

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA DE CANINOS
VACUNADOS CONTRA EL VIRUS DE LA RABIA**

Por



Nicolás BURGHI RIVERO

Juan Marcos MORENO MOREIRA



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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2011

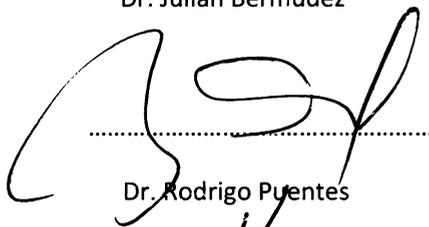
PAGINA DE APROBACION

Presidente de Mesa:



Dr. Julián Bermudez

Segundo Miembro (Tutor):



Dr. Rodrigo Puentes

Tercer Miembro:



Dr. Uruguaisito Benavides

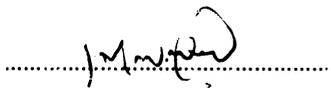
Cuarto Miembro (Co Tutor):

Dr. José Piaggio

Fecha:

14/11/2011

Autores:



Juan Marcos Moreno



Nicolás Burghi

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodrigo Puentes por apoyarnos en este trabajo, por confiar en nosotros, dedicarnos su tiempo, su trabajo y sus conocimientos.

Al Dr. José Piaggio por todo su aporte.

A todos aquellos profesionales, compañeros y propietarios que nos ayudaron a conseguir muestras, especialmente al Dr. Pablo Pisano, al cual agradecemos su ayuda desinteresada en este proyecto consiguiéndonos un gran número de muestras.

A nuestras familias, amigos y compañeros de estudio que nos acompañaron durante todos estos años de esfuerzo, gracias por el apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS, GRÁFICOS Y FIGURAS.....	VI
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	2
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
4.1 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE.....	4
4.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	8
4.3 SITUACIÓN EN LA REGIÓN.....	9
4.4 SITUACIÓN EN EL URUGUAY.....	11
4.5 TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	12
4.6 PATOGÉNI Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA RABIA CANINA.....	13
4.7 IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA.....	15
4.8 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD.....	16
4.9 TRATAMIENTO PARA LA ENFERMEDAD.....	19
4.10 RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR.....	20
4.11 VACUNACIÓN Y NIVELES DE ANTICUERPOS PROTECTORES.....	23
4.12 NIVEL DE PROTECCIÓN DE CANINOS VACUNADOS EN PAÍSES DE AMÉRICA LATINA.....	27
5. <u>OBJETIVOS</u>	28
5.1 <u>OBJETIVO GENERAL</u>	28
5.2 <u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	28

6. <u>HIPÓTESIS</u>	29
7. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	30
7.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y DATOS RECABADOS.....	30
7.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-RABICOS.....	31
7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
8. <u>RESULTADOS</u>	33
9. <u>DISCUSIÓN</u>	39
10. <u>CONCLUSIONES</u>	41
11. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	42

LISTA DE CUADROS, GRÁFICOS Y FIGURAS

Página

Figuras

Figura 1: Diagrama del virión de Rhabdovirus.....	5
Figura 2: Diagrama del ciclo de replicación de los Rhabdovirus.....	6
Figura 3: Tendencia de la rabia humana por especie agresora, América Latina, 1990-2003.....	9
Figura 4: Cobertura vacunal en América Latina 2001-2003.....	23

Gráficos

Gráfico 1: Porcentaje de animales protegidos y no protegidos	33
Gráfico 2: Porcentaje de caninos vacunados según nivel de protección.....	34
Gráfico 3: Porcentaje de hembras y machos protegidos y no protegidos.....	35
Gráfico 4: Porcentaje de animales protegidos y no protegidos según la edad del animal.	35
Gráfico 5: Nivel de protección según edad de los animales.....	36
Gráfico 6: Porcentaje de animales protegidos según tiempo de vacunación previo a la extracción	37
Gráfico 7: Nivel de protección según tiempo de vacunación previo a la extracción.....	38

Cuadros

Cuadro 1: Animales Protegidos y No Protegidos Según Edad.....	36
Cuadro 2: Nivel de protección según edad de los caninos.....	36
Cuadro 3: Animales Protegidos según tiempo de vacunación previo a la extracción.	37
Cuadro 4: Nivel de protección según fecha de vacunación previo a la extracción.....	38

1. RESUMEN:

La Rabia es una enfermedad infecciosa viral que se caracteriza por cuadros de encefalitis, conduciendo a la muerte de los animales afectados. Presenta un ciclo urbano y un ciclo silvestre, destacándose como importantes transmisores de la enfermedad el perro y el murciélago vampiro. Es una zoonosis que cobra 55000 vidas al año en todo el mundo. Presente en todos los continentes, en el Uruguay la enfermedad reemergió en el año 2007 presentándose en la especie bovina. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la forma más eficaz para reducir las muertes anuales de casos de rabia en humanos sería a través de vacunaciones en perros y gatos, dado que más del 95% de los casos de muertes en humanos son debido a mordeduras de perros infectados con el virus. En nuestro país, 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. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue determinar la protección frente al virus de la rabia en 140 caninos con previa vacunación y evaluar factores asociados. Para esto, se utilizó un Kit de ELISA comercial para la detección de anticuerpos específicos contra el virus. De las 140 muestras analizadas, 50 (35,7%, IC 95%: 28 - 44%) presentaron títulos de anticuerpos superiores a 0.5 UI/ml, indicando un nivel de protección aceptable según la OIE. El restante (64,3%) de los animales con historia de vacunación, no tienen títulos con niveles de protección (mayores o igual a 0.5 UI/ml). Los resultados del presente trabajo, deja de manifiesto el posible riesgo de infección que tiene la población canina estudiada. Medidas sanitarias más rigurosas deberían ser consideradas para lograr un status inmunitario aceptable en esta población.

2. SUMMARY

Rabies is a viral infectious disease characterized by encephalitis, this leads the affected animals to death. It presents an urban cycle and a wild cycle, as important transmitters of the disease stand out the dog and the vampire bat. This zoonotic disease takes 55,000 lives per year worldwide. Present in all continents, the disease reemerged in Uruguay in 2007, appearing in the bovine species. According to the World Health Organization (WHO), vaccination of dogs and cats is the most effective measure to reduce the number of human deaths due to this disease, since over 95% of cases contract the disease because of infected dogs bites. In our country, dogs vaccination is done partially, since it is not mandatory, this jeopardizes the protection of all susceptible animals, implying a potential risk to public health. In this sense, the aims of this study were determine the protection against rabies virus in 140 dogs with previous vaccination and to assess factors associated. To achieve this, we used a commercial ELISA kit for specific antibodies detection. Out of the 140 samples tested, 50 (35.7%, 95% CI: 28 - 44%) had antibody titers above 0.5 IU / ml, indicating an acceptable level of protection according to the OIE. The remaining samples (64.3%) did not show titles with protection levels (greater than or equal to 0.5 IU/ ml). The results presented here, reveals the possible risk of infection in the studied dog population. More rigorous sanitary measures should be considered to achieve an acceptable immune status in this population.

3. INTRODUCCIÓN

La rabia es una grave enfermedad zoonótica que causa 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 causada por perros rabiosos (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 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), ha habido pocos estudios de campo realizados para evaluar el nivel de protección conferida por las vacunas a los perros locales.

En nuestro país, 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. Por otro lado, no existen controles oficiales sobre el status inmunitario de la población canina vacunada, 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, el riesgo de contagio en los caninos, es posible.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el título de anticuerpos contra la rabia en 140 caninos con historia de vacunación y comparar con los títulos protectores establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Esto nos permitió conocer el nivel de protección que presentan los perros vacunados frente a una posible infección. En el mismo sentido, se evaluó el tiempo previo de vacunación en relación al nivel de protección, de manera tal de saber si la frecuencia de la vacunación utilizada, fue suficiente para garantizar una protección adecuada.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



4.1. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

La rabia es una encefalitis terminal, 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, 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) (Dietzchold 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) (Dietzchold y col., 2008).

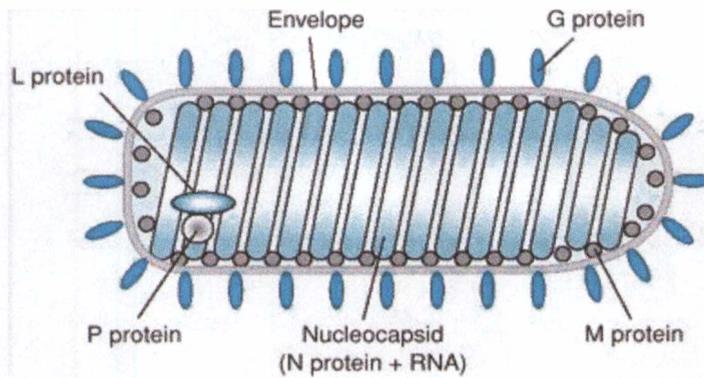


Figura 1. Diagrama del virión de Rhabdovirus. (Extraído de Lyles, D.S, Rupprecht, C.E. (2007) Volume I. Rhabdoviridae. En: Fields Virology. 5ª ed, Lippincott Williams & Wilkins. P 1363-1408)

La proteína G es el antígeno de superficie principal, capaz de inducir y reaccionar con anticuerpos neutralizantes (Cox y col., 1977; Dietzchold 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 estas estructuras son responsables para 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 col., 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 (Dietzchold 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 (Dietzchold 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).

