

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

NORMA Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007, Campaña nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas.

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

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

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

CONSIDERANDO

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

Que la rabia es una zoonosis infecto-contagiosa, aguda y mortal que ataca al sistema nervioso central, causado por un virus de la familia *Rhabdoviridae* y es transmitida por la saliva de animales enfermos a los bovinos y especies ganaderas como equinos, ovinos, caprinos y porcinos;

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

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

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

Que de acuerdo a los registros epidemiológicos de la Dirección de Campañas Zoonositarias, del año 2001 al mes de octubre de 2010 en nuestro país, la prevalencia de la Rabia Paralítica Bovina se ha incrementado de 3.80 por ciento a 5.63 por ciento, lo cual implica, que tan solo en bovinos, 649,596 de estos animales están en riesgo de contraer esta enfermedad, tomando en cuenta que cuando los animales contraen la enfermedad de la rabia mueren inevitablemente, en virtud de que no existe cura para ésta, esto mismo contribuye a generar la reducción de la producción ganadera asociada a dicha enfermedad representando pérdidas económicas para el sector pecuario;

Que las pérdidas económicas directas anuales estimadas en la ganadería nacional por la muerte de bovinos a causa de esta enfermedad, ascienden aproximadamente a 500 millones de pesos;

Que de acuerdo al Programa de Acción Específico 2007-2012, para rabia y otras zoonosis, de la Secretaría de Salud, en el periodo 2000-2006, se presentaron 23 casos de rabia humana transmitida por fauna silvestre; de éstos, 14 casos (60 por ciento) fueron ocasionados por agresión de murciélago, principalmente en población rural que reside cerca de nichos ecológicos donde prolifera este tipo de fauna. En 2006 sólo se presentó un caso en el Estado de Guerrero transmitido por murciélago;

Que los resultados de la caracterización del virus permitieron identificar que 95.5 por ciento corresponden a la variante perro, y el resto a virus de animales silvestres conforme a la siguiente distribución: murciélago hematófago, zorro Arizona, murciélago hematófago, zorrillo, murciélago insectívoro y murciélago hematófago;

Que en la actualidad la aplicación de vampiricidas es una herramienta para el control de las poblaciones de vampiros; y

Que en virtud de los fundamentos y razones antes mencionadas, he tenido a bien expedir la siguiente:

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

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones y abreviaturas
4. Disposiciones generales
5. Fases de la Campaña
6. Diagnóstico
7. Muestreo
8. Vacunas y vacunación
9. Requisitos mínimos para las vacunas contra la rabia, de virus activo modificado y de virus inactivado
10. Tratamientos para el control de poblaciones de vampiros
11. Productos vampiricidas
12. Vigilancia epidemiológica
13. Movilización de animales
14. Animales y productos importados
15. Sanciones
16. Procedimiento de evaluación de la conformidad
17. Concordancia con normas internacionales
18. Bibliografía

TRANSITORIOS

Apéndice "A" (Normativo)

Apéndice "B" (Normativo)

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. La presente Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto, establecer las especificaciones zoonosanitarias, criterios, estrategias y técnicas operativas para diagnosticar, prevenir y controlar la rabia transmitida por vampiros del género *Desmodus rotundus* a las especies ganaderas en riesgo.

1.2. La presente Norma Oficial Mexicana aplica a los propietarios de bovinos y especies ganaderas en riesgo tales como equinos, ovinos, caprinos y porcinos, así como a laboratorios que produzcan y comercialicen vacuna antirrábica y productos vampiricidas, laboratorios autorizados en el diagnóstico zoonosanitario, médicos veterinarios responsables autorizados, transportistas de ganado y Organismos Auxiliares de Sanidad Animal.

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

1.3. La vigilancia de esta Norma Oficial Mexicana corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; los Gobiernos Estatales; los Organismos Auxiliares de Sanidad Animal y los Comités de Fomento y Protección Pecuaria Estatales; y a la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

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

2. Referencias

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

NOM-011-SSA2-1993, Para la Prevención y control de la Rabia.

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

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

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

NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida.

3. Definiciones y abreviaturas

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana, se entiende por:

- 3.1. Animal sospechoso:** Animal enfermo que presenta signos sugestivos de rabia.
- 3.2. Animal confirmado:** Caso de rabia comprobado por pruebas de laboratorio.
- 3.3. Área endémica:** Sitio geográfico definido, donde se presenta la rabia bovina y en otras especies ganaderas en forma habitual.
- 3.4. Antígeno:** Sustancia que por sí misma sea capaz de estimular una respuesta inmune "*in vivo*", así como también pueda ser utilizada en la evaluación de la respuesta inmune "*in vitro*".
- 3.5. Biológico:** Vacuna procedente del cultivo del virus de la rabia, activo modificado o inactivado, que al ser aplicada al animal susceptible confiere inmunidad contra esta enfermedad, de forma tal que los animales vacunados no enfermen si son expuestos al virus patógeno contra el cual han sido vacunados.
- 3.6. Campaña:** Campaña nacional para la prevención de la rabia en bovinos y especies ganaderas.
- 3.7. Cepa aprobada:** Virus rábico vacunal o virulento que ha sido autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación para ser empleado en la producción de vacunas o para las pruebas de desafío, respectivamente.
- 3.8. Constatación:** Procedimiento mediante el cual se comprueba que los productos cumplen con las especificaciones requeridas por las normas oficiales mexicanas.
- 3.9. Control:** Conjunto de medidas zoonosanitarias que tienen por objeto disminuir la incidencia o prevalencia de la rabia en los animales de un área geográfica determinada.
- 3.10. CVS:** Challenge Virus Standar o Virus estándar de confrontación; virus fijo de la rabia que se utiliza en las pruebas de desafío.
- 3.11. Diagnóstico:** Estudio que se basa en el análisis que se haga del conjunto de signos clínicos observados en los animales que permite descartar o confirmar la sospecha, en este último caso, mediante pruebas de laboratorio, del virus de la rabia.
- 3.12. Dirección:** Dirección General de Salud Animal.
- 3.13. DLR-50 por ciento:** Dosis letal para el ratón al 50 por ciento.
- 3.14. Dosis:** Cantidad de producto recomendada por el laboratorio en la etiqueta para ser administrada en el animal.
- 3.15. Endémica:** Presencia habitual de la rabia en una población.
- 3.16. Especies ganaderas:** Son todos aquellos animales cuyos productos carne y leche son aprovechados por el hombre y que consisten en las especies bovina, equina, ovina, caprina y porcina.
- 3.17. Fecha de caducidad:** Fecha que designa el término de viabilidad en que debe aplicarse una vacuna antirrábica o un producto vampiricida.
- 3.18. Foco rábico:** Lugar donde se manejan, comercializan y/o explotan animales, sus productos y subproductos, en el cual se identifica la presencia de uno o más casos de rabia.
- 3.19. Georreferenciación:** Sistema basado en el levantamiento de datos geográficos sobre las actividades en campaña, en apoyo al proceso de notificación de la rabia para así poder dictar las medidas contraepizoóticas a emprender.
- 3.20. Herida:** Lesión en piel o mucosa con solución de continuidad.
- 3.21. Infección:** Situación que se presenta cuando el virus de la rabia ha penetrado al organismo de una persona o animal.
- 3.22. Laboratorio de Pruebas:** Persona física o moral acreditada de acuerdo a lo establecido por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y aprobada por la Secretaría para prestar servicios relacionados con las pruebas o análisis para determinar la presencia o ausencia de una enfermedad o plaga de los animales o para realizar servicios de constatación o de contaminantes físicos, microbiológicos y químicos conforme a las normas oficiales mexicanas en materia zoonosanitaria y expedir informe de resultados.
- 3.23. Laboratorio de Control de Calidad:** Laboratorio autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, que se encarga de la verificación y aprobación del cumplimiento de los requisitos mínimos de los productos biológicos, vacunas, antígenos y reactivos, utilizados en el diagnóstico y control de la rabia.
- 3.24. Laboratorio de Producción de Biológicos:** Laboratorio autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, para la fabricación de las vacunas, antígenos y reactivos utilizados en el diagnóstico y control de la rabia.
- 3.25. Lote:** Es una cantidad específica de cualquier materia prima o producto que haya sido elaborado bajo condiciones equivalentes de operación y durante un periodo determinado.

