

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN DE LA TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE  
VACUNA ANTIRRÁBICA BOVINA CEPA ERA Y CEPA SAD  
MEDIANTE LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE FOCOS  
FLUORESCENTES EN UN HATO BOVINO DE PURULHÁ,  
BAJA VERAPAZ**

**CARLOS ALBERTO QUIÑÓNEZ MONROY**

**GUATEMALA, FEBRERO DE 2015**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN DE LA TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE  
VACUNA ANTIRRÁBICA BOVINA CEPA ERA Y CEPA SAD  
MEDIANTE LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE FOCOS  
FLUORESCENTES EN UN HATO BOVINO DE PURULHÁ, BAJA  
VERAPAZ**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

**CARLOS ALBERTO QUIÑÓNEZ MONROY**

Al conferírsele el título profesional de

**MÉDICO VETERINARIO**

En el grado de Licenciado

GUATEMALA FEBRERO DE 2015

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**JUNTA DIRECTIVA**

DECANO:	M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA:	M.V. Blanca Josefina Zelaya De Romillo
VOCAL I:	Lic. Zoot. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	M.Sc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M. V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V:	Br. Andrea Analy López García

**ASESORES**

M.A. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA  
M.V. BYRON GUILLERMO THOMAE ESTRADA  
M.V. DAVID RENÉ ORELLANA SALGUERO

**HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS  
REGLAMENTOS Y NORMAS DE LA UNIVERSIDAD DE SAN  
CARLOS DE GUATEMALA, PRESENTO A SU CONSIDERACIÓN EL  
TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO:

**EVALUACIÓN DE LA TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE  
VACUNA ANTIRRÁBICA BOVINA CEPA ERA Y CEPA SAD  
MEDIANTE LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE FOCOS  
FLUORESCENTES EN UN HATO BOVINO DE PURULHÁ, BAJA  
VERAPAZ**

QUE FUERA APROBADO POR LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMO REQUISITO PREVIO A OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**MÉDICO VETERINARIO**

## **ACTO QUE DEDICO**

- A Dios: Por darme la oportunidad de disfrutar de cada maravilla de esta escuela de la vida. Todo sea siempre para mayor gloria de Dios.
- A mi madre: María Dolores Monroy Ramos. Gracias por ser mi apoyo y sustento y un gran ejemplo de amor, perseverancia, valentía y fe en dios. Te admiro y te amo negrita. Este triunfo es para ti.
- A mi padre: Oscar Leonel Quiñónez De La Cruz. Gracias por todos tus consejos, tu apoyo y tu cariño.
- A mis hermanos: Oscar Alejandro. Gracias por siempre ser mi apoyo, mi amigo y por todas tus luchas y esfuerzo. A Diego Adolfo, por tu cariño y tu apoyo incondicional. A José Manuel por acompañarme siempre.
- A mis abuelitos: Papito, Mamita, Papameme y Mamachela. Son y serán siempre mi ejemplo de vida, esfuerzo y perseverancia.
- A mi sobrina: María Alejandra. ¡Eres la niña más tierna y especial de este mundo! Sé con certeza que serás una mujer increíble y virtuosa. Te amo.
- A mi novia: Mariajosé. Gracias por tu amor, por ser mi inspiración y por siempre alentarme a ser mejor. Te amo pichita.
- A mi familia: Por su cariño y todo su apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A: Dios padre creador de todo.
- A: La Universidad de San Carlos de Guatemala y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- A: El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, en especial a todos mis amigos y compañeros de la Dirección de Sanidad Animal, por abrirme sus puertas y por todo el apoyo brindado durante estos años, por su amistad y cariño sinceros.
- A: Dr. Jaime Méndez, Dr. Byron Thomae y Dr. David Orellana, por su valiosa asesoría y amistad; al Dr. Ludwig Figueroa, Dr. Fredy González, por todo su apoyo y amistad sincera.
- A: Dra. Amy Gilbert del centro nacional de investigación en vida silvestre del USDA, por sus aportes y valiosos consejos para la culminación de ésta investigación.
- A: Dr. Nery Sandoval, Dr. Byron Gil, Dr. Herber Morales, Dr. Aníbal Menéndez, Sandrita Palacios, Flor García, Maribel Martínez, y a todos los que de alguna forma u otra me apoyaron de manera desinteresada para la finalización de mis estudios y de este proyecto.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	HIPÓTESIS .....	3
III.	OBJETIVOS .....	4
	3.1 Objetivo General .....	4
	3.2 Objetivo Específico .....	4
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
	4.1 La rabia .....	5
	4.1 Rabia paralítica bovina.....	5
	4.3 Sinonimia .....	5
	4.4 Historia.....	6
	4.5 Agente etiológico .....	7
	4.6 Distribución geográfica.....	8
	4.7 Control de la rabia.....	9
	4.8 Vacunas antirrábicas.....	10
	4.8.1 Vacunas de primera generación .....	10
	4.8.2 Vacunas de Segunda Generación: vacunas producidas en cultivos celulares.....	11
	4.8.3 Vacunas recombinantes (Vacunas de tercera generación) .....	13
	4.9 Vacuna cepa ERA.....	13
	4.10 Vacuna cepa SAD.....	14
	4.11 Pruebas serológicas.....	15
	4.11.1 Prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes (RFFIT) ..	15
	4.11.2 Neutralización del virus en ratones .....	21
	4.12 Importancia de las pruebas serológicas para la medición de anticuerpos protectores contra rabia.....	21
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
	5.1 Materiales .....	23
	5.1.1 Recursos humanos.....	23
	5.1.2 Recursos biológicos.....	23

5.1.3 Recursos de campo.....	23
5.1.4 Recursos para envío de muestras al laboratorio .....	24
5.1.5 Recursos de oficina .....	24
5.1.6 Recursos de transporte .....	24
5.2 Metodología .....	25
5.2.1 Descripción del área .....	25
5.2.2 Métodos .....	25
5.2.3 Vacunación .....	27
5.2.4 Recolección de muestras .....	27
5.2.5 Análisis de Laboratorio.....	28
5.2.6 Análisis Estadístico .....	28
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
VII. CONCLUSIONES.....	34
VIII. RECOMENDACIONES .....	35
IX. RESUMEN .....	36
SUMMARY .....	37
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38
XI. ANEXOS .....	44

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.....	45
Cuadro 2.....	46
Cuadro 3.....	47
Cuadro 4.....	48
Cuadro 5.....	49
Cuadro 6.....	50
Cuadro 7.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	52
Figura 2.....	53
Figura 3.....	53
Figura 4.....	54
Figura 5.....	54

## I. INTRODUCCIÓN

La rabia es una zoonosis que en los últimos años ha cobrado gran importancia en Guatemala; representa un serio problema de salud pública y además causa pérdidas económicas y de producción en las explotaciones ganaderas.

Las pérdidas sustanciales que se presentan en la industria pecuaria tanto por mortalidad debida a rabia en el ganado, como por la acción de los vampiros que disminuyen la productividad, así como el riesgo potencial de la transmisión de la rabia a los humanos, justifican plenamente la necesidad de determinar el nivel de protección que se ofrece al hato bovino nacional con las vacunas comerciales utilizadas en el país, como parte de la evaluación de las medidas de control que se aplican en nuestro patrimonio pecuario. (1, 11)

Es necesario reconocer que los laboratorios productores de vacunas realizan un gran esfuerzo al probar la potencia y eficacia de sus biológicos antes de lanzarlos al mercado, como parte de los requisitos que exigen los países donde comercializan sus productos, sin embargo, surge la interrogante de saber si existe alguna diferencia en la producción de anticuerpos en nuestros animales al inocularlos con alguna vacuna antirrábica, específicamente en los primeros 45 días postvacunación, partiendo de la premisa de que el médico veterinario cuenta con un período de tiempo limitado para asegurar el éxito de las medidas de control al momento de presentarse un brote de rabia en los bovinos.

Ya que en el mercado existe una gran variedad de Biológicos para la prevención de la rabia bovina, resulta útil ahondar en el conocimiento de la respuesta inmune que inducen, en éste estudio en particular, dos cepas distintas de vacuna antirrábica. Conocimiento que busca contribuir al adecuado y oportuno control de brotes de rabia bovina, y que puede servir como base para futuras investigaciones, que tengan como fin último el encontrar la vacuna ideal a ser utilizada en nuestros bovinos para el adecuado control de la rabia. (28, 29)

El objetivo principal de esta investigación es contribuir al conocimiento de la respuesta inmune inducida por dos vacunas antirrábicas en un período de 45 días postvacunación, en un hato bovino de Purulhá, Baja Verapaz.

Se pretende determinar y comparar los niveles de anticuerpos postvacunales a los 7, 15, 21 y 45 días de dos vacunas contra la rabia presentes en nuestro medio (Cepa ERA y Cepa SAD) en un grupo de 50 bovinos no vacunados utilizando la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes.

## **II. HIPÓTESIS**

No existe diferencia en los niveles de anticuerpos protectores que produce la vacuna antirrábica cepa ERA versus la vacuna cepa SAD, medidos a los 7, 15, 21 y 45 días postvacunación en bovinos no vacunados de 3-6 meses de edad.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Contribuir al conocimiento de la respuesta inmune inducida por dos vacunas antirrábicas en un hato bovino de Purulhá, Baja Verapaz.

#### **3.2 Objetivo Específico**

Determinar y comparar los niveles de anticuerpos postvacunales a los 7, 15, 21 y 45 días de dos vacunas contra la rabia (Cepa ERA y Cepa SAD), en un grupo de 50 bovinos no vacunados utilizando la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes.

## **IV. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1 La rabia**

La rabia es una enfermedad infecciosa del sistema nervioso central, generalmente aguda, cuyo agente causal es un virus. Todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre, son susceptibles en mayor o menor grado.

Desde el punto de vista epizootiológico la rabia puede dividirse en rabia urbana y rabia silvestre. Esta división, un tanto arbitraria, hace referencia al modo de transmisión y perpetuación de la rabia en las poblaciones animales. (1,7,11)

### **4.1 Rabia paralítica bovina**

La rabia paralítica o paresiante bovina transmitida por murciélagos hematófagos, es por derecho propio, parte de la rabia de los animales silvestres. El comportamiento del vampiro y sus hábitos alimenticios lo colocan en una categoría aparte de otros animales silvestres. El animal del que prefieren alimentarse los vampiros es el bovino; de ahí que el mayor impacto de la enfermedad se refleje en los bovinos y en menor proporción en otras especies animales. (1,7,11)

### **4.3 Sinonimia**

Hidrofobia, Lisa, Mal de Luna. La rabia paralítica de los bovinos recibe en cada país de América Latina diferentes nombres: Mal de Caderas y Rabia Paresiante en Argentina; Peste de Caderas en el Brasil; Renguera en Colombia y Costa Rica; Derrengue y Tronchado en México; Huequera en Panamá; Mal de Caderas, Tumbi Baba en Paraguay. (2, 4, 13)

#### 4.4 Historia

La rabia es una enfermedad muy remota, tal vez tan remota como la propia humanidad. Tres mil años antes de Jesucristo ya se encuentra el origen de la palabra "rabia" en la lengua sánscrita, donde "*Rabhas*" en griego significa "agredir".

