

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“RESPUESTA A LA VACUNACIÓN CONTRA EL VIRUS DE LA RABIA EN
PERROS INMUNIZADOS EN SITUACIONES INMUNOMODULADAS”**

Por

CALERO HORMIGA, Diana

CARESANI CASCO, Betina

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria
Higiene, Inspección, Control y Tecnología
de los Alimentos

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2014**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Luis Delucchi

Segundo miembro:

Dr. Rodrigo Puentes

Tercer miembro:

Dra. Alejandra Suanes

Autores:

Diana Calero Hormiga

Betina Caresani Casco

Fecha:

19/09/2014.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodrigo Puentes y su familia por apoyarnos incondicionalmente en este trabajo por dedicar tanto tiempo, contagiar su pasión por la investigación y simplemente por creer que esto era posible.

Al Dr. Gonzalo Suárez por su gran ayuda en la elaboración de esta tesis.

A los laboratorios privados por proporcionar las vacunas para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Mario Quintero por desinteresadamente acompañarnos con este proyecto y proporcionarnos muestras e instalaciones para que podamos trabajar.

Al Dr. Pedro Martino y todo el equipo de laboratorio de análisis clínico de Facultad de Veterinaria por la colaboración en el procesamiento de datos y su apoyo en este proyecto.

A toda la Secretaria de Estado de Salud (Instituto Pasteur) de San Pablo .Especialmente a la Dra. Helena Ruthner Batista-Área de Biología Molecular a la Dra. Andrea de Cassia da Silva (Jefe de la sección de diagnostico), A la Dra. Graciane Caporale , Dra. Luciana Botelho ,Dra. Juliana Ferreira , Dra. Eliane de Almeida y todo el Instituto Pasteur de San Pablo por su interés y apoyo en este trabajo y por recibirnos tan amablemente en sus instalaciones.

A todos los amigos y propietarios de animales que nos colaboraron con muestras.

Al Dr. Sergio Klisich por su apoyo incondicional.

A todos los animales que participaron.

A nuestros amigos y familiares que acompañaron nuestros esfuerzos durante tanto tiempo y nos apoyaron enérgicamente en este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Página

Figuras

Figura 1: Diagrama del Rhabdovirus	11
Figura 2: Diagrama del ciclo de replicación de los Rhabdovirus	12
Figura 3: Tendencia de la rabia humana por especie agresora, América Latina, 1990-2003.....	14
Figura 4: Cobertura de la vacunación en América Latina 2001-2003.....	25
Figura 5: Título de anticuerpos anti-rábiticos en caninos inmunizados con vacunas monovalentes (azul) y vacunas polivalentes (rojo).	37
Figura 6: Efecto del tratamiento inmunosupresor e inmunoestimulante en la respuesta inmune humoral contra la rabia. El grupo inmunoestimulado (rojo) se analizó hasta el día 60.....	38
Figura 7: Títulos de anticuerpos contra la rabia al día 30 post vacunación en perros inmunizados durante la castración quirúrgica.....	39

Tablas

Tabla 1: Promedio de los valores del hemograma de los animales de los distintos grupos al inicio del experimento..	36
Tabla 2: Nivel de protección contra la rabia en caninos inmunizados bajo distintas situaciones de inmunomodulación.....	40

1. RESUMEN:

Según la Organización Mundial de Salud (OMS) la forma más eficaz para reducir los casos de rabia anuales en humanos es a través de vacunaciones en perros y gatos, dado que el 90 % de los mismos son debido a mordeduras de perros infectados con el virus. En países de la región, donde se ha evaluado el nivel de protección de perros vacunados contra el virus de la rabia, se han encontrado variaciones importantes. Los objetivos de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune humoral contra la rabia en perros con algún tipo de estrés (biológico, quirúrgico o farmacológico) o inmunoestimulados farmacológicamente. Para esto se evaluó el título de anticuerpos anti-rábitos en perros inmunizados a campo con vacunas polivalentes (Grupo 1) y monovalentes (Grupo 2), que fueron inmunizados al momento de la castración quirúrgica (Grupo 3), que estaban en tratamiento con corticoides durante la inmunización (Grupo 4) y que habían sido inmunoestimulados al momento de la primo vacunación (Grupo 5). En términos generales los resultados obtenidos indican que en todos los casos, la mayoría de los animales pudieron superar el límite mínimo de anticuerpos para estar protegido según la OMS (0.5UI/ml). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el empleo de vacunas monovalentes vs polivalentes, en el uso de corticoides al momento de la inmunización y en la vacunación durante la castración quirúrgica. Esta investigación deja de manifiesto que es viable la vacunación en caninos contra la rabia en determinadas situaciones estresantes para los animales, aunque la respuesta inmune sea significativamente menor.

2 SUMMARY

According to the World Health Organization (WHO) the most effective way to reduce the number of annual cases of human rabies, is through vaccination of dogs and cats, since 90% of the cases are due to bites of dogs infected with the virus. The level of protection of dogs vaccinated against rabies virus was found to have significant variations in countries of the region. The objectives of this study were to evaluate the humoral immune response against rabies virus in dogs with some type of stress (biological, surgical or pharmacological) or pharmacologically immune-stimulated. The rabies antibodies titers were evaluated in dogs immunized with polyvalent vaccines (Group 1) monovalent (Group 2), animals immunized at the time of surgical castration (Group 3), dogs treated with corticosteroids during immunization (Group 4) and immune-stimulated at the time of the first vaccination (Group 5). Results indicate that the majority of the animals had protective antibody titers higher than the WHO threshold (0.5UI/ml). However, significant differences were found in the groups of polyvalent vs monovalent vaccines, the use of corticosteroids at the time of immunization and vaccination during surgical castration. This research shows that it is feasible to vaccinate canines against rabies, in certain stressful situations, but the immune response is significantly lower.

2. INTRODUCCIÓN

La rabia es una grave enfermedad zoonótica que causa dentro de otros síntomas encefalitis mortal. La mortalidad humana por rabia se estima en 55.000 muertes por año en todo el mundo, y más del 95% de las muertes humanas por rabia son causadas por perros rabiosos (Acha y Szyfres 2003; Knobel y col., 2005).

En América Latina la rabia sigue siendo uno de los problemas más importantes de salud pública. Aunque en muchas zonas urbanas se ha interrumpido la circulación del virus de la rabia en perros con medidas de control apropiadas, incluida la vacunación masiva, las zonas endémicas persisten en varios países debido a las deficiencias en la vacunación y las malas condiciones sociales y ambientales en que viven las personas (Belotto y col., 2005).

Aunque la vacunación de perros es considerada como una parte importante de los programas de control de la rabia en muchos países en desarrollo (Meslin y col., 1994), existen algunas controversias en cuanto a la calidad de la respuesta inmune inducida por algunas marcas de vacunas y la duración que la misma induce en los animales vacunados (Minke y col., 2009; Moreno y col., 2012).

En Uruguay, la vacunación en caninos se realiza parcialmente, ya que no es obligatoria, lo que pone en riesgo la protección de todos los animales susceptibles a la enfermedad, implicando un potencial riesgo para la Salud Pública (Moreno y col., 2012). Por otro lado, no existen controles oficiales sobre el status inmunitario de la población canina vacunada ni sobre las vacunas, de forma que no se conoce si los animales vacunados, están protegidos de una posible exposición al virus o si son necesarias revacunaciones para garantizar esa protección. Al ser esta una enfermedad reemergente en Uruguay (González y col., 2009), el riesgo de contagio en los caninos, es posible.

En un trabajo realizado por Moreno y col. (2012) en una población canina de Montevideo y Canelones (Uruguay), se determinó mediante la técnica de Elisa, que apenas el 36% de los animales que estaban vacunados, tenían niveles de protección contra el virus de la rabia. Esto demuestra que existen factores tanto del animal como de las vacunas en sí, que influyen en la respuesta a la vacunación y que deben ser estudiados detalladamente. A raíz de esa investigación, se puede concluir que las autoridades sanitarias deberían profundizar la profilaxis contra este virus en caninos, estimulando u obligando a la vacunación de los animales. En este sentido, esta tesis tuvo como uno de sus objetivos, evaluar la viabilidad de que se puedan vacunar los caninos durante la cirugía realizada en las campañas de castración masiva. Partiendo de la base que la cirugía genera estrés para los animales (Miyamoto y col., 1994), es necesario comprobar si ese estrés es suficientemente alto como para disminuir la calidad de la respuesta inmune en los animales vacunados durante la anestesia posquirúrgica.

Además se evaluó como responden los animales según la formulación de la vacuna (monovalentes vs polivalente) y si los animales responden diferente bajo un efecto inmunomodulador (depresor o estimulante). Para esto se utilizaron un grupo de animales sometidos a un tratamiento médico con corticosteroides y un grupo con un tratamiento inmunoestimulante con una formulación comercial utilizada para tal fin.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

La rabia es una enfermedad viral, causada por virus neurotrópicos del género *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae*, orden Mononegavirales (Meslin y col., 1994). El virus tiene forma de bala, el genoma es ARN monocatenario no segmentado de polaridad negativa. Posee una nucleocápside helicoidal con una envoltura de bicapa lipídica (Acha y Szyfres, 2003), y una longitud de unos 100-300 nm y 75 nm de diámetro (Meslin y col., 1994). En la superficie de la envoltura sobresalen proyecciones en forma de espículas de naturaleza glicoprotéica (Acha y Szyfres, 2003) (Fig 1). Inicialmente se consideró que todos los virus aislados pertenecían a un tipo antigénico común, sin embargo técnicas con anticuerpos monoclonales (ACM) producidos contra proteínas virales y técnicas de secuenciación genética proporcionaron evidencias de diferencias antigénicas y genéticas (variantes) entre varios virus aislados de huéspedes animales domésticos y salvajes dentro de una región geográfica determinada (Smith y col., 1992; Smith y col., 1993).

En el género *Lyssavirus* se pueden distinguir siete líneas genéticas por pruebas de protección cruzada y por análisis de biología molecular (Fekadu y col., 1988; Baer, 1991; Bourhy y col., 1993): el virus de la rabia clásico (RABV, genotipo 1, serotipo 1), el virus del murciélago de Lagos (LBV, genotipo 2, serotipo 2), el virus Mokola (MOKV, genotipo 3, serotipo 3) y el virus Duvenhage (DUW, genotipo 4, serotipo 4). Los lisavirus del murciélago europeo (EBLV), que se subdividen en dos biotipos (EBLV1, genotipo 5 y EBLV2, genotipo 6), y el lisavirus del murciélago australiano (ABLV, genotipo 7), aislado en Australia (Hooper y col., 1997), también son miembros del género *Lyssavirus*, pero aún no se han clasificado en serotipos (OIE, 2011). Del punto de vista morfológico, se han identificado 5 proteínas estructurales en la partícula viral: una ARN polimerasa (L), una nucleoproteína (N), una proteína fosforilada (P), una proteína de la matriz (M) y una glicoproteína (G) (Fig 1) (Dietzschold y col., 2008). De éstas, interesan especialmente 2: la nucleoproteína (N) del ARN, que es un antígeno grupo - específico y la glicoproteína (G) de las proyecciones en la superficie del virión, que es la responsable de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (Acha y Szyfres, 2003). Las proteínas N, L y P forman junto con el ARN el complejo ribonucleoproteico (RNP) (Dietzschold y col., 2008).

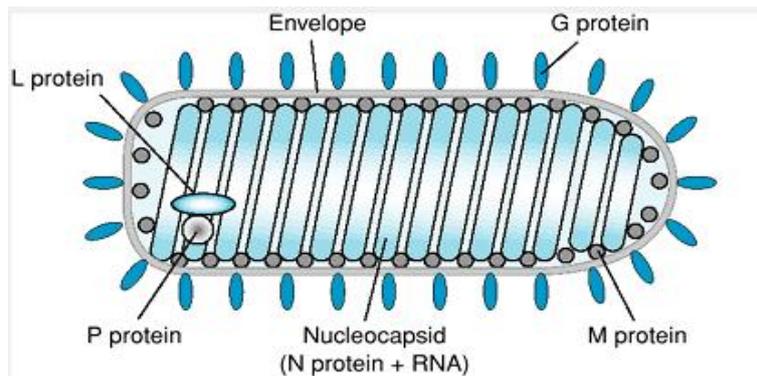


Figura 1. Diagrama del virión de Rhabdovirus. (Extraído de Lyles, D.S, Rupprecht, C.E. (2007) Volume I. Rhabdoviridae. En: Fields Virology. 5ª ed, Lippincott Williams & Wilkins. P 1363-1408)

La proteína G es el antígeno de superficie principal, capaz de inducir y reaccionar con anticuerpos neutralizantes (Cox y col., 1977; Dietzschold y col., 2008). Casi todas las principales vacunas humanas y veterinarias se basan en los aspectos funcionales de la proteína G, y el gen de la proteína G ha sido clonado y secuenciado de un gran número de *Lissavirus* (Anilionis y col., 1981; Yelverton y col., 1983; Tordo y col., 1986; Conzelmann y col., 1990; Xianhe y col., 1993). Esta glicoproteína de superficie es de los principales factores determinantes de la neuropatogenicidad del virus de la rabia (Morimoto y col., 2000), ya que son las responsables la unión específica a los receptores celulares (Finke y Conzelmann, 2005).

En cuanto a la resistencia físico-química del virus, es estable entre pH = 3,0 y pH = 11,0 y puede sobrevivir durante muchos años a -70 °C o cuando se liofiliza y se mantiene de 0 a 4 °C. Se inactiva rápidamente por desecación, exposición a rayos UV, a rayos X, a la luz del sol, a la tripsina, éter y detergentes. Compuesto de amonio cuaternario (1:5000), 45-70% alcohol, el jabón al 1%, 7.5% de solución de yodo, también inactivan el virus (Lewis y Thacker, 1974; Nandi y Kumar, 2010).

El ciclo de replicación de los Rhabdovirus es el típico de la mayoría de los virus ARN no segmentados de polaridad negativa (Lyles y Rupprecht, 2007). La infección comienza con la unión del virus a un receptor celular. Aunque varias moléculas de membrana de la superficie han sido propuestas como los receptores, incluyendo el receptor nicotínico de la acetilcolina (Lentz y col., 1982) y otras molécula de adhesión (Thoulouze y col., 1998; Tuffereau y col., 1998), todavía no está claro si estas moléculas desempeñan un papel en la replicación del virus de la rabia (Dietzschold y col., 2008). En el lado viral, la proteína G juega un papel crucial en la adsorción del virus, y es la vía más probable de interacción con los supuestos receptores celulares que facilitan la adsorción rápida (Dietzschold y col., 2008).

Después de la unión al receptor, el virus es internalizado a través de la adsorción o endocitosis mediada por estos receptores (Marsh y Helenius, 1989; Lewis y Lentz, 1998). El bajo pH del medio ambiente dentro del compartimiento endosomal, provoca un cambio conformacional en la proteína G, que induce la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma, liberando así el complejo RNP en el citoplasma (Gaudin y col., 1991).

Después de la fusión de la envoltura del virus con la membrana del endosoma, que libera los componentes internos del virión en el citoplasma de la célula huésped, se disocia de la nucleocápside la proteína M (Rigaut y col., 1991). Este paso es necesario para que ocurra la síntesis de ARN viral, porque la proteína M inhibe la transcripción viral (Carroll y Wagner, 1979; Lyles y Rupprecht, 2007). El primer paso de la biosíntesis en el ciclo de replicación es la transcripción primaria, mediada por la ARN polimerasa dependiente de ARN (Lyles y Rupprecht, 2007) (Fig 2).

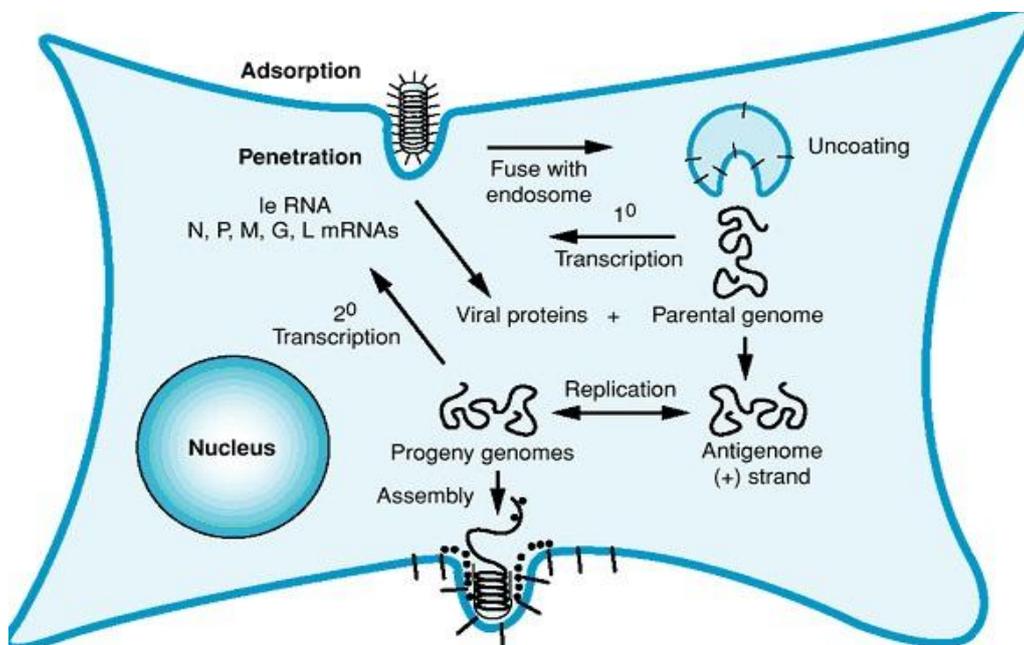


Figura 2. Diagrama del ciclo de replicación de los Rhabdovirus. Las etapas ilustradas son adsorción y penetración del virus por endocitosis, fusión de la envoltura con las membranas endosomales, liberación de la nucleocápside, transcripción primaria, replicación del genoma para producir antígenomas y genomas progenie, transcripción secundaria y el montaje por gemación de la membrana plasmática (Extraído de Lyles D.S, Rupprecht, C.E. (2007) Volume I. Rhabdoviridae. En: Fields Virology. 5ª ed, Lippincott Williams & Wilkins. P 1363-1408).