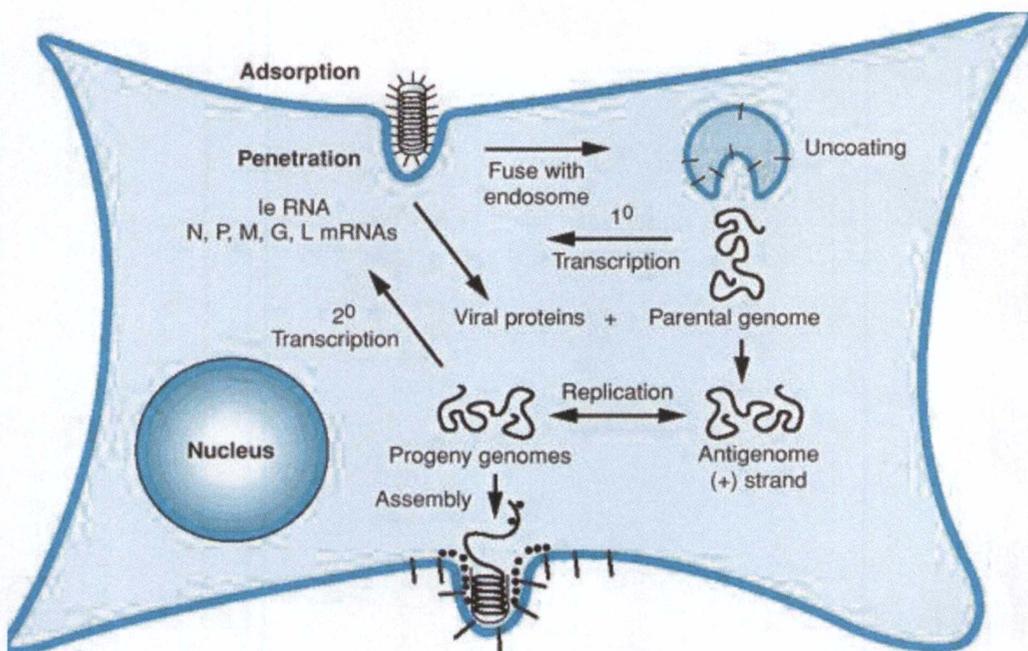


Figura 2. Diagrama del ciclo de replicación de los Rhabdovirus. Las etapas ilustradas son adsorción y penetración del virus por endocitosis, fusión de la envoltura con las membranas endosomales, liberación de la nucleocápside, transcripción primaria, replicación del genoma para producir antígenomas y 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 (Dietzchold 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 (Dietzchold y col., 2008).

4.2. 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 (Diego, 1974).

Este tipo de rabia afecta principalmente a los bovinos, produciendo la rabia paresiante 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).

4.3. 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).

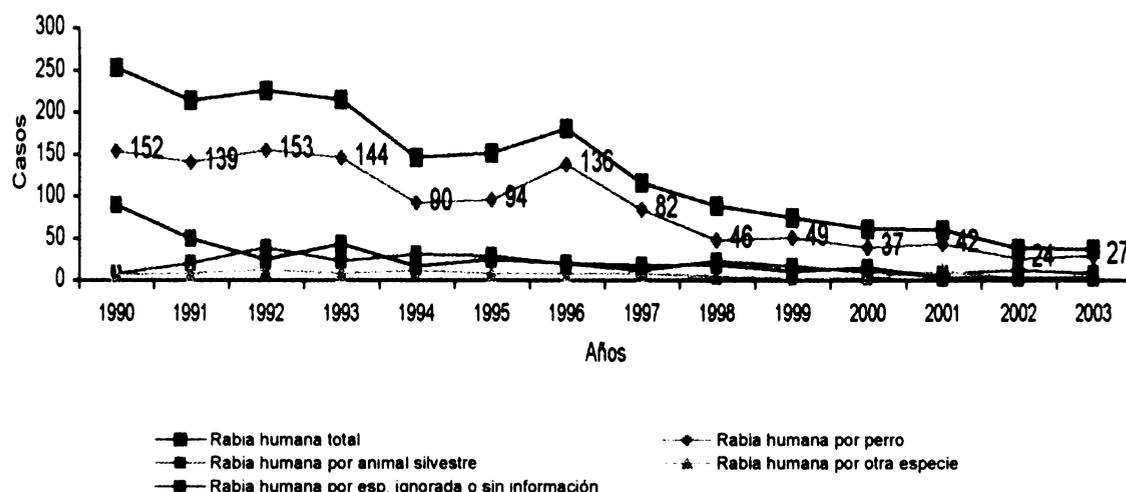


Figura 3: Tendencia de la rabia humana por especie agresora, América Latina, 1990-2003 (Extraído de Organización Panamericana de la Salud, 2005. Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: análisis de la situación. Washington D.C. PAHO. p 1-71).

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).

4.4. SITUACIÓN EN EL URUGUAY

ACU

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 parestante 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.

4.5. 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 (Dietzchold 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, 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).

4.6. 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 centrífugamente 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).

4.7. IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA

Alrededor de 55000 personas mueren cada año debido a la rabia urbana, y son más de 3 billones lo que se encuentran en riesgo de infección con el virus en más de 150 países (Wunner, 2010). 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, 1999).

4.8. DIAGNÓSTICO 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, 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 (Knipe y Howley, 2007).

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 tallo cerebral. 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 esta 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 mas 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; McQuiston y col., 1999).

Las pruebas de neutralización de los virus en cultivos celulares son las prescritas para el comercio internacional. Alternativamente, se puede usar una prueba que se correlacione con esta, como un ensayo de inmunoenzima con anticuerpos contra la proteína G o la prueba de neutralización en ratones. Los resultados se expresan en Unidades Internacionales o en unidades equivalentes relativas a un antisuero estándar internacional (OIE, 2011).

Las pruebas serológicas se usan muy poco en estudios epidemiológicos debido a la seroconversión tardía y al bajo porcentaje de animales que sobreviven a la enfermedad con anticuerpos post-infección. La principal aplicación de la serología es determinar respuestas a la vacunación en animales domésticos antes de sus desplazamientos internacionales o en poblaciones salvajes después de la inmunización oral de los reservorios de rabia (OIE, 2011).

Finalmente, el ensayo de inmunoadsorción 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). La prueba se basa en el uso de una técnica de inmunoanálisis enzimático con fase sólida denominado ELISA indirecto. Una

microplaca se recubre con glicoproteína de la rabia extraída de la membrana del virus inactivado y purificado (Atanasiu y col., 1978). El conjugado enzimático consiste en una proteína A de *Staphylococcus aureus* asociado con peroxidasa. Los controles positivos, calibrados contra los patrones de la OIE, permiten la determinación cualitativa o cuantitativa del título de anticuerpos contra el virus de la rabia en suero (Atanasiu y col., 1980).

Los títulos en las pruebas de cuantificación se obtienen a partir de la lectura directa de la curva estándar y se expresa en unidades equivalentes por ml (UE/ml), unidad equivalente a las unidades internacionales definidas por la seroneutralización (Servat y col., 2007).

4.9. TRATAMIENTO PARA LA ENFERMEDAD

La administración de un tratamiento eficaz 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). Las vacunas modernas contra la rabia consisten en virus inactivados derivados de líneas celulares continuas que se dan por vía intramuscular o intradérmica siguiendo los protocolos recomendados de la OMS. Estos regímenes han sido desarrollados para garantizar una respuesta inmune óptima y por lo general consisten en múltiples inyecciones en un período de 4 semanas (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).

4.10. 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 (Blondel, 2002; Prehaud y col., 2005; Chelbi-Alix y col., 2006; Johnson, 2006; Rieder y Conzelmann, 2009; 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 desnudos (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; Dietzchold 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., 1987; Dietzschold y col., 1989; Tollis y col., 1991; Lodmell y col., 1993; Dietzchold 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).

Se ha visto que la proteína G es uno de los antígenos que inducen mayores respuestas de estos Linfocitos T citotóxicos (MacFarlan y col., 1984).

El perfeccionamiento de la síntesis de ARN y la expresión de genes pueden contribuir sustancialmente a la viabilidad sostenida del virus en el huésped infectado, ya que puede ayudar en la fuga de la respuesta antiviral de la célula huésped, tal como la presentación de antígenos o el daño prematuro de la célula huésped. Esto parece ser crucial para llevar a cabo el transporte del virus por largas distancias a través de los axones para que se manifieste en el sistema nervioso central (SNC) y la posterior transmisión de la infección (Finke y Conzelmann, 2005).



4.11. 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). Las vacunas orales que podrían llegar a estos perros callejeros, todavía no son comunes en el mercado (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).