3.26. Medidas zoonositarias: Disposiciones para prevenir, controlar o erradicar la introducción, radicación o propagación de una plaga o enfermedad; y de los riesgos provenientes de aditivos, contaminantes, toxinas u organismos causantes de enfermedades y daños que afecten a los animales.

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

3.28. Murciélago hematófago o vampiro: Quiróptero que se alimenta de sangre.

3.29. NIH: Prueba mediante la cual se mide el grado de protección conferida por las vacunas antirrábicas inactivadas e inoculadas a ratones, los cuales se desafían con el virus de la rabia, esta prueba de potencia fue originalmente desarrollada por los National Institutes of Health (NIH), en Bethesda, Estados Unidos de América.

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

3.31. pH: Potencial Hidrógeno.

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

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

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

3.35. Prueba de potencia: Análisis que se realiza para asegurar que un producto biológico es capaz de producir una respuesta inmune y proteger, lo cual se expresará en Unidades Internacionales (U.I.) o porcentaje de protección, de acuerdo a lo establecido en los requisitos mínimos de calidad del producto.

3.36. Prueba de pureza: Análisis mediante el cual se verifica que existe en el producto, únicamente el microorganismo indicado y que está libre de microorganismos extraños.

3.37. Prueba de seguridad e inocuidad: Análisis que se efectúa para asegurar que un producto no cause reacciones desfavorables atribuibles al mismo.

3.38. Prueba de titulación: Análisis utilizado para asegurar que un producto contiene la cantidad de antígeno de virus rábico o anticuerpos establecidos en los requisitos mínimos.

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

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

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

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

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

3.44. SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, órgano administrativo desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

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

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

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

3.48. Zona libre: Área geográfica determinada en la cual no se han presentado casos positivos de rabia en bovinos y otras especies ganaderas, de acuerdo a lo que la Secretaría disponga en términos de sanidad aplicables.

3.49. Zoonosis: Enfermedades que son transmitidas entre animales y el hombre.

4. Disposiciones generales

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

4.2. La responsabilidad de operar la Campaña es responsabilidad de los Organismos Auxiliares de Sanidad Animal, autorizados por la Secretaría, se podrá concertar con los Gobiernos Federal y Estatales, la implementación de estrategias de operación orientadas a mantener y mejorar la condición zoonosanitaria de la Campaña contra la rabia bovina.

4.3. La Secretaría, por medio del SENASICA, verificará el cumplimiento de las Normas Oficiales Mexicanas observando lo dispuesto en la Ley Federal de Sanidad Animal; de igual manera, será aplicable lo dispuesto en materia de evaluación de la conformidad, en lo referente a fabricación, importación, exportación, almacenaje, transportación, comercialización y uso de las vacunas antirrábicas citadas en esta Norma Oficial Mexicana, así como en los productos vampiricidas.

5. Fases de la Campaña

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

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

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

a) La zona de control debe de contar con las siguientes medidas zoonosanitarias:

- Control de las poblaciones de vampiros, por la realización de actividades conforme a los numerales 10 y 11 de esta Norma Oficial Mexicana y la georreferenciación de estas actividades.
- Vacunación de las especies ganaderas susceptibles conforme al numeral 8 de esta Norma Oficial Mexicana y la georreferenciación de estas actividades.
- Control de los focos rábicos conforme a lo dispuesto a los numerales 8, 10, 12 y 13 de esta Norma Oficial Mexicana y la georreferenciación de estas actividades.
- Contar con un sistema de muestreo, y monitoreo de los lugares donde habitan los vampiros y la georreferenciación de estos lugares.
- Contar con un sistema de muestreo y monitoreo, basado en el diagnóstico de laboratorio para realizar la vigilancia epidemiológica de la rabia bovina y especies ganaderas.

Por otra parte, la zona de control deberá contar con las siguientes actividades como son:

- Promoción y difusión de la Campaña las cuales se deben llevar a cabo por las instituciones involucradas, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.
- Capacitación de personal operativo y productores, mediante la programación y realización de cursos y talleres sobre la prevención de la rabia y el control de las poblaciones de vampiros.

b) La zona libre debe contar con las siguientes medidas zoonosanitarias:

- Ausencia del virus rábico en la población de bovinos y otras especies ganaderas susceptibles, tales como equinos, ovinos, caprinos y porcinos.
- Ausencia de vampiros del género *Desmodus rotundus*, en el área o región ya sea por razones ecológicas o por acciones de la Campaña, comprobada mediante inspección oficial.
- Control de los focos rábicos conforme a lo dispuesto a los numerales 8, 10, 12 y 13 de esta Norma Oficial Mexicana y la georreferenciación de estas actividades.
- Control de la movilización de animales conforme al numeral 13 de esta Norma Oficial Mexicana.
- Contar con un sistema de muestreo y monitoreo, basado en el diagnóstico de laboratorio para realizar la vigilancia epidemiológica de la rabia bovina y especies ganaderas.

6. Diagnóstico

6.1. Las pruebas para la detección del virus rábico en bovinos y especies ganaderas, se deben realizar de acuerdo a lo descrito en la NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria; y en la Parte 2, Sección 2.2, capítulo 2.2.5 del Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal. Ver Apéndice "B" (Normativo).

7. Muestreo

7.1. Toma y envío de muestras a laboratorio.

7.1.1. La muestra para el diagnóstico de rabia en laboratorio, es el encéfalo y médula de bovinos y especies ganaderas, que hayan muerto con signos nerviosos característicos de la enfermedad, así como los murciélagos hematófagos capturados durante los operativos, para poder determinar la presencia del virus de la rabia.

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

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

8. Vacunas y vacunación

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

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

8.3. Para garantizar una buena práctica de inmunización antirrábica en los animales, se deben conservar todas las vacunas antirrábicas en refrigeración de 2 a 8 grados centígrados desde su compra y hasta la aplicación en los animales, siguiendo las recomendaciones del laboratorio productor.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

b) Una camada de por lo menos 8 ratones lactantes sanos y susceptibles a la rabia, de 3 a 5 días de edad.

c) Por lo menos 2 conejos sanos y susceptibles a la rabia, de 1.5 a 2.5 kilogramos de peso.

Estos animales deben ser inoculados con la suspensión viral en estudio, por vía intracerebral; los ratones de 21 días con 0.03 mililitros, los ratones lactantes con 0.02 mililitros y los conejos con 0.25 mililitros, todos los animales deben ser observados diariamente durante 28 días post-inoculación. Se deben coleccionar los cerebros de los animales que mueran entre los días 5 y 28, post-inoculación y se tratará de detectar la presencia o ausencia del virus, mediante la inyección de 5 ratones por vía intracerebral, con el material procedente de cada cerebro, debiéndose observar durante 30 días. Para la confirmación de la presencia o ausencia del virus de la rabia, se debe realizar la prueba de anticuerpos fluorescentes, basado a lo estipulado en el numeral 6 de esta Norma Oficial Mexicana.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cinco animales deben ser inoculados por vía intramuscular, cada uno con el equivalente a 10 dosis del producto y cada uno de los otros 5 debe ser inoculado también por vía intramuscular, infiltrando el inóculo en un nervio mayor con el equivalente a 10 dosis del producto.

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

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

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

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

Se deben realizar diluciones decimales desde 10 a la cero a 10 a la menos cero de la vacuna con una solución tampón fosfatada (conteniendo 2 mililitros de suero de caballo, libre de anticuerpos contra la rabia, o albúmina de bovino al 0.4 por ciento), con un pH de 7.2 más o menos 0.3 o con el diluyente recomendado por el productor.

Con cada dilución se deben inocular 10 ratones de 21 días de edad de 12 a 16 gramos de peso, por vía intracerebral, cada uno con 0.03 mililitros, empezando la dilución más alta de 10 a la menos cero, después con 10 a la menos 5, 10 a la menos 4 y así sucesivamente.