La palabra griega "*lyssa*" viene de la raíz "*lud*": "violento". La primera descripción de la enfermedad se remonta al siglo XXIII antes de Jesucristo, en el Código Eshuma en Babilonia. Desde la antigüedad ya se había establecido la relación entre la rabia humana y la rabia canina debida a mordeduras de los animales (especialmente perros). Girolamo Fracastoro (1530), describió la enfermedad (que había podido observar en numerosos pacientes) y sus modos de contaminación. (13, 20)

El descubrimiento en 1882 por Louis Pasteur de la vacuna antirrábica con virus vivos atenuados por pases sucesivos y aplicada por primera vez el 6 de julio de 1885 al niño llamado Joseph Meister de 9 años de edad, herido por mordeduras de un perro rabioso, vacuna obtenida de tejido nervioso (médula espinal de conejo desecada al aire), abrió el paso a muy importantes investigaciones frente a esta enfermedad y sobre todo inició el concepto de inmunoterapia con vacuna. (2,13,19)

Posteriores desarrollos desde esta vacuna en médula espinal de conejo, dieron paso histórico a las vacunas de tejido nervioso en ratones lactantes (Fuenzalida y Palacios), de embrión de pollo (Koprowski y Cox), de embrión de pato (Powell y Culbertson), de cultivos de células primarias, de líneas celulares continuas y de líneas celulares diploides. (2, 19)

#### 4.5 Agente etiológico

La enfermedad está producida por un virus de tipo RNA lineal, monocatenario, con polaridad negativa, de 12 kbs, en forma de bala (simetría helicoidal) y recubierto. (2, 21)

Taxonómicamente incluido en el Orden Mononegavirales, Familia Rhabdoviridae y Género Lyssavirus. Las partículas víricas tienen una longitud de 180 nm y un diámetro de 75 nm. Cada partícula tiene “nucleocápside” en forma helicoidal que está rodeada de membrana bilipídica. El virus es muy sensible a detergentes catiónicos, alcohol, fenol, éter, ácidos, calor a 30-50° C y radiaciones, siendo resistente a la congelación. (1,2, 21)

El RNA posee 5 genes que codifican 5 proteínas, que son las denominadas: L (polimerasa), N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), asociadas con el RNA en la ribonucleoproteína, y las otras dos M (matriz) y G (glucoproteína de la cubierta externa y de las proyecciones de la cubierta), ligadas a la envoltura bilipídica.

Las glucoproteínas de la superficie y de las proyecciones, constituyen el antígeno G que por un lado es el elemento de fijación al receptor nicotínico de la acetilcolina en las células nerviosas y por otro lado es el que induce la formación de anticuerpos neutralizantes protectores frente al virus clásico y a otros serotipos. El virus penetra por endocitosis y pierde la cubierta. (1,2)

Los serotipos descritos son 7 hasta la fecha: serotipo 1 (virus rábico clásico y de las cepas vacunales), serotipo 2 (Lagos-Bat), serotipo 3 (Mokola), serotipo 4 (Duvenhage), serotipo 5 (EBL-1 European Bat Lyssavirus), serotipo 6 (EBL-2) y recientemente se ha descrito el Australian Bat Lyssavirus (ABL). (1, 2, 6, 11, 3, 15, 21)

Dentro de los virus rábicos “clásicos” debe señalarse la distinción entre el “virus calle” y el “virus fijo”. La denominación de “virus calle” se refiere al de reciente aislamiento en animales que no ha sufrido modificaciones en el laboratorio. Las cepas de ese virus se caracterizan por un período de incubación

muy variable, a veces muy prolongado, y por su capacidad de invadir las glándulas salivales. En cambio, la denominación de “virus fijo” se refiere a cepas adaptadas a animales de laboratorio por medio de pases intracerebrales en serie, que tienen un período de incubación corto de solo 4 a 6 días y que no invaden las glándulas salivales. Desde hace tiempo se sospecha que los virus rábicos pueden diferir en su composición antigénica y se han obtenido evidencias al respecto mediante ensayos de protección cruzada. (1,2)

Con el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales se pudo comprobar la existencia de una gran variación antigénica entre los virus rábicos. En el análisis de varios virus fijos y virus calle, se detectan las marcadas diferencias en reactividad mediante un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos glucoproteínicos. (2, 6)

Estos nuevos conocimientos y técnicas permitieron la confirmación del origen vacunal de la rabia en perros, gatos y un zorro, debida a vacunas de virus vivo modificado. (2,3,4,9)

#### **4.6 Distribución geográfica**

La rabia se presenta en todos los continentes con excepción de la mayor parte de Oceanía. Varios países están libres de la infección, entre ellos Barbados, Jamaica, varias islas del Caribe en las Américas, el Japón en Asia, y Bulgaria, Gran Bretaña, Irlanda, los Países Bajos, Portugal y varios países escandinavos en Europa. La rabia no tiene una distribución uniforme en los países infectados, ya que en muchos de ellos existen áreas libres, de endemidad baja y alta, y otras con brotes epizootémicos. (2,7,10,21,24,25)

La rabia en los murciélagos es un problema independiente de los ciclos infecciosos de otros mamíferos. Es necesario distinguir la infección en quirópteros hematófagos y no hematófagos. La rabia en los murciélagos no hematófagos se registra del norte al sur de las Américas y se ha comprobado en numerosas especies, principalmente en murciélagos insectívoros, frugívoros y omnívoros.

La rabia en los murciélagos hematófagos o vampiros es un problema limitado a América Latina. La infección ha sido comprobada en las tres especies de hematófagos, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*, pero solo la primera especie tiene importancia epidemiológica. La distribución de los vampiros *D. rotundus* comprende un área que se extiende desde México hasta la parte central de la Argentina. El *Desmodus* es responsable por las pérdidas en la ganadería latinoamericana, en particular por la rabia bovina. (2, 4, 7)

Se ha estimado que en Latinoamérica la mortalidad anual es cercana a las 50,000 cabezas de ganado, lo que sumado a las pérdidas indirectas de carne y leche y la devaluación de pieles por mordeduras de vampiros, significa una pérdida anual superior a US\$ 44 millones. En América del Sur, los únicos países donde no se registran casos de rabia transmitida por vampiros son Chile y Uruguay. (2)

En los cuadros (Cuadro 1 y 2) se señala el número de casos de rabia en bovinos y humanos respectivamente, en América del año 2007 al 2011. (25, 26)

#### **4.7 Control de la rabia**

Todo esfuerzo encaminado a resolver el problema de la rabia bovina no puede ser enfocado desde un punto de vista simplista. Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad son muy importantes, sin embargo, el ataque de los murciélagos hematófagos, ocupa un renglón importante en las pérdidas ocasionadas a la ganadería subtropical. La solución satisfactoria a esta serie de problemas debe ser a lo largo de dos líneas principales de ataque. Primeramente se debe aplicar los métodos más eficientes para reducir la población de vampiros y en segundo término, se debe vacunar a todos los animales susceptibles que habitan en las zonas endémicas del murciélago hematófago. (1,7,10)

## **4.8 Vacunas antirrábicas**

### **4.8.1 Vacunas de primera generación**

Las vacunas de primera generación son producidas usando un sustrato animal para obtener una masa viral. Estas vacunas han sido usadas en humanos y animales. Dependiendo del sustrato empleado para su producción se pueden clasificar de la siguiente manera:

#### **4.8.1.1 Vacunas producidas empleando tejido nervioso de animal adulto**

Las vacunas producidas en tejido cerebral de animales adultos no difieren mucho de la primera vacuna producida por Louis Pasteur. Sin embargo, presentan muchas complicaciones, entre ellas están:

- Presencia de virus vivo residual: las vacunas como la cepa Fermi, que contiene virus vivo por la deficiente inactivación con fenol, son consideradas vacunas mixtas (contienen virus vivo residual y virus inactivado) y no deben ser utilizadas.
- Reacciones encefalomielíticas postvacunales: algunas vacunas de éste grupo, incluyendo la tipo Semple y Hempt, son totalmente inactivadas, y aunque cumplen con todos los requerimientos de potencia, se han observado severas reacciones encefalomielíticas postvacunales durante o después del tratamiento. Las reacciones son causadas por el factor encefalitogénico (una proteína básica asociada a la mielina) que proviene del tejido nervioso de animales adultos empleados como sustrato para la producción de la vacuna.
- Poco contenido antigénico por dosis de vacuna: ésta característica hace necesario un tratamiento largo con un gran número de inoculaciones. Presentan poca estabilidad (aproximadamente 6 meses). (4, 6, 27)

#### **4.8.1.2 Vacunas producidas con huevos embrionados**

Una adaptación de las cepas de virus rábico en embriones de pato (cepa Ptiman Moore) permitió el desarrollo de vacunas mucho más seguras para uso humano, disminuyendo las reacciones neuromusculares y encefalomielíticas postvacunales.

La incidencia de reacciones neurológicas es mucho más baja (3 de cada 100,000) en vacunas para uso humano producidas en embriones de pato que en aquellas producidas en tejido nervioso.

Las cepas Flury y Kelev han sido adaptadas a embriones de pollo mediante pasajes repetidos para producir cepas virales atenuadas. Las vacunas producidas con virus atenuado en embriones de pollo (PM, Flury, Kelev) son usadas en la inmunización de perros, gatos y bovinos. (27)

#### **4.8.1.3 Vacunas producidas en cerebro de animales lactantes**

El factor encefalitogénico, causante de los accidentes neurológicos postvacunales, está presente en el tejido nervioso de animales adultos, pero está ausente en animales lactantes de algunas especies. Además el tejido nervioso de animales lactantes tiene una mayor productividad viral.

La primera vacuna de éste tipo fue desarrollada por Fuenzalida y Palacios en cerebro de ratón lactante, empleando tres cepas de virus rábico (CVS, 51 y 91).

