

RABIA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA RABIA Y OTROS LYSSAVIRUS)

RESUMEN

La rabia es una zoonosis importante para la que se han estandarizado internacionalmente las técnicas de diagnóstico. Dado que no hay ni lesiones patognomónicas macroscópicas ni signos clínicos específicos y constantes de rabia, solo puede establecerse un diagnóstico exacto en el laboratorio. Las técnicas de laboratorio se llevan a cabo preferiblemente con tejido del sistema nervioso central (SNC) extraído del cráneo (concretamente, del tronco del encéfalo, el pie del hipocampo, el tálamo, la corteza cerebral y el bulbo raquídeo). Se debe analizar un conjunto de muestras del SNC, y el tronco del encéfalo es el componente más importante de dichas muestras.

Identificación del agente: *La identificación del agente se lleva a cabo preferentemente mediante pruebas de diagnóstico como la prueba de inmunofluorescencia directa (FAT), la prueba de inmunohistoquímica rápida (dRIT), o reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) aptas para la detección de cualquier lyssavirus. La FAT, la dRIT y la PCR proporcionan un diagnóstico fiable en el 98–100% de los casos causados por cepas de lyssavirus si se utiliza un conjugado o cebador/sonda adecuado. Cuando se tiene un gran número de muestras, como en el caso de un estudio epidemiológico, la PCR puede aportar resultados rápidos en laboratorios que dispongan del material necesario.*

Las técnicas histológicas, como la tinción de Seller (corpúsculos de Negri) ya no se recomiendan como método de diagnóstico.

En los casos de resultados inconcluyentes de las técnicas de diagnóstico primarias (FAT, dRIT o PCR para cualquier lyssavirus), se recomienda analizar la misma muestra con otras pruebas de confirmación (pruebas moleculares, o de inoculación en cultivo celular o en ratón), o bien repetir la prueba primaria con otras muestras. Cuando sea posible, el aislamiento del virus en cultivo celular debe reemplazar las pruebas de inoculación en ratones.

La caracterización del agente puede llevarse a cabo en laboratorios especializados utilizando anticuerpos monoclonales, o la secuenciación parcial o completa del genoma seguida de un análisis filogenético. Tales técnicas permiten distinguir entre las cepas naturales y las vacunales, e identificar el origen geográfico de las cepas naturales. Estas técnicas tan sensibles deben llevarse a cabo e interpretarse por parte de personal experto.

Pruebas serológicas: *Los ensayos de neutralización vírica (NV) y los de enzimoimmunoanálisis (ELISA) son adecuados para el seguimiento de la respuesta de anticuerpos de los animales vacunados en el marco de los programas de control de la rabia. A los efectos de medir las respuestas de anticuerpos a la vacunación antes del desplazamiento o comercio de animales a nivel internacional, la VN, la FAVN y la RFFIT son métodos aceptables, así como los ELISA validados para este fin. Para el diagnóstico primario no deben utilizarse pruebas serológicas.*

Requisitos para las vacunas: *Para la vacunación de animales contra la rabia, se utilizan vacunas de virus inactivados (en el caso de los animales de compañía y del ganado), de virus atenuados vivos (en el caso de la fauna salvaje y de los perros vagabundos) o vacunas recombinantes (para fauna salvaje, perros y gatos).*

Los fabricantes de vacuna deben dar a conocer las características del producto y llevar a cabo los estudios necesarios para cumplir con los requisitos mínimos establecidos a nivel nacional e internacional. Para que las vacunas puedan recibir la aprobación por parte de la autoridad reguladora pertinente, se debe determinar la duración de la inmunidad derivada de su empleo en animales vacunados de la especie de destino. Las vacunas deben proporcionar una protección inmunitaria durante al menos 1 año.

La potencia, la eficacia y la inocuidad de las vacunas se establecen y controlan mediante pruebas que se hayan formuladas a partir de una farmacopea reconocida.

A. INTRODUCCIÓN

La rabia está causada por virus neurotrópicos del género *Lyssavirus*, que corresponde a la familia Rhabdoviridae, y se transmite a todos los mamíferos. Dado que los virus son transmisibles al ser humano, todo material sospechoso de estar infectado debe manipularse respetando las normas de seguridad establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1996). Los laboratorios que trabajan con lyssavirus o material de animales sospechosos de estar infectados por estos virus, deben cumplir con la normativa nacional relativa a la biocontención y la bioseguridad, así como aplicar procedimientos de bioseguridad y biocontención adecuados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en los laboratorios veterinarios y en las instalaciones de los animales*).

El virus de la rabia (VRAB) constituye la especie taxonómica prototípica del género *Lyssavirus*, que incluye otras especies de lyssavirus o bien relacionadas antigénicamente con lyssavirus (ICTV, 2017)¹. El VRAB se halla en todo el mundo, y es responsable de la inmensa mayoría de los casos notificados de rabia animal y humana. Otros lyssavirus parecen hallarse en una zona geográfica más reducida y en una menor variedad de hospedadores, y la mayoría se han aislado de murciélagos, con poca implicación para la salud pública y la sanidad animal. Sin embargo, todos los lyssavirus analizados hasta la fecha causan una enfermedad clínica no diferenciable de la causada por el VRAB.