Los ratones deben observarse diariamente durante 14 días post-inoculación y se deben registrar las muertes y los signos de parálisis y espasmos que se observen en los ratones, esto a partir del quinto día post-inoculación. Los ratones que mueran dentro de los primeros 4 días post-inoculación deben ser descartados.

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

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

Todos los lotes de vacuna elaborados deben demostrar un título mínimo de 10 a la 3.3 Dosis Letal Ratón 50 por ciento por cada 0.03 mililitros al inicio y durante el periodo de vigencia.

9.5. Pruebas de potencia.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Con cada dilución deben vacunarse 16 ratones, cada uno con 0.5 mililitros por vía intraperitoneal; se debe comenzar por la dilución mayor y se debe terminar con la menor. Al momento del desafío, se realizará la titulación del CVS, en 6 ratones por dilución, empleando la previa a la que contenga 50 Dosis Letal Ratón al momento del desafío.

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

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

La prueba debe considerarse válida cuando la titulación del virus de confrontación (Challenge Virus Standar) tenga una concentración de 12 a 50 Dosis Letal Ratón 50 por ciento, en 0.03 mililitros.

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

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

Potencia de la vacuna de prueba	=	Dosis Protectora 50 por ciento de la vacuna de prueba	X	Potencia de la vacuna de referencia en Unidades Internacionales/mililitros
		Dosis Protectora 50 por ciento de la vacuna de referencia		

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

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

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

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

Para muestra de retención, en vacunas de virus activo modificado el título mínimo aceptable debe ser de 10 a la 3.3 Dosis Letal Ratón 50 por ciento en 0.03 mililitros, durante 3 meses más a la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Para vacunas inactivadas el valor mínimo será de 2 Unidades Internacionales por dosis, durante 3 meses más a la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

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

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

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

9.8. Prueba de pH.

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

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

10. Tratamientos para el control de poblaciones de vampiros

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

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

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

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

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

10.5.1. Previa identificación taxonómica de los murciélagos hematófagos capturados, en corral o refugio por personal capacitado se procederá al tratamiento tópico con pomada vampiricida. Esta técnica sólo debe ser empleada por personal oficial y/o personal entrenado en las técnicas de control, además de estar vacunado previamente contra la rabia.

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

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

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

10.7. Registrar la información georreferenciada sobre las actividades de control de vampiros.

11. Productos vampiricidas

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

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

12. Vigilancia epidemiológica

12.1. En el caso de focos de rabia en una explotación o de un resultado positivo a rabia por laboratorio, es obligación tanto del propietario de los animales, Organismos Auxiliares de Sanidad Animal, Comités de Fomento y Protección Pecuaria, Médicos Veterinarios Zootecnistas, así como el público en general según corresponda, notificarlo de forma inmediata a la Secretaría y cuando ocurra exposición directa a alguna persona se deberá notificar a las autoridades del Sector Salud.

12.2. En las zonas en control y libres de rabia, es responsabilidad de los Gobiernos Federal y Estatal, así como de poseedores o productores de ganado bovino y otras especies ganaderas, laboratorios autorizados en el diagnóstico zoonosanitario, médicos veterinarios responsables autorizados, transportistas de ganado, Organismos Auxiliares de Sanidad Animal; así como del público en general según corresponda, la notificación inmediata de morbilidad, mortalidad, sospecha o confirmación de rabia en los animales.

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

- Notificación inmediata de casos o sospecha de rabia en bovinos y especies ganaderas a las Delegaciones Estatales de la Secretaría, Comités de Fomento y Protección Pecuaria, Gobiernos Estatales, Gobiernos Municipales, laboratorios de diagnóstico autorizados en materia zoonosanitaria o a la Dirección General de Salud Animal, con domicilio ubicado en la avenida Cuauhtémoc número 1230, colonia Santa Cruz Atoyac, Delegación Benito Juárez, código postal 03110, México, Distrito Federal, teléfono (55) 59 05 1000, extensión 51092.

- Las Delegaciones Estatales de la Secretaría, los Gobiernos Estatales, Comités de Fomento y Protección Pecuaria, Gobiernos Municipales, laboratorios de diagnóstico, la Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo, deben enviar a la Campaña, la información geográfica (georreferenciación) sobre las actividades de vacunación y control de vampiros, así como la correspondiente a los focos de rabia bovina.

- Realización del diagnóstico de rabia conforme a lo referido en el numeral 6 de esta Norma Oficial Mexicana.

- El seguimiento epidemiológico de los casos en bovinos y especies ganaderas, se debe realizar de acuerdo a lo referido en los numerales 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de esta Norma Oficial Mexicana.

- El cierre de los casos se debe efectuar cuando ya no existan bovinos y especies ganaderas con evidencias de rabia o sospechas de la enfermedad como efecto de las acciones indicadas en los numerales 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de esta Norma Oficial Mexicana.

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

13. Movilización de animales

13.1. Las especificaciones contenidas en este numeral se aplican para el ganado bovino y especies ganaderas que se pretenda movilizar, para lo cual se debe comprobar mediante una constancia expedida por un Médico Veterinario Zootecnista Responsable Autorizado en el área de rumiantes, que los animales fueron vacunados mínimo 30 días antes de la movilización; asimismo, la movilización no podrá ser realizada cuando el animal tenga hasta 12 meses de la última vacunación. Adicional al certificado de vacunación se debe contar con el Certificado Zoonosanitario correspondiente.

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

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

13.4. Todos los animales originarios de zonas libres de rabia pueden moverse sin ninguna restricción a zonas libres; en el caso que el destino de los animales sea a un Estado, zona o región en control, y se pretende que estos animales se establezcan en zonas de riesgo, deben estar vacunados contra la rabia, mínimo 30 días antes de la movilización; asimismo, la movilización no podrá ser realizada cuando el animal tenga más de 12 meses de la última vacunación.

13.5. Los bovinos y especies ganaderas originarias de zonas en control podrán moverse en el territorio nacional siempre y cuando comprueben la vacunación antirrábica de los animales, 30 días antes de la movilización e igualmente, ésta no podrá ser realizada cuando el animal tenga más de 12 meses de la última vacunación, además de contar con el Certificado Zoonosanitario correspondiente.

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

14. Animales y productos importados

14.1. La importación de bovinos y especies ganaderas que provengan de países enzoóticos de rabia de acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de Sanidad Animal, tendrán que demostrar la vacunación antirrábica de los animales mínimo 30 días antes de la importación e igualmente, ésta no puede ser realizada cuando el animal tenga más de 12 meses de la última vacunación a su importación, de acuerdo a lo estipulado en el numeral 8 y 13 de esta Norma Oficial Mexicana.

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

14.3. Las vacunas importadas para su uso en bovinos y especies ganaderas, deben provenir de una empresa elaboradora con registro oficial del país de origen y cumplir con todos los requisitos establecidos en esta Norma Oficial Mexicana y las disposiciones correspondientes.

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

15. Sanciones

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

15.2. Las personas que teniendo conocimiento de la presencia o sospecha de rabia y que no lo notifiquen, serán sancionadas por la autoridad competente conforme a lo dispuesto en la Ley Federal de Sanidad Animal.

16. Procedimiento de evaluación de la conformidad

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

Los dictámenes serán elaborados por el Médico Veterinario Oficial o Médico Veterinario Responsable Autorizado o las unidades de verificación aprobadas, en los cuales se presentan los resultados obtenidos de la verificación realizada.

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

El certificado zoonosanitario debe ser expedido por la Secretaría o por un Organismo de Certificación Aprobado para constatar el cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana. Tratándose de animales será signado por un Médico Veterinario Oficial o por un Médico Veterinario Tercero Especialista Autorizado.

El certificado zoonosanitario constata el cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana o parte de la misma.

