J. Biol. Stand.*, **7**, 213–220.

*
* *

NB: Existen laboratorios de referencia de la OIE para la Rabia (ver Cuadro en Parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consultar la página Web de la OIE para una lista más actualizada: www.oie.int).