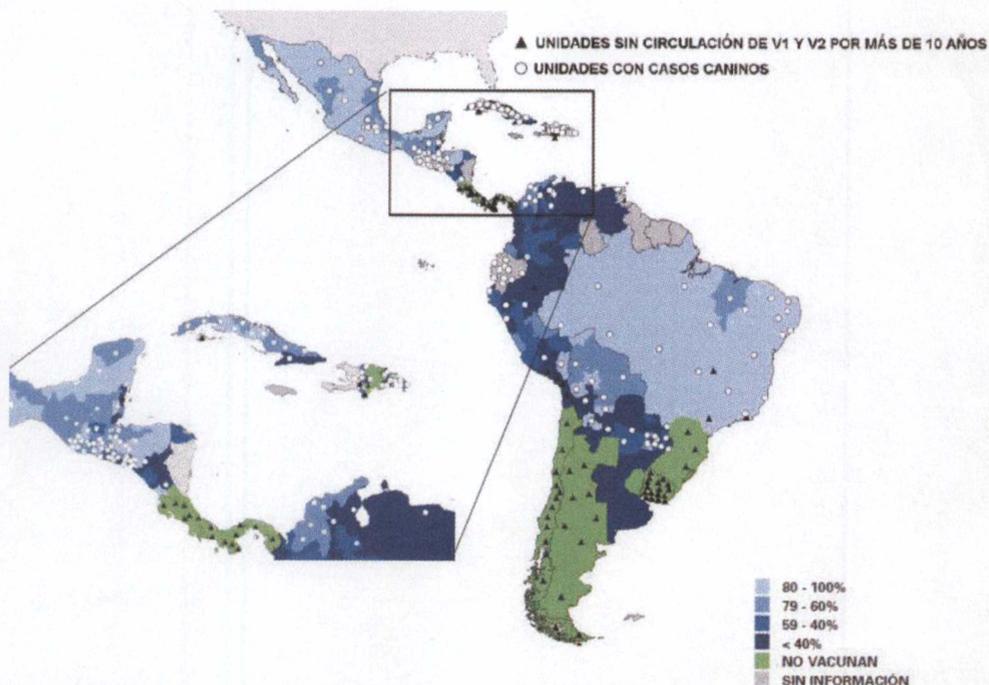


Figura 4: Cobertura vacunal en América Latina 2001-2003. (Extraído de Organización Panamericana de la Salud, 2005. Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: análisis de la situación. Washington D.C. PAHO. p 1-71)

La mayor parte de la farmacopea Europea y de los países de América del Norte requiere que las vacunas para perros sean testeadas en ésta especie, pero son utilizados perros criados para fines de laboratorio. Esto podría conducir a la sobreestimación de la actividad de protección de las vacunas cuando se utilizan en perros comunes, que generalmente están parasitados y que pueden estar mal alimentados (Seghaier y col., 1999). Los perros criados en los países en desarrollo en general, producen menos títulos de anticuerpos que los perros europeos, mientras que estos a su vez producen menos títulos que los perros de laboratorio (Haddad, 1987; Sage y col., 1993).

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).

Las vacunas contra la rabia para aplicar en animales contienen virus vivos atenuados para la especie animal concreta (como la cepa Flury con pocos pases en huevo (LEP), la Flury con muchos pases en huevo (LEP), o la Street-Alabama-Dufferin o la Kelev), o virus inactivados por medios químicos o físicos, o bien vacunas recombinantes. El virus se propaga en huevos embrionados o en cultivos celulares (OIE, 2011).

Las vacunas contra la rabia preparadas de la cepa original 1885 de Pasteur y sus cepas derivadas (virus Pasteur, virus de desafío (challenge) estándar, Pitman-Moore, etc.), y de cepas aisladas más recientemente (Flury, Street-Alabama-Dufferin [SAD], Vnukovo y Kelev), protegen contra todas las cepas del genotipo 1 aisladas hasta la fecha (OIE, 2011). En general, el nivel de protección es inversamente proporcional a la distancia genética entre las cepas nuevas y cepa de la vacuna utilizada (Hanlon y col., 2005; Nandi y Kumar, 2010).

Las vacunas convencionales contra el virus de la rabia pueden no suministrar una adecuada protección cruzada contra otros lisavirus, especialmente en el filogrupo II; no existe protección contra el virus Mokola (Kieny y col., 1984; Von Teichman y col., 1998) ni el recientemente descrito virus West Caucasian de murciélago (Hanlon y col., 2005). Usando vacunas con virus de la rabia convencional se ha demostrado neutralización cruzada contra dos virus del filogrupo I: EBLV tipo-1 y EVLV tipo-2 (Brookes y col., 2005). La existencia de un gran número de genotipos puede tener repercusiones importantes en la producción de vacunas (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 un adyuvante (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 antirrábicas recombinantes no son vacunas vivas. Se preparan insertando ácido nucleico no infectante de la rabia en un vector como el poxvirus vacunal o canaripoxvirus (OIE, 2011). Como no contienen virus de la rabia vivo, los animales vacunados con estas vacunas recombinantes no deberían de tener limitada su entrada en países que tienen restricciones para la entrada de animales vacunados con vacunas antirrábicas vivas. 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) (OIE, 2011).

Normalmente las vacunas contra la rabia están liofilizadas, pero las vacunas con virus inactivados se pueden mantener en forma líquida, preferiblemente con un adyuvante. Antes de autorizar nuevas vacunas se debe determinar la duración de la inmunidad derivada de su empleo en animales vacunados de la especie concreta. Las vacunas deben proporcionar una protección inmunitaria durante al menos 1 año (OIE, 2011).

El Comité de Expertos de la Rabia de la OMS recomienda que las vacunas preparadas a partir de cultivos celulares deben sustituir a las vacunas de tejido nervioso, tan pronto como sea posible (Nandi y Kumar, 2010). Las BHK21 son las líneas celulares más utilizadas para la producción de vacunas para animales (Kallel y col., 2002).

Para evaluar la respuesta inmune generada por estas vacunas, existen kits comerciales de técnicas como el ELISA, que permiten una detección cuantitativa de anticuerpos contra la rabia en muestras individuales de sueros de perros y gatos tras la vacunación. 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). En el 2007 el comité internacional aprobó el ELISA como método para evaluar la respuesta a la vacunación en perros y gatos para movimientos internacionales (OIE, 2011), y establece que además de tener un mínimo de 0,5 UI / ml de títulos de anticuerpos neutralizantes contra rabia deben tener un mínimo de 90 días y un máximo de 24 meses a partir de la vacunación para la entrada en el país o área libre (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., 2003).

En Uruguay las vacunas de rabia autorizadas en caninos y felinos son inactivadas, por razones de seguridad (Albert y col., 2006). 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.

4.12. NIVEL DE PROTECCIÓN DE CANINOS VACUNADOS EN PAÍSES DE AMÉRICA LATINA

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 EU/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. Los autores concluyeron que existe una deficiente protección inmune contra la rabia en dos distritos distintos en Perú, lo cual hace estas zonas muy susceptibles a desarrollar brotes de rabia canina (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).

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la protección frente al virus de la rabia en caninos con previa vacunación y evaluar factores asociados.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

5.2.1. Establecer el nivel de protección contra el virus de la rabia en la población de estudio, de acuerdo a lo establecido por la OIE.

5.2.3. Evaluar la asociación de los niveles de protección encontrados con la edad, el sexo y tiempo de vacunación previo a la extracción de sangre.

6. HIPOTESIS

La proporción de caninos vacunados que presentan un nivel suficiente de anticuerpos protectores es baja. Existe relación entre el nivel de protección y el tiempo de vacunación previo la extracción.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y DATOS RECABADOS

Se colectaron muestras de sangre sin anticoagulante de 140 caninos hembras y machos, de distintas razas y edades, procedente de, centro hospital veterinario (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República), 4 clínicas veterinarias, propietarios de caninos que participaron en forma voluntaria, del Departamento de Montevideo e interior. Estos animales no presentaron enfermedades clínicas aparentes, relacionadas con inmunodeficiencias.

Se procedió a la extracción de sangre a través de la vena cefálica. Luego de obtenida la muestra de sangre, se colectaron en tubos para la posterior extracción del suero mediante centrifugación a 3000 rpm. Se rotularon adecuadamente y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Además se realizó una ficha para cada animal documentando la edad (menores de 1 año, mayores de 1 año y menores de 3 años, mayores de 3 años y menores de 6 años y mayores de 6 años), raza, sexo, localidad y tiempo transcurrido desde la vacunación hasta la extracción, categorizándolo en menor a 6 meses de vacunados, entre 6 meses y 1 año, y mayor a 1 año de vacunados.

7.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-RABICOS

Las muestras fueron procesadas utilizando el kit comercial para la detección y valoración in vitro de la IgG contra la glicoproteína del virus de la rabia en suero (Platelia Rabies II Kit ad usum veterinarium Ref.: 355-0180, Marnes-la Coquette, France). Se realizó la técnica, siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio Rad, France). La prueba se fundamentó en un inmunoanálisis enzimático en fase sólida preparada con la glicoproteína extraída de la membrana del virus inactivado y purificado siguiendo el procedimiento de Perrin (Perrin y col., 1986) y de un conjugado enzimático que corresponde a la proteína A de *Staphylococcus aureus* acoplado a la peroxidasa (de acuerdo con los protocolos de Forsgren y Sjoquist y de Biderfield (Forsgren y Sjoquist, 1966; Biderfield y col., 1975). Finalmente la placa se leyó con un lector de ELISA a 460 nm. La presencia y cantidad de anticuerpos contra el virus de la rabia en una muestra se determinó comparando la densidad óptica de la muestra con una curva estándar. Los títulos de suero se expresan en unidades equivalentes por ml (UE/ml), unidad equivalente a las unidades internacionales (UI/ml) definidas por seroneutralización. Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA fueron el 88,4% y 98,8%, respectivamente (Feyssaguet y col., 2005). Los sueros con títulos mayores o iguales a 0.5 UE/ml fueron considerados protegidos. Además se uso el criterio de clasificación recomendado por el kit sobre nivel de protección, donde los títulos mayores a 4 UI/ml se considera como un nivel elevado, aquellas que están entre 0.5 y 4 UI/ml son consideradas con nivel suficiente, las que son menores a 0.5 pero mayores a 0.125 UI/ml con nivel insuficiente y en las menores a 0.125 UI/ml se considera sin detección de anticuerpos.