17. Concordancia con normas internacionales

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

18. Bibliografía

1. Baer G.M. (1991). The Natural History of Rabies, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
2. Council of Europe (1997). Vaccinum rabie inactivatum ad usum veterinarium. Inactivated Rabies Vaccine for Veterinary Use. European Pharmacopoeia, Third Edition. Monograph 0451. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France.
3. Flores, C.R. La rabia en las diferentes especies sus transmisores y su control. 1a. edición, Editado por INIFAP SARH (Agosto de 1998).
4. Flores, C.R. Prevención de la Rabia Parálitica Bovina y el control de los murciélagos vampiros. 1a. Edición Mayo 1996. Editado por INIFAP-SAGAR-PAIPEME. (1996).
5. Flores, C.R. Técnicas, substancias y estrategias para el control de murciélagos vampiros. 1a. Edición, Marzo 2003, México, D.F. ISBN 970-92109-1-2 Impreso por Laboratorios Bayer de México.
6. Jiménez, R.A. 2005. Manual para la Toma de Muestras para el Diagnóstico de Rabia en Bovinos.
7. Jiménez, R.A. 2006. Manual Técnico sobre Técnicas para el control de poblaciones de vampiros (*Desmodus rotundus*). 1a. edición. Impreso por Laboratorios Bayer de México.
8. Manual Operativo para el control de la Rabia Parálitica Bovina. México, D.F., SAGARPA, 2002.
9. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, OIE. 5a. Edición, París Francia 2004.
10. Organización Mundial de la Salud. 8o. Informe del Comité de expertos de la OMS sobre rabia. Serie de Informes Técnicos No. 824, 1992.
11. Rexford, D.L. Manual de campo para el control de murciélagos vampiros y la rabia. Bat Conservation International. Austin, Texas, July 31, 1998.
12. World Health Organization (1996). Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., Eds. WHO, Geneva, Switzerland.

TRANSITORIOS

PRIMERO.- La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 180 días posteriores a su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

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

Ciudad de México, Distrito Federal, a veintiséis de abril de dos mil once.- El Coordinador General Jurídico,
Wolfgang Rodolfo González Muñoz.- Rúbrica.

Apéndice "A" (Normativo)**Toma y Envío de Muestras al Laboratorio para Diagnóstico de Rabia**

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

La recolección será efectuada por un Médico Veterinario Zootecnista o personal entrenado para esta actividad que cuente con el equipo de protección necesario y que haya recibido el esquema de vacunación previo a la exposición.

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

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

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

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

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

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

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

- Bolsas de plástico suficientes (de preferencia con cierre hermético, tipo zip)
- 1 o 2 frascos de plástico de boca ancha con cierre hermético de un volumen de 1 y medio litros
- Hielo en cantidad suficiente o Glicerina fosfatada al 50 por ciento
- Hielera con refrigerante

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

1. Retirar la piel del cráneo y efectuar los siguientes cortes con segueta o sierra de carnicero para el corte de los huesos.

2. El primer corte de hueso es transversal y posterior a las cuencas oculares, las cuales sirven para sujetar la cabeza y como puntos de referencia.

3. Hacer dos cortes, uno en cada hueso parietal, tomando como punto de referencia la comisura externa del ojo y la porción lateral del agujero magno exactamente encima de los cóndilos del occipital, procurando evitar cortar la masa encefálica.

4. Al desprender la bóveda craneana dejamos al descubierto el encéfalo.

5. Cortar con las tijeras las meninges que cubren la superficie del encéfalo y que se caracteriza por ser muy duras en los bovinos.

6. Extraer con sumo cuidado el encéfalo.

7. Cada encéfalo se pone en una bolsa de plástico y se deposita dentro de la hielera, misma que contiene refrigerantes o hielo en cantidad suficiente, para asegurar su óptimo traslado y conservación hasta el laboratorio.

8. Por cada muestra, debe elaborarse y anexarse una hoja con la información completa y detallada (SIVE 1).

9. Una vez hecho todo lo anterior se procede el envío del tejido dentro de las primeras 24 horas, después de su extracción manteniéndolo en refrigeración de 2 a 8 grados centígrados. De no ser así, sumergirlo en una solución de glicerol al 50 por ciento preparada con agua y remitirlo al laboratorio autorizado para el diagnóstico de rabia más cercano.

Apéndice "B" (Normativo)
Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para Animales Terrestres
PARTE 2; SECCION 2.2; CAPITULO 2.2.5

RABIA

Resumen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A. Introducción

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

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

El personal que trabaja con material sospechoso debe estar vacunado contra los lyssavirus y otros patógenos que pueden estar presentes en las muestras a diagnosticar. El laboratorio debe cumplir con la normativa nacional de biocontención y de bioseguridad para proteger al personal del contacto con los patógenos; también debe cumplir con especificaciones de seguridad humana en el laboratorio de microbiología.

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

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

1. Identificación del agente

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

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

Pueden utilizarse varias técnicas de laboratorio, mismas que han sido detalladas y estandarizadas en la cuarta edición de Técnicas de Laboratorio para la Rabia de la Organización Mundial de la Salud (OMS's Laboratory Techniques in Rabies) (37). Los métodos varían en su eficacia, especificidad y confiabilidad. Se aplican generalmente al tejido cerebral, pero pueden también ser aplicados aunque con menos eficacia a otros órganos (e.g. glándulas salivales). En el cerebro, el virus de la rabia es particularmente abundante en el tálamo, el Puente de Varolio y la médula. El hipocampo (cuerno de Ammon), el cerebelo y diferentes partes

del cerebro se han reportado negativos en 3.9 - 11.1 por ciento de los cerebros positivos. La estructura de la elección es el tálamo y esto fue positivo en todos los casos. Se recomienda que una serie de tejidos cerebro sean incluidos la corteza el tallo cerebral debe ser colectado y probado (12). Para alcanzar estas partes del cerebro, es necesario remover el órgano completo después de haber abierto el cráneo en un cuarto de necropsias. Bajo algunas condiciones (como en el campo o cuando se realizan muestreos grandes para estudios epidemiológicos), puede emplearse un método de muestreo simplificado a través del agujero occipital (11), o a través de la cavidad orbital (26).

a) Envío de muestras

Durante el envío de material sospechoso para diagnóstico (cabezas de animales, cerebro u otros tejidos), no debe existir ningún riesgo de contaminación al hombre: los cerebros deben colocarse en un envase rígido y hermético (las cabezas de animales serán envueltas en material absorbente) como se señala en el Apéndice "A" (Normativo).

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

- La formalina inactiva el virus de la rabia, por lo que no puede utilizarse pruebas del aislamiento y el diagnóstico depende del uso de pruebas modificadas y con menos sensibilidad como son la de inmunofluorescencia directa (FAT), inmunohistoquímica o histológica (33, 37);

- La infecciosidad a temperatura ambiente puede extenderse por varios días si el material del cerebro se mantiene en una mezcla tamponada de glicerol al 50 por ciento y solución salina fosfatada (PBS). La mezcla Glicerol/Solución de Fosfatos Buferada retarda la acción bacteriana y por lo tanto la protege contra los efectos químicos y biológicos de la putrefacción. Esta no protege contra la declinación del título debido a las condiciones térmicas y por lo tanto como el virus de la rabia es termolábil, el título del virus declinará durante su almacenaje en Glicerol/ Solución de Fosfatos Buferada. Bajo condiciones de transporte normal en las zonas tropicales, esta protección puede ser eficaz por cuestión de días. Por lo tanto, siempre que sea posible mantener las muestras en Glicerol/ Solución de Fosfatos Buferada deben mantenerse refrigeradas. Como el virus no se inactiva por el Glicerol/ Solución de Fosfatos Buferada, todas las pruebas de laboratorio pueden utilizarse en estas muestras.

b) Colecta de muestras

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

• Ruta del Agujero Occipital para la toma de muestra de cerebro

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

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

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

c) Pruebas de rutina en el laboratorio

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

• Identificación histológica de lesiones celulares características

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

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

• Identificación inmunoquímica del antígeno del virus de la rabia**i) Prueba de anticuerpos fluorescentes (Inmunofluorescencia FAT)**