#### **4.8.2 Vacunas de Segunda Generación: vacunas producidas en cultivos celulares**

En 1958 Kissiling logró el primer avance significativo en la producción de vacunas de cultivo celular al describir la multiplicación del virus rábico en cultivos primarios de células de riñón de hámster, empleando una cepa modificada de virus CVS y obtuvo títulos de  $10^{3.5}$  LD<sub>50</sub> en ratones. No fue hasta 1960 que Fenje

obtuvo la primera vacuna producida en cultivos celulares, empleando una cepa SAD de virus rábico, originalmente aislada del cerebro de un perro con rabia. Actualmente las vacunas de cultivo celular se clasifican en tres grupos dependiendo del sistema de células empleado para su producción:

- Grupo primario: comprende vacunas producidas en cultivos primarios de cultivos celulares, como riñón de hámster, riñón de perro y riñón de feto bovino, o en cultivos celulares de aves, como embriones de pollo o codorniz, siguiendo la metodología descrita por Kissling.
- Grupo secundario: vacunas producidas en células diploides de cariogenicidad y duplicación normal, principalmente de origen humano (WI38 y MRC5). Algunas vacunas de origen animal como la producida en feto de mono *Rhesus* también pertenecen a éste grupo.
- Grupo terciario: el tercer grupo incluye a las vacunas producidas en cultivos de células heteroploides como la línea Vero.

El desarrollo de vacunas antirrábicas para uso veterinario, usualmente utilizadas para prevención, fue mucho más favorecido con éste tipo de producción, a diferencia de las vacunas para uso humano. Ésta diferencia se debe no solamente a la gran demanda de vacunas para animales, sino también debido a que los requerimientos para la producción de vacunas para uso veterinario son mucho menores. (6,8,27)

Las líneas celulares BHK21 y NIL2, en donde el virus rábico se replica y produce buena cantidad de virus, alcanzando altos títulos virales (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> DL50 en ratones), han sido aceptadas como sustratos. Éste tipo de células permiten una fácil producción a escala industrial de vacuna antirrábica.

Las vacunas manufacturadas con virus vivo atenuado son permitidas para la inmunización en animales, incluso en animales silvestres se ha permitido la vacunación oral con cepa SAD o SAD-B19 clonada. Además pueden utilizarse coadyuvantes para favorecer el efecto de la vacuna. (27)

#### **4.8.3 Vacunas recombinantes (Vacunas de tercera generación)**

En la actualidad, los investigadores han desarrollado vacunas virales y ADN recombinantes contra la rabia. Aunque las vacunas en base a ADN resultaron inmunogénicas en ratones, la eficacia de éstas vacunas en primates no humanos, fue desalentador.

Shankar (2009) sostiene que las vacunas de virus recombinantes de vaccinia y virus rábico han resultado eficaces en el tratamiento preexposición en roedores y murciélagos, pero su eficacia en tratamiento postexposición no ha sido comprobada. (30)

#### **4.9 Vacuna cepa ERA**

Vacuna de virus vivo modificado, también llamada Vnukovo. La cepa inicial de donde deriva fue aislada en Alabama de un perro rabioso (cepa SAD). La cepa ERA, SAD-Bern, Sad-B19, SAG y SAG2 son derivadas atenuadas por pasajes sucesivos en cultivos celulares de la cepa SAD. (2, 4, 9,20)

La vacuna antirrábica cepa-ERA (Evelyn Gaynor-A. Rockitnicki-M.K. Abelseh) desarrollada por Abelseh, se produce en células de riñón de cerdo, hámster o perro y ha demostrado conferir una inmunidad bastante duradera a distintas especies de animales domésticos. Se ha demostrado que la vacuna en cuestión produce una inmunidad con una duración de cuatro años a bovinos que fueron expuestos en condiciones experimentales, con una cepa de virus rábico de origen zorra. Atanasiu y col., demostraron en estudios realizados en el Centro Panamericano de Zoonosis, que la vacuna cepa ERA, producía anticuerpos específicos contra la rabia en la mayoría de los animales vacunados, 12, 24 y 36 meses después de haberse aplicado; al mismo tiempo, al exponer estos animales con virus rábico de origen vampiro, la vacuna protegió a los animales vacunados con 2 y 3 años de anterioridad. La vacuna utilizada en Guatemala posee títulos mínimos a la liofilización de  $10^{3.2}$  DLR / 0.3 ml. (4, 9, 18)

#### 4.10 Vacuna cepa SAD

La cepa SAD (Street Alabama Dufferin) fue aislada originalmente del cerebro de un perro rabioso en Alabama, EU en 1935 (Su nombre proviene del lugar en dónde fue aislada). Desde entonces se han derivado de la cepa SAD diferentes variantes utilizadas principalmente para la producción de vacunas orales: Las cepas que se originan mediante series de pasajes en cultivos celulares son: SAD-Bern, SAD-B19, SAG y SAG2. (4, 9) Estas vacunas aplicadas por vía intracerebral, intramuscular u oral, son patógenas para los ratones adultos y otras especies de roedores e inocuas por vía oral para carnívoros silvestres tal como se ha demostrado en América del Norte y Europa. La vacuna SAG es una mutante de SAD y no es patógena para roedores de laboratorio o silvestres.

La vacuna SAD-Bern ha sido usada extensamente en Suiza en cebos de cabeza de pollo para vacunar zorros: de 1,3 millones de cebos distribuidos se detectaron 3 casos de rabia inducida por la vacuna. La vacuna SAD-B19 fue distribuida en 20 millones de cebos en Alemania, Bélgica, Francia, Italia y Luxemburgo, sin haberse registrado muertes de zorros o de animales de otras especies que comparten con ellos el mismo territorio. (2)

Las vacunas a base de cepa SAD contienen virus vivo atenuado de Rabia obtenido en cultivo de tejido de riñón de hámster. La vacuna que se utiliza en nuestro medio posee una DLR de  $10^{3.3}$  / ml.

Se recomienda aplicar vacuna cepa SAD a partir de las 12 semanas de edad (3 meses), evitando la interferencia de anticuerpos maternos que puedan bloquear los antígenos virales contenidos en la vacuna y las posibles reacciones adversas en el animal. Las revacunaciones se harán cada año o cada 6 meses en zonas de alto riesgo debido a poblaciones importantes de murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*). (17)

#### **4.11 Pruebas serológicas**

Las pruebas serológicas se usan muy poco en estudios epidemiológicos debido a la seroconversión tardía y al bajo porcentaje de animales que sobreviven a la enfermedad con anticuerpos post-infección. 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. (24)

##### **4.11.1 Prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes (RFFIT)**

Ésta prueba mide los anticuerpos inducidos fundamentalmente por la Glucoproteína G del virus rábico. Es una prueba obligatoria para el comercio internacional de animales hacia áreas libres de rabia y es aceptada como la prueba de oro para la medición de anticuerpos neutralizantes contra rabia. (18)

Anteriormente la prueba aceptada para la medición de los títulos postvacunales contra rabia era la prueba de neutralización en ratones, sin embargo se ha probado a través de diversos estudios, que la prueba de RFFIT constituye un mejor método para la detección de anticuerpos postvacunales, en base a su sensibilidad, especificidad, la rapidez de sus resultados y la relativa facilidad para realizarse, en contraposición con la prueba de neutralización en ratones que suponía costos de tiempo y la disponibilidad de ratones para inocular. (14, 16, 22, 23, 32, 34)

##### **4.11.1.1 Procedimiento de la prueba RFFIT**

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

Se detalla el procedimiento estándar (tomado de Técnicas de Laboratorio para la Rabia de la OMS, 1996). (24)

- **Preparación de la suspensión de virus de inóculo**

i) Se tripsiniza un cultivo de 3 días de células de neuroblastoma de ratón (MNA) en un frasco de 150 ml.

Estas células prefieren un medio ácido suplementado con vitaminas. Puede obtenerse una línea celular similar (CCL-31) por petición a la ATCC.

(ii) En un tubo cónico de centrifuga de 50 ml, se resuspenden  $3 \times 10^7$  células en 2,7 ml de medio mínimo esencial de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino (EMEM-10).

iii) Con procedimientos estándar de seguridad contra la rabia, se añaden  $1 \times 10^7$  unidades infecciosas del virus de la rabia CVS-11 (ATCC, VR959) y se mezcla con un vórtex una vez. Se incuban las células y el virus durante 15 minutos a 37°C; durante este tiempo, se someten una vez las células al vórtex.

iv) Se añaden 10 ml de EMEM-10, se mezcla con vórtex, y se centrifugan las células a 500 g durante 10 minutos.

v) Se elimina el sobrenadante. Se resuspenden las células en 30 ml de medio de cultivo y se transfieren a un frasco de 150 ml.

vi) Se agita el recipiente suavemente para mezclar la suspensión celular y después se preparan tres portas con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos pipeteando 0,2 ml de la suspensión celular en un pocillo de cada porta.

vii) Se incuban los frascos y los portas a 37°C en una incubadora con humedad con 0,5% de CO<sub>2</sub>. El frasco debe incubarse como cultivo cerrado (tapón ajustado).

viii) A las 20, 40 y 60 horas después de la infección, se fija con acetona y se tiñe un porta por la técnica de inmunofluorescencia para determinar la infectividad vírica. 24 horas después de que las células muestren un 100% de infectividad (generalmente a las 40 horas de la infección), debe recogerse el sobrenadante.

ix) Se transfiere el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifuga a 4.000 g durante 10 minutos.

x) Se distribuye el sobrenadante en partes de 0,5 ml. y se guarda a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

- **Titulación de la suspensión vírica de inóculo**

i) Se descongela una parte del virus de inóculo y se preparan diluciones decimales seriadas (de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) en EMEM-10.

ii) Se distribuye 0.1 ml de cada dilución de virus en un pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. Se añade a cada pocillo 0,2 ml de células MNA suspendidas en EMEM-10 (concentración de  $5 \times 10^4$  células por 0,2 ml).

iii) Se mezclan las células y el virus moviendo suavemente el porta y se después se incuban durante 40 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en una incubadora con humedad y 0,5% de  $\text{CO}_2$ .

iv) Se fija con acetona y se tiñe el porta mediante la técnica de la inmunofluorescencia. Se debe observar la infección vírica con la dilución  $10^{-6}$  del virus, lo que indica que el stock de la suspensión vírica contiene al menos  $1 \times 10^6$  unidades infecciosas por 0,1 ml. Es preciso preparar suficiente virus de inóculo para que no sean necesarios frecuentes pases seriados del virus.

- **Preparación de la suspensión stock de virus**

i) Se infectan  $3 \times 10^7$  células MNA con  $1 \times 10^7$  unidades infecciosas de la preparación de virus de inóculo.

ii) Se recoge el sobrenadante 24 después de que las células alcancen el 100% de infectividad (generalmente a las 40 horas de la infección).

iii) Se distribuye y guarda el sobrenadante a  $-70^{\circ}\text{C}$  en partes de 0,5 ml.