Los lyssavirus se han dividido en al menos tres filogrupos con patogenicidad e inmunogenicidad bien diferenciadas (Kuzmin *et al.*, 2010). Sin embargo, las vacunas antirrábicas podrían no aportar suficiente protección cruzada contra todos los lyssavirus genéticamente divergentes. con la vacuna pre-exposición y con la profilaxis convencional tras la exposición a la rabia se ha observado muy poca o ninguna protección cruzada para lyssavirus de los filogrupos 2 y 3 (Badrane *et al.*, 2001; Brookes *et al.*, 2005; Hanlon *et al.*, 2005). La OMS recomienda la vacunación preventiva de todo el personal que manipule material infectado o sospechoso de estarlo (OMS, 2013).

Al no existir signos clínicos ni lesiones macroscópicas post-mortem que puedan considerarse patognomónicas en animales domésticos ni salvajes, el diagnóstico de la rabia se basa en pruebas de laboratorio. Las pruebas serológicas no se utilizan para el diagnóstico ante-mortem debido a la seroconversión tardía y a la alta tasa de mortalidad de las especies hospedadoras, pero sí son muy útiles para evaluar la seroconversión tras la vacunación, y para los estudios epidemiológicos.

1 https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la rabia y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Demostrar ausencia de infección en la población	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
DFA (detección de antígeno)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
dRIT (detección de antígeno)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
ELISA (detección de antígeno)	+	n/a	+	+	+	n/a
Cultivo celular (aislamiento del virus)	+	n/a	+++	+++	+++	n/a
MIT (aislamiento del virus)	n/a	n/a	+++	+++	+++	n/a
RT-PCR convencional (detección de ARN)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
RT-PCR en tiempo real (detección de ARN)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
Detección de respuesta inmunitaria						
VN	n/a	+++	+++	n/a	n/a	+++
ELISA	n/a	n/a	+++	n/a	n/a	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;

+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

DFA = prueba de inmunofluorescencia directa; dRIT = prueba de inmunohistoquímica directa rápida;

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; MIT = prueba de inoculación en ratón;

VN = neutralización del virus; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

1. Identificación del agente

La observación clínica como máximo puede conducir a la sospecha de rabia, porque los signos de la enfermedad no son característicos y pueden variar mucho de un animal a otro. El único modo de llevar a cabo un diagnóstico fiable de la rabia es identificar el virus o alguno de sus componentes específicos mediante pruebas de laboratorio.

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

Se pueden utilizar varias técnicas, que varían en cuanto a eficacia, especificidad y fiabilidad. En los animales, clásicamente se aplican a tejido encefálico, pero también se pueden aplicar, con una sensibilidad y especificidad variables, a otros órganos (como las glándulas salivales). En el encéfalo, el virus de la rabia es particularmente abundante en el tálamo, el puente y el bulbo raquídeo. Para las pruebas, se recomienda disponer de un conjunto

de tejidos encefálicos que incluya el tronco del encéfalo (Bingham & Van der Merwe, 2002). La prueba más utilizada para el diagnóstico de la rabia es la inmunofluorescencia directa (FAT).

1.1. Obtención de muestras de encéfalo

Lo óptimo es obtener muestras de tras abrir el cráneo en la sala de necropsias, y escoger las más adecuadas, preferiblemente de tronco encefálico, pie del hipocampo, tálamo, corteza cerebral, cerebelo y bulbo raquídeo. Como alternativa, también puede aplicarse métodos de obtención de ciertas muestras encefálicas sin abrir el cráneo.

Cuando se manipulan tejidos del sistema nervioso central en casos sospechosos de rabia, han de tomarse las debidas precauciones. Siempre se debe usar equipo de protección personal (como guantes, visera y mascarilla) y se debe evitar la formación de aerosoles. Los instrumentos de corte, como tijeras y bisturís, deben utilizarse con cuidado para evitar daños y contaminación.

1.1.1. Ruta del agujero occipital para la obtención de muestras del encéfalo

Se introduce en el agujero occipital en dirección al ojo una pajita de beber de 5 mm (Barrat & Blancou, 1988), una pipeta desechable de plástico de 2 ml o una jeringa de plástico truncada de 1-2 ml. Pueden tomarse muestras de la base del pie del hipocampo, del cerebelo, del hipocampo, de la corteza y del bulbo raquídeo. Cuando se utiliza una paja, debe pinzarse entre los dedos para impedir que se escape material al retirarla.

1.1.2. Vía retro-orbital para la obtención de muestras del encéfalo

En esta técnica (Montano Hirose *et al.*, 1991), se utiliza un trocar para hacer un agujero en la parte posterior de la cavidad ocular y luego se introduce una pipeta o pajilla de plástico a través de este hueco. Las partes del encéfalo muestreadas son las mismas que en la técnica anterior, pero se toman en la dirección opuesta.