7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis descriptivo de las variables estudiadas a través porcentajes, tablas y gráficos.

Las proporciones fueron estimadas con un nivel de confianza del 95 % utilizando la Distribución Binomial.

Para hallar la proporción verdadera de los animales protegidos se utilizó la fórmula:

$$P_v = \frac{PA + (E-1)}{E + (S-1)}$$

Donde PA es la proporción aparente, E y S son la especificidad y la sensibilidad de la prueba respectivamente (Rogan y Gladen, 1978).

Para comparar los niveles de protección entre categorías para las variables estudiadas (sexo, edad y tiempo de vacunación previo a la extracción de sangre) se utilizó la prueba de χ^2 con un nivel de significación de 5% (se usó el α con corrección de Bonferroni para las comparaciones entre las categorías de tiempo de vacunación puesto que el análisis de la tabla general resultó significativo).

El análisis estadístico fue realizado con el software STATA v 11.2 (StataCorp, 2009)

8. RESULTADOS

De las 140 muestras analizadas, 50 (35,7%, IC 95%: 28 - 44%) presentaron títulos de anticuerpos superiores a 0.5 UI/ml, indicando un nivel de protección aceptable según la OIE. El restante (64,3%) de los animales con historia de vacunación, no tienen títulos con niveles de protección (mayores o igual a 0.5 UI/ml) (Gráfico 1). La proporción verdadera de protección (corregida según especificidad y sensibilidad de la prueba de ELISA) es de 39,4%.

Del total de muestras analizadas, sólo 12 (8.6%) presentaron un título de anticuerpos elevado (>4 UI/ml), 38 (27.1%) tuvieron un nivel suficiente de protección (0.5-4 UI/ml), 35 muestras (25.0%) tuvieron un nivel insuficiente de anticuerpos para generar protección (0.125-0.5 UI/ml) y en 55 (39.3%) no se detectaron niveles de anticuerpos antirrábicos (<0.125 UI/ml) (Gráfico 2).

Gráfico 1: Porcentaje de animales protegidos y no protegidos

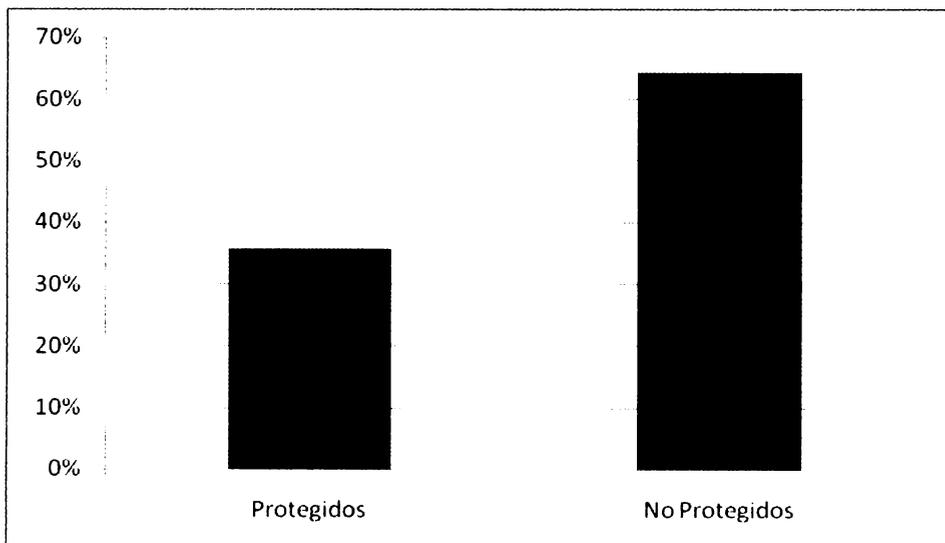
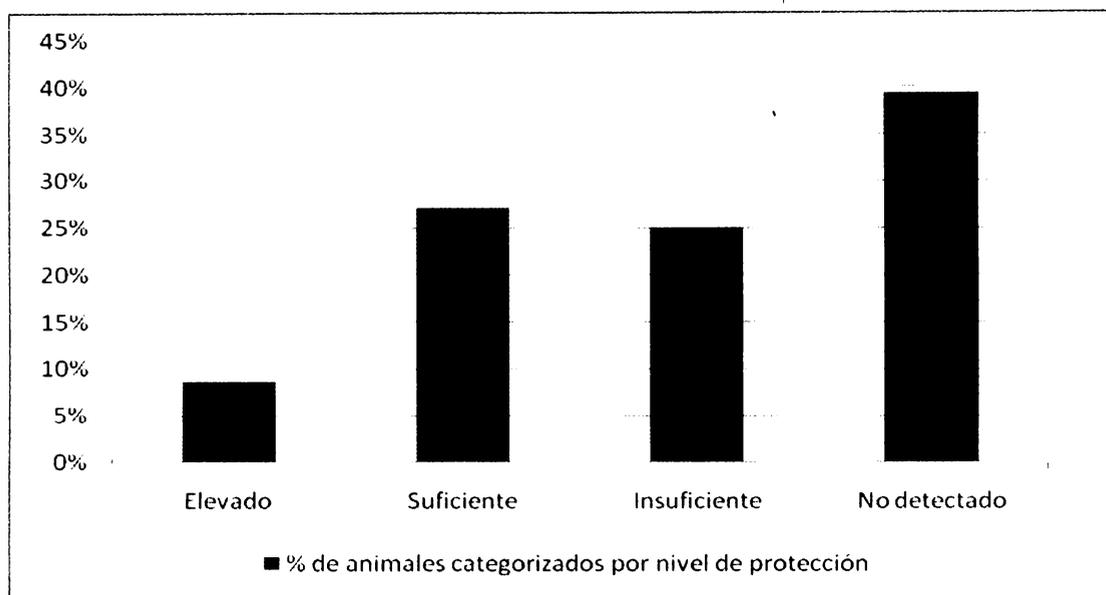


Gráfico 2: Porcentaje de caninos vacunados contra rabia según nivel de protección.



De los 140 sueros analizados, 82 fueron sueros de caninos hembras, lo que corresponde al 59% y 58 fueron sueros de caninos machos, que representan el 41% restante. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la protección según el género del animal ($\chi^2 = 0,27$ $p = 0,33$). El 31.03% y el 37.8% de machos y hembras respectivamente, estaban protegidos (Gráfico 3).

Con respecto a la edad de los animales, en los 20 que eran menores a 1 año de edad, sólo 7 (35%, I.C 95%: 15 - 59%) estaban protegidos a diferencia de los 13 restantes que no lo estaban (Gráfico 4 y Cuadro 2). De los 41 animales que tenían entre 1 y 3 años 12 (29,3%, IC 95%: 16 - 45%) estaban protegidos. De la categoría que se encontraba entre los 3 y 6 años de edad solo 13 (41,9%, IC 95%: 24 - 61%) de los 31 presentaban un nivel de anticuerpos protectores suficiente. De los 48 perros mayores a 6 años solo 18 estaban protegidos (37,5%, IC 95%: 24 - 53%).

Si observamos el nivel de protección vemos que de los menores a 1 año de edad, sólo 1 (4.8%) presentó títulos elevados de anticuerpos protectores, 6 (28.6%) presentaron títulos suficientes de protección, 9 (42.9%) títulos en niveles insuficientes para conferir protección y en 5 muestras (23.8%) no se detectaron anticuerpos antirrábicos, (Cuadro 2 y Gráfico 5).