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

i) Se descongela una parte del virus de inóculo y se preparan diluciones decimales seriadas (de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) en EMEM-10.

ii) Se distribuye 0,1 ml de cada dilución de virus en un pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. Se añade a cada pocillo 0,2 ml

de células MNA suspendidas en EMEM-10 (concentración de  $1 \times 10^5$  células por 0,2 ml).

iii) Se mezclan las células y el virus moviendo suavemente el porta y se incuba después a 37°C en una incubadora con humedad y 0,5% de CO<sub>2</sub> durante 20 horas.

iv) Se fija con acetona y se tiñe el porta por la técnica de inmunofluorescencia.

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

- **Sueros de referencia**

En cada prueba debe incluirse un suero estándar de referencia nacional o internacional diluido a una potencia de 2,0 UI/ml. El suero de referencia utilizado en los Centros para Control y Prevención de Enfermedades es el primer estándar internacional de inmunoglobulina antirrábica y puede obtenerse del NIBSC (Instituto Nacional de Standares Biológicos y Control). El suero de referencia debe mantenerse congelado en una cantidad suficiente para 1 semana de pruebas. También deben prepararse por parte del laboratorio, e incluirse en cada prueba, un suero control estándar positivo diluido a una potencia de 0,1 UI/ml y un suero control estándar negativo.

- **Sueros problema**

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

i) Se prepara una dilución 1/2,5 añadiendo a uno de los portas 0,1 ml del suero inactivado y 0,15 ml de EMEM-10. Se mezcla mediante una agitación suave del porta.

ii) Se transfiere 0,05 ml de la dilución 1/2,5 a un segundo pocillo que contenga 0,45 ml de EMEM-10. Se desecha todo excepto 0,1 ml del pocillo que contiene la dilución 1/2,5.

iii) Se mezcla el segundo pocillo y se desecha todo excepto 0,1 ml.

iv) Se añade a todas las diluciones de suero 0,1 ml de la preparación de stock de virus (que contenga 32–100 FFD<sub>50</sub>).

v) Se mezcla e incuba a 35°C durante 90 minutos en una incubadora con humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

- **Adición de células**

i) Durante el período de incubación, se tripsiniza un cultivo de 3–5 días de células MNA.

ii) Se resuspenden las células en EMEM-10 a una concentración final de  $1 \times 10^5$  células por 0,2 ml.

iii) Se distribuye 0,2 ml de la suspensión celular en cada pocillo del porta y se incuba a 35°C en una incubadora con humedad y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 horas.

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

i) Después de 20 horas, se sacan los portas de la incubadora y se elimina el medio vertiéndolo sobre una solución viricida.

ii) Se lavan los portas una vez con PBS y luego se fijan con acetona fría (-20°C). durante 10 minutos a temperatura ambiente.

iii) Se dejan secar los portas durante 10 minutos antes de añadir el suero conjugado antirrábico con FITC.

El conjugado se puede preparar en EMEM-10 o PBS; no hay necesidad de adsorber el conjugado con papel o células. La dilución del conjugado debe determinarse por titulación. Los portas se tiñen durante 20–30 minutos a 37°C y después se lavan con PBS y agua destilada, respectivamente.

iv) Se observan los portas con un microscopio de fluorescencia.

- **Determinación de los títulos de los anticuerpos neutralizantes**

Los virus residuales se detectan mediante un microscopio normal de fluorescencia. El título de neutralización a punto final del suero se define como el factor de dilución de la dilución más alta de suero a la que el 50% de los campos microscópicos observados contiene una o más células infectadas (es decir, un 97% de reducción en el inóculo vírico). Este valor se puede obtener mediante una interpolación matemática.

Alternativamente se puede determinar un título del 100% de neutralización anotando la dilución más alta de suero a la que se neutraliza el 100% del inóculo y no hay células infectadas en ninguno de los campos de observación. Por ambos métodos de titulación, se puede obtener el título de anticuerpos en el suero problema (en UI/ml) mediante comparación con el título del estándar nacional de referencia incluido en cada prueba. Debe señalarse que también resulta válido realizar la prueba RFFIT utilizando células BHK-21 en lugar de células de neuroblastoma. Para tal fin se ha publicado un protocolo modificado.

Se debe respetar estrictamente los siguientes parámetros:

- Virus de la Rabia: solo se debe usar la cepa CVS-11 (Número ATCC=VR 959)
- Cultivo de células: solo se deben usar células BHK-21 (Número ATCC= CCL 10) o células MNA (Número ATCC= CCL131)
- La prueba debe realizarse solamente en cámaras Labteck.
- Se deben de emplear listas de control para el virus de la Rabia, suero no inmune y suero estándar de la OIE.
- La titulación del virus CVS, así como la del suero no inmune y la del suero de la OIE debe estar presente en la placa control.
- Método de lectura de la prueba: cada cámara debería contener 25–50 campos que deberían ser observados con aumentos de 160–200x.
- Se requieren diluciones de al menos tres a cinco veces.
- En la conversión del log  $D_{50}$  a UI/ml, los laboratorios deberían de emplear solamente el valor log  $D_{50}$  del suero estándar de la OIE de origen canino. (11, 19, 27, 29)

#### **4.11.2 Neutralización del virus en ratones**

Este método ya no está recomendado por la OIE ni por la OMS y debe sustituirse cuando sea posible por pruebas en cultivos celulares. (24, 34)

#### **4.12 Importancia de las pruebas serológicas para la medición de anticuerpos protectores contra rabia**

La valoración de los anticuerpos contra el virus de la rabia tiene varias aplicaciones prácticas: los anticuerpos contra el virus de la rabia son medidos en laboratorios especializados para determinar el grado de inmunidad de los humanos o animales vacunados, tanto para comprobar la efectividad de las

vacunas y los programas de vacunación, como para conocer el tiempo exacto en el que el individuo necesitará una dosis de refuerzo. Los expertos de la OMS y de la Organización Mundial de Sanidad Animal consideran que un nivel de anticuerpos igual o mayor de 0,5 UI/ml. constituye una protección adecuada contra el riesgo de contaminación. Y es aceptado a nivel internacional un nivel igual o mayor a 0.5 UI/ml como prueba de una adecuada inmunización en animales. (4, 20, 22, 24)

La OIE establece en el Manual de Enfermedades de los Animales Terrestres las medidas para el control de los inóculos contra la rabia bovina, que cada país debería de probar de manera interna y rutinaria: *“Resulta adecuada cualquier cepa de serotipo 1 que demuestre proteger contra los virus naturales de la rabia (que se encuentren actualmente en el país donde se va a usar la vacuna). La cepa de virus utilizada debe tener propiedades biológicas (patogenicidad) y antigénicas (tipadas por MAbs) bien conocidas. Si se emplea como vacuna viva, el inóculo primario de virus no debe causar rabia clínica. Deben probarse al menos dos animales (preferiblemente cinco o seis por grupo) de cada una de las especies a las que va dirigida la vacuna, y si fuera posible de cualquier especie que pueda estar en contacto con la vacuna o con animales vacunados”*. (24)

La forma más sencilla de asegurar el adecuado funcionamiento de las vacunas comerciales presentes en el medio es un control rutinario del nivel de anticuerpos de los animales. (4)

El control de los anticuerpos contra la rabia permite la evaluación indirecta de la eficacia de las vacunas suministradas en el marco de las campañas de vacunación. (20)

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

#### **5.1.1 Recursos humanos**

- 1 Estudiante investigador.
- 3 Médicos Veterinarios asesores.
- 2 ayudantes de finca para sujeción y cuidado de animales.
- Personal de laboratorio ubicado en México.

#### **5.1.2 Recursos biológicos**

- 50 terneras no vacunadas raza Brahman de 3-6 meses de edad.
- 25 dosis de Vacuna cepa ERA.
- 25 dosis de Vacuna cepa SAD.

#### **5.1.3 Recursos de campo**

- Bolsas Ziplock®.
- Guantes de látex.
- Lápices y bolígrafos.
- 4 marcadores de ganado.
- Hojas y cuaderno de apuntes.
- Hielera.
- Hielo.
- Cámara fotográfica.
- Jeringas de 3 ml.
- Tubos Vacutainer®.

- Viales para suero de 2 ml.
- Centrífuga.
- Masking tape.
- Lazo.
- Ternillera.
- Gradilla para colocar tubos.
- Agujas No. 18 x 1 ½.

#### **5.1.4 Recursos para envío de muestras al laboratorio**

- Hielera.
- Protocolos de muestreos.
- Hielo seco (CO<sub>2</sub>).
- Refrigerantes sintéticos.
- Indicadores de temperatura.
- Bolsas ziplock® .
- Guía de envío (servicio de mensajería).

#### **5.1.5 Recursos de oficina**

- Computadora con acceso a internet.
- Fotocopiadora.
- Impresora.
- Papel.

#### **5.1.6 Recursos de transporte**

- Combustible.
- Vehículo.

## **5.2 Metodología**

### **5.2.1 Descripción del área**

La finca San Rafael se encuentra en el municipio de Purulhá, departamento de Baja Verapaz, a una distancia de 32 kilómetros de la cabecera departamental. El área de tierra que tiene el municipio en su mayoría es montañosa, peñascos y siguanes y tierras calizas altas propias del norte del país son parte de su estructura geográfica, y en su mayoría las pendientes son aptas para vocación forestal y propicia para cultivos hortícolas y agro-forestales. Según la encuesta nacional agropecuaria realizada por el INE en 2004, en Purulhá hay una existencia de 1823 bovinos.

Ubicación (Coordenadas): 15°14'13"N 90°14'2"O.

Altitud: 1,570 msnm.

Distancia de la cabecera: 32 km.

Superficie: 248 km<sup>2</sup>.

### **5.2.2 Métodos**

Se utilizaron 50 bovinos hembras de 3-6 meses de edad que no han sido vacunados contra la rabia, y que provienen de madres no vacunadas. Con el fin de obtener una muestra homogénea y disminuir el error experimental.

Se eligió este grupo muestral debido a que según datos del Instituto Nacional de Estadística, el porcentaje más alto (15%) de la población bovina se encuentra concentrada en hatos de 20 a 49 cabezas de ganado y dichos hatos tienen la mayor concentración de terneras menores de un año (17%) de todo el país (Ver cuadro 3). (8)

Este hecho justificó plenamente el tamaño y características de la muestra ya que se asegura que el conocimiento científico alcanzado podrá ser inferido a nuestra población bovina nacional.