La síntesis de ARN sucede exclusivamente en el citoplasma. Una regulación precisa de la expresión de genes virales y la replicación del RNP son requisitos clave de una infección con éxito (Finke y Conzelmann, 2005).

La neuroinvasión, el neurotropismo y la neurovirulencia son las principales características que definen al virus de la rabia. La velocidad de adsorción del virus, la capacidad del virus para propagarse de forma eficiente a partir de célula a célula y la tasa de replicación son los principales factores que determinan la patogenicidad (Dietzschold y col., 2008). La eficiente propagación neuronal del virus dentro del Sistema Nervioso Central (SNC), requiere la integridad intacta de las estructuras del mismo durante casi todo el ciclo de infección (Dietzschold y col., 2008).

3.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Epidemiológicamente la rabia se clasifica en tres tipos: urbana, silvestre y desmodina. Aunque otros autores, simplifican esta clasificación y hablan de dos ciclos: el urbano y el silvestre (Favi y col., 1999). En la rabia urbana, que ocurre en las ciudades, los involucrados son principalmente los perros y en segundo término los gatos.

Es el tipo epidemiológico que más exposiciones provoca en el hombre (Amasino y col., 2002). En la rabia silvestre o salvaje, que ocurre en los bosques, zonas rurales, estepas o selvas de acuerdo a la región, los animales involucrados son los zorros, los zorrinos, mapaches, chacales, lobos, coatíes, entre otros. En este caso, la exposición humana es cuantitativamente menor (Amasino y col., 2002). La rabia desmodina, está distribuida principalmente en América del Sur y Central llegando hasta México y los transmisores son tres especies de murciélagos hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngii*, aunque las dos últimas no tienen la importancia de la primera (De Diego, 1974). Este tipo de rabia afecta principalmente a los bovinos, produciendo la rabia paresiente ya que comienza con la sintomatología de paresia y tambaleo del tren posterior, luego progresa a parálisis y posteriormente afección completa del sistema nervioso central, produciéndose en menor grado en los equinos, ovinos y esporádicamente en el hombre. En algunos casos se comprobaron exposiciones humanas, favorecidas por hábitos de dormir fuera de las viviendas en zonas calurosas, como en las primeras descripciones de rabia por vampiros en Trinidad (Hurst y Pawan, 1932).

La rabia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártida. Algunos países han puesto en práctica medidas de vigilancia y control que les han permitido erradicar la enfermedad. En otros países, sin embargo, la enfermedad sigue siendo endémica y sus principales hospedadores son los animales salvajes (OIE, 2011).

Hay rabia en más de 150 países y territorios, pero más del 95% de las muertes humanas se registran en Asia y África. Una vez que aparecen los síntomas, la enfermedad es casi siempre mortal (OMS, 2010).

Cada año mueren de rabia más de 55000 personas en todo el mundo y los perros están en el origen de más del 95% de las muertes humanas por esta enfermedad. El 40% de las personas mordidas por animales presuntamente rabiosos son menores de 15 años. Cada año más de 15 millones de personas reciben profilaxis

posexposición para evitar la enfermedad y se calcula que esto ahorra 327000 muertes anuales (OMS, 2010). La rabia canina constituye una amenaza potencial para más de 3300 millones de personas en Asia y África. El mayor riesgo lo corren quienes viven en zonas rurales donde no hay disponibilidad o facilidad de acceso a las vacunas e inmunoglobulinas humanas (OMS, 2010). La amenaza de la transmisión del virus de la rabia a los humanos a través de los perros aumenta cuando la densidad de perros supera el umbral de densidad en el que se mantiene la rabia canina. Este umbral de densidad ha sido estimado en 4,5 perros/km² (Knobel y col., 2005).

3.3. SITUACIÓN EN LA REGIÓN

Eliminar la rabia humana transmitida por perros en la Región de las Américas para el año 2005 fue una decisión tomada por todos los Estados Miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en los años ochenta. En los dos decenios que han transcurrido, los resultados confirman los grandes esfuerzos hechos por los países (OPS, 2005).

Analizando la tendencia durante el período 1990-2003, se observa que la rabia humana transmitida por las diferentes especies se redujo de 251 casos a 35 (86%) (Fig 3). Por lo tanto se estima que, en promedio, cada año dejaron de morir de rabia 18 personas en la Región ($\beta = -17,5$). Se puede observar además que la rabia humana transmitida por perros fue la que básicamente presentó esa reducción, bajando de 152 a 27 casos anuales. En la rabia humana por animales silvestres, el 75% de los casos se debe a murciélagos, y aunque varió en número, no presentó una tendencia (OPS, 2005). De 1990 a 2003, el perro ha sido la fuente de infección en el 65% de los casos humanos notificados en América latina (OPS, 2005).

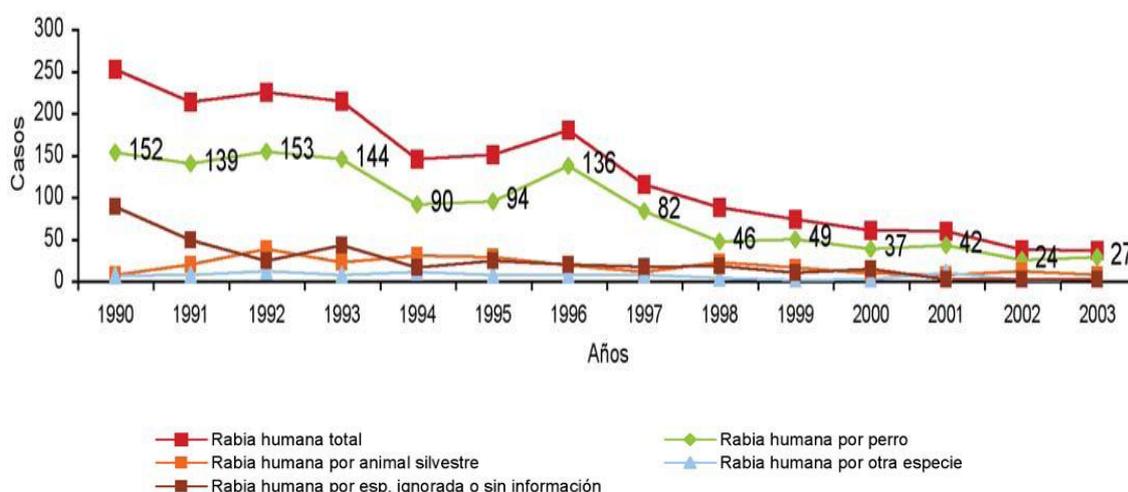


Figura 3: Tendencia de la rabia humana por especie agresora, América Latina, 1990-2003 (Extraído de Organización Panamericana de la Salud, 2005. Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: análisis de la situación. Washington D.C. PAHO. p 1-71).

Con respecto a la situación de los países más cercanos, Brasil en el período de 1990 a 2003, disminuyó el número de casos de rabia humana transmitida por perros considerablemente, pasando de 39 en 1990 a 14 en 2003. En ese período, el perro fue el animal agresor en 80% de los casos de rabia humana, seguido del murciélago en 6,5% de los casos. La rabia en éste país no tiene una distribución uniforme: la mitad de los casos ocurren en la región nordeste y todo el sur del país ha estado exento de casos humanos desde hace más de 15 años (OPS, 2005).

Por su parte, en Argentina en el período de 1990 a 2003, la incidencia de la rabia canina descendió de 57 casos en 1990 a 2 casos en 2001, con un máximo de 101 casos en 1993. En 2002 y 2003 el número de casos se incrementó debido a la reemergencia de la rabia canina en algunas ciudades de las provincias de Salta y Jujuy en la frontera con Bolivia, donde se informó de 157 casos en 2003. En 1994, ocurrió el último caso de rabia humana transmitida por perros en la provincia de Tucumán (OPS, 2005).

En Santa Cruz (Bolivia), donde la rabia es endémica y se efectúan campañas de vacunación gratuita, de 236 sueros analizados de perros vacunados, la proporción con un título de anticuerpos protectores (valor umbral de 0,5 UI/ml) fue del 58% [95% intervalo de confianza (IC): 52-65] (Suzuki y col., 2008). Por su parte en una investigación en 1987 en Perú sólo el 3% de 198 perros con 12 meses desde la vacunación tenían menos de 0,5 UI / ml de anticuerpos neutralizantes contra la rabia, el 87% tenían 1,0 UI / ml o más. Estos datos demostraron excelentes resultados obtenidos en condiciones de campo con la vacunación (Chomel y col., 1987). Sin embargo en otro trabajo realizado en el 2007 en el mismo país, luego de tres meses de una campaña de vacunación antirrábica, 32% del total de canes estuvieron protegidos adecuadamente, y el 56% del total no presentaron ningún nivel de anticuerpos (López y col., 2007). Otros trabajos en Perú mostraron niveles de protección que variaron entre el 52% y 67% (Rodríguez y Villanueva, 1993; Valderrama y col., 2004). En Colombia investigaron la respuesta inmunológica en 192 caninos entre 3 y 18 meses de edad que recibieron únicamente la primera dosis de la vacuna antirrábica, encontrando sólo 24.5% de perros protegidos (Paéz y col., 2007).

En Brasil (San Pablo y Paulinia), Almeida y col. (1997) analizaron 145 muestras de canes durante una campaña de vacunación (vacunados hacia un año en otra campaña). Luego de 30 días analizaron 114 muestras de sangre de los 145 perros anteriores. Los autores observaron que de los canes provenientes de San Pablo en la primera muestra, el 26.2% estaba protegido. Porcentaje que aumento a 64.0% en la segunda muestra extraída luego de 1 mes de la segunda vacunación. En Paulinia solo el 25.0% estaban protegidos en la primera muestra. El porcentaje aumentó a 72.7% en la segunda muestra. Por su parte en un estudio también realizado en Brasil en Campo Grande (MS), de las muestras analizadas extraídas de 333 perros, 170 (51.1%) no estaban protegidos y el restante 48.9% (163 muestras) presentaban niveles protectores (>0.5 UI/ml) (Rigo y Honer, 2006).

3.4. SITUACIÓN EN EL URUGUAY

En Uruguay los primeros casos de rabia canina datan de 1807. Las efectivas acciones de control desarrolladas por las autoridades sanitarias hicieron posible declarar al país libre de rabia en 1960 (OPS, 2005). Cuatro años después sucede una epidemia en el país con 866 animales afectados (77 % en Montevideo) y 3 humanos. El último caso de rabia humana en Uruguay fue en 1966 y el último caso de rabia canina ocurrió en 1983 en Rocha (OPS, 2005). En el año 2007, se diagnosticó por primera vez rabia pasesiente en herbívoros en el departamento de Rivera, afectando en esa oportunidad a bovinos y equinos de la zona, y la fuente de infección yacía en los murciélagos (Vitale y col., 2008). En el departamento de Rivera, en el año 2008 se hace el primer diagnóstico de Rabia en murciélagos no hematófagos. Por su comportamiento migratorio y sinantrópico, es probable que éstos lleguen a estar en contacto con perros (González y col., 2009).

Para reforzar las acciones de control, las autoridades nacionales crearon en 2001, a través de decreto, la Comisión Nacional de Vigilancia y Prevención de la Rabia y de los Accidentes por Mordedura de Animales. Con la finalidad de mejorar la vigilancia de la rabia y la denuncia de los accidentes por mordedura, en la actualización del Código Nacional sobre Enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria, efectuada en el año 2004, se han incluido como de notificación obligatoria tanto la rabia animal como las personas mordidas (OPS, 2005).

En el Uruguay, si bien se recomienda la vacunación en perros y gatos a nivel veterinario, la misma no es obligatoria, siendo esta una práctica limitada que no cubre a todos los animales que pudieran estar expuestos al virus, y las revacunaciones en los animales vacunados pueden no realizarse en la forma que corresponde. No existen controles oficiales que se realicen a los animales para saber si realmente están protegidos contra la enfermedad, no existiendo antecedentes de estudios sobre la cobertura de vacunación ni del estatus inmunológico en las especies que configuran el mayor riesgo para la Salud Pública.

3.5. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

Los huéspedes animales que mantienen el virus rábico en la naturaleza son los carnívoros y los quirópteros. Los herbívoros y otros animales no mordedores, los roedores y los lagomorfos no desempeñan ningún papel como reservorios. El perro es el principal vector de la rabia urbana y es el responsable de más del 95% de todos los casos de rabia humana en el mundo (Acha y Szyfres, 2003).

Aunque hay varias vías de transmisión del virus de la rabia, la infección natural con más frecuencia se produce a través de mordeduras (Dietzschold y col., 2008). La infección se transmite de un perro a otro y del perro al hombre y a otros animales domésticos por medio de ésta vía. El virus aparece en saliva a los 2, 3 y a hasta 13 días antes del comienzo de la enfermedad y la eliminación del agente por esa vía

puede continuar hasta la muerte del animal. No todos los perros infectados eliminan el virus por saliva y en consecuencia algunas mordeduras no son infectantes. Se estima que cerca del 60 al 75% de los perros rabiosos eliminan el virus por saliva (Acha y Szyfres, 2003). El riesgo de transmisión aumenta cuando la mordedura se produce en la cara, el cuello o las manos y disminuye cuando se trata del tronco y extremidades inferiores (Acha y Szyfres, 2003).

Se ha demostrado que el virus también puede penetrar por conjuntiva y otras mucosas (Anderson y col., 1984). Pero los casos donde la fuente de infección fueron abrasiones, rasguños o lamedura de heridas y no mordeduras, son raros (Fishbein y Robinson, 1993).

Han sido descritos casos donde la transmisión de la rabia ocurrió a través del contacto con carne de animales infectados (Crandell, 1991; Tariq, 1991). Por ejemplo en China, existen casos de rabia humana reportados donde aparentemente el virus fue contraído a partir de la ingestión de carne de perros infectados. Esta ruta de transmisión ha sido documentada en animales anteriormente (Abdussalam y Botton, 1974; Kureishi y col., 1992).

Finalmente, se ha sugerido la transmisión del virus exhalado o excretado como forma de propagación entre animales en colonias de murciélagos (Huck y col., 1969; Gibbons, 2002). Existen casos reportados de rabia en humanos transmitidos por aerosoles en accidentes de laboratorio (CDC, 1972; CDC, 1977) y en contacto con grandes colonias de murciélagos (Constantine, 1962; Davis y col., 2007).

3.6. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA RABIA CANINA

La entrada del virus de la rabia se produce a través de heridas o por contacto directo con las mucosas, no pudiendo atravesar la piel intacta (WHO 2004). El virus de la rabia al ser inoculado por vía subcutánea o intramuscular, como sucede en las mordeduras, se replica en forma local en los miocitos que amplían la diseminación a las uniones neuromusculares y ejes neurotendinosos. Puede persistir y replicarse en el sitio de la inoculación durante un periodo variable de horas a semanas (Charlton y Casey, 1979; Charlton y col., 1987; Green y Dreesen, 1993). Durante el período de incubación, el virus puede residir en la periferia, puede permanecer secuestrado dentro de las neuronas o puede persistir en los macrófagos (Ray y col., 1995).