En los 40 perros mayores de 1 año y menores de 3 años, 2 presentaron niveles elevados representando el 5.0%, en 10 muestras (25.0%) se observaron títulos suficientes de protección, en 6 (15.0%) muestras se detectó un nivel insuficiente y finalmente el mayor porcentaje (55.0%) fueron las 22 muestras en las que no se detectaron anticuerpos, (Cuadro 2 y Gráfico 5). En los 31 perros mayores a 3 años y

Gráfico 3: Porcentaje de hembras y machos protegidos y no protegidos

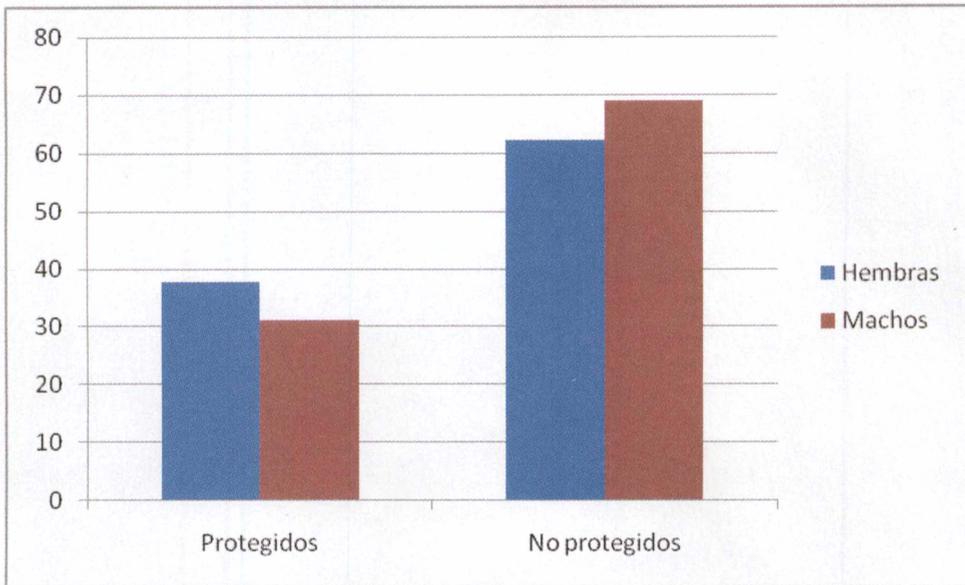
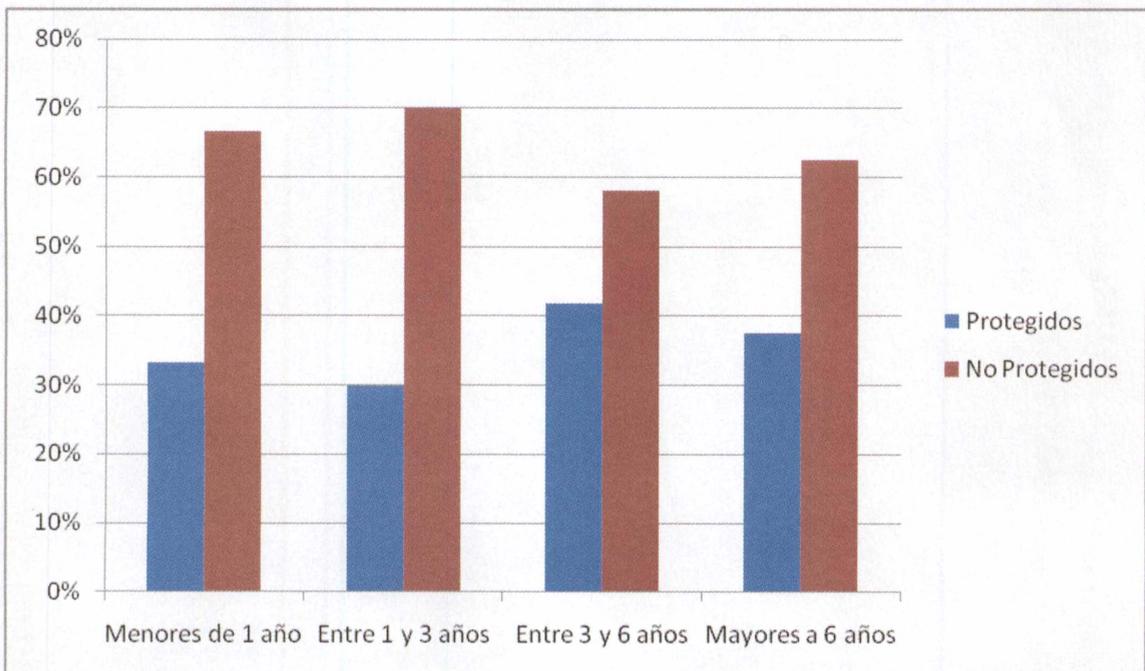


Gráfico 4: Porcentaje de animales protegidos y no protegidos según la edad del animal.

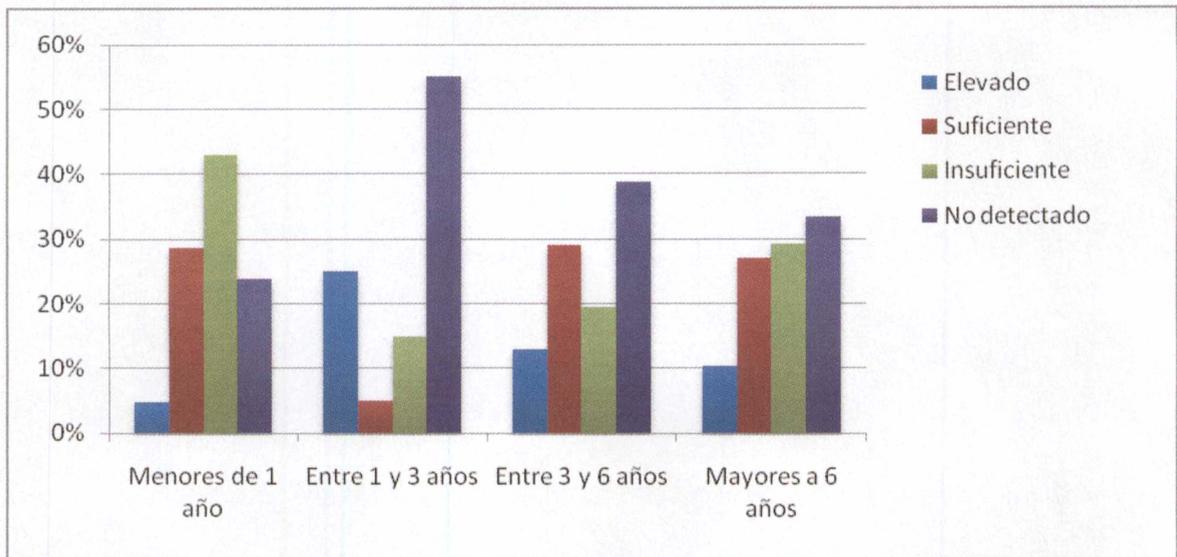


Cuadro 1: Animales Protegidos y No Protegidos según edad

Edad	P(n)	P(%)	NP(n)	NP(%)
Menores de 1 año	7	35	13	65
Entre 1 y 3 años	12	29,3	28	70,7
Entre 3 y 6 años	13	41,9	18	58,1
Mayores a 6 años	18	37,5	30	62,5

Animales Protegidos (P), Animales No Protegidos (NP).

Gráfico 5: Nivel de protección según edad de los animales.



Cuadro 2: Nivel de protección según edad de los caninos.

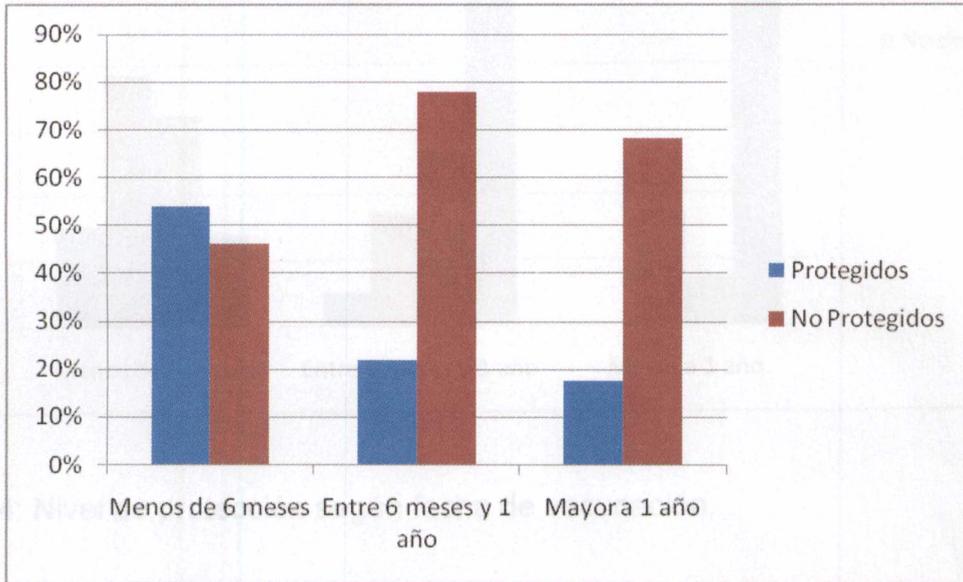
Edad	E (n)	E (%)	S (n)	S (%)	NS (n)	NS (%)	ND (n)	ND (%)
Menores de 1 año	1	4,8	6	28,6	9	42,9	5	23,8
Entre 1 y 3 años	2	25	10	5	6	15	22	55
Entre 3 y 6 años	4	12,9	9	29	6	19,4	12	38,7
Mayores a 6 años	5	10,4	13	27,1	14	29,2	16	33,3

Elevado (E), Suficiente (S), Insuficiente (NS), No detectado (ND).

menores de 6, se observó que 4 muestras (12.9%) presentaron un nivel de anticuerpos elevado, en 9 (29.0%) un nivel suficiente, en 6 (19.4%) no fue suficiente el título de protección y en 12 muestras (38.7%) no se detectaron anticuerpos antirrábicos, (Cuadro 2 y Gráfico 5). En aquellas muestras que provenían de caninos mayores de 6 años se pudo observar que 5 (10.4%) presentó un nivel elevado de protección, en 13 muestras (27.1%) el nivel detectado fue suficiente, en 14 (29.2%) los títulos fueron insuficientes y finalmente en 16 perros mayores a 6 años (33.3%) no se detectaron anticuerpos contra rabia (Cuadro 2 y Gráfico 5). No se observan diferencias significativas entre las categorías ($\chi^2 = 1,33$ $p = 0,72$).