Los animales del estudio permanecieron aislados del hato general durante el transcurso del mismo, se les ofreció potreros exclusivos para pastar aislados de los demás animales de la finca. Además se contó con dos personas que se encargaron exclusivamente del cuidado de éstos animales, ofreciéndoles alimentación controlada exclusiva, fueron sometidos al menor estrés posible y no se utilizaron otros productos químicos o biológicos durante el transcurso del estudio.

Se formaron 2 lotes de 25 animales cada uno:

1. Lote 1: se les aplicó la vacuna antirrábica bovina cepa ERA.
2. Lote 2: se le aplicó la vacuna antirrábica bovina cepa SAD.

El período de estudio fue de 45 días a partir de la vacunación de los animales, tiempo que fue suficiente para determinar una cantidad adecuada de anticuerpos neutralizantes del virus de rabia y en nuestro caso, representa el período de tiempo de interés, teniendo en cuenta que en condiciones de campo, bajo la amenaza de un brote, los primeros 45 días son claves para un adecuado control de la rabia.

Se muestrearon los animales al inicio del estudio, previo a la vacunación para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra rabia, posteriormente se realizó la vacunación de los animales una sola vez, y luego se realizaron 4 muestreos postvacunación donde se extrajo sangre de los animales para realizar la prueba serológica y determinar la presencia de los anticuerpos neutralizantes contra la rabia.

Toda la información necesaria fue guardada en una boleta creada para el estudio (Ver Cuadro 4).

### **5.2.3 Vacunación**

Ambas cepas de vacuna antirrábica fueron obtenidas directamente de las casas comerciales, y aplicadas siguiendo las indicaciones de los laboratorios productores. Éstas se mantuvieron en estricta refrigeración (2-4°C) hasta el momento de su aplicación, esto se garantizó mediante la utilización de indicadores desechables de temperatura insertos en la refrigeradora y las hieleras que se utilizaron para el almacenaje y transporte de las vacunas utilizadas en el estudio.

La vacunación de los animales se realizó en forma aséptica y el biológico fue administrado por vía intramuscular en el músculo glúteo en cantidad de 2 ml. Esta se llevó a cabo en los 50 animales de los 2 lotes y se les aplicó la vacuna que les corresponda siguiendo las instrucciones del laboratorio fabricante.

### **5.2.4 Recolección de muestras**

La extracción de sangre se realizó por punción de la vena yugular con agujas calibre 18", recolectando aproximadamente 10 ml. de sangre por animal. Cada tubo fue previamente identificado con el número de animal a muestrear y se realizó el registro de cada tubo en la hoja de protocolo de muestreo. Los muestreos se realizaron de la siguiente manera:

1. El 1º muestreo se realizó antes de la vacunación para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra la rabia.
2. El 2º muestreo se realizó el día 7º. después de la vacunación, el 3º. muestreo el día 15, el 4º muestreo el día 21 y el 5º muestreo el día 45 postvacunación.
3. Cada muestra fue centrifugada a 3,000 rpm por 5 minutos para obtener suero.

4. Los sueros fueron separados en dos viales de 2ml y fueron puestos en congelación a -20°C y al finalizar el estudio fueron enviados por vía terrestre al laboratorio de diagnóstico ubicado en México. DF, México.

### 5.2.5 Análisis de Laboratorio

—La determinación de los títulos de anticuerpos fue realizado mediante la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes, La cual posee un 98% de sensibilidad y 93% de especificidad y un coeficiente de variación de 0.2 UI/ml y es la prueba estándar “dorada” recomendada por OIE y OMS para la titulación de anticuerpos postvacunales contra rabia en animales y humanos (14, 22, 24) Dicha prueba fue efectuada en México, D.F. en el laboratorio del Dr. Álvaro Aguilar-Setién.

### 5.2.6 Análisis Estadístico

Estadísticamente los resultados fueron analizados mediante la prueba  $t$  de Student para diferencia de medias de muestras independientes. La prueba tendrá un nivel de significancia de 0.05 ( $t_{\text{tabla}} = 2.04$ ) en base a 48 grados de libertad (2 grupos de 25 animales cada uno).

Se asume que las distribuciones poblacionales son normales y de varianza homogénea.

Se utilizó la siguiente fórmula: 
$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{Ver Cuadro 7})$$

El  $n$  de 25 animales de ambos grupos se basa en los protocolos utilizados para comparar la respuesta inmune de vacunas antirrábicas, publicados por Nunes, A. quien en el año 2,000 utilizó 10 grupos de 6 bovinos cada uno (23);

Suntharasamai, P. en 1985 utilizó 3 grupos de 15 individuos cada uno; Shimazaki, Y. en el año 2003 utilizó grupos de 2 animales, cada uno recibiendo una dilución distinta de vacuna antirrábica (31); Prosperi en 1984 utilizó 3 grupos de 50 animales cada uno (28) y luego colaboró en el estudio de Rodrigues, A. en el año 2000, quien utilizó 2 grupos de 30 animales cada uno (29); Loza-Rubio en 2004 utilizó dos grupos de 15 bovinos para medir y comparar los títulos de anticuerpos maternos transferidos al aplicar dos tipos de vacuna de cultivo celular. (19)

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 50 bovinos divididos en dos grupos de 25 animales cada uno, fueron muestreados al día "0" (antes de la vacunación), fueron vacunados con dos cepas distintas de vacunas comerciales contra la rabia bovina y posteriormente muestreados al día 7, 15, 21 y 45 días postvacunación para realizar la titulación de anticuerpos neutralizantes contra virus rábico por medio de la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (Figura 1).

No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) en los niveles de anticuerpos antirrábicos postvacunales de ambas cepas vacunales a los 7, 15, 21 y 45 días postvacunación de bovinos hembras no vacunadas, con un promedio de edad de 4 meses (Cuadros 5,6 y 7).

El 30% (15 de 50) de los animales presentó anticuerpos neutralizantes contra el virus rábico antes de ser vacunado (primer muestreo), y el 8% (4 de 50) presentaba un título por encima de 0.5 UI/ml lo cual se considera un hallazgo importante de la investigación.

Se ha probado con anterioridad la presencia de anticuerpos neutralizantes contra rabia sin vacunación, lo que demuestra la posibilidad de sufrir un desafío con el virus rábico sin desarrollar la enfermedad. Ellison et. Al. (2014) demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes contra rabia en 7% de 672 murciélagos capturados de los cuáles el 30% pertenecían a la especie *Desmodus rotundus*.

Gilbert et. Al. (2012) reportó anticuerpos neutralizantes contra rabia en el 11% (7 de 63) de la población en un estudio en personas con historial de mordedura de murciélago en la amazonia peruana.

En base los resultados de la presente investigación no es posible determinar si los anticuerpos neutralizantes contra el virus rábico provienen de un desafío de campo con el virus, sin embargo existe evidencia de una alta prevalencia de anticuerpos naturales contra la rabia en algunas zonas altamente endémicas, como lo expuesto por Bowen et. Al. (2013) quien demostró una seroprevalencia de

hasta 37% de anticuerpos neutralizantes contra rabia en murciélagos en Colima, México y Colorado, EEUU.

Los resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado que una fracción sustancial de animales aparentemente sanos posee anticuerpos neutralizantes contra el virus rábico, sugiriendo una exposición previa al virus y la posible infección periférica sin provocar un cuadro clínico en los animales.

Ellison et. Al (2014) demostró la presencia de virus rábico en murciélagos hematófagos mediante aislamiento viral y una prevalencia de 7% de anticuerpos antirrábicos tanto en murciélagos hematófagos como no hematófagos.

La presencia de anticuerpos neutralizantes contra la rabia únicamente demuestra la exposición previa a antígenos del virus rábico pero no provee información acerca del tiempo, intensidad o frecuencia de la posible infección. Por lo que es altamente recomendable investigar con mayor profundidad el hallazgo de esta investigación debido a su importancia en la salud pública.

Al día 7 postvacunación el 86% (43 de 50) de los animales presentó anticuerpos neutralizantes contra rabia. Sin embargo solo el 56% presentaba un nivel adecuado de protección mayor o igual a 0.5 UI/ml (Figura 2).

La media del título de anticuerpos neutralizantes contra virus de rabia al día 7 fue de 1.22 UI/ml y 0.61 UI/ml para cepa ERA y SAD respectivamente (Figura 1).

Al día 15 postvacunación el 88% (44 de 50) de los animales presentó anticuerpos neutralizantes contra rabia. El 74% presentaba un nivel adecuado de protección mayor o igual a 0.5 UI/ml (Figura 3).

La media del título de anticuerpos neutralizantes contra virus de rabia al día 15 postvacunación fue de 1.93 UI/ml y 1.39 UI/ml para cepa ERA y SAD respectivamente (Figura 1).

Al día 21 postvacunación el 90% (45 de 50) de los animales presentó anticuerpos neutralizantes contra rabia. El 80% presentaba un nivel adecuado de protección mayor o igual a 0.5 UI/ml (Figura 4).

La media del título de anticuerpos neutralizantes contra virus de rabia al día 21 postvacunación fue de 2.28 UI/ml y 1.97 UI/ml para cepa ERA y SAD respectivamente (Figura 1).

Al día 45 postvacunación el 92% (46 de 50) de los animales presentó anticuerpos neutralizantes contra rabia. Encontrando un 82% de la muestra con el nivel mínimo adecuado de protección (Figura 5).

La media del título de anticuerpos neutralizantes contra virus de rabia al día 45 postvacunación fue de 3.74 UI/ml y 2.90 UI/ml para cepa ERA y SAD respectivamente (Figura 1).

Ambas cepas vacunales demostraron ser adecuadamente antigénicas y produjeron anticuerpos neutralizantes contra la rabia en el 92% de la población en estudio. Aunque una de las cepas probó ser más antigénica que la otra, la diferencia en la producción de anticuerpos medida a los 7, 15, 21 y 45 días no posee relevancia estadísticamente significativa, por lo que ambas cepas podrían ser ampliamente recomendadas para el control de brotes y la prevención de la rabia bovina en el hato bovino nacional.

Aubert (1992) y Blancou (1986) demostraron la aparición de títulos protectores contra rabia en caninos a partir del día 10 y 15 postvacunación respectivamente, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio en el que se encontraron anticuerpos neutralizantes contra rabia en el 56% de la población al día 7 postvacunación y en el 76% de la población al día 15 postvacunación.

Proserpi (1984) comparó la respuesta inmune de vacuna antirrábica bovina cepa ERA y una vacuna inactivada y obtuvo títulos protectores en ambas cepas a partir del día 9 postvacunación, manteniendo los títulos protectores hasta 180 días postvacunación.