Se disemina por flujo retrogrado (centrípeto) del lugar de inoculación al sistema nervioso central por el axoplasma de los nervios periféricos (WHO 2004). El virus puede replicarse en el tejido muscular (Murphy y col., 1973; Charlton y Casey, 1979; Fekadu y col., 1992) antes de avanzar en el tejido nervioso periférico a través de las conexiones neuromusculares. La mortalidad puede reducirse drásticamente cuando los miembros infectados se cauterizan o son amputados (Baer y Cleary, 1972). Los periodos de transporte al sistema periférico en los perros infectados y en humanos

por lo general requieren un mínimo de 21 días, pero esto depende de la edad del individuo mordido, grado de inervación del sitio de la mordida, distancia del punto de inoculación a la médula espinal o al cerebro, cepa y cantidad de virus que se introdujo, tratamiento posexposición, etc (Green y Dreesen, 1993). Después de la entrada al nervio periférico, el virus se mueve dentro de los axones hacia el SNC a una tasa estimada de 3 mm/h (Murphy y col., 1973; Tsiang, 1978). Luego que el virus inicia su avance en el sistema nervioso central, por lo general en médula espinal, su progreso al cerebro es rápido. La diseminación interneuronal corresponde al avance de los signos clínicos (Green y Dreesen, 1993). El neurotropismo es la principal característica asociada a la infección natural, con la replicación viral casi exclusivamente restringida a las neuronas (Harrison y Murphy, 1978; Watson y col., 1981; Lentz y col., 1982). La infección se disemina y afecta las neuronas contralaterales y asciende en forma bilateral en la médula espinal o tallo cerebral al prosencéfalo, tal vez por la vía del líquido cefalorraquídeo (LCR) (Schneider, 1975; Green y Dreesen, 1993). El daño a las neuronas motoras causa lesiones progresivas en los nervios motores bajos que a cambio producen la parálisis flácida típica de la enfermedad y parálisis ascendente. La respuesta inmune del huésped puede acentuar la inflamación y degeneración del tejido nervioso. Una vez que el virus llega al cerebro, se extiende centrifugamente a una variedad de órganos.

La difusión a las glándulas salivales por los pares craneanos, representa la última fase de la infección e indica daño cerebral. Esto es importante para la transmisión de animal a animal y del animal al hombre. El virus puede encontrarse en las glándulas salivales de la mayoría de los zorros, mapaches, zorrillos y los perros infectados (Winkler, 1975; Charlton y col., 1984; Winkler y col., 1985; Baer y Wandeler, 1987; Green y Dreesen, 1993). Gran parte de los virus se multiplican en las células acinares mucogénicas y se liberan en la saliva por el flujo de secreción normal (Murphy, 1985). En las glándulas salivales se han comprobado títulos víricos más altos que en el cerebro y también se han hallado títulos altos en los pulmones (Acha y Szyfres, 2003). Esto indicaría que el agente puede multiplicarse fuera del sistema nervioso central. En la mayoría de los casos, la eliminación por la saliva se inicia con el comienzo de la enfermedad, pero en muchas especies se ha comprobado la aparición del agente antes de que se manifestaran los síntomas clínicos. En perros se pudo detectar el virus de 1 a 3 días antes de manifestarse la enfermedad y en algunos casos con 14 días de anterioridad (Acha y Szyfres, 2003).

La infección clínica por el virus de la rabia se divide en forma clásica en tres etapas principales: prodrómica, furiosa y paralítica (Lackay y col., 2008). La fase prodrómica en perros dura por lo general de 2 a 3 días y se observa aprensión, nerviosismo, ansiedad, aislamiento y fiebre variable. Hay dilatación pupilar con o sin pesadez palpebral o reflejos corneales (Green y Dreesen, 1993). En la etapa furiosa los perros se muestran con un cambio de conducta: se esconden en rincones oscuros o muestran una agitación inusitada y dan vueltas intranquilos. Los perros se vuelven peligrosamente agresivos, con tendencia a morder objetos, animales y al hombre,

incluso se muerden a sí mismo infligiéndose graves heridas. La salivación es abundante ya que el animal no deglute la saliva debido a la parálisis de los músculos de deglución, y hay una alteración del ladrido por la parálisis parcial de las cuerdas vocales, con un aullido ronco y prolongado (Acha y Szyfres, 2003). En la fase muda o paralítica se observa parálisis de los nervios motores posteriores que suele progresar del sitio de la herida hasta afectar todo el SNC (Green y Dreesen, 1993). El curso de la enfermedad se extiende de 1 a 11 días. En la fase terminal de la enfermedad, con frecuencia se pueden observar convulsiones generalizadas y luego incoordinación muscular y parálisis de los músculos del tronco y de las extremidades (Acha y Szyfres, 2003). La clasificación en prodrómica, furiosa y paralítica muchas veces no se logra ver, ya que el progreso de la infección es variable y con frecuencia se ven signos atípicos. No todos los animales sufren todas las etapas clínicas y se describen infecciones subclínicas, crónicas y recuperaciones (Green y Dreesen, 1993).

3.7. IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA

Alrededor de 55000 personas mueren cada año debido a la rabia urbana, y son más de 3 billones los que se encuentran en riesgo de infección con el virus en más de 150 países. Más del 99% de todas las muertes humanas por rabia ocurren en países en desarrollo y la enfermedad no ha sido controlada en la mayoría de los países afectados. Un factor importante en el bajo nivel de compromiso político para el control de la rabia es una falta de datos precisos sobre el verdadero impacto de la enfermedad en la salud pública. Se sabe que el número de muertes humanas reportadas oficialmente en los países en desarrollo subestima la verdadera incidencia de la enfermedad (WHO 2004) al igual que los más de 27000 casos de rabia animal que se informan anualmente en el mundo. Se sabe que la cantidad estimada de casos reales es mucho mayor (Zeidner, 1990).

La mayoría de las muertes humanas (más del 90%) son debidas a transmisión desde perros infectados, siendo un 30-60% de las víctimas de mordeduras de perros, menores de 15 años (OPS, 2005) y un 40% de los tratamientos profilácticos posexposición se administran a niños de 5 a 14 años, siendo en su mayoría varones (OMS, 2010). A pesar del desenlace fatal de la enfermedad, la rabia se mantiene en las ciudades por la presencia de una porción importante de perros susceptibles. La gran densidad de perros y su alta reproducción anual son factores importantes en las epizootias de rabia canina en América Latina (Acha y Szyfres, 2003).

La rabia canina constituye una amenaza potencial para más de 3300 millones de personas en Asia y África. El mayor riesgo lo corren quienes viven en zonas rurales donde no hay disponibilidad o facilidad de acceso a las vacunas e inmunoglobulinas humanas. Los pobres corren mayor riesgo, puesto que el costo medio de la profilaxis posexposición tras el contacto con un animal presuntamente rabioso, es de US\$ 40 en África y US\$ 49 en Asia, donde los ingresos diarios medios son de aproximadamente US\$ 1-2 por persona. Se calcula que la rabia causa 20000 muertes al año en la India (esto significa, aproximadamente 2 de cada 100000

personas en riesgo); en África, la cifra correspondiente es de 24000 (aproximadamente 4 de cada 100000 personas en riesgo) (OMS, 2010).

También están en riesgo todas las personas con exposición continua o frecuente o con un aumento de la probabilidad de exposición debido a la naturaleza de su ocupación o lugar de residencia. Los viajeros que pasen mucho tiempo al aire libre en zonas rurales de alto riesgo donde el acceso inmediato a la atención médica apropiada sea limitado, también se deben considerar en riesgo, con independencia de la duración de la estancia. Los niños que viven en zonas afectadas por la rabia o las visitan corren un riesgo especialmente alto (OMS, 2010).

Debido al alto costo de las vacunas derivadas de cultivo celular, muchos países todavía utilizan las vacunas producidas en ovejas y cabras o ratón lactante. La estabilidad y el bajo costo de producción en masa de nuevas tecnologías, como las vacunas de ADN, hacen que esta pueda ser ideal para los países en desarrollo (Lodmell y col., 1999).

3.8. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico de la rabia sobre la base de criterios clínicos por sí sola es difícil y poco fiable, excepto en humanos cuando existen signos clínicos específicos como hidro o aerofobia (Rupprecht y Hemachudha, 2004). Algunos cambios característicos en el SNC incluyen la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma de las neuronas (Negri, 1903). Estos cuerpos de inclusión son llamados Corpúsculos de Negri y son masas eosinofílicas que miden de 1 a 30 nm de diámetro. Los corpúsculos de Negri pueden ser no muy evidentes, y pueden confundirse con otras inclusiones.

Para aislar el virus de la rabia se recomienda usar células de neuroblastoma murino (Zanoni y col., 1990), que son más susceptibles que cualquier otro tipo de células. El aislamiento en este tipo de células es por lo menos tan eficiente como la inoculación de ratones y el resultado puede obtenerse en 2 días en lugar de 10 a 15 días necesarios en la inoculación de ratones (Rudd y Trimarchi, 1989; Acha y Szyfres, 2003). Una vez aislado se puede tipificar con anticuerpos monoclonales (Acha y Szyfres, 2003). La prueba de elección para el diagnóstico de rabia es la inmunofluorescencia directa en tejidos nerviosos, que resulta rápida, muy sensible y específica (Acha y Szyfres, 2003; Lackay y col., 2008; OIE, 2011). Se añade una gota de inmunoglobulina purificada, previamente conjugada con isotiocianato de fluoresceína, a un frotis de tejido cerebral fijado con acetona, a ser posible hecho de varias partes del tronco encefálico. La inmunofluorescencia proporciona un diagnóstico fiable en el 98–100% de los casos si se usa un conjugado potente (OIE, 2011). Una ventaja de esta prueba es que también se puede realizar mientras el paciente o animal rabioso está aún con vida, para esto se utilizan frotis de impresiones corneales, raspado de mucosa lingual, tejido bulbar de folículos pilosos y corte cutáneos congelados. Sin embargo la sensibilidad de esta prueba en estas condiciones es limitada. Aunque el resultado positivo confirma el diagnóstico, un resultado negativo no excluye la posibilidad de la infección (Acha y Szyfres, 2003).

La inoculación intracerebral de ratones para aislar el virus sigue siendo una de las pruebas más útiles para el diagnóstico de la rabia en muchos países. Se inoculan intracerebralmente ratones recién nacidos o de 3–4 semanas con un inóculo de muestra similar y se mantienen en observación durante 28 días. Para cualquier ratón que muera entre los 5 y los 28 días después de la inoculación debe confirmarse la causa mediante inmunofluorescencia (OIE, 2011). Se recomienda el empleo de ratones lactantes, ya que son más sensibles que los animales de mayor edad (Acha y Szyfres, 2003). La inoculación de los ratones con tejido fresco o fresco homogeneizado es una prueba para confirmar la rabia pero no se usa de rutina en casos sospechosos (Green y Dreesen, 1993). Esta prueba rinde los mejores resultados si se combina con la inmunofluorescencia (Acha y Szyfres, 2003). La OMS y la OIE recomiendan la inoculación de ratones como confirmación de resultados negativos (Koprowski, 1973; Webster y col., 1976; OIE, 2011).

Recientemente se ha desarrollado un test rápido y directo de inmunohistoquímica, que es similar a la prueba de inmunofluorescencia directa. Se usan impresiones de cerebro que son fijadas al 10% de formalina. La sensibilidad y especificidad de esta prueba es equivalente a la inmunofluorescencia directa (Lembo y col., 2006).

Por otro lado en los países en desarrollo sigue siendo útil el examen microscópico de los corpúsculos de Negri para el diagnóstico. Es un procedimiento simple, rápido y económico, aunque es el método menos sensible. La detección de los corpúsculos de Negri mediante las tinciones de Sellers, May-Grünwald, Mann u otra técnica, asegura el diagnóstico, pero no se puede excluir la posibilidad de la infección cuando no se encuentran esas inclusiones (Acha y Szyfres, 2003). Su importancia ha disminuido con el advenimiento de nuevas técnicas diagnósticas de anticuerpos fluorescentes específicas o técnicas de inmunohistoquímica (Knipe y Howley, 2007).

La reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) es un nuevo método desarrollado para el diagnóstico de rabia (Sacramento y col., 1991; Paéz y col., 2002; WHO 2007). RT-PCR es usado cuando las muestras son de tamaño pequeño, por ejemplo de saliva y fluido espinal. El ARN viral es amplificado con primers usualmente diseñados para el gen N, el gen más conservado en el virus de la rabia (Lackay y col., 2008). Esta prueba es tan rápida como la inmunofluorescencia directa y es tan sensible como la inoculación viral (Macedo y col., 2006). Si este método se combina con la secuenciación, se puede utilizar para la diferenciación de las variantes del virus de diferentes especies animales (Sacramento y col., 1991; Tordo y Sacramento, 1996; Crepin y col., 1998).

Las pruebas de neutralización de los virus en cultivos celulares son las prescritas para el comercio internacional y las más utilizadas para evaluar la respuesta a la vacunación de animales. La determinación de anticuerpos neutralizantes se realiza mediante la técnica de Inhibición de Focos Fluorescente (RFFIT) que consiste brevemente en hacer diluciones seriadas de los sueros 1:5 a 1:625 y enfrentarlos a una dosis de virus constante. Luego de una incubación, se agregan una suspensión de células y se incuban a 37 °C. Luego las células son teñidas por la técnica de inmunofluorescencia directa y observadas al microscopio de fluorescencia. Los

resultados se expresan en Unidades Internacionales o en unidades equivalentes relativas a un antisuero estándar internacional (OIE, 2011).

Por último, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), es otra técnica que fue desarrollada inicialmente para la valoración de anticuerpos. La técnica fue aplicada luego a la cuantificación del antígeno de la rabia (WHO, 2005). ELISA es una prueba rápida (aproximadamente 4 horas) que no requiere utilizar virus vivos para determinar si los perros y gatos vacunados presentan seroconversión. La sensibilidad y especificidad de cualquiera de los kits usados debería determinarse por comparación con los métodos de neutralización vírica. El ELISA se acepta como prueba prescrita para el desplazamiento internacional de perros y gatos con tal de que se emplee un kit que haya sido validado y aceptado por el Registro de la OIE como adecuado a esos propósitos (OIE, 2011). Estas técnicas son también útiles para el seguimiento en las campañas de vacunación en poblaciones de animales silvestres siempre que el kit empleado se haya validado para la especie silvestre estudiada (OIE, 2011).

En cuanto al tratamiento, la administración eficaz de inmunoglobulinas poco después de la exposición (en los días siguientes, y cuanto antes mejor), puede prevenir la aparición de síntomas y la muerte. La prevención posexposición consiste en el tratamiento local de la herida, la administración de inmunoglobulina antirrábica (si está indicada) y la vacunación inmediata (Johnson y col., 2010).

Un medio de protección eficaz consiste en eliminar el virus de la rabia del lugar de la infección con métodos químicos o físicos. Por consiguiente, resulta muy importante proceder rápidamente al tratamiento local de todas las mordeduras y arañazos que puedan estar contaminados por el virus de la rabia. Los primeros auxilios recomendados consisten en el lavado inmediato y concienzudo de la herida durante un mínimo de 15 minutos con agua y jabón, detergente, povidona yodada u otras sustancias que inactiven al virus de la rabia (OMS, 2010).

3.9. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR

La virulencia del virus de la rabia depende de varios factores, tales como su capacidad para evitar la muerte prematura de las neuronas infectadas y su propiedad de evadir la respuesta inmune (Chopy y col., 2011).

Diferentes mecanismos han sido propuestos para explicar una deficiente respuesta inmune (Johnson y col., 2010). El bajo nivel de respuesta que a menudo se ve en víctimas de la rabia es desconcertante, ya que no se puede explicar por una débil inmunogenicidad de los antígenos. De hecho, la proteína G y la nucleocápside son potentes antígenos cuando se administra por vía parenteral (Dietzschold y col., 2003). La infección en el SNC induce inmunosupresión (Wiktor y col., 1977; Torres-Anjel y col., 1988; Camelo y col., 2001), limitando la infiltración de linfocitos T hacia el sistema nervioso (Roy y Hooper, 2008) y la hermeticidad de la barrera hematoencefálica permanece cerrada (Phares y col., 2006; Roy y Hooper, 2007). Estas son algunas de las explicaciones para el bajo grado de respuesta inmune

frente a la rabia en pacientes humanos o animales. Además se ha propuesto que el virus de la rabia utiliza una estrategia que incluye la destrucción de células T CD8 migratorias a través de la sobre expresión de proteínas inmunoevasivas como B7-H1 (Baloul y col., 2004; Lafon, 2004; Lafon, 2008). La B7-H1 (también conocida como PD-1 ligando y CD274) es interferón (IFN) inducible y se expresa por lo general por las células inmunes, que contribuye a la proliferación, la producción de citoquinas y la actividad citolítica (Schreiner, 2004; Greenwald y col., 2005; Chopy y col., 2011).

Durante su migración por el sistema nervioso, el virus de la rabia activa el sensor inmune innato RIG-I y probablemente también el MDA-5 (Hornung, 2006; Faul, 2010), induciendo la producción de IFN tipo I y respuestas inflamatorias en las células infectadas, lo que podría ser responsable de un ambiente desfavorable para el virus y desencadenar una respuesta inmune eficiente (Faul, 2010). Como la mayoría de los virus, la rabia ha desarrollado una estrategia para contrarrestar el efecto antiviral del IFN tipo I (Ito, 2010; Masatani, 2010). A pesar de todos estos mecanismos y de la respuesta inmune generada, el virus infecta con éxito el sistema nervioso (Chopy y col., 2011).