En cuanto a los animales protegidos según tiempo de vacunación previo a la extracción, podemos observar que de los 66 caninos menores de 6 meses de vacunación, 35 (53%, IC 95%: 40 – 65%) presentaron protección y los restantes 30 (47%) estaban desprotegidos. De los 40 caninos que tenían entre 6 meses y 1 año de edad solo 9 (22,5%, IC 95%: 11 – 38%) presentaban un nivel de anticuerpos suficiente como para brindar protección. De los 34 perros comprendidos en la categoría que tenía más de 1 año de edad, solo 6 (17,7%, IC 95%: 6 – 35%) presentaban protección (Gráfico 6 y Cuadro 3).

Gráfico 6: Porcentaje de animales protegidos según tiempo de vacunación previo a la extracción.



Cuadro 3: Animales Protegidos según tiempo de vacunación previo a la extracción.

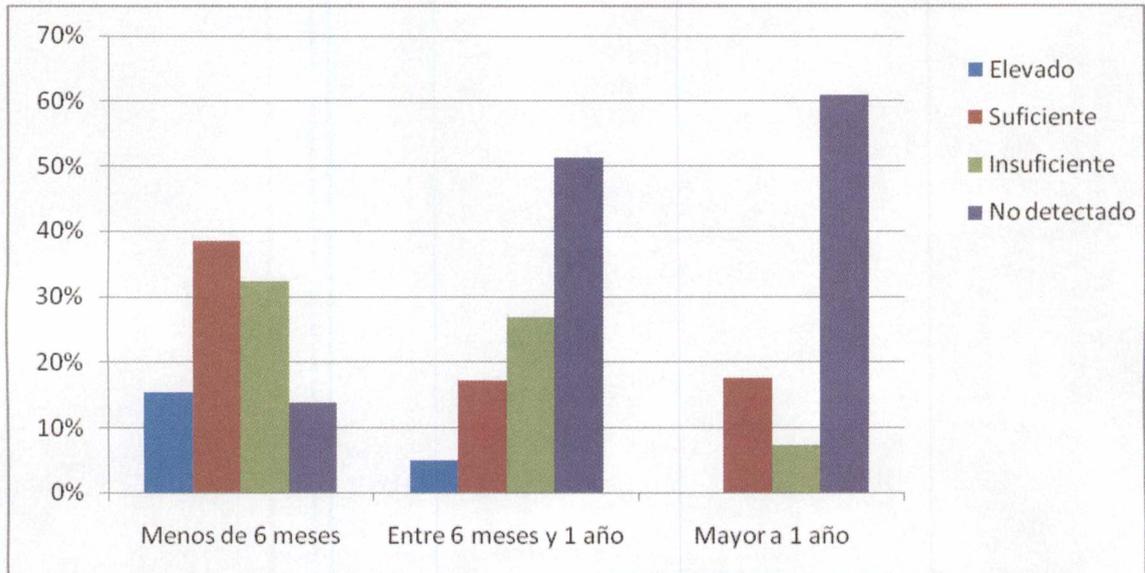
Tiempo de Vacunación.	P (n)	P (%)	NP(n)	NP(%)
Menos de 6 meses	35	53	30	47
Entre 6 meses y 1 año	9	22,5	32	77,5
Mayor a 1 año	6	17,5	28	82,5

Animales Protegidos (P), Animales No Portegidos (NP).

Si a su vez analizamos por nivel de protección según tiempo de vacunación previo podemos ver que de los 65 caninos vacunados hacia menos de 6 meses, sólo 10 (15.4%) presentaron un nivel elevado de protección, 25 (38.5%) un nivel suficiente, 21 (32.3%) un nivel insuficiente y 9 (13.8%) no presentaron anticuerpos antirrábicos (Cuadro 4 y Gráfico 7). De los 41 caninos vacunados más de 6 meses pero menos de 1 año sólo 2 (4.9%) presentaron un nivel elevado de anticuerpos, 7 (17.1%) un

nivel suficiente, 11 (26.8%) nivel insuficiente y en 21 (51.2%) muestras no se detectaron anticuerpos, (Cuadro 4 y Gráfico 7). De los 32 caninos vacunados hacia más de un año ninguno presentó un nivel de anticuerpos elevado, 6 (17.6%) un nivel suficiente, 3 (7.3%) un nivel insuficiente de protección y en 25 muestras (61.0%) no se detectaron anticuerpos (Cuadro 4 y Gráfico 7).

Gráfico 7: Nivel de protección según tiempo de vacunación previo a la extracción.



Cuadro 4: Nivel de protección según fecha de vacunación.

Tiempo de Vacunación.	E (n)	E (%)	S (n)	S (%)	NS (n)	NS (%)	ND (n)	ND (%)	Total
Menos de 6 meses	10	15,4	25	38,5	21	32,3	9	13,8	65
Entre 6 meses y 1 año	2	4,9	7	17,1	11	26,8	21	51,2	41
Mayor a 1 año	0	0	6	17,6	3	7,3	25	61	34

Elevado (E), Suficiente (S), Insuficiente (NS), No detectado (ND).

Si analizamos la variable tiempo de vacunación previo a la extracción, observamos que a partir de la hipótesis nula que las proporciones son iguales para las tres categorías, al testearla por χ^2 se rechaza dicha hipótesis ($\chi^2=16,5$ $p<0,001$), por lo tanto hay diferencias significativas entre las categorías.

Si analizamos estas categorías, se observa que existe una diferencia significativa entre los perros menores a 6 meses y los que tienen entre 6 meses y 1 año ($\chi^2=11,61$ $p=0,001$). Entre la categoría que está entre 6 meses y 1 año y la que es mayor a 1 año no hay diferencias significativas ($\chi^2=0,26$ $p=0,60$). Y para la categoría con menos de 6 meses de vacunación y la que se encuentra mayor a un año sí hay diferencia significativa ($\chi^2=10,82$ $p=0,001$).

9. DISCUSIÓN

Son muchos los factores que pueden influir para que los animales no presenten un nivel adecuado de protección tras la vacunación. Entre ellos podemos incluir la calidad de las vacunas y su capacidad inmunogénica, la forma de conservación de las mismas, la correcta administración, el estado de sanidad del animal, así como su estado nutricional. Por lo tanto, del punto de vista sanitario, esta situación debe ser encarada de manera integral, considerando todos estos aspectos como influyentes en una respuesta inmune adecuada.

En nuestro país, si bien se recomienda la vacunación en perros, la misma no es obligatoria, pudiendo ser ésta una práctica no tan frecuente. Además las revacunaciones en los animales vacunados muchas veces no se realizan en la forma que corresponde. No se realizan campañas de vacunación masiva y tampoco existen controles oficiales para conocer el status inmunitario de la población canina. Si analizamos esta situación, podemos inferir que podrían ser pocos los caninos que llegan a ser vacunados, limitándose muchas veces sólo a aquellos que reciben atención veterinaria periódicamente. Además, en muchos planes de vacunación, la vacuna contra rabia es una de las últimas que el animal recibe cuando es cachorro, omitiéndose muchas veces al no completarse el plan de vacunación. Si a ésta situación le sumamos que los perros que creemos que están realmente protegidos por haber sido vacunados, no cumplen con el nivel mínimo de protección establecido internacionalmente, es una situación alarmante.

De los 140 sueros de caninos con vacunación previa analizados, sólo el 35.7% mostró un nivel de protección según lo establecido por la OIE (mayor o igual a 0.5 UI/ml) (Gráfico 1). Esto es un porcentaje bajo de protección que indica el status inmunológico de los animales frente al virus de la rabia, confirmando la hipótesis planteada. Si analizamos los resultados según tiempo de vacunación previo a extracción vemos que los perros con vacunación reciente (<6 meses) mostraron un 53% (IC 95%: 40 - 65%) de protección, entre 6 meses y 1 año de vacunación 22,5% (IC 95%: 11 - 38%) y con más de 1 año de vacunación 17,6% (IC 95%: 7 - 34%) (Gráfico 6). Estos resultados permiten observar que a mayor tiempo transcurrido desde la vacunación, menor protección de los animales, resultando significativas las diferencias de las categorías 2 y 3 respecto a los recientemente vacunados (< 6 meses), pero no fueron significativas las diferencias entre las categorías entre 6 meses y un año y más de un año de vacunación. Confirmando la hipótesis planteada de que existe relación entre el nivel de protección y el tiempo transcurrido desde la vacunación.

La revacunación anual se recomienda comúnmente en nuestro país contra la rabia canina. Este plazo podría no ser suficiente para mantener un nivel de protección adecuado en la población.

Si comparamos los resultados obtenidos en este trabajo con otros realizados en América Latina, vemos que resultados similares se observaron en Perú en 2007 donde sólo el 32% presentaron protección (Lopez y col., 2007). Resultados con menor protección se encontraron en Colombia donde sólo el 24.5% estaban protegidos (Paéz y col., 2007). Si comparamos los resultados obtenidos en Brasil en perros vacunados hacia un año, donde se encontraron niveles de protección en el 25% de las muestras analizadas (Almeida y col., 1997), fueron muy similares a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, donde los perros vacunados entre 6 meses y un año y aquellos vacunados hacía más de un año presentaron niveles de protección de 22% y de 17.1% respectivamente.