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

La inmunofluorescencia puede aplicarse a muestras conservadas en glicerol. Si la muestra ha sido conservada en una solución de formalina, la inmunofluorescencia puede ser utilizada solamente después que el espécimen se ha tratado con una enzima proteolítica (6, 7, 32, 33). Sin embargo, la inmunofluorescencia en muestras fijadas en formalina y digeridas son siempre menos confiable y más incómodas que cuando éstas se realizan en tejido fresco.

ii) Pruebas inmunoquímicas

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

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

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

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

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

i) Prueba de inoculación en ratones

Se inoculan intracerebralmente de 5 a 10 a ratones de 3 a 4 semanas de edad (12-14 gramos de peso), o una camada de ratones de 2 días de nacidos. Es recomendable, aunque no estrictamente esencial, el uso de ratones libres de patógeno específico (SPF). El inóculo es el sobrenadante clarificado de un 20 por ciento (peso/volumen) homogéneo del material del cerebro (corteza, cuerno de Ammon, cerebelo, médula oblongada) en una solución isotónica bufferada conteniendo antibióticos. Para reducir el dolor en los animales, los ratones deben ser anestesiados cuando sean inoculados. Los ratones jóvenes adulto serán observados diariamente por 28 días y cada ratón que muera será examinado para rabia usando inmunofluorescencia directa. Para las cepas de calle de rabia en zorros, las muertes debido a la rabia generalmente comienzan 9 días post-inoculación. Para resultados más rápidos en ratones recién nacidos, es posible revisar un ratón bebé por inmunofluorescencia directa en los días 5, 7, 9 y 11 post-inoculación.

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

ii) Prueba de cultivos celulares

Para el diagnóstico rutinario de rabia se usan las líneas de células de Neuroblastoma, por ejemplo CCL-131 en la American Type Culture Collection (ATCC: American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, United States of America). Las células se cultivan en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 5 por ciento de suero fetal bovino y se incuban a 36 grados centígrados con 5 por ciento de bióxido de carbono. Esta sensibilidad ha sido comparada en células del riñón del hámster neonato (BHK-21) (29). Esta línea celular es la adecuada para los aislamientos de cepas de la calle sin ningún paso de adaptación, pero debe ser analizada, antes de su empleo, para comprobar su susceptibilidad a las variantes de virus predominantes localmente. La presencia del virus de la rabia en las células es revelada por inmunofluorescencia. El resultado de la prueba se obtiene por lo menos 18 horas después (un ciclo de replicación de virus en las células); generalmente la incubación se prolonga por 48 horas (10) y en algunos laboratorios hasta 4 días.

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

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

d) Otras pruebas de identificación

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

2. Pruebas serológicas

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

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

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

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

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

• Equipo esencial

Incubador humedecido a 37 grados centígrados con 5 por ciento de bióxido de carbono; incubador seco a 37 grados centígrados; gabinete de biocontención; microscopio de fluorescencia apropiado para fluorescencia con FITC y equipado con ocular x10 y objetivo x10. El aumento global del microscopio varía entre x100 y x125 debido al aumento adicional de algunos sistemas de epi-fluorescencia.

• Reactivos y biológicos

Solución tamponada solución de fosfatos tamponada, pH 7.2, sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , almacenada a 4 grados centígrados;

Tripsina con etilen diamino tetra acético (EDTA);

Acetona de alto grado al 80 por ciento (diluida con agua desionizada), almacenada a 4 grados centígrados;

Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) más 10 por ciento de suero bovino inactivado por calor;
 Conjugado antirrábico con FITC;
 Células: BHK-21 C13 (ATCC CCL-10);

Virus: Cepa CVS-11 (ATCC VR 959), la cual está disponible en el ATCC o en el laboratorio de referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal para la rabia, Nancy, Francia. Los frascos se almacenan a menos 80 grados centígrados;

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

Suero control: Conjunto de 10 sueros caninos liofilizados, se almacena a 4 grados centígrados, y se reconstituye con 0.5 mililitro de agua estéril desionizada o de agua destilada.

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

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

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

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

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

● **Titulación del virus en TCID₅₀ (Dosis infectiva del 50 por ciento en cultivo de tejidos)**

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

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

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

i) Suspensión celular: El día anterior a la titulación, se prepara una suspensión de células que contengan 10^5 células por mililitro en medio de cultivo celular que contenga 10 por ciento de suero fetal bovino inactivado por calor y es distribuida en la placa de microtitulación de 96 pozos, con 200 microlitros por pozo. Las placas son después incubadas por 24 horas de 35.5 a 37 grados centígrados con 5 por ciento de bióxido de carbono.

ii) Dilución del virus: Las diluciones seriadas son realizadas en tubos de 5 mililitros usando un medio de cultivo celular sin suero fetal bovino como diluyente. Se preparan diluciones de 10^{-1} a 10^{-12} (0.9 mililitro de diluyente con 0.1 mililitro de la dilución anterior).

iii) Infección de las células: El medio de las placas de microtitulación es desechado usando un sistema de aspirado. Se distribuye en cada pozo 50 microlitros de cada dilución de virus. Se usan 6 réplicas por cada dilución. La placa de microtitulación es después incubada por 1 hora a 35.5 – 37 grados centígrados con 5 por ciento de bióxido de carbono. Después se añaden 200 microlitros de medio de cultivo con 5 por ciento de suero fetal bovino.

iv) **Incubación:** Incubar por 3 días a 35.5 – 37 grados centígrados en 5 por ciento de bióxido de carbono.

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

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

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

x0 = (Logaritmo₁₀ de la dilución más baja con todos los pozos positivos)

d = Logaritmo 10 del paso de la dilución, 1 en este caso

ni = número de réplicas, 6 en este caso

ri = número de pozos positivos

Fig. 1. Utilización propuesta de las microplacas para la prueba de neutralización del virus por anticuerpos fluorescentes. Los pozos a los cuales se les debe añadir sueros sin diluirse llenan con los “50 microlitros” indicados. Los pozos a los que se les debe añadir 50 microlitros de dilución de virus estándar de desafío se muestran en sombreado. Las diluciones se expresan en logaritmo base 10.

Plate 1: Controls

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

Naïve dog serum (negative)

Plate 2: Sera to be tested

log dilution	0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	2.87	0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	2.87
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serum 1	A	50 µl					50 µl					
	B	50 µl					50 µl					
	C	50 µl					50 µl					
	D	50 µl					50 µl					
Serum 2	E	50 µl					50 µl					
	F	50 µl					50 µl					
	G	50 µl					50 µl					
	H	50 µl					50 µl					

Serum 3
Serum 4

● **Procedimiento de la prueba**

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

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

iii) Los sueros a probarse son inactivados por calor durante 30 minutos a 56 grados centígrados. Como se indica en la figura 1, se agregan 50 microlitros de cada suero sin diluido a los 4 pozos adyacentes.

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

El suero de la Organización Mundial de Sanidad Animal, el suero de OMS, el control interno y el suero canino control: con una pipeta multicanal de 50-200 microlitros, mezcle los primeros pozos de la dilución succionando dentro y fuera por lo menos 8 veces, transfiera 50 microlitros de una fila a la siguiente, hasta alcanzar la última. Descarte 50 microlitros de la última fila.

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

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

i) El stock de CVS es guardado en microtubos de 1 mililitro a menos 80 grados centígrados. Un tubo se descongela rápidamente bajo el chorro de agua corriente y se coloca en hielo.

ii) Se prepara una dilución de este tubo para obtener 100 Dosis Infectantes Tejido de Cultivos al 50 por ciento en 50 mililitros. De esta dilución se agregan 50 microlitros de suero a cada pozo (véase la figura 1). Para la titulación del virus se añaden 50 microlitros a los pozos H1 a H4 (placa 1). Después, transfiera 50 microlitros de una fila a la otra fila (placa 1, líneas 1-4). Deseche los 50 microlitros de la última fila (placa 1, pozos A1 a A4). No agregue ningún virus a los pozos A9 a A12 de la placa 1 (controles).

iii) Incube las microplacas a 37 grados centígrados en una incubadora húmeda con 5 por ciento de bióxido de carbono por 1 hora.

iv) Adición de células: Tripsinizar un cultivo subconfluente de células BHK-21 de 3 días de edad. Resuspenda las células para obtener una suspensión de 4 por 10⁵ células por mililitro en DMEM suplementada con 10 por ciento de suero fetal bovino e inactivada por calor. Agregue 50 microlitros de la suspensión de células a cada pozo.

v) Incube las microplacas por 48 horas a 37 grados centígrados en una incubadora húmeda con 5 por ciento de bióxido de carbono.