Se obtuvieron resultados con gran variabilidad en la titulación de cada cepa vacunal en un rango de 0 a 12.2 UI/ml, lo cual fue probado también por Aubert

(1992), quien demostró que existe una gran variabilidad en la respuesta inmune de animales vacunados en condiciones de laboratorio que van en un rango de 0 a 20 UI/ml.

Blancou (1986) demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes contra rabia en el 100% de individuos vacunados con vacunas vivas modificadas por vía intramuscular después de 60 días de estudio.

## VII. CONCLUSIONES

- No existe diferencia estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ) en los niveles de anticuerpos protectores que produce la vacuna antirrábica cepa ERA versus la vacuna cepa SAD, medidos a los 7, 15, 21 y 45 días postvacunación en bovinos no vacunados de 3-6 meses de edad.
- Ambas cepas vacunales produjeron anticuerpos neutralizantes contra la rabia en un nivel adecuado, evidenciando producción de anticuerpos desde el día 7 postvacunación y desarrollando un incremento constante en el nivel de protección hasta el día 45, dando como resultado un 84% y un 80% de prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra rabia en bovinos primovacunados con cepa ERA y SAD respectivamente.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Comparar los niveles de anticuerpos postvacunales en un estudio de mayor longitud para evaluar el tiempo adecuado de revacunación de los animales.
- Realizar pruebas de desafío de campo con virus rábico posterior a la vacunación de bovinos con las cepas estudiadas.
- Probar ambas cepas en un esquema de revacunación a tiempos fijos en base a estudios similares realizados con otras cepas vacunales que han resultado en la obtención de una inmunidad más duradera.
- Establecer el riesgo de contacto que poseen los bovinos del área con animales silvestres y/o perros que puedan ser portadores de rabia bovina y que puedan estar causando el desafío del ganado con el virus rábico.
- Establecer la relación entre el riesgo de la mordedura de murciélago y la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra rabia en los bovinos del área.
- Promover la tipificación filogenética de los virus rábicos presentes en nuestro país para asegurar que las vacunas presentes en el medio protegen adecuadamente al ganado bovino mediante desafíos de campo.
- Promover el establecimiento de la prueba RFFIT como la prueba estándar en el país para la evaluación de las campañas sanitarias de inmunización antirrábica y para el comercio de animales vivos.

## IX. RESUMEN

La rabia es una zoonosis que en los últimos años ha cobrado gran importancia en Guatemala; representa un serio problema de salud pública y además causa pérdidas económicas y de producción en las explotaciones ganaderas.

Ya que en el mercado existe gran variedad de biológicos para la prevención de la rabia bovina, resulta útil ahondar en el conocimiento de la respuesta inmune que inducen, en éste estudio en particular, dos cepas distintas de vacuna antirrábica bovina. El objetivo principal de ésta investigación es contribuir al conocimiento de la respuesta inmune inducida por dos vacunas antirrábicas en un período de 45 días postvacunación, en un hato bovino de Purulhá, Baja Verapaz.

Se determinó y comparó los niveles de anticuerpos postvacunales a los 7, 15, 21 y 45 días de dos vacunas antirrábicas presentes en nuestro medio (Cepa ERA y Cepa SAD) en un grupo de 50 bovinos no vacunados utilizando la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (prueba recomendada para el comercio internacional).

A partir del día 15 postvacunación ambas cepas probaron producir anticuerpos neutralizantes contra rabia en más del 84% de la población en estudio, y para el día 45 el 92% de la población en estudio presentó anticuerpos protectores contra rabia bovina.

Aunque una de las cepas probó ser más antigénica que la otra a lo largo del estudio, se concluye que la diferencia en la producción de anticuerpos medida a los 7, 15, 21 y 45 días no posee relevancia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ), por lo que ambas cepas podrían ser ampliamente recomendadas para el control de brotes y la prevención de la rabia bovina en el hato nacional.

## SUMMARY

Rabies is a zoonotic disease that in recent years has gained great importance in Guatemala; represents a serious public health treat and causes economic and production losses in livestock farms.

Since in the market there are a variety of vaccines for prevention of bovine rabies, it is useful to deepen the understanding of the immune response induced, in this particular study, of two different strains of bovine rabies vaccine. The main objective of this research is to contribute to the knowledge of the immune response induced by two rabies vaccines in a period of 45 days post-vaccination, in a bovine herd at Purulhá, Baja Verapaz, Guatemala.

Levels of post-vaccination rabies virus antibodies were measured and compared at 7, 15, 21 and 45 days of two rabies vaccines present in our country (ERA strain and SAD strain) in a group of 50 non-vaccinated heifers using rapid fluorescent focus inhibition test (recommended test for international trade)

From day 15 post-vaccination both strains tested produced neutralizing antibodies against rabies in more than 84% of the study population, and by day 45, 92% of the study population developed protective antibodies against bovine rabies.

Although one of the strains proved to be more antigenic than the other throughout the study, it is concluded that the difference in antibody production measured at 7, 15, 21 and 45 days has no statistical significance ( $p > 0.05$ ), so both strains could be widely recommended for outbreak control and prevention of bovine rabies in the national herd.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acha, P. 1968. Epidemiología de la Rabia Transmitida por los Quirópteros. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. p. 211-229.
2. Acha, P; Szyfres, B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. Washington, EU. 3 ed. 425 p.
3. Aubert, M; 1992. Practical significance of rabies antibodies. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 11 (3) (en línea) Consultado 13 de dic. 2012. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1472723>
4. Blancou, J. 1985. Las vacunas y la vacunación antirrábica de los animales domésticos y salvajes en Europa. OIE. (en línea) consultado 23 de ene. 2012. Disponible en <http://www.oie.int/doc/ged/D8820.PDF>
5. Bowen R.A., O'Shea T.J., Shankar V., Neubaum M.A., Neubaum D.J., Rupprecht C.E. 2013. Prevalence of neutralizing antibodies to rabies virus in serum of seven species of insectivorous bats from Colorado and New Mexico, United States. J Wildl Dis 49: 367–374.
6. Chang, D.E. 1989. Comparación de los niveles de anticuerpos antirrábicos detectados por la técnica de contrainmunolectroforesis (CIE), en perros inmunizados con vacunas de cerebro de ratón lactante (CRL): 2% normal y 1% adsorbida con hidróxido de aluminio. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala, GT, USAC/FMVZ. 87 p.
7. Ellison, J.A., Gilbert, A.T., Recuenco, S., Moran, D., Alvarez, D.A., Kuzmina, N.,

García, D.L., Peruski, L.F., Mendonca, M.T., Lindblade, K.A., Rupprecht, C.E., 2014. Bat rabies in Guatemala. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, e3070.

8. Favi, M; Yung P; Roos, O; Rodríguez, L; Trujillo, R; Acevedo, A. 2004. Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida-Palacios (CRL) y de la vacuna antirrábica de cultivo celular (Verorab) en personas con tratamiento preexposición. Revista Med Chile. Santiago, CL. (en línea) Consultado 12 de dic. 2011. Disponible en [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034\\_98872004000100006&script=sci\\_art\\_text](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034_98872004000100006&script=sci_art_text)
9. Formadi, H. 2005. Rabies. Virginia Bioinformatics Institute. Virginia, EU. (en línea) consultado 10 de jul. 2011. Disponible en [http://ci.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Rabies\\_virus\\_2.html](http://ci.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Rabies_virus_2.html)
10. Gilbert, A.T.; Petersen, B.; Recuenco, S.; Niezgodá, M.; Gómez, J.; Laguna-Torres, A.; Rupprecht, C. 2012. Evidence of Rabies Virus Exposure among Humans in the Peruvian Amazon. Am. J. Trop. Med. Hyg. 87 (2) pp. 206-215.
11. Hernández, E. 1986. La rabia parestante bovina: definición del problema y metodología de control. Ciencia Veterinaria (1). México D.F. MX. p. 103-129. (en línea) Consultado 06 de Jul. 2011. Disponible en <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c05.pdf>
12. Instituto Nacional de Estadística. 2004. IV Censo Nacional Agropecuario (en línea) Consultado 12 de sep. 2011. Disponible en [www.ine.gob.gt/np/agropecuario/tomo%20IV.pdf](http://www.ine.gob.gt/np/agropecuario/tomo%20IV.pdf)
13. Kahrs, R. 1991. Enfermedades Víricas Del Ganado Vacuno. Zaragoza, ES. 2da. Ed. Acribia. 361p.

14. Krämer B, Schildger H, Behrens-Nicol HA, Hanschmann KM, Duchow K. 2009. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. (en línea) consultado 15 de nov. 2011. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105609000025>
15. Kubes, V. 1958 Diferencias Inmunológicas Entre Los Virus Rábicos. Separata de la Revista "Universidad de San Carlos" No. XLVI Guatemala, GT, USAC. P. 201-212.
16. Kurz, J; Vogel, J; Gerstl, F; Dostal, V. 1986. Comparative studies of two potency tests for antirabies serum: neutralization test in mice (MNT) and rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). National Center For Biotechnology Information. Maryland, EU. (en línea) consultado 23 oct. 2011. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3539671>
17. Laboratorios Biozoo. 2011. Vacuna Contra el Derriengue. (en línea) Consultado 06 de mayo. 2011. Disponible en <http://www.biozoo.com.mx/index.php/es/men-prod/smen-grupo-farm/53-cat-bio-bov/92-art-derrien.html>
18. Laboratorios Sanfer. 2010. Derrisan Cepa Era: Ficha técnica. (en línea) Consultado 06 de mayo. 2011. Disponible en <http://www.sanfer.com.mx/pdf/veterinaria/derrisan.pdf>
19. Loza-Rubio E; Orozco V; Niezgoda M; Labrandero; Rojas A; Banda R; 2004. Transferencia de Anticuerpos Antirrábicos Maternos, Utilizando Vacunas Producidas en Cultivo Celular. CENID-Microbiología. México, MX. 5pp.