10. CONCLUSIONES

- FACU

Los resultados del presente trabajo describen la protección inmunológica contra la rabia que tienen 140 caninos con vacunación previa, encontrándose un bajo porcentaje (35,7%) de protección (Gráfico 1), según los niveles de títulos protectores recomendados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Los animales con tiempo de vacunación menor a seis meses de edad presentaron diferencias significativas con las otras 2 categorías mayores de seis meses. En conclusión los animales con tiempo de vacunación menores a seis meses presentan inmunidad más alta que las otras dos categorías, pero de todas maneras sólo se llega a cubrir el 53.8 % de la población en estudio, (Gráfico6).

No se encontraron diferencias significativas con respecto a la edad y sexo de los animales en la población de estudio, (Gráfico 3 y Gráfico 4).

Por lo tanto, los resultados de éste trabajo, dejan de manifiesto el posible riesgo de infección que tiene la población canina analizada. Considerando que es una enfermedad reemergente en el Uruguay, el virus podría ser transmitido fácilmente entre la mayoría de la población canina estudiada. Al no presentar un nivel adecuado de protección, constituye sin duda un problema importante para la salud pública.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdussalam, M., Botton, P.C. (1974) Global aspect of rabies. Symposia series in immunobiological standardization, vol 21. Basel, Karger. p 3-17
2. Acha, P.N., Szyfres, B. (2003) Parte II: Virosis, Rabia. En: Acha y Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed., vol. II. Washington. Pan American Health Org, P. 351-374.
3. Albert, G., Brunner, R., Danner, K., Jungbak, C., Lemke, I., Moos, M., Selbitz, H., Truyen, U. (2006) Vacunación preventiva del perro. En: Albert. Vacunación de los animales domésticos. 3ª Ed. P 142,143.
4. Almeida, M.F., Aguilar, 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 Publica. 31(5): 502-507.
5. Amasino, C.F., Garbi, C.J., Amasino, M. F. (2002) La rabia urbana en la provincia de Buenos aires, Argentina: Origen- Evolución- Actualidad. Analecta Veterinaria. 22 (1): 17-31.
6. Anderson, L.J., Williams, L.P., Layde, J.B., Dixon, F.R., Winkler, W.G. (1984) Nosocomial rabies: investigation of contacts of human rabies cases associated with a corneal transplant. Am J Public Health 74:370–372.
7. Anilionis, A., Wunner, W.H., Curtis, P. (1981) Structure of the glycoprotein gene of rabies virus. Nature 294:275–278.
8. Atanasiu, P., Savy, V., Gibert, C. (1978) Rapid immunoenzymatic technique for titration of rabies antibodies IgG and IgM results. Med. Microbiol. Immunol. 166:201-208
9. Atanasiu, P., Perrin, P., Delagneau, J.F. (1980) Use of an enzyme immunoassay with protein A for rabies antigen and antibody determination. Develop. Biol. Standard. 46:207-215.
10. Baer, G.M., Cleary, W.F. (1972) A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. J Infect Dis. 125:520–527.
11. 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.
12. Baer, G.M. (1991) The Natural History of Rabies, 2a ed. Florida. CRC Press. 620

13. 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
14. Belotto, A., Leanes, L.F., Schneider, M.C., Tamayo, H., Correa, E. (2005) Overview of rabies in the Americas. *Virus Res.* 111: 5–12.
15. Biderfeld, P., Ghetie, V., Sjoquist, J. (1975) Demonstration and assaying of IgG antibodies in tissues and on cells by labelled staphylococcal protein A. *J. Immunol. Meth.* 6:249-259.
16. Blondel, D. (2002) Rabies virus P and small P products interact directly with PML and reorganize PML nuclear bodies. *Oncogene* 21:7957–7970.
17. Bourhy, H., Kissi, B., Tordo, N. (1993) Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology.* 194:70–81.
18. 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.
19. Brookes, S.M., Parsons, G., Johnson, N., McElhinney, L.M., Fooks, A.R. (2005) Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses. *Vaccine.* 23: 4101–4109.
20. 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.
21. Budzco, D.B., Charamella, L.J., Jelinek, D., Anderson, G.R. (1983) Rapid test for detection of rabies antibodies in human serum. *J Clin Microbiol.* 17: 481-484.
22. 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
23. 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.
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1972) Rabies in laboratory worker – Texas. *Morb Mortal Wkly Rep.* p.1113–1124.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1977) Rabies in laboratory worker – New York. *Morb Mortal Wkly Rep.* p. 183–184.

26. Charlton, K.M., Casey, G.A. (1979) Experimental rabies in skunks. Immunofluorescence light and electron microscope studies. *Lab Invest.* 41:36–44.
27. 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.
28. 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.
29. Chelbi-Alix, M. K., Vidy A., El Bougrini J., Blondel, D. (2006) Rabies viral mechanisms to escape the IFN system: the viral protein P interferes with IRF-3, Stat1, and PML nuclear bodies. *J. Interferon Cytokine Res.* 26:271–280.
30. 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.
31. 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):6657-68
32. Coleman, P.G., Dye, C. (1996) Immunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies. *Vaccine.* 14:185-6.
33. Constantine DG. (1962) Rabies transmission by nonbite route. *Public Health Rep* 77:287–289.
34. 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.
35. Cox, J.H., Dietzschold, B., Schneider, L.G. (1977) Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect Immun.* 16:754–759
36. Crandell, R.A. (1991) Arctic fox rabies. En: Baer GM, ed. *The Natural History of Rabies.* Boca Raton, FL: CRC Press. P. 291–306.
37. 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.
38. Davis, A.D, Rudd, R.J., Bowen, R.A. (2007) Effects of aerosolized rabies virus exposure on bats and mice. *J Infect Dis.* 195:1144–50

39. De Diego A.I. (1974) Guía Para el estudio de las Enfermedades Infecciosas de los animales. Buenos Aires, Argentina. Talleres Gráficos Farro. P 572-576
40. 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.
41. Dietzschold, B., Wang, H., Rupprecht, C., Celis, E., Tollis, M., Ertl, H., Heber-Katz, E., Koprowski, H (1987) Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:9165-9169.
42. Dietzschold, B., Gore, M., Ertl, H. (1989) Analysis of protective immune mechanisms induced by rabies nucleoprotein. En: Mahy BWJ, Kolakofski D, eds. *Genetics and Pathology of Negative Strand Viruses.* New York: Elsevier. 295–305.
43. Dietzschold, B., Faber, M., Schnell, M.J. (2003) New approaches to the prevention and eradication of rabies. *Expert Rev Vaccines* 2:399–406.
44. Dietzschold, B., Li, J., Faber, M., Schnell, M. (2008) Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol.* 3(5): 481–490
45. 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.
46. 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.
47. 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
48. 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.
49. Feyssaguet, M., Morize, J.L., Todorova, V., Blanchard, I., Bourgeois, J.P. (2005) Platelia Rabies II, a new ELISA kit for the detection of rabies antibodies in animal and human serum or plasma. OIE First International Conference.

50. Finke, S., Conzelmann, K.K. (2005) Replication strategies of rabies virus. *Virus Research* 111: 120–131

51. Fishbein, D.B., L.E. Robinson. (1993) Rabies. *New Engl J Med* 329: 1632-1638.

45

52. Follmann, E.H., Ritter, D.G., Beller, M. (1994) Survey of fox trappers in northern Alaska for rabies antibody. *Epidemiol Infect*; 113:137–141.

53. Forsgren, A., Sjoquist, J. (1966) "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human g-globulin. *J. Immunol.* 97:822-827.

54. 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.

55. Gibbons, R.V. (2002) Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. *Ann Emerg Med* 39:528-536.

56. González, J.C., Briano, D., Guarino, H. (2009) Primer registro para el Uruguay de rabia en un murciélago no hematófago *Tadarida brasiliensis*. En: *Veterinaria (Montevideo)*; 45(173-176):31.

57. Green, C.E, Dreesen, D.W. (1993) Infecciones virales, rickettsiales y micoplasmicas. Rabia. En: Green C.E. *Enfermedades Infecciosas Perros y gatos*. 2ª ed. p. 383- 402.

58. Greenwald, R. J., Freeman, G.J, Sharpe, A.H. (2005) The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23:515–548.

59. Haddad, N. (1987). Evaluation par la sérologie de l'efficacité d'un vaccin antirabique chez des chiens du terrain en Tunisie. *Ann Rech Vet* 18: 63–67.

60. Hanlon, C.A., Kuzmin, I., Blanton, J., Manangan, J., Murphy, S.M., Rupprecht, C.E. (2003) Efficacy of biologics against newly described lyssaviruses. En: *Proceedings of 14th International conference on Rabies in the Americas*. P. 55-56

61. 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.

62. 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.