El virus de la rabia es conocido por su marcada sensibilidad al IFN y por lo tanto debe codificar los mecanismos que impiden la expresión del mismo. Recientemente se atribuyó esto a la actividad de la proteína P (Brzózka y col., 2005; Finke y Conzelmann, 2005). Hay muy poca información disponible sobre la respuesta inmune en los animales infectados de forma natural (Nandi y Kumar, 2010). No es seguro si la saliva del animal rabioso juega un papel inmunomodulador que permite al virus eludir la respuesta inmune del huésped, pero las glándulas salivales y homogeneizados de cerebro han demostrado ser inmunosupresores (Nandi y Kumar, 2010).

Los estudios experimentales han demostrado que la respuesta inmune y la inmunosupresión son posibles en gran medida influenciada por la cepa, la dosis y vía de inoculación (Nandi y Kumar, 2010). En ratones que fueron expuestos a la infección, los anticuerpos específicos del virus se detectaron por primera vez a los 4 a 6 días después de la infección experimental, alcanzando los niveles máximos dos semanas después de la infección (Lodmell y Ewalt, 2004). En humanos la respuesta inmune no es detectable hasta 7-10 días después de la aparición de los signos clínicos (Hattwig y Gregg, 1975). En los animales que sobreviven a la infección los títulos de anticuerpos se mantienen altos, mientras que en los ratones que murieron se aprecia una depleción de células B y T en el bazo y en el timo (Tuffereau y col., 1989; Nandi y Kumar, 2010).

La infección experimental en ratones transgénicos (deficientes en células T) ha demostrado que la rama celular del sistema inmune es muy importante. Lo mismo sucede tras la vacunación en el hombre, a través de ensayos de proliferación de linfocitos *in vitro* (Woldehiwet, 2002). La respuesta inmune mediada por células, se puede detectar durante un período prolongado después de la vacunación (Nandi y

Kumar, 2010). Los linfocitos T citotóxicos y células T helper específicos para epítopes de la glicoproteína viral o ribonucleoproteína del virus, se han detectado en la sangre periférica de animales infectados y en seres humanos vacunados (Nandi y Kumar, 2010). Los ratones que son naturalmente resistentes a los virus de la rabia, se vuelven susceptibles si hay un agotamiento de las células CD4+, pero la depleción de las células CD8+, no muestra ningún efecto (Perry y Lodmell, 1991).

Los anticuerpos inducidos por la vacunación, especialmente aquellos con actividad neutralizante, desempeñan un papel destacado en la defensa inmune contra la infección (Hooper y col., 1998). En raras ocasiones la inmunidad también puede ser adquirida de forma natural después de múltiples exposiciones al virus (Follmann y col., 1994). La proteína G representa el único antígeno que induce y reacciona con anticuerpos neutralizantes del virus y es capaz de conferir inmunidad frente a un desafío letal de la infección (Cox y col., 1977; Dietzschold y col., 2008). La capacidad de inducir anticuerpos depende de la estructura intacta secundaria y terciaria de la proteína G (Dietzschold y col., 1982; Wunner y col., 1985).

Por otro lado, el complejo RNP demostró ser el antígeno capaz de inducir una respuesta de células T CD4+ que pueden aumentar la producción de anticuerpos neutralizantes a través del reconocimiento de antígenos intraestructurales. El complejo RNP desempeña un rol importante en el establecimiento de la memoria inmunológica y la inmunidad de larga duración (Dietzschold y col., 2008). Un hallazgo interesante es que las células T citotóxicas no parecen desempeñar un papel en la protección y la realidad puede ser perjudicial para el huésped (Johnson y col., 2010).

3.10. VACUNACIÓN Y NIVELES DE ANTICUERPOS PROTECTORES

La vacunación es la estrategia de control más importante para interrumpir la circulación del virus en la población canina (OPS, 2005). Muchas vacunas eficaces contra la rabia canina se encuentran disponibles y la observación empírica y de modelos de transmisión de la rabia indican que puede ser erradicada si el 70% de la población de perros fue vacunada varias veces (Coleman y Die, 1996; Kayali y col., 2003). La rabia canina, y en consecuencia la exposición humana a la rabia, puede controlarse mediante la vacunación masiva del reservorio animal cuando los dueños de los perros están dispuestos a cooperar. Sin embargo, los perros inaccesibles sin dueños, reducen la cobertura de vacunación lograda en las campañas de vacunación parenteral (Kayali y col., 2003). La eliminación de estos animales para reducir la población de vectores, ya no se recomienda como una estrategia contra la rabia por la OMS (WHO, 1992; Kayali y col., 2003), debido a que disminuye la inmunidad de grupo (Matter y col., 1995). En América Latina se vacunan anualmente cerca de 44 millones de perros (en 2003 se vacunaron 43.616.634 perros). Gran parte de este número de animales vacunados corresponde al Brasil (17 millones) y México (16 millones), que son los países con mayor población canina en la región y tienen excelentes coberturas vacunales (Fig 4). La recomendación establecida en los años ochenta por el Programa Regional para la Eliminación de la Rabia era vacunar a 80% de la población canina estimada (OPS, 2005).

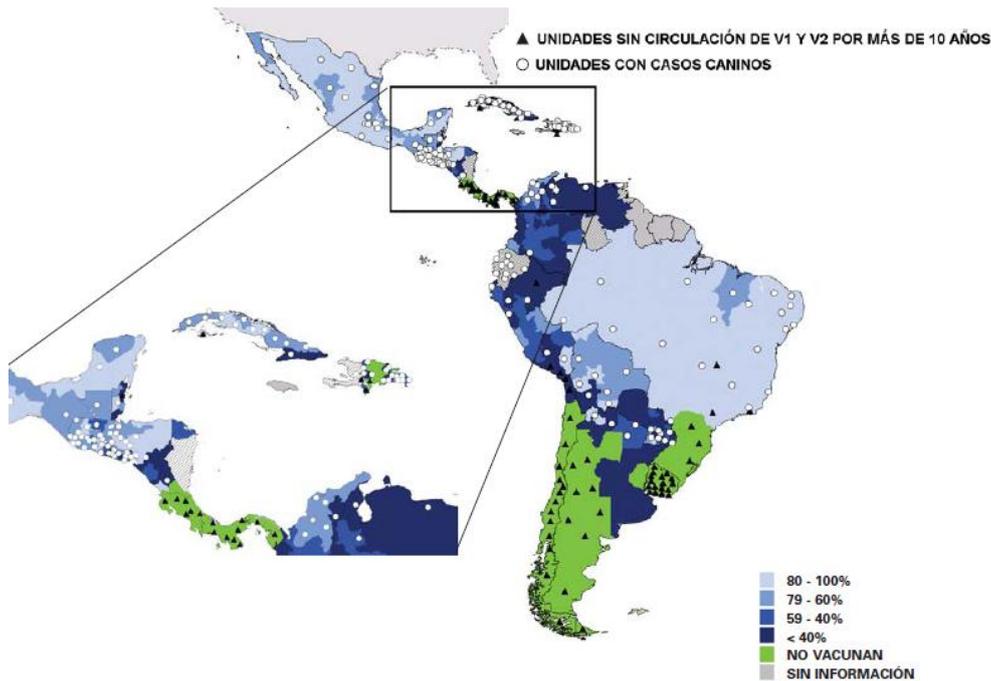


Figura 4: Cobertura de la vacuna en América Latina 2001-2003. (Extraído de Organización Panamericana de la Salud, 2005. Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: análisis de la situación. Washington D.C. PAHO. p 1-71)

El virus de la rabia ha sido agrupado en virus calle y en virus fijo. El virus calle es derivado del que existe en la naturaleza, en los casos de origen natural y el virus fijo son cepas del virus que ha sido adaptado por varios pasajes intracerebrales en conejos de laboratorio. Las cepas de virus fijo son las utilizadas en la producción de vacunas (Nandi y Kumar, 2010). Las vacunas convencionales utilizadas actualmente para la vacunación de seres humanos, animales domésticos y animales de vida libre se derivan del virus fijo de genotipo 1 y del serotipo 1. Esas vacunas ofrecen una protección excelente contra el virus de la rabia clásico, pero no puede conferir una buena protección contra el serotipo 2, 3, 4 y 6 (Hanlon y col., 2005; Nandi y Kumar, 2010).

Los principios que rigen la preparación de las vacunas inactivadas contra la rabia son idénticos a los vigentes para las que se usan en humanos o en animales, aunque en las vacunas para animales se puede añadir adyuvantes (OIE, 2011). También resultan eficaces las vacunas recombinantes (por ejemplo, glicoproteína recombinante del virus de la rabia expresada en poxvirus) (Kieny y col., 1984; Brochier y col., 1991). Las vacunas vivas y las recombinantes son eficaces en los animales por vía oral y pueden distribuirse en cebos para inmunizar animales salvajes (o domésticos). Las mismas deben proporcionar una protección inmunitaria durante al menos 1 año (OIE, 2011).

Para evaluar la respuesta inmune generada por estas vacunas, las técnicas más empleadas actualmente son la *Rapid fluorescent focus inhibition test* (RFFIT) y algunos kits comerciales de ELISA, avalados por la OIE. Según recomendaciones de la OMS, se considera que un título mínimo de anticuerpos de 0,5 UI por ml representa un nivel de inmunidad que se corresponde con la capacidad de protección frente a la infección por la rabia (WHO, 1985; OIE, 2011). Se recomienda vacunar al animal cuando es joven pero con no menos de 3 meses de edad en el caso de los perros (Nandi y Kumar, 2010). La vacunación primaria puede ser de una sola inyección (vacunas vivas atenuadas) o dos inoculaciones de 1 mes de separación. Luego las vacunas son de periodicidad anual, semestral o administradas cada 3 años para aumentar su inmunidad en función de la eficacia de la vacuna (Hanlon y col., 2005).

En Uruguay las vacunas de rabia autorizadas en caninos y felinos son inactivadas, por razones de seguridad. Estas pueden adquirirse en el mercado interno como vacunas monovalentes o como vacunas polivalentes. Las vacunas monovalentes contienen solo el virus inactivado de la rabia, mientras que las vacunas polivalentes vienen con un componente liofilizado y otro en suspensión, que al momento de administrar, antes se debe reconstituir. El componente liofilizado presenta cepas atenuadas de hepatitis, Distemper y Parvovirus canino. El componente en suspensión contiene virus inactivado de rabia y algunos serovares de *Leptospira*. Todas las marcas comerciales de vacunas utilizadas son elaboradas a partir de virus inactivado de la Rabia, cepa Pasteur (V.P.) o cepa V.P-12. La mayoría son propagadas en células BHK21, inactivadas con etilénimina binaria (BEI), purificadas y concentradas por filtración molecular y adsorbida en gel de hidróxido de Aluminio. La dosis utilizada en cualquiera de ellas es de 1 ml por animal que equivale a una potencia de 1 U.I por animal. La dosificación varía si la vacuna es monovalente o polivalente. Para las vacunas monovalentes se debe dar una dosis a las doce semanas de edad de vida del animal. Revacunar a los 21 a 30 días y luego cada un año. Para las vacunas polivalentes se administra el inyectable a partir de los tres meses de edad y luego cada un año se revacuna.

4.11 EFECTOS DE LOS CORTICOIDES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE

Los glucocorticoides poseen una potente actividad antiinflamatoria e inmunosupresora, inhibiendo la producción de factores proinflamatorios como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Robinson y Badwey, 2002; Schwiebert y col., 1996). Inhiben la migración de leucocitos y la producción de procolágeno y mucopolisacáridos en los fibroblastos y condrocitos, afectando así el proceso de reparación tisular. Por el efecto en cascada de los glucocorticoides, ellos tienen la capacidad de modular una amplia gama de procesos antiinflamatorios que son independientes de la causa original. Sin embargo la inhibición de estos procesos inflamatorios, pueden también causar la supresión de las funciones inmunes. Esto genera una preocupación importante, ya que las enfermedades infecciosas se

desarrollan más frecuentemente durante tratamientos con glucocorticoides como resultado de una inmunosupresión (Matsumoto y col., 2001).

Los corticoides reducen el número de polimorfonucleares (PMNs), linfocitos y monocitos, y disminuyen la capacidad de liberar histamina por parte de los basófilos y mastocitos. Reducen también la actividad de los macrófagos y la liberación de metabolitos tóxicos del oxígeno por lo macrófagos y neutrófilos, inhibiendo también la síntesis y la secreción de varias citoquinas como por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF) y GM-CSF. Actúan tanto a nivel de la respuesta inmune innata como la adaptativa, y tanto en la respuesta humoral y celular (Schwiebert y col., 1996).

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en sangre y su activa participación en la respuesta inmune innata es bien conocida. Sin embargo cuando los glucocorticoides son usados como parte de una terapia farmacológica, los efectos inmunosupresores sobre los PMNs (estudiados tanto *in vivo* como *in vitro*) son considerados indeseables (Yoshida y col., 1997). La acción supresora sobre estas células varía según el corticoide utilizado en la terapia farmacológica, pero esencialmente se ha visto que puede actuar ya sea en el comportamiento migratorio de los neutrófilos (Aglas y col., 1997), en la expresión de moléculas de adhesión (Burton y col., 1995), y en el reclutamiento o interacción con células del endotelio vascular (Vainer y Nielsen, 2000). Estos estudios están basados en ensayos con glucocorticoides, prednisolona, dexametasona y metil prednisolona, teniendo todos efectos supresores sobre las funciones de los neutrófilos, dependiendo de la dosis utilizada (Llewellyn-Jones y col., 1994).

4.12 EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE *Escherichia coli* y *Proponibacterium granulorum*

Los inmunoestimulantes son sustancia de origen biológico o químico usadas para estimular la respuesta inmune. Los efectos buscados están relacionados principalmente en producir una respuesta inmune más intensa y efectiva contra patógenos. Se utilizan por ejemplo para incrementar la respuesta inmune específica celular y humoral, luego de la vacunación contra agentes específicos. Además también se ha utilizado para disminuir los efectos inmunosupresores producidos por estrés o patógenos que interfieren en el funcionamiento del sistema inmune o que producen infección permanente (Quinn, 1990).

El mecanismo de acción de los inmunoestimulantes aún no están del todo claro, pero se han comprobado y propuesto varias hipótesis para explicar el funcionamiento de algunas de estas sustancias. Varias formas de acción de los inmunomoduladores, están basadas en la alteración que producen en la actividad de las células inmunes, cambios en la expresión genética, procesamiento del RNA mensajero, transporte intracelular de proteínas, síntesis proteica y la secreción y expresión de proteínas en la superficie celular lo cual induce cambios celulares que

pueden influir en el inicio y regulación de la respuesta inmune (Quinn, 1990; Pell y Astonb, 1995). En muchos casos se ha observado que la acción de los inmunomoduladores está relacionada con el mecanismo y equilibrio del adenisina-monofosfato cíclico (cAMP) y la guanina-mono fosfato cíclico (cGMP). Se ha demostrado que el aumento de los niveles de cAMP inhibe la función efectora de los linfocitos lo que conlleva a una inmunosupresión, mientras que altos niveles de cGMP promueve un incremento de la actividad de los linfocitos maduros lo que se traduce en una inmunoestimulación (Quinn, 1990).

El *Propionibacterium granulosum* y los lipopolisacáridos (LPS), solo o combinados, están presentes en productos comerciales cuya acción sobre el sistema inmune ha sido parcialmente estudiada (Gallego-Olivella y col., 1997). Estos compuestos se han utilizado en especies como el cerdo, disminuyendo los efectos adversos de la inmunodepresión causada por enfermedades víricas como la enfermedad de Aujeszky y la Peste porcina clásica, así como para reducir las lesiones, morbilidad y mortalidad causada por la neumonía enzoótica porcina (Markowska-Daniel y col., 1993).

El LPS está compuesto por una cadena de oligosacáridos – polisacáridos y el lípido A, los cuales son, estructuralmente, similar en todas las especies de bacterias gram negativas (Sunwoo y col., 1996). Diversos autores han comprobado los efectos que el LPS produce sobre el sistema inmunitario. Sus efectos inmunoestimulantes dependen básicamente del lípido A, el cual está constituido por una estructura de monosacáridos y disacáridos así como de ácidos grasos (Alving, 1993). El LPS aplicado parenteralmente, deja rápidamente el torrente sanguíneo y se acumula en los macrófagos donde se unen a su receptor, CD14. Luego se produce la fosforilación y activación de determinada proteína kinasa, así como el aumento en los mecanismos de transducción de señal, lo que produce la estimulación de las funciones de los macrófagos y la secreción de citoquinas por parte de éstos (Alving, 1993). En medicina humana se ha utilizado el lípido A como adyuvante para incrementar la respuesta inmune frente a la toxina del cólera, Herpes simplex, virus de Epstein Barr, *Plasmodium falciparum* y *enfermedad meningitis* (Alving, 1993). Dentro de los efectos que el LPS produce sobre el sistema inmune, se observa entre otras cosas que induce la activación de neutrófilos, macrófagos y células T; actúa como mitógeno policlonal sobre las células B; estimula la producción de proteínas de fase aguda y varias citoquinas (ej. IL-1, TNF- α , factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos - GM-CSF); activa la expresión de moléculas de adhesión I (ICAM-I) por parte de macrófagos, linfocitos, células NK y fibroblastos duodenales (Pang y col., 1994; Norimatsu y col., 1995; Singh y col., 2000).