Código de campo cambiado

20. Mancilla, K. 2006. Evaluación de títulos de anticuerpos post vacunales del virus de rabia canina mediante la técnica de elisa en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra. Tesis Lic. Med. Vet. Santa Cruz, BO. UAGRM. 58 p.
21. Manual Merck de Veterinaria. 2000. 5 ed. ES. Grupo Editorial Océano. 2558p.
22. Moore, S; Hanlon, C. 2010. Rabies-Specific Antibodies: Measuring Surrogates of Protection against a Fatal Disease. Kansas State University, Kansas, EU. (en línea) Consultado 4 sep. 2011. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2834733/?tool=pubmed>
23. Nunes, A; Ribeiro, M; Da Silva, M; Correa W; Cortez, E. 2000. Immune Response in Cattle Vaccinated against Rabies. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Río de Janeiro , BR. (en línea) consultado 6 de feb. 2011. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000100013>
24. OIE. 2008. Rabia. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. Consultado 15 de ago. 2011. Disponible en [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.01.13.%20Rabi a.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.13.%20Rabi a.pdf)
25. OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud) 2011. Rabia en bovinos. Distribución por sub-región y país. Las Américas, 2003 - 2012. Sistema de Información Epidemiológica PANAFTOSA. (en línea) Consultado 06 de nov. 2011. Disponible en <http://siepi.panaftosa.org.br/Anuais.aspx?Idioma=e>

26. OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud) 2011. Rabia en humanos. Distribución por sub-región y país. Las Américas, 2003 - 2012. Sistema de Información Epidemiológica PANAFTOSA. (en línea) Consultado 06 de nov. 2011. Disponible en <http://siepi.panaftosa.org.br/Anuais.aspx?Idioma=e>
27. Pérez, O; Paolazzi, C. 1997. Production methods of rabies vaccine. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. (en línea) Consultado 10 nov. 2011. Disponible en <http://www.springerlink.com/content/df8m99arg912h7jx/>
28. Prosperi, S; Irsara, A; Battelli, G; Sanguinetti, V. 1984. Vaccination of cattle with live and inactivated rabies vaccines: A study of antibody response. Veterinary Research Communications. (en línea) consultado 20 de feb. 2012. Disponible en <http://www.springerlink.com/content/73g12t8016240143/>
29. Rodrigues, A; Caporale, G; Targueta, M; Comin, ; Zanetti, C; Kotait, I. 2000. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. Vol 42 No. 2 Sao Paulo, BR. (en línea) consultado 13 ene. 2012. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652000000200006>
30. Shankar B. 2009. Advances in diagnosis of rabies. Department of Veterinary Pathology, Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Science University Veterinary World, Karnataka, IN. (en línea) consultado 2 de nov. 2011. Disponible en [www.veterinaryworld.org/Vol.2%20No.2%20Full%20Text/Advances%20in%20Diagnosis%20of%20Rabies.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.2%20No.2%20Full%20Text/Advances%20in%20Diagnosis%20of%20Rabies.pdf)
31. Shimazaki, Y.; Inoue, S; Takahashi, C; Gamoh, K; Etoh, M; Kamiyama, T; Makie, H. 2003. Immune Response to Japanese Rabies Vaccine in Domestic Dogs. National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture and Fisheries, Tokyo, JP. (en línea) consultado 11 ago. 2011. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675902>

32. Smith, J; Yager, P; Baer, G. 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Boletín No. 48 WHO (World Health Organization) Georgia, EU. (en línea) Consultado 4 sep. 2011. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2482941/>
33. Tierkel, E; Neff, H. 1996 La Rabia: Sistemas para el diagnóstico de laboratorio. U.S. Department of Health Education, and welfare, Public Health Service, Georgia, EU. CDC. 41 p.
34. WHO. 2011. Tests for determination of rabies antibodies. (en línea) consultado 22 de oct. 2011. Disponible en [http://www.who.int/rabies/human/test\\_antibody/en/index.html](http://www.who.int/rabies/human/test_antibody/en/index.html)

## **XI. ANEXOS**

## CUADRO 1: Situación de la Rabia Bovina en las Américas. Años 2007 al 2011

### Rabia en Bovinos. Distribución por sub-región y país. Las Américas, 2007 - 2011.

Países por sub-región	2007	2008	2009	2010	2011
<b>América Latina</b>	<b>1563</b>	<b>1595</b>	<b>1422</b>	<b>1414</b>	<b>439</b>
<b>Área Andina</b>	<b>282</b>	<b>339</b>	<b>348</b>	<b>337</b>	<b>131</b>
Bolivia	38	47	55	43	0
Colombia	84	112	133	123	0
Ecuador	22	41	46	30	16
Perú	120	107	95	126	115
Venezuela	18	32	19	15	...
<b>Cono Sur</b>	<b>152</b>	<b>137</b>	<b>82</b>	<b>106</b>	<b>54</b>
Argentina	51	91	31	30	39
Chile	0	0	0	0	0
Paraguay	75	15	27	67	15
Uruguay	26	31	24	9	0
<b>Brasil</b>	<b>865</b>	<b>872</b>	<b>791</b>	<b>601</b>	<b>73</b>
<b>América Central</b>	<b>35</b>	<b>53</b>	<b>59</b>	<b>66</b>	<b>54</b>
Belice	...	...	...	...	...
Costa Rica	1	1	0	1	0
El Salvador	18	4	18	7	0
<b>Guatemala</b>	<b>13</b>	<b>23</b>	<b>32</b>	<b>49</b>	<b>39</b>
Honduras	0	1	0	1	8
Nicaragua	0	0	1	1	0
Panamá	3	24	8	7	7
<b>México</b>	<b>227</b>	<b>183</b>	<b>134</b>	<b>296</b>	<b>121</b>
<b>Caribe Latino</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>6</b>
Cuba	1	5	7	6	1
Haití	0	0	...	...	0
Puerto Rico	0	1	0	0	...
República Dominicana	1	5	1	2	5
<b>América del Norte</b>	<b>72</b>	<b>70</b>	<b>82</b>	<b>72</b>	<b>0</b>
Canadá	15	12	8	1	...
Estados Unidos	57	58	74	71	...
<b>Total</b>	<b>1636</b>	<b>1665</b>	<b>1504</b>	<b>1486</b>	<b>439</b>

Fuente: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

## CUADRO 2: Situación de la rabia humana en las Américas. Años 2007 al 2011

**Rabia en humanos. Distribución por sub-región y país. Las Américas, 2007 - 2011.**

Países por sub-región	2007	2008	2009	2010	2011
<b>América Latina</b>	<b>46</b>	<b>25</b>	<b>42</b>	<b>29</b>	<b>34</b>
<b>Área Andina</b>	<b>32</b>	<b>7</b>	<b>28</b>	<b>19</b>	<b>25</b>
Bolivia	4	4	3	1	5
Colombia	3	3	4	4	0
Ecuador	0	0	1	0	0
Perú	24	0	19	14	20
Venezuela	1	0	1	0	...
<b>Cono Sur</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Argentina	0	1	0	0	0
Chile	0	0	0	0	0
Paraguay	0	0	0	0	0
Uruguay	0	0	0	0	0
<b>Brasil</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>América Central</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
Belice	...	...	...	...	...
Costa Rica	0	0	0	0	0
El Salvador	2	1	0	0	0
<b>Guatemala</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
Honduras	0	0	1	0	0
Nicaragua	0	0	0	0	0
Panamá	0	0	0	0	0
<b>México</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
<b>Caribe Latino</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Cuba	0	2	0	0	0
Haití	6	4	...	...	4
Puerto Rico	0	0	0	0	...
República Dominicana	0	1	4	3	0
<b>América del Norte</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Bermuda	...	...	...	...	...
Canadá	0	0	0	0	...
Estados Unidos	1	2	4	1	...
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>27</b>	<b>46</b>	<b>30</b>	<b>34</b>

Fuente: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

**CUADRO 3: Número de fincas censales y número de cabezas de GANADO BOVINO, por estructura del hato, según departamento y tamaño del hato. Mayo 2003.**

Departamento y tamaño del hato	Número de fincas	Número de cabezas									
		Total	Hembras	Machos	Menores de un año			De un año y más			
					Total	Terneras	Terneros	Total	Novillas	Novillos	Vacas
Total República	106,789	1,627,522	1,097,033	530,489	372,739	206,575	166,164	1,254,783	242,459	255,081	647,999
De 1 a 4 cabezas	69,495	139,183	100,457	38,726	25,961	16,916	9,045	113,222	12,279	5,499	71,262
De 5 a 9 cabezas	14,212	91,819	66,774	25,045	22,059	13,061	8,998	69,760	10,263	4,377	43,450
De 10 a 19 cabezas	9,302	124,856	91,436	33,420	32,307	18,424	13,883	92,549	16,839	8,291	56,173
De 20 a 49 cabezas	7,700	233,234	170,067	63,167	61,506	34,628	26,878	171,728	36,623	22,746	98,816
De 50 a 99 cabezas	3,268	221,126	153,743	67,383	57,459	31,596	25,863	163,667	36,168	31,218	85,979
De 100 a 199 cabezas	1,618	216,592	138,876	77,716	49,883	26,908	22,975	166,709	35,879	44,591	76,089
De 200 a 499 cabezas	817	245,187	149,622	95,565	49,512	26,411	23,101	195,675	39,196	60,710	84,015
De 500 a 999 cabezas	271	181,180	116,794	64,386	38,481	19,561	18,920	142,699	28,438	38,249	68,795
De 1000 ó más cabezas	106	174,345	109,264	65,081	35,571	19,070	16,501	138,774	26,774	39,400	63,420

Fuente: INE 2003



**CUADRO 5: Titulación de vacuna antirrábica bovina cepa ERA mediante la prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes (RFFIT). En UI/ml**

			Muestreo 1 (Sin Vacunación)	Muestreo 2 (7 días post vacunación)	Muestreo 3 (15 días post vacunación)	Muestreo 4 (21 días post vacunación)	Muestreo 5 (45 días post vacunación)
No. Muestra	ID del animal	Edad al inicio del estudio (meses)	Título (UI/ml)	Título (UI/ml)	Título (UI/ml)	Título (UI/ml)	Título (UI/ml)
1	25-010	4	0	0.74	0.73	0.89	0.92
2	31-010	3	0	0.92	0.7	0.68	0.7
3	16-010	5	0	0	0	0	0
4	26-010	3	0	0.37	0.51	0.65	0.65
5	28-010	6	0	1.3	2.5	2.7	2.12
6	24-010	4	0	0.51	1.1	0.65	1.6
7	32-010	6	0	0.54	2.39	2.4	2.54
8	19-010	5	0.5	0.63	2.2	2.9	2.9
9	23-010	4	0.64	0.37	1.1	1.62	0.63
10	29-010	5	0.4	1.2	1.7	0.72	0.85
11	55-010	6	0	1.13	2	2.14	2.14
12	40-010	6	1	1.15	6.04	8.2	8.2
13	57-010	5	0	1.1	1.5	3.4	7.8
14	51-010	4	1.9	4.02	4.54	6.02	12.2
15	34-010	4	0	1.83	1.79	4.5	7.8
16	48-010	6	0.4	3.9	6.03	0	10
17	43-010	4	0.15	3.2	3.16	3.16	4.9
18	52-010	3	0	0.48	1.84	1.88	7.6
19	37-010	5	0.42	2.6	1.12	5.2	9.2
20	36-010	6	0.48	3.7	6.13	7.2	8.6
21	1-010	3	0	0	0	0	0
22	2-010	3	0	0	0.2	0.44	0.44
23	3-010	3	0	0.4	0.5	0.5	0.7
24	4-010	4	0	0.32	0.45	0.45	0.45
25	5-010	4	0	0	0	0.62	0.65