46

63. Hattwig, M.A.W., Gregg, M.B. (1975) The disease in man. En: *The Natural History of Rabies*. vol. II. NY Academic Press; NY p. 281-304.
64. Hooper, P.T., Lunt, R.A., Gould, A.R., Samaratunga, H., Hyatt, A.D., Gleeson, L.J., Rodwell, B.J., Rupprecht, C.E., Smith, J.S., Murray, P.K. (1997) A new lyssavirus, the first endemic rabies-related virus recognized in Australia. *Bull. Inst. Pasteur*. 95:209–218.
65. 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.
66. Hornung, V. (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314:994–997.
67. Huck, R.A, Evans, D.H, Hooper, R.S. (1969) The isolation of Aujeszky's disease virus from dogs. *Vet Rec* 81:172.
68. 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
69. Ito, N. (2010) Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. *J. Virol*. 84:6699–6710.
70. Johnson, N. (2006) Lyssavirus infection activates interferon gene expression in the brain. *J. Gen. Virol*. 87:2663–2667.
71. Johnson, N, Cunningham, A.F, Fooks, A.R. (2010) The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine* 28: 3896–3901
72. Kallel, H., Jouini, A., Majoul, S., Rourou, S. (2002) Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. *J Biotechnol* 95(3):195-204.
73. 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. *Bulletin of the World Health Organization* 81:739-744.
74. 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
75. 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* 83:360–8.

76. Koprowski, H. (1973) Laboratory techniques in rabies: the mouse inoculation test. *Monogr Ser World Health Organ*; 23:85-89.
77. Kureishi, A., Xu, L.Z., Wu, H., Stiver, H.G. (1992) Rabies in China; Recommendations for control. *Bulletin of the World Health Organization*, 70(4): 443-450.
78. Lackay, S.N.; Kuang, Y.; Fu, Z.F. (2008). Rabies in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 38(4): 851-861
79. Lafon, M. (2004) Subversive neuroinvasive strategy of rabies virus. *Arch Virol Suppl*. 18:149–159.
80. Lafon, M. (2008) Immune evasion, a critical strategy for rabies virus. *Dev Biol (Basel)*. 131:413-419
81. Lembo, T., Niezgodá, M., Velasco-Villa, A. (2006) Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg Infect Dis*;12:310.
82. Lentz, T.L., Burrage, T.G., Smith, A.L. (1982) Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 215:182–184.
83. Lewis, V.J., Thacker, W.L., (1974). Limitations of deteriorated tissue for rabies diagnosis. *Health Lab Sci*;11:8-12.
84. Lewis, P., Lentz, T.L. (1998) Rabies virus entry into cultured rat hippocampal neurons. *J Neurocytol* 27:559–573.
85. Lodmell, D.L., Esposito, J.J., Ewalt, L.C. (1993) Rabies virus antinucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro. *J Virol*; 67:6080–6086.
86. 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) En : Artículo. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus . *Nature Medicine*; 4:949 – 952.
87. 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.
88. López, R., Diaz, A., Condori, E. (2007) Susceptibilidad canina a rabia después de una campaña de vacunación en zonas endémicas del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2007; 24(1): 13-19
89. Lyles, D.S, Rupprecht, C.E. (2007) Volume I. Rhabdoviridae. En: *Fields Virology*. 5ª ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. P. 1363-1408

90. 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
91. MacFarlan, R.I., Dietzschold, B., Wiktor, T.J, et al. (1984) T-cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides. *J Immunol*;133:2748–2752.
92. Marsh, M., Helenius, A. (1989) Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res.* 36:107–151.
93. Masatani, T. (2010) Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J. Virol.* 84:4002–4012.
94. 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.
95. McQuiston, J.H, Yager, P.A, Smith J.S. (1999) Epidemiologic characteristics of rabies virus variants in dogs and cats in the United States, 1999. *J Am Vet Med Assoc*;218:1939.
96. Meslin, F.X, Fishbein, D.B, Matter, H.C. (1994) Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries. En: *Lyssaviruses.* Berlin. Springer-Verlag. P. 1-26
97. 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.
98. 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.
99. 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; 153–169.
100. Nandi, S., Kumar, M. (2010) Development in Immunoprophylaxis against Rabies for Animals and Humans. *Avicenna J Med Biotech* 2(1): 3-21
101. Negri, A. (1903) Beitrag zum Studium der Aetiologie der Tollwuth. *Z Hyg Infektionskr*;43:507–528.
102. 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.

103. 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. P 1-20
104. 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
105. 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, La Salle*. 7(2): 191-197
106. Paéz, A., García, C., Boshell, J. (2002) Estandarización de la obtención de amplificados del genoma del virus de la rabia para su uso en estudios de epidemiología molecular. *Biomédica* 22:71-6
107. Perrin, P., Versmisse, P., Delagneau, J.F., Lucas, G., Rollin, P.E., Sureau, P. (1986) The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA: advantages of purified glycoprotein over whole virus. *J. Biol. Standard*. 14:95-102
108. 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.
109. 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.
110. Prehaud, C., Megret, F., Lafage, M., Lafon, M. (2005). Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J. Virol*. 79:12893–12904.
111. 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.
112. Rieder, M., Conzelmann, K.K. (2009) Rhabdovirus evasion of the interferon system. *J. Interferon Cytokine Res*. 29:499–509.
113. Rigaut, K.D., Birk, D.E., Lenard, J. (1991) Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *J Virol*. 65:2622-2628.

114. 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 da Soc Bras Med Trop.* 39(6):553-555.
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. Lima; Instituto Nacional de Salud 3(2): 32-43.
116. Rogan, W.J, Gladen, B. (1978) Estimating prevalence from results of a screening test. *Am J Epidemiol.* 107: 71-76
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: *Infections of the central nervous system.* Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins. 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. Sage, G., Khawplod, P., Wilde, H., Lobaugh, C., Hemachudha, T., Tepsumethanon, W., Lumlerdaecha, B., (1993). Immune response to rabies vaccine in Alaskan dogs: failure to achieve a consistently protective antibody response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 593–595.
123. Seghaier, C., Cliquet, F., Hammami, S., Aouina, T., Tlatli, A., Aubert, M., (1999) Rabies mass vaccination campaigns in Tunisia: Are vaccinated dogs correctly immunized? *Am. J. Trop. Med. Hyg;* (6): 879–884.
124. Servat, A., Feyssaguet, M., Blanchard, I., Boue, F., Cliquet, F. (2007) A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J Immunol Methods* 318(1-2):1-10

125. 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.
126. 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. p.199–216.
127. 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.
128. Smith, J.S., Seidel, H.D., (1993). Rabies: a new look at an old disease. *Prog Med Virol* 40:82-106.
129. StataCorp. (2009). *Stata: Release 11. StataCorp LP*. College Station, TX: StataCorp LP.
130. Suja, M.S., Mahadevan, A., Madhusudana, S.N., (2003) Cerebral cysticercosis mimicking rabies in a dog. *Vet Rec*; 153:304.
131. 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
132. Tariq, W.U.Z., (1991). Rabies in man handling infected calf. *Lancet*, 337: 1224.
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. Tollis, M., Dietzschold, B., Volia, C.B., Koprowski, H. (1991) Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. *Vaccine* 9:134–136.
135. Tordo, N., Poch, O., Ermine, A. (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.
136. 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.
137. Tordo, N., Sacramento, D., H.B., (1996). *Laboratory techniques in rabies*. 4^a ed. Geneva: World Health Organization. p 476

138. 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
139. Tsiang, H., (1978) Evidence for an intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. *J Neuropathol Exp Neurol*; 38:286–292.
140. 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.
141. Tuffereau, C., Benejean, J., Blonde, I. 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.
142. 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
143. 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.
144. Von Teichman, B.F., De Koker, W.C., Bosch, S.J., Bishop, G.C., Meridith, C.D., Bingham, J. (1998) Mokola virus infection: description of recent south African cases and a review of the virus epidemiology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 69:169–171.
145. 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.
146. 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
147. Wiktor, T.J., Doherty, P.C., Koprowski, H. (1977) Suppression of cell-mediated immunity by street rabies virus. *J Exp Med.* 145:1617–1622.
148. Winkler, W.G. (1975) Fox rabies. En: Baer, G. *The Natural History of Rabies*. Orlando, Academic Press. p 3–22.
149. Winkler, W.G., Shaddock, J.H., Bowman, C., (1985) Rabies virus in salivary glands of raccoons (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis*; 21:297–298.
150. Woldehiwet, Z. (2002) Rabies: recent developments. *Res Vet Sci* 73(1):17-25.

151. World Health Organization (WHO) (1985) Expert Committee On Biological Standards Thirty-Fifth Report. World Health Organization Technical Report Series No. 725. Geneva. WHO.
152. World Health Organization (WHO) (1992) Expert Committee on Rabies: eighth report. Technical Report Series, No. 824. . p. 1-85.
153. 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: 23/8/11. p. 20.
154. World Health Organization (2007). Rabies - Bulletin - Europe, in Rabies Information System of the WHO Collaboration Centre for Rabies Surveillance and Research.
155. 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.
156. 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.
157. Yelverton, E., Norton, S., Obijeski, J.P., Goeddel, D.V., (1983) Rabies virus glycoprotein analogues: Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science*; 219:614–620.
158. Zaroni, R., Hornlimann, B., Wandeler, A.I., (1990). Rabies Tissue Culture Infection Test as an Alternative for the Mouse Inoculation Test. *ALTEX* 7:15
159. 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.