Por otro lado, se ha visto que *Propionibacterium granulosum* (bacteria gram positiva), también tiene un efecto inmunoestimulante sobre el sistema inmune, principalmente participando en la activación de macrófagos, aumentando el número de fagocitos en bazo, pulmones, hígado y nódulos linfáticos. Además mejora el procesamiento y presentación de antígenos, incrementando la respuesta humoral tanto dependiente como independiente de los linfocitos T, traduciéndose en un

aumento significativo de los títulos de anticuerpos, cuando son utilizados como adyuvante (Roszkowski y col., 1990).

Finalmente, el efecto de la asociación de LPS - *Propionibacterium granulosum*, ha sido observado tanto *in vivo* como *in vitro* en especies como ratones, cerdos y humanos, generando una respuesta inmune significativamente mayor tanto a nivel de producción de citoquinas, como de inmunoglobulinas y en la proliferación de linfocitos T y B (Gallego-Olivella y col., 1997; Erazo y col., 2001).

4.13 INTERFERENCIA DE LA CIRUGÍA SOBRE LAS FUNCIONES DEL SISTEMA INMUNE

Varias investigaciones han confirmado la inducción de inmunosupresión por la anestesia general y cirugías tanto en animales como en el hombre (Felsburg y col., 1986; Nakama y col., 1990). La excesiva respuesta inflamatoria, junto con una evidente deficiencia de la respuesta inmune mediada por células siguiendo una cirugía importante, parece ser la responsable del incremento de las subsecuentes sepsis encontrada en los pacientes (Angele y Faist, 2002). En vista de esto, la mayoría de las investigaciones médico-científicas se han dirigido hacia la evaluación de la progresión e inter-relación de mediadores que se activan o suprimen después de una cirugía (Angele y Faist, 2002). En la mayoría de los estudios clínicos realizados, las alteraciones en los parámetros inmunes de pacientes siguiendo una cirugía, han sido evaluadas basándose en las funciones de células de sangre periférica y niveles plasmáticos de varios mediadores (Angele y Faist, 2002).

En este sentido, se ha observado una falta de reactividad de monocitos circulantes estimulados con bacterias o endotoxinas luego de la realización de cirugías en pacientes sanos. Esta alteración de las funciones de los monocitos, ha sido observada durante al menos tres a cinco días luego del acto quirúrgico (Haupt y col., 1998). En contraste, otros estudios han demostrado un aumento de la secreción de IL-1 β e IL-10 por monocitos estimulados con endotoxinas luego de la cirugía. Las diferencias en la severidad del trauma quirúrgico, podrían explicar esos resultados divergentes (Angele y Faist, 2002). En cuanto a la presentación de antígenos ejercidas por estas células en el contexto de una respuesta inmune, las investigaciones realizadas sugieren que existe una depresión en la capacidad de macrófagos de cumplir esta función siguiendo una injuria o cirugía mayor. Esto consecuentemente provoca además una disminución de la inmunidad mediada por células, incrementando la susceptibilidad a la infección (Angele y Faist, 2002).

Por otro lado, en lo que se refiere a la función de los linfocitos T, se han realizado ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, donde se ha observado alteración en la habilidad de los linfocitos T para responder contra mitógenos como Concanavalina A y fitohemaglutinina (Ayala y col., 1994). Se ha observado además, que el grado de depresión de esos linfocitos, está correlacionada con la complejidad de la cirugía (Angele y Faist, 2002).

En lo que se refiere a la función de los linfocitos B, se ha observado una significativa disminución en la producción de anticuerpos luego de una cirugía traumática y pérdida de sangre (Abraham y Freitas, 1989). En este sentido, una disminución de los niveles de inmunoglobulinas en suero, ha sido detectada durante al menos 3 días luego de la cirugía (Abraham y Freitas, 1989). Una explicación de esta deficiente respuesta de las células B, podría deberse a la disminución de la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T, que también se ven comprometidos por el acto quirúrgico. Como se sabe, las citoquinas de las células T son prerequisites para una adecuada proliferación de linfocitos B y secreción de inmunoglobulinas (Angele y Faist, 2002).

Basado en estos antecedentes, donde se observa un compromiso de la respuesta inmune en animales sometidos a cirugías, se podría pensar que la vacunación durante esta práctica en animales, se traduce en fallas en la respuesta inmunológica. En este sentido, Miyamoto y col (1994) evaluaron los efectos en la respuesta inmune pre y post quirúrgica, de vacunas comerciales para caninos contra varios patógenos. Mediante blastogénesis y detección de anticuerpos en suero, observaron que la cirugía en los animales no alteró significativamente los parámetros inmunológicos analizados, obteniendo un nivel de protección aceptable en la respuesta inmune contra Parvovirus canino y Distemper canino.

Por otro lado, Taura y col. (1995) sugieren que la vacunación de perros inmediatamente antes de la cirugía, posiblemente impida una inmunosupresión postquirúrgica observada en perros no vacunados, y observan diferencias en cuanto al protocolo anestésico utilizado, detectando una mayor depresión de la inmunocompetencia en animales anestesiados con halotano más que con Isoflurano.

Más recientemente, en un trabajo realizado en gatos, que habían sido vacunados contra la Panleucopenia felina, herpesvirus felino, calicivirus felino y rabia, antes, durante y luego de la castración, no se encontraron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos detectados. La esterilización realizada durante o cerca de la vacunación no perjudicó las respuestas de anticuerpos de los animales. Por lo tanto, los autores sugieren que los gatos pueden ser vacunados en el período perioperatorio cuando sea necesario, sin que exista interferencia en la calidad de la respuesta inmune esperada (Reese y col., 2008).

5. HIPOTESIS

5.1 No existen diferencias significativas del punto de vista de la protección obtenida en perros luego de la vacunación contra la rabia utilizando vacunas mono y polivalentes.

5.2 Es eficaz la vacunación de caninos contra el virus de la rabia durante la castración quirúrgica.

5.3 El tratamiento con dosis altas de Triamcinolona acetónico en perros, interfiere en la vacunación contra la rabia.

5.4 El uso de un inmunoestimulante comercial utilizado para pequeños animales y que está basado en células inactivadas de *Propionibacterium granulosum* y Lipopolisacárido de *E. coli*, produce una respuesta significativamente mejor al ser aplicado al momento de la vacunación contra el virus de la rabia.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluación de la respuesta inmune en perros vacunados contra el virus de la rabia bajo diferentes condiciones inmunológicas.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Comparar la respuesta humoral protectora en perros inmunizados contra la rabia con vacunas mono y polivalentes

Determinar la respuesta humoral protectora en animales inmunizados contra la rabia que fueron sometidos a cirugía al momento de la vacunación

Determinar la respuesta humoral protectora en animales vacunados contra la rabia y tratados simultáneamente con inmunomoduladores.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Selección de los animales

Se utilizaron un total de 35 caninos cruzas, clínicamente sanos, ambos sexos, de entre 1 y 6 años de edad, desparasitados 15 días previos al experimento y que no tenían antecedentes de vacunación contra el virus de la rabia.

7.2. Drogas y vacunas utilizadas

Para este experimento se utilizaron marcas de productos reconocidos y disponibles en plaza. Las vacunas monovalentes utilizadas (vacuna A y vacuna B), contenían únicamente el virus de la rabia inactivado (cepa *Pasteur* originalmente aislada en el año 1882). Por otro lado la vacuna C, contenían cepas atenuadas de Parvovirus canino, Distemper canino, Adenovirus canino y Parainfluenza y la cepa inactivada de Coronavirus canino. La vacuna B y C pertenecían a una misma marca comercial y están indicadas por el fabricante para ser utilizada por separado (vacuna B) o juntas con la fracción polivalente (vacuna B y C). En este caso, se utilizó la vacuna B y C inyectadas en distintos sitios, pero al mismo tiempo en el animal, utilizando la dosis recomendada por el fabricante y se denominó a ese grupo como “vacuna polivalente”.

La droga inmunosupresora utilizada en este experimento fue una marca comercial basada en Triamcinolona acetónico a razón de 0,22mg/kg vía subcutánea. La misma se administró 7 días previos a cada inmunización (día -7 y día 23).

El inmunoadyuvante utilizado, estaba formulado con extractos de células inactivadas de *Propionibacterium granulosum* y Lipopolisacárido de *E. coli*, y se administró la cantidad recomendada por el fabricante, en una única dosis en el mismo día que se realizó la primovacunación.

7.3. Variables estudiadas y grupos de ensayos

- Grupo 1 - ocho (8) caninos inmunizados con una vacuna comercial **polivalente**.
- Grupo 2 - siete (7) caninos inmunizados con una vacuna comercial **monovalente**.
- Grupo 3 - ocho (8) caninos inmunizados durante la **castración quirúrgica** con una vacuna comercial polivalente.
- Grupo 4 - seis (6) caninos inmunizados con una vacuna comercial monovalente y sometido a un tratamiento médico con una dosis única de 0,22mg/kg de Triamcinolona acetónico (**corticosteroides**) 7 días previos a cada inmunización vía subcutánea.
- Grupo 5 - seis (6) caninos inmunizados con una vacuna comercial monovalente y sometido a un tratamiento médico con 2 ml de un **inmunoadyuvante** comercial basado en células inactivadas de *Propionibacterium granulosum* y Lipopolisacárido de *E. coli*, aplicado al momento de la primera inmunización vía subcutánea.

7.4. Plan de inmunización y toma de muestras

Los animales del grupo 1, 2, 4 y 5 recibieron dos dosis de vacuna por la vía subcutánea en un intervalo de 30 días:

Día 0 – Primovacunación

Día 30 – Revacunación

El grupo 3 recibió una única dosis de vacuna comercial polivalente al momento de la cirugía (vacunación intra operatoria)

Se colectaron muestras de sangre sin anticoagulante de la vena cefálica con mariposas 21G de todos los animales los días 0, 30, 60 y 120. Las mismas fueron colocadas en tubos secos y enviadas al laboratorio refrigeradas. Posteriormente, fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1600 g y luego almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Además se tomaron muestras de sangre con EDTA el día 0 en todos los grupos para evaluar el estado de salud de los animales al inicio del experimento y el día -7 coincidiendo con los días que se administraron Triamcinolona acetónico en los animales del grupo 4. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Veterinaria realizando recuento diferencial de glóbulos blancos en equipo automatizado con sistema láser (HumaCount – Human Diagnostics Worldwide) y recuento diferencial mediante frotis sanguíneo.

7.5. *Rapid fluorescent focus inhibition test* (RFFIT) para la detección de anticuerpos anti-rábcos.

La titulación de los anticuerpos anti rábcos fueron realizados en el Instituto Pasteur de Sao Paulo (Laboratorio de Referencia en la región). La técnica se realizó siguiendo las recomendaciones de la OIE (2011). Brevemente, se incubaron los sueros problemas con 100 FFD₅₀ (dosis formadora de focos en 50% de cultivos) de virus rábcico durante 90 minutos a 37 °C con atmósfera controlada (5% CO₂). Posteriormente se sembraron $2,5 \times 10^4$ células/pocillo de la línea BHK (células de riñón de hámster neonato) en placas de 96 pocillos y se incubaron en igual condiciones por 20hs. Luego se fijaron las células con acetona y se realizó la Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-IgG de perro conjugados a FTIC (Isotiocianato de Fluoresceína). La reacción se visualizó en microscopio invertido de Fluorescencia a 200X y los resultados se expresaron en Unidades Internacionales o relativas a un antisuero estándar internacional (OIE, 2011).

7.6. Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar. Los datos son reportados mediante su media \pm error estándar (SEM). Para determinar el nivel de protección ($>0,5$ UI/ml) y las diferencias entre títulos de anticuerpos entre grupos en cada día en particular, se utilizó el Test exacto de Fisher y el Test de Mann Whitney, respectivamente. El nivel de significancia en ambos test fue de un 95%.

7.7. Comisión de bioética

El protocolo de experimentación animal fue aprobado por el consejo de Facultad de Veterinaria en diciembre de 2013 (expediente número: 111130-002157-13).

8. RESULTADOS

- Estado de salud de los animales al inicio del experimento.

Se trabajó con un total de 35 animales clínicamente sanos y con buen estado físico. Además se les realizó a todos al inicio del experimento un hemograma para corroborar los valores de células sanguíneas. En el grupo 4, se tomó además una muestra de sangre el día -7, previa la administración del corticoide. Los promedios de todos los grupos se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Promedio de los valores del hemograma de los animales de los distintos grupos al inicio del experimento.

Grupo	Día	Hematocrito (%)	Leucocitos ($10^9/l$)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Neutrófilos (%)
1	0	44	13	17	1	2	82
2	0	42	11	20	2	4	75
3	0	31	19	34	1	9	51
4	-7	40	15	18	2	2	79
	0	43	12	15	4	2	81
5	0	44	12	40	1	3	57

Grupo 1 – Animales inmunizados con vacuna polivalente, Grupo 2 – Animales inmunizados con vacuna monovalente, Grupo 3 – Animales inmunizados con vacuna polivalente durante la cirugía, Grupo 4 – Animales inmunizados con vacuna monovalente durante tratamiento con corticoides, Grupo 5 – Animales inmunizados con vacuna monovalente e inmunoestimulado al momento de la primovacuna. En los animales del grupo 4, se tomaron además muestras de sangre para hemograma los días -7 previo a la administración de Triamcinolona acetinado.

- Comparación de la respuesta inmune en perros inmunizados con vacuna monovalente vs polivalente.

Para evaluar las diferencias en la respuesta inmune con la utilización de vacunas mono o polivalentes, se dividieron 15 perros en dos grupos distintos: Grupo 1 (vacuna polivalente) = 8 animales y Grupo 2 (vacuna monovalente) = 7 animales. Al día 0, los títulos de anticuerpos por la técnica de RFFIT fueron en promedio $0,03 \pm 0,01$ UI/ml (Grupo 1) y $0,02 \pm 0,01$ UI/ml (Grupo 2).

En cuanto a los títulos de anticuerpos, en el grupo 1, todos los animales (8/8) superaron el mínimo necesario considerado protector ($0,5$ UI/ml) al día 30 post primovacuna, con un promedio de $1,75 \pm 0,18$ UI/ml. Al día 60 (32 días post revacunación), el promedio del título de anticuerpos en el grupo 1 fue de $2,88 \pm 0,73$ UI/ml, habiendo un animal que no superó el nivel mínimo exigido para estar protegido. Finalmente a los 120 días de la primera vacuna y 90 días de la revacunación, el promedio del título de anticuerpos de este grupo fue de $0,55 \pm 0,24$

UI/ml, habiendo cuatro de siete animales que el título de anticuerpos no superó el mínimo para estar protegido.

En el grupo 2, que fueron inmunizados con vacunas monovalentes, al día 30 post primovacuna, el promedio del título de anticuerpos fue de $15,97 \pm 5.37$ UI/ml, teniendo todos los animales títulos de anticuerpos superiores a 0,5UI/ml. En el día 60 (30 días post revacunación), el promedio del título de anticuerpos del grupo fue de 45.45 ± 8.64 UI/ml y el total de animales superaron 0,5UI/ml. Finalmente en el día 120, el promedio del grupo fue de $3,89 \pm 0.99$ UI/ml y todos los animales superaron 0,5UI/ml.

Si bien, no se alcanzó a demostrar diferencias entre los grupos 1 y 2 en superar el nivel mínimo de protección ($>0,5$ UI/ml), los títulos de anticuerpos del grupo monovalente fueron significativamente superiores al grupo polivalente los días 30, 60 y 120 ($P < 0,05$) (Fig. 5).

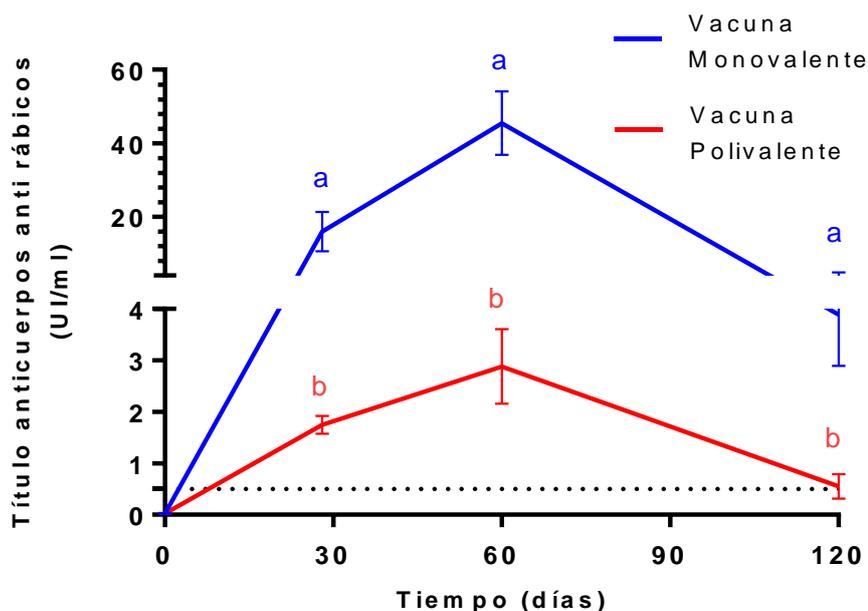


Fig 5. Título de anticuerpos anti-rábicos en caninos inmunizados con vacunas monovalentes (azul) y vacunas polivalentes (rojo).