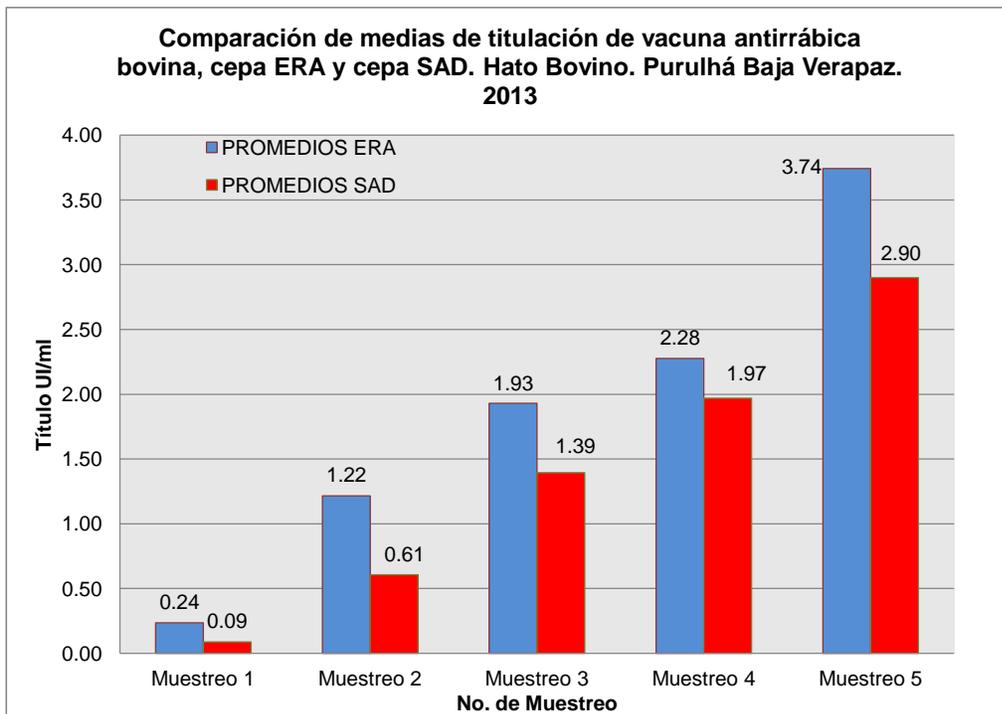
**CUADRO 6: Titulación de vacuna antirrábica bovina cepa SAD mediante la prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes (RFFIT). En UI/ml**

			Muestreo 1 (Sin Vacunación)	Muestreo 2 (7 días post vacunación)	Muestreo 3 (15 días post vacunación)	Muestreo 4 (21 días post vacunación)	Muestreo 5 (45 días post vacunación)
No. Muestra	ID del animal	Edad al inicio del estudio (meses)	título (UI/ml)	título (UI/ml)	título (UI/ml)	título (UI/ml)	título (UI/ml)
1	69-010	6	0.29	0.29	2.22	4.45	6.04
2	74-010	6	0	0.32	2.79	3.45	4.78
3	73-010	3	0	0.45	0	0.68	0.7
4	63-010	4	0.48	1.51	2.1	3.16	4.9
5	60-010	3	0	0.94	1.74	2.42	7.6
6	1-011	4	0.46	0.875	0	5.2	8.2
7	76-010	6	0	0.9	2.97	1.68	1.72
8	77-010	3	0	0.5	0.58	0.68	0.7
9	62-010	6	0	0	1.49	1.52	1.01
10	70-010	6	0.2	0.32	3.97	0.65	0.65
11	6-011	3	0	0.4	1.5	2.7	2.9
12	9-011	3	0	0.52	1.5	2.9	3.4
13	7-011	4	0.48	1.3	2.9	3.45	4.8
14	3-011	3	0	0.79	0.3	0.5	0.7
15	65-011	4	0	1.78	2	0	2.5
16	11-011	3	0	0.3	0.5	0.9	0.92
17	14-011	3	0	0	0.23	0.45	0.45
18	8-011	4	0	0.041	2.18	2.54	4.2
19	15-011	5	0	0.6	2.02	3.01	4.2
20	13-011	6	0	0.28	0.35	0.35	0.44
21	6-010	5	0	0.54	0.9	2.9	3.5
22	7-010	5	0.32	0.34	0.34	0.36	0.4
23	8-010	5	0	1.83	1.79	4.5	7.8
24	9-010	3	0	0.32	0.49	0.79	0
25	10-010	3	0	0	0	0	0

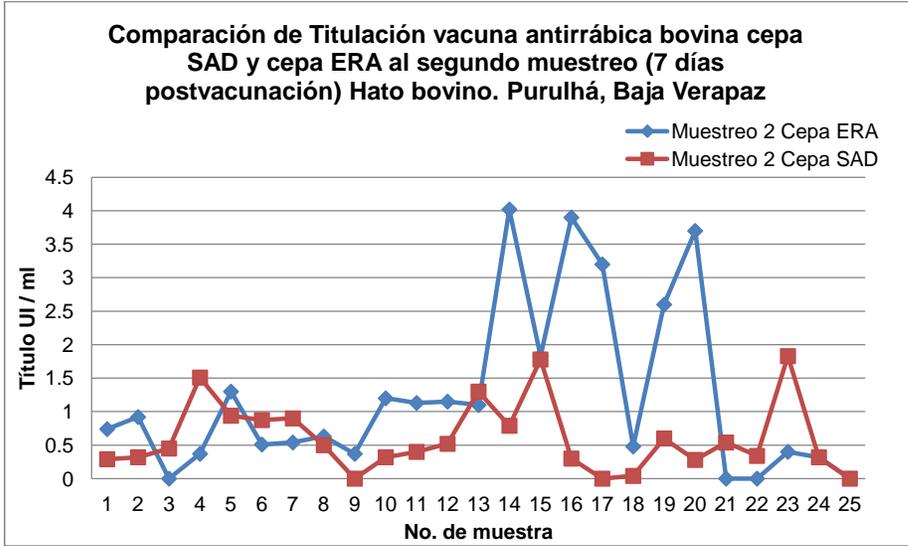
**CUADRO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS**

		EDAD	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Muestreo 5
<b>PROMEDIOS</b>	ERA	4.44	0.24	1.22	1.93	2.28	3.74
	SAD	4.24	0.09	0.61	1.39	1.97	2.90
<b>MEDIANA</b>	ERA		0.00	0.74	1.50	1.62	2.12
	SAD		0.00	0.45	1.50	1.68	2.50
VARIANZA	ERA		0.1929	1.6027	3.5813	5.4336	14.9353
	SAD		0.0291	0.2752	1.2211	2.4165	6.7889
S <sub>2</sub>	ERA		0.4392	1.2660	1.8924	2.3310	3.8646
	SAD		0.1707	0.5246	1.1050	1.5545	2.6055
	<b>S2P</b>		4.00	1.34	0.53	1.94	5.06
	<b>T</b>			<b>0.3</b>	<b>0.7</b>	<b>0.2</b>	<b>0.5</b>

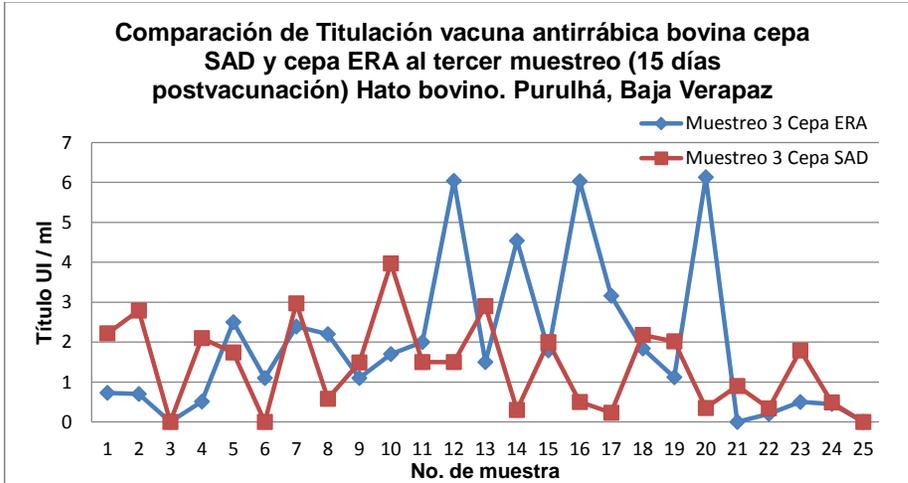
**FIGURA 1**



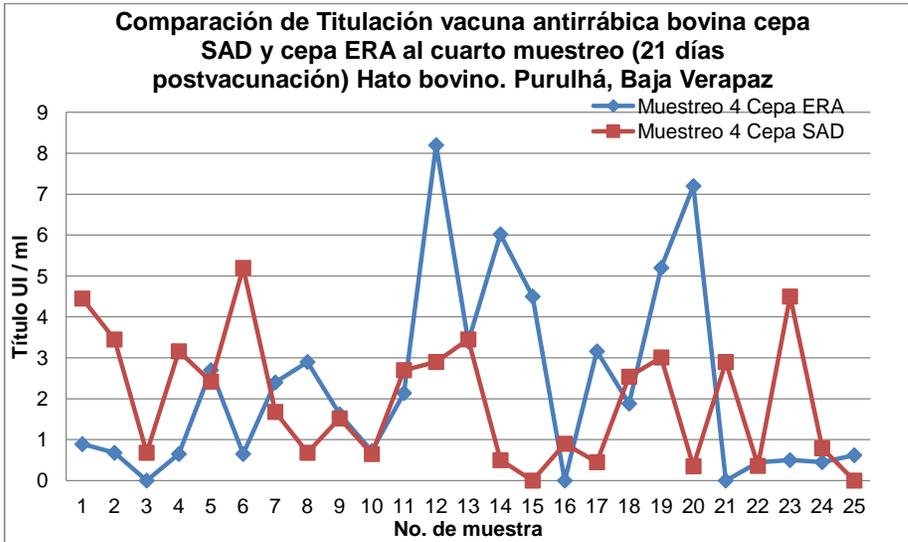
**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**