● **Fijación y tinción**

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

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

● **Lectura e interpretación de resultados**

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

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

iii) Los resultados de la titulación de CVS (TCID₅₀), del suero control (D₅₀ dosis media) y del positivo estándar (Dosis₅₀) se reportan en una tarjeta de control para cada caso. Los resultados de control de la prueba actual se comparan con los resultados de las pruebas control de pruebas anteriores usando el mismo lote de control. La prueba se valida si los valores obtenidos para los tres controles en la prueba actual no son estadísticamente diferentes de la media de todos los valores obtenidos en las pruebas anteriores según esta técnica.

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

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

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

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

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

ii) Resuspender 3×10^7 de células en un tubo cónico de centrifuga de 50 mililitros en 2.7 mililitros de medio mínimo esencial de Eagle suplementado con 10 por ciento de suero fetal bovino (EMEM-10).

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

iv) Agregue 10 mililitros EMEM-10, mezclar con vórtex y centrifuge las células a 500 gravedades por 10 minutos.

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

vi) Agite suavemente el frasco para mezclar la suspensión de células y después prepare 3 portaobjetos con cámara para cultivo de tejidos con 8 pozos, midiendo con una pipeta 0.2 mililitros de la suspensión celular en un pozo de cada portaobjetos.

vii) Incube el frasco y los portaobjetos a 37 grados centígrados en una incubadora humedecida con 0.5 por ciento de bióxido de carbono. El frasco debe incubarse como un cultivo cerrado (apretar la tapa).

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

ix) Transfiera el sobrenadante a un tubo de centrifugadora de 50 mililitros y centrifuge a 4000 gravedades por 10 minutos.

x) Distribuya el sobrenadante en alícuotas de 0.5 mililitros y almacénelas a menos 70 grados centígrados.

• **Titulación de la suspensión viral de inóculo**

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

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

iii) Mezcle las células y el virus oscilando suavemente el portaobjetos, después incúbase a 37 grados centígrados en una incubadora humedecida con 0.5 por ciento de bióxido de carbono por 40 horas.

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

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

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

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

iii) Distribuya el sobrenadante en alícuotas de 0.5 mililitros y almacénelo a menos 70 grados centígrados.

• Titulación de la suspensión viral stock

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

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

iii) Mezcle las células y la suspensión del virus agitando suavemente el portaobjetos, entonces incube a 37 grados centígrados en una incubadora humedecida con 0.5 por ciento de bióxido de carbono por 20 horas.

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

Cada pozo del portaobjeto con cámara para cultivo de tejidos con ocho pozos contiene 25-50 campos microscópicos distintos cuando se observa en la ampliación $\times 160$ -200. Una unidad de virus para el RFFIT es determinada como la dilución en la cual el 50 por ciento de los campos microscópicos observados contienen unos o más focos de células infectadas (la dosis de foco-formación, FFD₅₀). La suspensión stock de virus debe contener al menos 1×10^4 FFD₅₀ por 0.1 mililitros (es decir el pozo de células infectadas con la dilución 10^{-4} debe contener al menos un foco de células infectadas en 50 por ciento de los campos microscópicos observados). Una suspensión stock de virus con este título puede después diluirse a $10^{-2.3}$ para obtener un virus de desafío 50 FFD₅₀.

• Suero de referencia

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

• Sueros problema

Antes de probarse, las muestras del suero deben calentarse a 56 grados centígrados por 30 minutos para inactivar el complemento. Si el suero está congelado, éste debe recalentarse después de descongelarse. Las diluciones seriadas de los sueros problema pueden ser preparadas en un portaobjetos con cámara para cultivo de tejidos de 8 pozos. El análisis de las diluciones 1 en 5 y 1 en 50 es suficiente para una evaluación rutinaria de eficacia vacunal y pueden hacerse como sigue:

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

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

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

iv) Agregue 0.1 mililitros de la preparación del virus del desafío (que contiene 32-100 FFD₅₀) a todas las diluciones del suero.

v) Mezcle e incube a 35 grados centígrados en una incubadora humedecida con 0.5 por ciento de bióxido de carbono por 90 minutos.

• Adición de células

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

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

iii) Distribuya 0.2 mililitros de la suspensión de células en cada pozo del portaobjetos e incube a 35 grados centígrados en una incubadora humedecida con 0.5 por ciento de bióxido de carbono por 20 horas más.

• Fijación con acetona y tinción por inmunofluorescencia

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

ii) Lave los portaobjetos una vez en PBS y después fíjelas por 10 minutos a temperatura ambiente en acetona fría (menos 20 grados centígrados).

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

iv) Observe los portaobjetos en un microscopio de fluorescencia.

• Cálculo de los títulos de virus neutralizado por anticuerpos

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

c) Neutralización viral en ratones

El principio de esta prueba es la neutralización *in vitro* de una cantidad constante de virus rábico (50 LD₅₀ [dosis letal al 50 por ciento] por 0.03 mililitros de cepa CVS) variando las cantidades del suero a ser titulado durante un paso de incubación de 90 minutos a 37 grados centígrados. La mezcla de virus/suero (0.03 mililitros) es inoculado en el cerebro de ratones de 3 semanas de edad. El título del suero es la dilución final del suero en la mezcla del virus/suero que protege al 50 por ciento de los ratones (la mortalidad es 100 por ciento en ausencia de neutralización). Este título puede expresarse en Unidades Internacionales, comparándolo con la dilución que neutraliza un suero estándar bajo mismas condiciones experimentales.

Para realizar la prueba, descongele una ampolleta de virus de CVS y prepare una suspensión que contenga 100 LD₅₀/0.03 mililitros (considere que será diluida 2 veces por la adición del mismo volumen del suero antes de ser inyectado). La cantidad de virus usada realmente durante la prueba (límites permitidos: 30-300 LD₅₀/0.03 mililitros) es comprobado titulado 4 diluciones de la preparación viral, cada una de las cuales se inocularán en 5 ratones. Los sueros de prueba se calientan a 56 grados centígrados por 30 minutos para inactivar cualquier complemento.

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

A cada dilución de suero se agrega un volumen igual de la preparación viral conteniendo 100 LD₅₀/0.03 mililitros. Las mezclas se incuban en un baño de agua a 37 grados centígrados por 90 minutos y después se colocan en hielo para reducir la inactivación del virus debido a la temperatura. La reacción es detenida por la inmersión en hielo. Durante la inoculación, los tubos que no se utilizan inmediatamente se guardan en 4 grados centígrados.

Para cada dilución, se inoculan 5 ratones intracerebralmente con 0.03 mililitros de la mezcla del suero/virus. La mortalidad es registrada durante 21 días después de la inoculación, aunque las muertes que ocurren durante los primeros 4 días son observadas como inespecíficas (debido al choque, a la infección, etc.). El título de suero puede ser calculado en Unidades Internacionales por la comparación con un suero estándar internacional.

d) Enzimoimmunoensayo ELISA

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

La reacción está compuesta por tres pasos:

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

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

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

● **Preparación del antígeno**

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

● **Reactivos**

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

Microplaca con 6 filas de 16 pozos sensibilizados con antígenos de la rabia. Se deben usar en las 4 semanas después de abrir la bolsa, la cual debe estar cerrada después de cada uso;

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

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

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

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

Diluyente de la muestra (SD), PBS tamponado, pH 7.8, incluyendo 0.28 por ciento de caseína (peso/volumen), (volumen/volumen) Tritón X100 al 0.055 por ciento;

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

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

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

Solución de detención (S), Solución de Acido Sulfúrico 4 N + tiomersal al 0.02 por ciento (peso/volumen).

Los reactivos diluidos deben ser almacenados a 5 grados centígrados más o menos a 3 grados centígrados. Coloque todos los reactivos a temperatura del laboratorio por lo menos 1 hora antes de usarse.