- Efecto de la administración de corticoides previa inmunización con vacuna monovalente contra rabia.

Para determinar si dosis altas de Triamcinolona acetónico, afecta la respuesta a la vacunación contra la rabia en perros, se administró 0,22mg/kg a 6 perros a los 7

días previo a la primer inmunización y 7 días previos a la revacunación por vía subcutánea.

Al día 0, el promedio del título de anticuerpos de los animales fue de $0,04 \pm 0,01$ UI/ml. Al día 30 post primovacuna, todos los animales superaron el nivel mínimo de protección y el promedio del grupo fue de $1,41 \pm 0,18$ UI/ml. En el día 60 (30 días post revacunación), el promedio del título de anticuerpos del grupo fue de $13,72 \pm 4,14$ UI/ml, superando todos los animales (6/6), el mínimo exigido para estar protegido. Finalmente al día 120, el promedio del grupo fue de $0,21 \pm 0,06$ UI/ml, y en el total de los animales ($n=6$) los títulos de anticuerpos no superaron 0,5UI/ml.

Si bien, únicamente se alcanzaron diferencias a los 120 días entre los grupos 4 y 2 en superar el nivel mínimo de protección ($>0,5$ UI/ml), los títulos de anticuerpos del grupo 2 (monovalente) fueron estadísticamente superiores al grupo 4 (con administración de corticoides) los días 60 y 120 (Fig. 6).

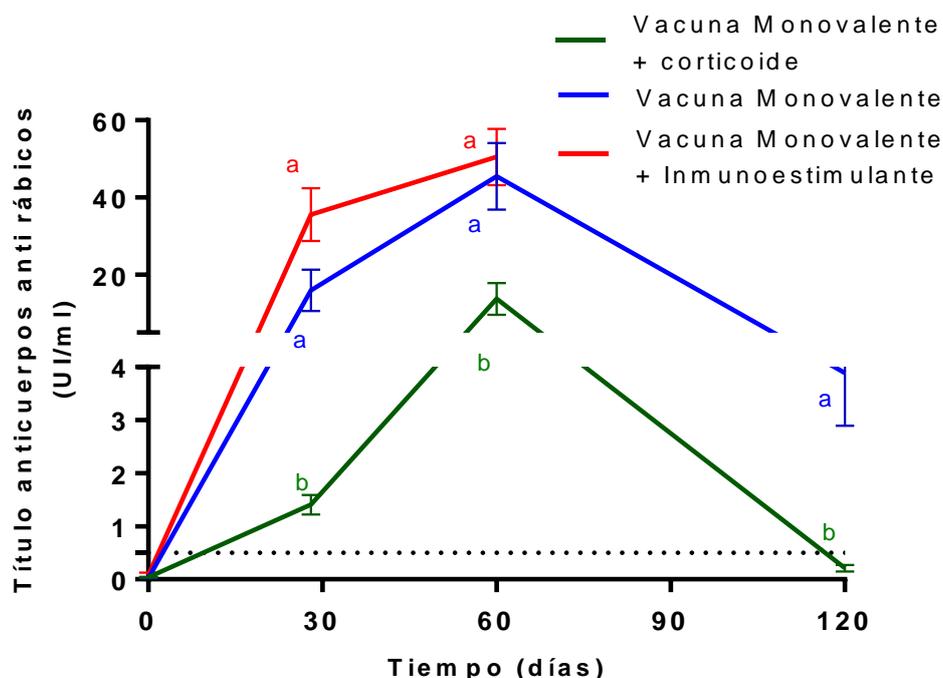


Fig 6. Efecto del tratamiento inmunosupresor e inmunoestimulante en la respuesta inmune humoral contra la rabia. El grupo inmunoestimulado (rojo) se analizó hasta el día 60.

- Efecto de la utilización de un inmunoestimulante comercial administrado junto con una vacuna monovalente contra rabia.

Se utilizó un inmunoestimulante comercial basado en células inactivadas de *Propionibacterium granulosum* y Lipopolisacárido de *E. coli*, administrándose una

única dosis al momento de la primovacunación. Al día 0, el promedio del título de anticuerpos del grupo fue de $0,09\text{UI/ml} \pm 0,04\text{ UI/ml}$. Al día 30, el promedio del grupo fue de $35,58 \pm 6,83\text{ UI/ml}$ y todos los animales (6/6) superaron $0,5\text{UI/ml}$. Luego, en el día 60, el promedio del título de anticuerpos del grupo fue de $50,51 \pm 7,30\text{ UI/ml}$, manteniéndose todos con niveles de protección. No se obtuvieron muestras para analizar al día 120 en este grupo de animales.

Si bien se pudo observar que los títulos de anticuerpos del grupo 5 fueron superiores al del grupo 2 (vacuna monovalente sin inmunoestimulación), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 2).

- Interferencia de la cirugía en la respuesta a la inmunización con vacuna polivalente.

Se evaluó la respuesta a la vacunación contra rabia en perros sometidos (grupo 3) o no (grupo 1) a una intervención quirúrgica (esterilización) al momento de la inmunización con una única dosis de vacuna polivalente.

Al comparar los resultados del título de anticuerpos del grupo 3 (inmunizados durante la cirugía) y el grupo 1 (inmunizado sin cirugía), los promedios al día 30 fueron de $0,83 \pm 0,17\text{ UI/ml}$ y $1,75 \pm 0,18\text{ UI/ml}$ respectivamente. Si bien, no se alcanzaron diferencias a los 30 días entre grupos en superar el nivel mínimo de protección ($>0,5\text{UI/ml}$), los títulos de anticuerpos del grupo polivalente fueron estadísticamente superiores al grupo sometido a cirugía al día 30 (Fig. 7).

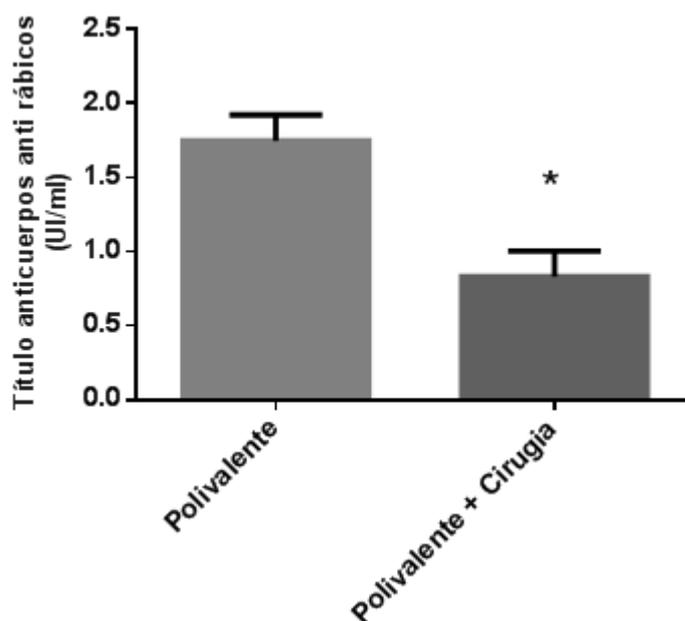


Fig 7. Títulos de anticuerpos contra la rabia al día 30 post vacunación en perros inmunizados durante la castración quirúrgica.

- Nivel de protección alcanzado en los títulos de anticuerpos en los distintos grupos de ensayo.

Si bien se evidenciaron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos entre algunos grupos de ensayo, el nivel de protección fue suficiente en la mayoría de los animales de todos los grupos experimentales en el día 30 post vacunación (Tabla 3). No se evidenciaron diferencias significativas en el nivel de protección, entre los grupos comparables según el tratamiento utilizado.

En el día 60, los grupos 1, 2, 4 y 5, que habían recibido una segunda dosis de vacuna al día 30, el nivel de protección fue entre 87 y 100 % según el grupo experimental analizado. En el grupo 3, que solo habían recibido una única dosis de vacuna al momento de la castración quirúrgica, el nivel de protección al día 60 fue de 0%.

Tabla 2. Nivel de protección contra la rabia en caninos inmunizados bajo distintas situaciones de inmunomodulación.

Día	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
0	0/8	0%	0/7	0%	0/8	0%	0/6	0%	0/6	0%
30	8/8	100%	7/7	100%	6/7	85%	5/5	100%	6/6	100%
60	7/8	87%	7/7	100%	0/8	0%	6/6	100%	5/5	100%
120	3/7	42%	7/7	100%	Nd	Nd	0/6	0%	Nd	Nd

Grupo 1 – Animales inmunizados con vacuna polivalente, Grupo 2 – Animales inmunizados con vacuna monovalente, Grupo 3 – Animales inmunizados con vacuna polivalente durante la cirugía, Grupo 4 – Animales inmunizados con vacuna monovalente durante tratamiento con corticoides, Grupo 5 – Animales inmunizados con vacuna monovalente e inmunoestimulado al momento de la primovacuna. Nd = no determinado.

9. DISCUSIÓN

Esta tesis tuvo como objetivos principales, abordar algunos aspectos importantes y de uso práctico para la medicina canina, en lo relacionado a la vacunación contra la rabia. Se evaluó como incide la respuesta inmune contra esta enfermedad, bajo distintas condiciones de inmunomodulación. Desde hace mucho tiempo se sabe que las respuestas inmunes en los animales pueden variar sí se utilizan vacunas polivalentes con cepas de virus vivos atenuados (Strasser y col., 2003), sí la administración de las mismas se hace concomitantemente con drogas inmunosupresoras (ej. corticoides) (Schwiebert y col., 1996) o inmunoestimulantes (Gallego-Olivella y col., 1997; Erazo y col., 2001) o el estrés inmunológico que causan los procedimientos quirúrgicos (Felsburg y col., 1986; Nakama y col., 1990; Angele y Faist, 2002).

Al inicio del experimento se les realizó un hemograma a todos los animales, para corroborar que se encontraban en condiciones saludables del punto de vista inmunológico. Aunque no se evaluó la actividad de cada célula en particular, se determinó que se encontraban en niveles normales para la especie. Si bien algunos valores estuvieron levemente fuera de los normales según la literatura, esto pudo haber sido debido al hecho de que el experimento fue realizado a campo, con las posibles interferencias del medio ambiente sobre la salud de los animales. De todas formas se pudo descartar leucopenias graves que pudieran interferir con la inmunización o parasitosis intestinales (helminthiasis) reflejadas por eosinofilia severas. La parasitosis, es una causa importante de falla en la vacunación en perros por la modulación que induce estos patógenos en la respuesta inmune de las células T, principalmente hacia la población Th2 (Mojžišová y col., 2007). Cabe señalar que además de evaluar los niveles de eosinófilos en sangre, los animales habían sido desparasitados farmacológicamente 15 días previos al inicio del experimento. Finalmente, el número de neutrófilos nos podría estar indicando la presencia de infecciones graves, sobre todo bacterianas. En este caso, no se observaron en sangre valores llamativos de esta célula, lo que permite asumir que los animales se encontraban inmunológicamente aptos para el inicio del experimento. Por otro lado, el grupo 4 que recibió una dosis alta de triamcinolona 7 días previos a la inmunización (día -7), presentó un recuento de leucocitos apenas levemente inferior al día 0. Por lo tanto la aplicación de la droga no indujo una leucopenia importante. El mecanismo de acción de los corticoides no sólo está relacionado a la disminución de células circulantes en sangre, si no principalmente a la actividad de las mismas, generando una modificación de la actividad de algunas enzimas, reduciendo la inflamación al inhibir la liberación de las hidrolasas de los leucocitos, previniendo la acumulación de macrófagos en los lugares de la infección interfiriendo con la adhesión de los leucocitos a la pared de los capilares, así como inhibiendo la liberación de histamina, kininas, leucotrienos y las prostaglandinas entre otras funciones (Nara y col., 1979).

Al comparar la respuesta a la vacunación de perros inmunizados con vacuna monovalente vs vacuna polivalente, se pudo observar que al día 30, 60 y 120 los títulos de anticuerpos del grupo inmunizado con la vacuna monovalente fue significativamente superior ($P < 0,05$) al título del grupo inmunizado con la vacuna polivalente. El 100% de los animales del grupo 2 (vacuna monovalente) estuvieron protegidos los días 30, 60 y 120. Sin embargo en el grupo 1 (vacuna polivalente) la protección fue de 100%, 87% y 42% en los días 30, 60 y 120 respectivamente (Tabla 2). Las diferencias encontradas entre ambos grupos (monovalente vs polivalente), sobre todo en los días 30 y 60, pueden obedecer a varias causas. Por un lado, la inmunosupresión que causan algunos virus incluidos en la vacuna polivalente como Distemper y Parvovirus canino. Se ha observado que estos virus, modulan la respuesta inmune del hospedador, pudiendo interferir en la eficacia de las vacunas y la protección inmunológica obtenida (Strasser y col., 2003). Por otro lado, es importante señalar, que en este trabajo, la inmunización polivalente que se realizó, era de una marca de vacuna, donde el componente contra la rabia, comercialmente viene separado del resto de los demás antígenos, pudiendo ser administrado solo o junto a la fracción polivalente, pero en distintos puntos de inyección, como se realizó en este trabajo. No podemos determinar si las diferencias encontradas se deben a un problema en la vacuna (vacuna B) independientemente de la administración conjunta con la polivalente (vacuna C). En un futuro, se debería realizar otros ensayos, donde se aplicara únicamente el componente rabia de la vacuna B, para comparar con los niveles obtenidos en este trabajo y evaluar si la administración de ambas vacunas, genera un efecto negativo en la respuesta contra la rabia. Al margen de esto, y del punto de vista práctico, la aplicación de ambas vacunas (rabia y polivalente) al mismo tiempo, es utilizada a menudo en varios países incluyendo Uruguay, donde generalmente en la última dosis del plan de vacunación, se incluye la vacuna de rabia y en las revacunaciones anuales también. Con los resultados del presente trabajo, se deja de manifiesto la posible interferencia que pudiera existir en la respuesta inmune contra la rabia, en planes de vacunación que se administra junto con vacunas polivalentes. Más ensayos son necesarios con un número mayor de animales, para corroborar estos resultados. Finalmente, en cuanto a la duración de la protección, en Uruguay y en varios países, se recomienda la revacunación anual contra el virus de la rabia. En este trabajo se siguieron los animales hasta los cuatro meses. En ese momento, menos de la mitad de los animales del grupo 1 (polivalente) y la totalidad de los animales del grupo 2 (monovalente), estaban protegidos. La duración y la permanencia de los niveles protectores luego de los cuatro meses (período que duró el experimento), deben ser evaluados y no pueden ser extrapolados a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, el efecto de los corticoides sobre las funciones del sistema inmune, ha sido investigado en numerosos experimentos (Llewellyn-Jones y col., 1994; Burton y col., 1995; Schwiebert y col., 1996; Aglas y col., 1997; Yoshida y col., 1997; Vainer y Nielsen, 2000; Matsumoto y col., 2001; Robinson y Badwey, 2002). En este trabajo se analizó la utilización de dosis altas de triamcinolona acetona a razón de 0.22mg/kg aplicado 7 días antes de cada inmunización. Este tipo de terapia se utiliza en medicina canina en los casos de cuadros alérgicos importantes, donde se desea

suprimir las funciones del sistema inmune para disminuir la sintomatología clínica. Por lo tanto, la vacunación en los animales que están siendo tratados con estas drogas, no está indicado. Sin embargo algunos autores han demostrado que animales en tratamiento con altas dosis de Prednisolona son capaces de protegerse frente al desafío con Distemper canino (Nara y col., 1979), lo que demuestra que no siempre los tratamientos con corticosteroides impiden una respuesta a la vacunación satisfactoria. En el presente trabajo, todos los animales superaron el nivel mínimo de protección al día 30 y 60 post vacunación, aunque las diferencias encontradas en la media del título de anticuerpos entre este grupo (tratado con triamcinolona) y el grupo no tratado, fue significativamente diferente ($P < 0,05$) (Fig. 6). Del punto de vista de la protección contra la rabia, el efecto de los corticoides se observó más claramente en el día 120, cuando ya ningún animal tenía títulos mayores a 0.5UI/ml. Estos resultados sugieren que sí deseamos vacunar contra la rabia animales que estén siendo tratados con triamcinolona, se debería hacer una tercera revacunación antes del día 120.

El uso de inmunoestimulantes en medicina veterinaria con el fin de mejorar la respuesta a la vacunación, no es una práctica habitual. La activación de importantes componentes del sistema inmune luego de la inyección de LPS + *Propionibacterium granulosum* (inmunoestimulante utilizado en este trabajo), ha sido observado anteriormente tanto a nivel de células T y B, como de citoquinas e inmunoglobulinas (Gallego-Olivella y col., 1997; Erazo y col., 2001). Con estos antecedentes es de esperar, que el uso de inmunoestimulantes puede mejorar significativamente la respuesta inmune contra la rabia. En este trabajo si bien en el día 30 y 60 se observaron mayores títulos de anticuerpos en los animales inmunoestimulados con una única dosis al momento de la primovacunación, estas diferencias no fueron significativas, lo que pone en duda la real importancia de este tratamiento para mejorar los títulos protectores contra la rabia. Quizás la importancia de la inmunoestimulación, puede ser en el caso de vacunas con baja inmunogenicidad o de animales inmunodeprimidos o inmunocomprometidos (Markowska-Daniel y col., 1993). En este caso la vacuna monovalente generó una respuesta muy buena en términos de títulos de anticuerpos anti-rábicos, siendo quizás poco probable que esa respuesta aumentara significativamente por el uso de inmunoestimulantes. Se debería profundizar estos resultados, con la aplicación de inmunoestimulantes utilizando vacunas polivalentes, donde se observa una respuesta inmune significativamente menor, causada quizás por la presencia de virus inmunosupresores como se mencionó anteriormente. La duración de la inmunidad en el grupo 5 (inmunoestimulados), lamentablemente no pudo ser analizada en el día 120. Esto podría generar una diferencia en la respuesta inmune comparada con los animales no inmunoestimulados (grupo 2), teniendo en cuenta que la activación de linfocitos de memoria, podría estar incrementada en los animales inmunoestimulados, lo que se traduciría en una respuesta más prolongada en el tiempo.

En cuanto a la vacunación contra la rabia durante la cirugía, al día 30 post vacunación, 6 de 7 animales (85%) superaron el nivel de anticuerpos mínimo

necesario para estar protegido (0,5UI/ml), con una media de $0,83\pm 0,17$ UI/ml. Sin embargo, si se compara este valor con la media del título de anticuerpos de los animales que no habían sido sometidos al estrés quirúrgico pero sí fueron vacunados con la misma vacuna ($1,7\pm 0,18$ UI/ml), este valor es significativamente más bajo ($P < 0,05$). Estos resultados demuestran que, aunque en la literatura está demostrado que existe un compromiso inmunológico causado por el acto quirúrgico tanto en componentes del sistema inmune innato como adaptativos (Abraham y Freitas, 1989, Ayala y col., 1994, Angele y Faist, 2002), la vacunación contra la rabia durante la castración quirúrgica es eficaz y la gran mayoría de los animales sobrepasan los niveles de anticuerpos considerados suficientes para estar protegido. Si bien Miyamoto y col (1994), habían demostrado la eficacia de la vacunación en perros sometidos a cirugías, ellos evaluaron la respuesta contra Parvovirus y Distemper canino, y la vacunación se había realizado dentro de los 10 días previos hasta el tercer día posterior a la cirugía. Por otro lado, Reese y col. (2008) evaluaron la respuesta inmune a la vacunación contra distintos patógenos incluyendo la rabia, antes, durante y luego de la cirugía, pero este experimento se realizó en gatos, por lo que la respuesta podría no ser extrapolable a la especie canina.

La importancia central de los resultados obtenidos sobre vacunación contra rabia durante cirugías, radica en la posibilidad de utilizar la vacunación de perros (al menos contra la rabia), durante las campañas de castración masiva que realizan varios países, incluyendo a Uruguay. La Comisión Nacional Honoraria de Zoonosis del Ministerio de Salud Pública, podría en un futuro implementar la vacunación contra rabia junto con la castración, teniendo en cuenta que esta es una de las principales zoonosis que se transmiten del perro al hombre. Si bien Uruguay es libre de rabia canina desde el año 1983, la enfermedad en bovinos ha sido diagnosticada en los últimos años en distintos departamentos, y además se ha detectado la presencia de murciélagos positivos en la ciudad de Montevideo y Rivera (González y col., 2009). Esto demuestra que el virus está circulando en nuestro país, y la exposición de perros a esta enfermedad genera un problema grave para la salud pública, teniendo en cuenta que más del 90% de los casos de rabia en humanos, es transmitida por perros rabiosos. Según la OMS, la vacunación de perros y gatos es la forma más eficaz de controlar la rabia urbana. Sin embargo en Uruguay, al no ser obligatoria, la vacunación se realiza parcialmente, lo que supone un bajo nivel de protección en la población canina susceptible. Sumado a esto, Moreno y col. (2012), en un estudio realizado con perros vacunados de los departamentos de Montevideo y Canelones, demostraron que apenas el 36% de los perros vacunados tenían niveles suficientes de anticuerpos para estar protegidos frente a la exposición del virus. Si bien el trabajo no fue realizado con un muestreo estadísticamente significativo para todos los perros de los departamentos analizados, los autores alertan que la protección inmunológica contra la rabia canina, puede no ser suficiente en la actualidad. Esta realidad no solo pasa en Uruguay, ya que otros países de América latina donde se han realizado trabajos similares, también han obtenido en algunos casos, bajos niveles de protección en poblaciones de perros vacunados (López y col., 2007; Paéz y col., 2007; Suzuki y col., 2008).

En cuanto la duración de la inmunidad en los perros vacunados durante la cirugía, en este trabajo se pudo observar que si bien al día 30 post vacunación, 6 de 7 animales tenían niveles de anticuerpos suficientes para estar protegido, al día 60 ninguno sobrepasaba este límite de protección (0,5UI/ml). Esto significa que sí bien la vacunación fue eficaz durante la cirugía, es necesaria la revacunación de estos animales, para lograr una protección más prolongada en el tiempo. Además, teniendo en cuenta que en este trabajo se evaluó la respuesta a la inmunización de caninos inmunológicamente vírgenes, se podría esperar mejores resultados en títulos de anticuerpos luego de la vacunación en los casos de animales que ya hayan recibido vacunas anteriores contra la rabia, y por lo tanto tienen células de memorias que inducirán una mayor respuesta a la vacunación. Finalmente, investigaciones futuras deberían evaluar además la factibilidad de la vacunación en perros durante la cirugía contra otros patógenos de interés para la especie, como pueden ser Parvovirus, Distemper, Coronavirus, Parainfluenza, Leptospirosis, entre otros.

10.CONCLUSIONES

- La aplicación de la vacuna contra la rabia en conjunto con otros antígenos, generaron una respuesta inmune suficiente, pero significativamente menor que la vacuna monovalente utilizada.
- Los títulos protectores en el grupo inmunizado con la vacuna monovalente, se mantuvo en todos los animales hasta el día 120 post vacunación. En el grupo inmunizado con vacuna polivalente, al día 120, apenas un 42% de los animales tenían títulos mayores o iguales a 0.5UI/ml (protectores según la OMS).
- La vacunación durante la castración quirúrgica, si bien disminuyó significativamente la respuesta inmune contra la rabia, no impidió que los animales respondieran contra la misma. El 85% de los animales, tenían niveles protectores al día 30 post vacunación.
- La vacunación contra la rabia en perros que estaban siendo tratados con triamcinolona acetona, fue inhibida parcialmente, aunque se pudo observar niveles de anticuerpos protectores en el 100% de los perros en los días 30 y 60.
- El uso de una dosis del inmunoestimulante comercial en el día de la primovacuna no generó una respuesta inmune significativamente más alta en los animales. Sin embargo, la duración en el tiempo de la misma no pudo ser evaluado.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdussalam M., Botton, P.C. (1974) Global aspect of rabies. Symposia series in immunobiological standardization, Karger, vol.21, p. 3-17.
2. Abraham E, Freitas AA: Hemorrhage produces abnormalities in lymphocyte function and lymphokine generation. (1989). *J Immunol.* 142:899-906.
3. Acha P.N., Szyfres, B. (2003): *Virosis, Rabia*. En: Acha y Szyfres. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3ª ed., Washington. Pan American Health Org, v.2, p. 351- 374.
4. Aglas F, Rainer F, Lipp RW, Schnedl WJ, Horn S, Egger G. (1997) Effect of steroid treatment on the migration behaviour of neutrophils in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 1997; 17(4):137-140.
5. Almeida M.F., Aguilár E.A., Martorelli L.A., Presotto, D., Brendão M.M., Pereira, O.A. (1997) Resposta imune humoral de cães á vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. *Rev Saude Publ.* 31(5): 502-507.
6. Alving C.R. (1993). Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiol* 187:430-446.
7. Amasino C.F., Garbi, C.J., Amasino M. F. (2002) La rabia urbana en la provincia de Buenos aires, Argentina: Origen- Evolución- Actualidad. *Anal. Vet.* 22 (1): 17-31.
8. Angele MK, Faist E. (2002). Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care.* 6(4):298-305.
9. Anilionis A., Wunner W.H., Curtis P. (1981) Structure of the glycoprotein gene of rabies virus. *Nature* 294:275–278.
10. Ayala A, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH. (1994). Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage: interleukin (IL)-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid induced IL-4 release. *Arch Surg.* 129:1172-1178.
11. Baer G.M. (1991) *The Natural History of Rabies*, 2a ed. Florida. CRC. 620 p.
12. Baer G.M., Cleary, W.F. (1972) A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. *J Infect Dis.* 125:520–527.

13. Baer G.M., Wandeler A.I. (1987) Virus infections of carnivores. En: Appel M. J, (ed.) Virus Infections of Carnivores. Amsterdam: Elsevier. p. 167–182.
14. Baloul L., Camelo, S., Lafon M. (2004) Up-regulation of Fas ligand (FasL) in the central nervous system: a mechanism of immune evasion by rabies virus. *J. Neurovirol.* 10:372–382.
15. Belotto A., Leanes L.F., Schneider, M.C., Tamayo H., Correa E. (2005) Overview of rabies in the Americas. *Virus Res.* 111: 5–12.
16. Bourhy H., Kissi, B., Tordo N. (1993) Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology.* 194:70–81.
17. Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Bauduin B., Lecocq J.P., Languet T B., Chappuis G., Desmettrep P., Afiademanyo K., Libois R., Pastoret P.P. (1991) Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature.* 354:520–522.
18. Brzózka K., Finke S., Conzelmann K.K. (2005) Identification of the rabies virus a/b interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 79:7673-7681.
19. Burton JL, Kehrl ME Jr, Kapil S, Horst RL. (1995). Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J Leukoc Biol.* 57(2):317-325.
20. Camelo S., Lafage M., Galelli A., Lafon M. (2001) Selective role for the p55 Kd TNF-alpha receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 113:95–108.
21. Carroll A.R., Wagner R.R. (1979) Role of the membrane (M) protein in endogenous inhibition of in vitro transcription by vesicular stomatitis virus. *J Virol* 29(1):134-142.
22. Charlton K.M., Casey G.A. (1979) Experimental rabies in skunks. Immunofluorescence light and electron microscope studies. *Lab Invest.* 41:36–44.
23. Charlton K.M., Casey G.A., Webster, W.A. (1984) Rabies virus in the salivary glands and nasal mucosa of naturally infected skunks. *Can J Comp Med.* 48:338–339.
24. Charlton K.M., Casey G.A., Webster W.A., Bundza A. (1987) Experimental rabies in skunks and foxes: Pathogenesis of the spongiform lesions. *Lab Invest.* 57:634–645.
25. Chomel B., Chappuis G.B., Cardenas E., De Beublain T.D., Maufrais M.C, Giambruno E. (1987) Serological results of a dog vaccination campaign against rabies in Peru. *Rev. Sci. Tech. OIE* 6: 97–113.

26. Chopy D., Pothlichet J., Lafage M., Mégret F., Fiette L., Si-Tahar M., Lafon M. (2011) Ambivalent role of the innate immune response in rabies virus pathogenesis. *J Virol.* 85(13):6657-6668.
27. Coleman P.G., Dye, C. (1996) Immunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies. *Vaccine.* 14:185-186.
28. Constantine DG. (1962) Rabies transmission by nonbite route. *Public Health Rep* 77:287–289.
29. Conzelmann K.K., Cox J.H., Schneider L.G., Thiel H.J. (1990) Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology.* 175:485–499.
30. Cox J.H., Dietzschold B., Schneider, L.G. (1977) Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect Immun.* 16:754–759.
31. Crandell R.A. (1991) Arctic fox rabies. En: Baer GM, ed. *The Natural History of Rabies.* Boca Raton: CRC Press. P. 291–306.
32. Crepin P., Audry L., Rotivel Y. (1998) Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 36:1117-1121.
33. Davis A.D, Rudd R.J., Bowen R.A. (2007) Effects of aerosolized rabies virus exposure on bats and mice. *J Infect Dis.* 195:1144–1150.
34. De Diego A.I. (1974) Guía Para el estudio de las Enfermedades Infecciosas de los animales. Buenos Aires, Talleres Gráficos Farro. P 572-576.
35. Dietzschold B., Faber M., Schnell M.J. (2003) New approaches to the prevention and eradication of rabies. *Expert Rev Vaccines* 2:399–406.
36. Dietzschold B., Li, J., Faber M., Schnell M. (2008) Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol.* 3(5): 481–490.
37. Dietzschold B., Wiktor T.J., MacFarlan R., Varrichio A. (1982) Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: Ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments. *J Virol.* 44:595–602.
38. Erazo G.P., Marca J., Navarrete E. (2001). Evaluación zootécnica y sanitaria de la administración del inmunoterápico Inmodulen® en madres gestantes y lechones neonatos. Resúmenes XXII Symposium ANAPORC. Santiago de Compostela. España, p. 342-345.

39. Faul E. J., (2010) Rabies virus infection induces type I interferon production in an IPS-1 dependent manner while dendritic cell activation relies on IFNAR signaling. *PLoS Pathog.* 6:e1001016.
40. Favi M., Yung, V., Pavletic B., Ramírez E., De Mattos C. (1999) En: Rol de los murciélagos insectívoros en la transmisión de la rabia en Chile. *Medicina Veterinaria.* 31 (3): 157-165.
41. Fekadu M., Shaddock J.H., Ekstrom J., Osterhaus A., Sanderlin D.W., Sundquist, B., Morein, B. (1992) An immune stimulating complex (ISCOM) subunit rabies vaccine protects dogs and mice against street rabies challenge. *Vaccine* 10:192–197.
42. 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.
43. Felsburg PJ, Keyes LL, Krawiec DR, Rubin SI. (1986). The effect of general anesthesia on canine lymphocyte function. *Vet Immunol Immunopathol.* 13(1-2):63-70.
44. Finke, S., Conzelmann, K.K. (2005) Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.* 111: 120–131.
45. Fishbein D.B., L.E. Robinson. (1993) Rabies. *New Engl J Med* 329: 1632-1638.
46. Follmann E.H., Ritter, D.G., Beller M. (1994) Survey of fox trappers in northern Alaska for rabies antibody. *Epidemiol Infect;* 113:137–141.
47. Gallego-Olivella J, Ruiz-Martin JM, Fadura-Torres E. (1997). Study of the immunostimulating effect of IM-104 in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 19(4):331-333.
48. Gaudin Y., Tuffereau C., Segretain D., Knossow M., Flamand A. (1991) Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* 65:4853–4859.
49. Gibbons R.V. (2002) Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. *Ann Emerg Med* 39:528-536.
50. González J.C., Briano, D., Guarino H. (2009) Primer registro para el Uruguay de rabia en un murciélago no hematófago *Tadarida brasiliensis*. *Veterinaria (Montevideo);* 45(173-176):31.