● **Muestras**

La reacción se realiza con sueros individuales inactivados por calor (30 minutos a 56 grados centígrados) diluidos a 1 en 100. Es necesario probar las diluciones apropiadas del suero estándar de referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal que contiene 6.7 Unidades Internacionales por mililitro (disponible en el laboratorio de referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal para rabia, Nancy, Francia).

Las muestras de suero deben mantenerse de 5 grados centígrados a más o menos 3 grados centígrados. Para conservación prolongada, las muestras de suero deberán congelarse a menos 20 grados centígrados.

● **Pasos preliminares de predilución**

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

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

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

iii) Para la titulación del suero, debe hacerse un conjunto de 6 diluciones del Suero Estándar de la Organización Mundial de Sanidad Animal en un tubo o en una microplaca en blanco con la dilución inicial 1 en 10, luego 1 en 30, 1 en 100, 1 en 300, 1 en 1000 hasta la dilución final 1 en 3000. Estas diluciones del suero Estándar de la Organización Mundial de Sanidad Animal deben incluirse en cada prueba y/o microplaca con una dilución inicial de 1 en 10, luego 1 en 30, 1 en 100, 1 en 300, 1 en 1000 hasta la dilución final 1 en 3000.

Se recomienda el siguiente esquema para preparar las diluciones apropiadas:

Dilución OIE	Preparación
1 en 10	10 microlitros de Suero Estándar Internacional de la Organización Mundial de Sanidad Animal + 90 microlitros de diluyente de la muestra
1 en 30	10 microlitros de Suero Estándar Internacional de la Organización Mundial de Sanidad Animal + 290 microlitros de diluyente de la muestra
1 en 100	10 microlitros de la dilución 1/10 + 90 microlitros de diluyente de la muestra
1 en 300	10 microlitros de la dilución 1/30 + 90 microlitros de diluyente de la muestra
1 en 1000	10 microlitros de la dilución 1/100 + 90 microlitros de diluyente de la muestra
1 en 3000	10 microlitros de la dilución 1/300 + 90 microlitros de diluyente de la muestra

Este rango de diluciones del Suero Estándar de la Organización Mundial de Sanidad Animal debe estar presente en todas las placas.

• **Procedimiento de la prueba**

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

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

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

Cuantificación de anticuerpos (dilución final)

	1	2	3	4
A	N 1 en 10	N 1 en 10	S1 1 en 100	S1 1 en 100
B	P 1 en 10	P 1 en 10	S2 1 en 100	S2 1 en 100
C	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 100	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 100	S3 1 en 100	S3 1 en 100
D	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 300	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 300	S4 1 en 100	S4 1 en 100
E	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 1000	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 1000	S5 1 en 100	S5 1 en 100
F	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 3000	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 3000	S6 1 en 100	S6 1 en 100
G	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 10000	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 10000	S7 1 en 100	S7 1 en 100
H	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 30000	Organización Mundial de Sanidad Animal 1 en 30000	S8 1 en 100	S8 1 en 100

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

iii) Incubar las placas de microtitulación durante 1 hora más o menos 5 minutos a 37 grados centígrados y a más o menos 3 grados centígrados.

iv) Dilución del reactivo:

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

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

v) Con cuidado remueva la cinta adhesiva y lave 4 veces.

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

vii) Incube el conjugado por 1 hora más o menos 5 minutos a 37 grados centígrados, más o menos a 3 grados centígrados.

viii) Con cuidado remueva la cinta adhesiva y lave 4 veces.

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

x) Incube por 30 más o menos 5 minutos a temperatura del laboratorio (20 grados centígrados, más o menos 5 grados centígrados), y protegida de la luz.

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

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

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

Cálculo del título usando la curva de regresión.

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

ii) Calcular el valor del logaritmo natural (*ln*) de cada Densidad Optica (OD) media y el valor *ln* de la concentración de anticuerpos rábicos para cada dilución de la Organización Mundial de Sanidad Animal (a partir de 6.7 a 0.0223 Unidades Internacionales/mililitros, sin considerar el factor de dilución 1 en 100 de la prueba).

iii) Trace el *ln* de la Densidad Optica (OD) (en coordenadas eje Y) en función del *ln* (concentración de anticuerpos antirrábicos) (en abscisas eje X) para obtener la curva de referencia para el suero estándar de la Organización Mundial de Sanidad Animal.

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

$$\ln \text{ de la concentración de anticuerpos antirrábicos} = a + b \times \ln \text{ OD}$$

v) Para cada muestra probada, calcule el valor promedio de la Densidad Optica (OD) y después la concentración de anticuerpos antirrábicos de la muestra expresada como “unidades equivalentes por mililitros” (UE/mililitros), a partir del modelo establecido:

$$\text{Concentración de anticuerpos antirrábicos de la muestra (UE/mililitros)} = e (a + b \times \ln \text{ OD}).$$

● **Validación de la prueba**

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

● Si la densidad óptica obtenida con el control positivo Densidad Optica Positiva (OD P) es mayor que o igual a 0.300;

● Si la densidad óptica obtenida con el control negativo Densidad Optica Negativa (OD N) es menor que 0.50 x OD P; y

● El coeficiente de correlación entre *ln* ODs e *ln* la concentración de anticuerpos antirrábicos para el suero estándar de la Organización Mundial de Sanidad Animal Standard Serum es mayor que 0.95.

Ejemplos

Control positivo:

$$\text{OD pozo B}_1 = 0.610 \quad \text{OD pozo B}_2 = 0.690 \quad \rightarrow \quad \text{OD P} = 0.650$$

Control negativo:

$$\text{OD pozo A}_1 = 0.190 \quad \text{OD pozo A}_2 = 0.210 \quad \rightarrow \quad \text{OD N} = 0.200$$

Muestra 1:

$$\text{OD pozo 1} = 1.790 \quad \text{OD pozo 2} = 1.750 \quad \rightarrow \quad \text{OD} = 1.770$$

Muestra 2:

$$\text{OD pozo 1} = 0.350 \quad \text{OD pozo 2} = 0.390 \quad \rightarrow \quad \text{OD} = 0.370$$

Validación de la prueba.

OD P igual a 0.650 o mayor que 0.300 y OD N = 0.200 < 0.50 x 0.650 = 0.325, de esta forma la prueba es válida.

• Resultados e interpretación (Titulación cuantitativa de anticuerpos)

Si el título calculado es mayor o igual a 0.6, se considera que el animal presenta seroconversión después de la vacunación.

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

C. Requerimiento para las vacunas y los materiales de diagnóstico

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

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

Las normas para la producción de vacunas veterinarias deben ajustarse a las directrices de la Organización Mundial de Sanidad Animal y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

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

Toda manipulación del virus durante la producción y ensayo de las vacunas, debe adaptarse a las estrictas precauciones de seguridad especificadas por la Organización Mundial de la Salud (36, 37), la Organización Mundial de Sanidad Animal y las directrices y normas nacionales.

1. Control de los inóculos**a) Característica del inóculo**

Cualquier cepa perteneciente a la cepa del serotipo 1 que demuestre proteger contra los virus naturales de la rabia (que se encuentren actualmente en el país donde se va a usar la vacuna). La cepa de virus utilizada debe tener propiedades biológicas (patogenicidad) y antigénicas (caracterizadas por anticuerpos monoclonales) conocidas. Si es empleada como vacuna viva, el inóculo primario de virus no debe causar rabia clínica. Deben probarse al menos en 2 animales (preferentemente 5 o 6 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 10 veces superior al título vírico contenido en una dosis del producto final propuesto. Los animales deben observarse por lo menos durante 90 días para cualquier efecto que se pueda atribuir al inóculo primario.

b) Método de cultivo

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

c) Validación como vacuna

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

La eficacia de la vacuna producida se determina por estudios con cada especie a la que va dirigida, vacunada como se recomendó. La protección al final del periodo de inmunidad es monitoreada por la medición de anticuerpos neutralizantes específicos y por el desafío con virus de la rabia. Las condiciones experimentales de este desafío deben reflejar las condiciones naturales de la infección, aunque desde un

punto de vista práctico, puede resultar más fácil obtener un 100 por ciento de mortalidad en los animales control con una cepa de virus de rabia conocida que con una aislada localmente. En los animales vacunados con vacunas inactivadas, el porcentaje de seroconversión y el nivel medio de anticuerpos permiten un buen pronóstico de sobrevivencia al desafío.

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

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

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

2. Método de producción

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

a) En animales

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

b) En huevos

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

c) En cultivos celulares

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

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

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

3. Control del proceso

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

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

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

4. Control de lotes

a) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación de materiales biológicos, son las especificadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal.

b) Inocuidad

Las pruebas de inocuidad de los lotes de vacunas con virus inactivados se llevan a cabo mediante inoculación en cultivos celulares o intracerebralmente en ratones para detectar virus viables. Para vacunas antirrábicas vivas, debe realizarse una prueba de seguridad adecuada para cada lote de vacuna en la especie hospedadora concreta. Por lo menos 3 y preferentemente 5 o 6 animales de cada especie hospedadora en cuestión deben recibir una dosis equivalente a 10 veces la dosis de campo recomendada por la ruta normal de administración. Los animales deben ser observados durante 90 días para detectar reacciones atribuibles a la vacuna.

c) Potencia

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

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

De acuerdo a la Farmacopea Europea (20) se inoculan grupos de al menos 10 ratones de 3 a 4 semanas de edad, con dosis decrecientes únicas de vacuna o con dosis separadas por 1 semana, según la prueba del NIH (37). Se compara un número suficiente de diluciones para determinar la dilución a la que el 50 por ciento 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 Organización Mundial de la Salud, de modo que los resultados de la prueba de antigenicidad se pueden expresar en Unidades Internacionales (UI). La prueba no es válida a menos que:

i) Tanto para la vacuna examinada y la preparación estándar, la PD_{50} (dosis de protección al 50 por ciento) 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 mililitros de la suspensión contenía 10 Dosis Letales₅₀. La dosis de desafío debe estar entre 12 a 50 Dosis Letales₅₀ para una prueba válida.

iii) El intervalo de confianza ($p=0.95$) para la prueba no debe ser menor de 25 por ciento ni superior al 400 por ciento 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 Unidad Internacional 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 mayor o igual a 1 Unidad Internacional por dosis (4). Esta prueba se emplea como prueba de investigación aproximada para reducir el número de ratones utilizados en las pruebas de control de la potencia de la vacuna.

d) Duración de la inmunidad

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

e) Estabilidad

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

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

f) Conservadores

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

5. Pruebas sobre el producto final**a) Inocuidad**

Ver Sección C. 4 b).

b) Potencia

Ver Sección C. 4 c).

Referencias

1. Aubert M.F.A. (1982). Sensibilité et fidélité du diagnostic de rage au laboratoire. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 5, 369-376.
2. Aubert M.F.A. (1982). Une méthode simple de calcul des titres des suspensions virales, vaccinales ou séroneutralisantes: la méthode graphique. (A simple method for calculating titres of virus, vaccine or serum-neutralising suspensions: the graphic method.) *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1, 828-833.
3. Aubert M.F.A. (1992). Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 11, 735-760.
4. Aubert M.F.A. & Blancou J. (1982). Test simplifié de contrôle d'activité des vaccins antirabiques à virus inactivés. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1, 811-822.
5. Baer G.M. (1991). *The Natural History of Rabies*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 620 pp.
6. Barnard B.J.H. & Voges S.F. (1982). A simple technique for the diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. *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. OMS/Rab. Res./88.27*.
12. Bingham J. & van der Merwe M. (2002). Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Methods*, 101, 85-94.
13. Blancou J., Soria Baltazar R., Molli I. & Stoltz J.F. (1991). Effective postexposure treatment of rabies-infected sheep with rabies immune globulin and vaccine. *Vaccine*, 9, 432-437.
14. Bourhy H., Kissi B. & Tordo N. (1993). Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*, 194, 70-81.
15. Bourhy H., Rollin P.E., Vincent J. & Sureau P. (1989). Comparative field evaluation of the fluorescent antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzymes immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 519-523.
16. Bourhy H. & Sureau P. (1991). *Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage; Métodos de laboratorio para el diagnóstico de la rabia; Laboratory methods for rabies diagnosis*. Commission des Laboratoires de référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur, Paris, France, 197 pp.

17. Briggs D.J., Smith J.S., Mueller F.L., Schwenke J., Davis R.D., Gordon C.R., Schweitzer K., Orciari L.A., Yager P.A. & Rupprecht C.E. (1998). A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals*, 26, 347-355.
 18. Cliquet F., Aubert M. & Sagne L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*, 212, 79-87.
 19. Cliquet F., Sagne L., Schereffer J.L. & Aubert M.F.A. (2000). ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*, 18, 3272-3279.
 20. Council of Europe (1997). *Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium*. Inactivated Rabies Vaccine for Veterinary Use. European Pharmacopoeia, Third Edition. Monograph 0451. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1776-1777.
 21. Fekadu M., Shaddock J.H., Sanderlin D.W. & Smith J.S. (1988). Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies virus and rabies-related viruses. *Vaccine*, 6, 533-539.
 22. Genovese M.A. & Andral L. (1978). Comparaison de deux techniques utilisées pour le diagnostic de la rage: l'immunofluorescence et l'immunoperoxydase. *Rec. Med. Vet.*, 154 (7-8), 667-671.
 23. Goldwasser R.A. & Kissling R.E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98, 219-223.
 24. Hooper P.T., Lunt R.A., Gould A.R., Samaratunga H., Hyatt A.D., Gleeson L.J., Rodwell B.J., Rupprecht C.E., Smith J.S. & Murray P.K. (1997). A new lyssavirus (the first endemic rabies-related virus recognised in Australia). *Bull. Inst. Pasteur*, 95, 209-218.
 25. Kieny M.P., Lathe R., Drillien R., Spehner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H. & Lecocq J.P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, 312, 163-166.
 26. Montano Hirose J.A., Bourhy H. & Sureau P. (1991). Retro-orbital route for brain specimen collection for rabies diagnosis. *Vet. Rec.*, 129, 291-292.
 27. Perrin P., Lafon M., Versmisse P. & Sureau P. (1985). Application d'une méthode immunoenzymatique au titrage des anticorps antirabiques neutralisants en cultures cellulaires. *J. Biol. Stand.*, 13, 35-42.
 28. Perrin P., Rollin P.E. & Sureau P. (1986). A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID) useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. *J. Biol. Stand.*, 14, 217-222.
 29. Rudd R.J. & Trimachi C.V. (1987). Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 145-168.
 30. Smith J.S., Yager P.A. & Baer G.C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. OMS*, 48, 535-541.
 31. Von Teichman B.F., De Koker W.C., Bosch S.J., Bishop G.C., Meridith C.D. & Bingham J. (1998). Mokola virus infection: description of recent south African cases and a review of the virus epidemiology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 69, 169-171.
 32. Umoh J.U. & Blenden D.C. (1981). Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin fixed tissue after treatment with trypsin. *Bull. OMS*, 59, 737-744.
 33. Warner C.K., Whitfield S.G., Fekadu M. & Ho H. (1997). Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome in situ in formalin-fixed tissues. *J. Virol. Methods*, 67, 5-12.
 34. Wiktor T.J., Doherty P.C. & Koprowski H. (1977). In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74, 334-338.
 35. World Health Organization Expert Committee on Biological Standards. Thirty-Fifth Report (1985). World Health Organization Technical Report Series No. 725. OMS, Geneva, Switzerland.
 36. World Health Organization Expert Committee on Rabies. Eighth Report (1992). World Health Organization Technical Report Series No. 824, 84 pp.
 37. World Health Organization (1996). *Laboratory Techniques in Rabies*, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. OMS, Geneva, Switzerland.
 38. Zalan E., Wilson C. & Pukitis (1979). A microtest for quantitation of rabies virus. *J. Biol. Stand.*, 7, 213-220.
-