51. Green C.E, Dreesen, D.W. (1993) Infecciones virales, rickettsiales y micoplasmicas. Rabia. En: Green C.E. Enfermedades Infecciosas Perros y gatos. 2^a ed., Estados Unidos, Ed.: Interamericana McGraw-Hill, p. 383-402.
52. Greenwald R. J., Freeman, G.J, Sharpe A.H. (2005) The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23:515–548.
53. Hanlon C.A., Kuzmini I.V., Blanton J.D., Weldon W.C., Manangan J.S., Rupprecht, C.E. (2005) Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.* 111:44–54.
54. Harrison A.K., Murphy F.A. (1978). Lyssavirus infection of muscle spindles and motor end plates in striated muscle of hamsters. *Arch Virol*; 57:167–175.
55. Hattwig M.A.W., Gregg, M.B. (1975) The disease in man. En: *The Natural History of Rabies*. NY Academic Press, V.2 p. 281-304.
56. Haupt W, Riese J, Mehler C, Weber K, Zowe M, Hohenberger W. (1998). Monocyte function before and after surgical trauma. *Dig Surg* 15:102-104.
57. Hooper D.C, Morimoto K., Bette M., Weihe, E., Koprowski H., Dietzschold B. (1998). Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol*; 72:3711–3719.
58. Hooper P.T., Lunt R.A., Gould A.R., Samaratinga 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 recognized in Australia. *Bull. Inst. Pasteur.* 95:209–218.
59. Hornung V. (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314:994–997.
60. Huck RA, Evans DH, Hooper RS. (1969). The isolation of Aujeszky's disease virus from dogs. *Vet Rec* 81:172.
61. Hurst E.W., Pawan J.L. (1932) An outbreak of rabies in Trinidad without history of bites and with the symptoms of acute ascending myelitis, *Lancet*, 221:622.
62. Ito N. (2010) Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. *J. Virol.* 84:6699–6710.
63. Johnson N, Cunningham A.F, Fooks A.R. (2010) The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine* 28: 3896–3901.
64. Kayali U., Mindekem R., Yémadji N., Vounatsou P., Kanninga Y., Ndoutamia A.G., Zinsstag, J. (2003) Coverage of pilot parental vaccination campaign

- against canine rabies in N'Djaména, Chad. *Bull. World Health Org.* 81:739-744.
65. Kieny M.P., Lathe R., Drillen R., Spehner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowsky H., Lecocq, J.P. (1984) Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, 312:163–166.
 66. Knobel D.L., Cleaveland S., Coleman P.G., Fevre E.M., Meltzer M.I., Miranda, M.E.G., Shaw A., Zinsstag J., Meslin, F.X. (2005) Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Org* 83:360–368.
 67. Koprowski H. (1973) Laboratory techniques in rabies: the mouse inoculation test. *Monogr Ser World Health Organ*; 23:85-89.
 68. Kureishi A., Xu L.Z., Wu H., Stiver H.G. (1992) Rabies in China; Recommendations for control. *Bull. World Health Org.* 70(4): 443-450.
 69. Lackay S.N.; Kuang Y.; Fu Z.F. (2008). Rabies in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 38(4): 851-861.
 70. Lafon M. (2004) Subversive neuroinvasive strategy of rabies virus. *Arch Virol Suppl.* 18:149–159.
 71. Lafon M. (2008) Immune evasion, a critical strategy for rabies virus. *Dev Biol (Basel).* 131:413-419.
 72. Lembo T., Niezgodá M., Velasco-Villa, A. (2006) Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg Infect Dis*;12:310.
 73. Lentz T.L., Burrage T.G., Smith A.L. (1982) Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 215:182–184.
 74. Lewis P., Lentz T.L. (1998) Rabies virus entry into cultured rat hippocampal neurons. *J Neurocytol* 27:559–573.
 75. Lewis V.J., Thacker W.L., (1974). Limitations of deteriorated tissue for rabies diagnosis. *Health Lab Sci*;11:8-12.
 76. Llewellyn-Jones CG, Hill SL, Stockley RA. (1994). Effect of fluticasone propionate on neutrophil chemotaxis, superoxide generation, and extracellular proteolytic activity in vitro. *Thorax.* 49(3):207-212.
 77. Lodmell D. L., Ray, N.B., Parnell M.J., Ewalt L. C., Hanlon, C. A., Shaddock J. H., Sanderlin D. S., Rupprecht C. E. (1999) DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat. Med.* 4:949 – 952.

78. Lodmell D.L., Ewalt, L.C. (2004) Rabies cell culture vaccines reconstituted and stored at 40C for 1 year prior to use protect mice against rabies virus. *Vaccine*. 22(25-26):3237-3239.
79. López R., Diaz A., Condori E. (2007) Susceptibilidad canina a rabia después de una campaña de vacunación en zonas endémicas del Perú. *Revista Peru Med Exp Salud Pública* 2007; 24(1): 13-19.
80. Lyles D.S, Rupprecht C.E. (2007) Volume I. Rhabdoviridae. En: Lippincott Williams, Fields Virology. 5^a ed. Philadelphia. p. 1363-1408.
81. Macedo C.I, Carnieli P. Jr, Brandao, P.E. (2006) Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. *Braz J Infect Dis*. 10:341-345.
82. Markowska-Daniel I, Pejsak Z, Szmigielski S, Jeljaszewicz J, Pulverer G. (1993). Prophylactic application of *Propionibacterium avidum* KP-40 in swine with acute experimental infections. I. Viral infections--Aujeszky's disease and classical swine fever. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 100(4):149-151.
83. Marsh M., Helenius A. (1989) Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res*. 36:107–151.
84. Masatani T. (2010) Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J. Virol*. 84:4002–4012.
85. Matsumoto T, Tamaki T, Kawakami M, Yoshida M, Ando M, Yamada H. (2001) Early complications of high-dose methylprednisolone sodium succinate treatment in the follow-up of acute cervical spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 26(4):426-430.
86. Matter H.C., Kharmachi H., Haddad N., Ben Youssef S., Sghaier C., Ben Khelifa R., (1995) Test of three bait types for oral immunization of dogs against rabies in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* 52:489-495.
87. Meslin F.X, Fishbein D.B, Matter, H.C. (1994) Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries. En: Rupprecht CE, Dietzschold B, Koprowski H, editors. *Lyssaviruses*. Berlin: Springer Verlag; 1994. p.1-26.
88. Minke JM, Bouvet J, Cliquet F, Wasniewski M, Guiot AL, Lemaitre L, Cariou C, Cozette V, Vergne L, Guigal PM. (2009). Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Vet Microbiol*. 13;133(3):283-286.
89. Miyamoto T, Taura Y, Une S, Yoshitake M, Nakama S, Watanabe S. (1994). Immunological responses after vaccination pre- and post-surgery in dogs. *J Vet Med Sci*. 57(1):29-32.

90. Moreno J; Burghi N; Piaggio J; Puentes R. Respuesta inmune de caninos vacunados contra el virus de la rabia. (2012) *Veterinaria (Montevideo)*, 48 (186):19-22.
91. Mojžišová J, Süli J, Goldová M, Bajová V, Švrček S. (2007) The effect of endoparasitism on the immune response to antirabies vaccination in puppies. *Acta Parasitol.* 52(2):176-180.
92. Morimoto K., Foley, H.D., McGettigan J.P., Schnell M.J., Dietzschold B. (2000) Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *J. Neurovirol.* 6:373–381.
93. Murphy F.A, Baur S.P, Harrison A.K, Winn, W.C. (1973) Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. *Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. Lab Invest*; 28:361–376.
94. Murphy F.A. (1985) The pathogenesis of rabies virus infection. En: Plotkin, S.A, Koprowski, H. (eds). *World's Debt to Pasteur*. New York: Alan Liss; p.153–169.
95. Nakama S, Tanaka M, Tanaka, T. (1990) Effect of halothane or pentobarbital anesthesia on blastogenesis of peripheral blood lymphocytes in dogs. *Jap. J. Vet. Anesth. Surg.* 2(4):71-77.
96. Nandi S., Kumar M. (2010) Development in Immunoprophylaxis against Rabies for Animals and Humans. *Avicenna J Med Biotech* 2(1): 3-21.
97. Nara PL, Krakowka S, Powers TE. (1979) Effects of prednisolone on the development of immune responses to canine distemper virus in beagle pups. *Am J Vet Res.* 40(12):1742-7.
98. Negri A. (1903) Beitrag zum Studium der Aetiologie der Tollwuth. *Z Hyg Infektionskr*;43:507–528.
99. Norimatsu M., Ono T., Aoki A., Ohishi K., Takahashi T., Watanabe G., Taya K., Sasamoto S., Tamura Y. (1995). Lipopolysaccharide-induced apoptosis in swine lymphocytes in vivo. *Infect. Immun.* 63: 1122-1126.
100. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010) Rabia Nota descriptiva nº 99. Septiembre de 2010. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>. Fecha de consulta: 23/8/11.
101. Organización Mundial de Sanidad Animal. (OIE) (2011) *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2011, París, Francia, p 1-20.

102. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2005) Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: análisis de la situación. Washington D.C. PAHO. p 1-71.
103. Paéz A., García, C., Boshell J. (2002) Estandarización de la obtención de amplificadores del genoma del virus de la rabia para su uso en estudios de epidemiología molecular. *Biomédica* 22:71-76.
104. Paéz A., Gómez J., Calvo P., Garzón P. (2007) Niveles de inmunidad humoral conferidos con la primera dosis de la vacuna antirrábica en caninos con dueño de la ciudad de Bogotá, Colombia. *Revista de Investigación, Universidad La Salle*. 7(2): 191-197.
105. Pang G., Couch L., Batey R., Clancy R., Cripps A. (1994). GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin. Exp. Immunol.* 96:437-443.
106. Pell J, Astonb R. (1995) Principles of immunomodulation. *Livest Prod Sci* 42,(2-3):123-133.
107. Perry L.L., Lodmell D.L., (1991) Role of CD4+ and CD8+ T-cells in murine resistance to street rabies virus. *J Virol.* 65:3429-3434.
108. Phares T. W., Kean, R.B., Mikheeva T., Hooper D.C. (2006) Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system. *J. Immunol.* 176:7666-7675.
109. Quinn PJ. (1990). Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Adv Vet Sci Comp Med.* 35:43-99.
110. Ray N.B., Ewalt L.C., Lodmell D.L. (1995) Rabies virus replication in primary murine bone marrow macrophages and in human and murine macrophage-like cell lines: Implications for viral persistence. *J Virol* 69:764-772.
111. Reese MJ, Patterson EV, Tucker SJ, Dubovi EJ, Davis RD, Crawford PC, Levy JK. (2008). Effects of anesthesia and surgery on serologic responses to vaccination in kittens. *J Am Vet Med Assoc.* 233(1):116-121.
112. Rigaut K.D., Birk D.E., Lenard J. (1991) Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *J Virol.* 65:2622-2628.
113. Rigo L., Honer, M.R. (2006) Titulação de anticorpos contra o vírus da raiva em cães, em Campo Grande, MS, na Campanha Anti-Rábica de 2003. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39(6):553-555.

114. Robinson JM, Badwey JA. (2002) Rapid association of cytoskeletal remodeling proteins with the developing phagosomes of human neutrophils. *Histochem Cell Biol.* 118(2):117-25.
115. Rodríguez F.A., Villanueva M. (1993) Efecto de la aplicación de la vacuna antirrábica a los canes vacunados durante la campaña de vacunación masiva de Lima en 1993. *Nova Scientia* 3(6): 32-46.
116. Roszkowski W., Roszkowski K., Ko H.L., Beuth J., Jeljaszewicz J. (1990). Immunomodulation by Propionibacteria. *Zentralbl. Bakteriol.* 274:289-298.
117. Roy A., Hooper D.C. (2007) Lethal silver-haired bat rabies virus infection can be prevented by opening the blood-brain barrier. *J. Virol.* 81:7993–7998.
118. Roy A., Hooper D.C. (2008) Immune evasion by rabies viruses through the maintenance of blood-brain barrier integrity. *J. Neurovirol.* 14:401–411.
119. Rudd R.J., Trimarchi, C.V., (1989). Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J Clin Microbiol*; 27: 2522-2528.
120. Rupprecht C.E., Hemachudha T., (2004) Rabies. En: Lippincott, Williams. *Infections of the central nervous system.* Philadelphia, p 243-259.
121. Sacramento D., Bourhy H., Tordo N., (1991) PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol Cell Probes*; 5:229.
122. Schneider L.G., (1975) Spread of virus within the central nervous system. En: Baer GM,(ed). *The Natural History of Rabies.* New York: Academic Press. 199–216.
123. Schreiner B.; (2004). Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 155:172–182.
124. Schwiebert LM, Beck LA, Stellato C, Bickel CA, Bochner BS, Schleimer RP. (1996). Glucocorticosteroid inhibition of cytokine production: relevance to antiallergic actions. *J Allergy Clin Immunol.* 97(1 Pt 2):143-52.
125. Singh J., Sidhu S.S., Dhaliwal G.S., Pangoankar G.R., Nanda A.S., Grewal A.S. (2000). Effectiveness of lipopolisaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Anim Reprod Sci* 59:159-166.

126. Smith J.S., Orciari L.A., Yager P.A., (1992). Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. *J Infect Dis.* 166:296-307.
127. Smith J.S., Seidel H.D., (1993). Rabies: a new look at an old disease. *Prog Med Virol* 40:82-106.
128. Strasser A, May B, Teltscher A, Wistrela E, Niedermüller H. (2003) Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 94(3-4):113-121.
129. Sunwoo HH, Nakano T, Dixon WT, Sim JS. (1996). Immune responses in chickens against lipopolysaccharide on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Poult Sci* 75:342-345.
130. Suzuki K., González E.T, Ascarrunz G., Loza A., Pérez M., Ruiz G., Rojas L., Mancilla K., Pereira, J.A.C., Guzman, J.A, Pecoraro M.R. (2008) Antibody Response to an Anti-rabies Vaccine in a Dog Population under Field Conditions in Bolivia. *Zoonoses Public Health.* 55: 414-420.
131. Tariq W.U.Z., (1991). Rabies in man handling infected calf. *Lancet*, 337: 1224.
132. Taura Y, Ishi K, Nagami M, Mikasa N, Nakaichi M, Nakama S. (1995). Changes in lymphoproliferation and DTH responses after vaccination immediately before surgery in puppies. *J Vet Med Sci.* 57(5):899-904.
133. Thoulouze M.I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Crème, r H., Lafon, M. (1998) The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* 72:7181–7190.
134. Tordo N., Poch O., Ermine A., Ermine A., Keith G., Rougeon F., (1986) Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci U S A*; 83:3914–3918.
135. Tordo, N., Sacramento, D., H.B., (1996). Laboratory techniques in rabies. 4^a ed. Geneva: World Health Organization. 476p.
136. Torres-Anjel, M. J., Volz D., Torres M.J., Turk M., Tshikuka J.G. (1988) Failure to thrive, wasting syndrome, and immunodeficiency in rabies: a hypophyseal/hypothalamic/thymic axis effect of rabies virus. *Rev. Infect. Dis.* 10(Suppl. 4):S710–S725.
137. Tsiang H., (1978) Evidence for an intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. *J Neuropathol Exp Neurol*; 38:286–292.
138. Tuffereau C., Benejean J., Blondel D., Kieffer B., Flamand A. (1998). Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 17:7250–7259.

139. Tuffereau C., Leblois H., Benejean J., Coulon P., Lafay F., Flamand A. (1989) Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 172 (1):206-212.
140. Vainer B, Nielsen OH. (2000). Chemotactic properties of ICAM-1 and PECAM-1 on neutrophil granulocytes in ulcerative colitis: effects of prednisolone and mesalazine. *Aliment Pharmacol Ther.* 14(8):1023-1031.
141. Valderrama A., Díaz A., López-Ingunza, R. (2004) Cobertura inmunológica antirrábica de canes mordedores ingresados al Centro Antirrábico de Lima. Primer Seminario Internacional de Zoonosis y Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Lima: MINSA, p. 15-21.
142. Vitale E., Días L.E., Lagartilla P., (2008) Estrategia para el control de la rabia herbívora en el Uruguay. En: Academia Nacional de Veterinaria. Rabia Paralítica. Montevideo. Tradinco. P 69-74.
143. Watson H.D., Tignor G.H., Smith A.L., (1981) Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. *J Gen Virol* . 56:371–382.
144. Webster W.A., Casey G.A., Charlton K.M., (1976). The mouse inoculation test in rabies diagnosis: early diagnosis in mice during the incubation period. *Can J Comp Med*; 40:322-325.
145. Wiktor T.J., Doherty P.C., Koprowski H. (1977) Suppression of cell-mediated immunity by street rabies virus. *J Exp Med.* 145:1617–1622.
146. Winkler W.G. (1975) Fox rabies. En: Baer, G. *The Natural History of Rabies.* Orlando, Academic Press. p 3–22.
147. Winkler W.G., Shaddock J.H., Bowman C., (1985) Rabies virus in salivary glands of raccoons (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis*; 21:297–298.
148. Woldehiwet Z. (2002) Rabies: recent developments. *Res Vet Sci* 73(1):17-25.
149. World Health Organization (2004). Expert Consultation on Rabies, first report. Geneva. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_931_eng.pdf. Fecha de consulta: 23/4/14. p. 20.
150. World Health Organization (2007). Rabies - Bulletin - Europe, in Rabies Information System of the WHO Collaboration Centre for Rabies Surveillance and Research. Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d12267.pdf>. Fecha de consulta: 14/Julio/2014.
151. World Health Organization (WHO) (1985) Expert Committee On Biological Standards Thirty-Fifth Report. World Health Organization Technical Report Series No. 725. Geneva. WHO. Disponible en:

http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_725.pdf. Fecha de consulta: 12/Julio/2014.

152. World Health Organization (WHO) (1992) Expert Committee on Rabies: eighth report. Technical Report Series, No. 824. 85p.
153. Wunner W.H., Dietzschold B., Smith C.L., Lafon M., Golub E. (1985) Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology*. 140:1–12.
154. Xianhe B., Warner C.K., Fekadu M., (1993) Comparisons of nucleotide and deduced amino acid sequences of the glycoprotein genes of a Chinese street strain (CGX89-1) and a Chinese vaccine strain (3aG) of rabies virus. *Virus Res*; 27:101–112.
155. Yelverton E., Norton S., Obijeski J.P., Goeddel D.V., (1983) Rabies virus glycoprotein analogues: Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science*; 219:614–620.
156. Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y, Takenaka S, Sakamoto K, Manabe H, Nakagawa S, Kondo M. (1997). Methylprednisolone inhibits neutrophil-endothelial cell interactions induced by interleukin-1beta under flow conditions. *Life Sci*. 60(25):2341-2347.
157. Zanoni R., Hornlimann B., Wandeler A.I., (1990). Rabies Tissue Culture Infection Test as an Alternative for the Mouse Inoculation Test. *ALTEX* 7:15
158. Zeidner N.S., Myles M.H., Mathiason-DuBard, C.K., (1990). Alpha interferon (2b) in combination with zidovudine for the treatment of presymptomatic feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1749-1756.