1.2. Envío de muestras

El material sospechoso que deba transportarse por carretera deberá enviarse aplicando las normas del *International Carriage of Dangerous Goods by Road* (ADR). En el caso del transporte aéreo internacional, deberán aplicarse las *Dangerous Goods Regulations of the International Air Transport Association* (IATA). Estas indicaciones se resumen en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*.

Cuando no es posible enviar muestras refrigeradas/congeladas, se pueden utilizar otras técnicas de conservación. La elección de conservantes depende del tipo de prueba que se va a usar en el diagnóstico:

i) Muestras fijadas en formalina

La fijación en formalina (solución al 10% [p/v] en solución salina tamponada con fosfato [PBS]) permite el análisis con FAT, inmunohistoquímica y PCR convencional y en tiempo real, pero es posible que sean necesarias ciertas modificaciones y que las pruebas sean menos sensibles que cuando se usan muestras frescas (Warner *et al.*, 1997).

ii) Glicerol/solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Para el transporte de muestras, si estas se mantienen en una mezcla de glicerol al 50% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), la infectividad puede durar varios días. La mezcla glicerol/PBS reduce la actividad bacteriana y, por tanto, protege contra los efectos químicos y biológicos de la putrefacción. Debido al hecho de que el virus de la rabia es termolábil, este método no previene un descenso en la carga vírica de la muestra. En condiciones normales de transporte en regiones con temperaturas altas (superiores a los 30°C), esta protección podría ser eficaz solo durante unos cuantos días. Así, siempre que sea posible, las muestras conservadas en glicerol/PBS deben mantenerse refrigeradas. Como en glicerol/PBS el virus no se inactiva, con estas muestras se pueden utilizar todas las pruebas de laboratorio.

iii) Conservación para el uso de técnicas moleculares

Para las técnicas moleculares, se pueden utilizar tampones de lisis para la extracción de ácido nucleico y tampones de conservación del ARN impregnados en papel de filtro (Picard-Meyer *et al.*, 2007). Estos tampones conservan el ARN del virus de la rabia y permiten el transporte de

muestras a temperatura ambiente sin tener que aplicar precauciones específicas contra amenazas biológicas para la detección de ARN vírico y la posterior caracterización genética de cepas del virus de la rabia.

1.3. Pruebas de laboratorio

1.3.1. Identificación inmunoquímica del antígeno del virus de la rabia

i) Prueba de inmunofluorescencia directa (FAT)

La prueba más utilizada en el diagnóstico de la rabia es la FAT, que recomiendan tanto la OMS como la OIE. Esta prueba de referencia puede utilizarse directamente sobre un frotis de impresión y también para confirmar la presencia del antígeno de la rabia en cultivo celular o en tejido encefálico de ratones que se hayan inoculado con fines de diagnóstico. La FAT es muy sensible y específica (96–99%), y da resultados fiables en muestras frescas en menos de 2 horas. La sensibilidad de la FAT depende de la muestra, del grado de autólisis (McElhinney *et al.*, 2014) y del tipo de muestra (Barrat & Aubert, 1995).

Para el diagnóstico directo de la rabia, se deben fijar frotis de impresión preparados a partir de una muestra compuesta de tejido encefálico, que incluya el tronco del encéfalo y el cerebelo. Si no se dispone de cerebelo, puede emplearse un corte transversal del pie del hipocampo. Estos frotis se fijan en acetona fría de grado alto al 100% (–20°C) durante al menos 20 minutos o se fijan por calor pasando el porta 2–3 veces por una llama. A continuación, se secan al aire y después se tiñen con conjugado de anticuerpo policlonal o monoclonal anti-rabia marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína), diluido a concentración de trabajo y en una cantidad suficiente como para cubrir todo el porta, durante 30 minutos a 37°C en una caja húmeda. A continuación, los portas problema para la FAT deben examinarse para comprobar si presentan fluorescencia específica, empleando un microscopio de fluorescencia invertido y un filtro apropiado para la longitud de onda (490 nm y re-emite a 510 nm). Se identifican agregados de proteína de la nucleocápsida mediante fluorescencia específica de conjugado unido. Es recomendable que el porta de la FAT sea leído por dos miembros cualificados independientes. Los sitios antigénicos conservados en las proteínas de la nucleocápsida permiten la identificación de todos los lyssavirus con preparaciones comerciales modernas de conjugados de anticuerpos policlonales anti-rabia que se emplean para pruebas diagnósticas en tejido encefálico, mientras que los conjugados de anticuerpos monoclonales anti-rabia pueden tener poca sensibilidad para la detección de varios lyssavirus. Los conjugados de anticuerpos fluorescentes, en concreto los generados a nivel local, deberán validarse por completo respecto a la especificidad y sensibilidad antes de ser utilizados.

La FAT podría aplicarse a muestras conservadas en glicerol después de un paso de lavado. Si la muestra se ha conservado en solución de formalina, solo se puede emplear FAT después de que la muestra se haya tratado con una enzima proteolítica (Warner *et al.*, 1997). No obstante, con muestras fijadas con formalina y digeridas, la FAT siempre resulta menos fiable y más lenta que cuando se realiza con muestras frescas (Barrat, 1992).

En los casos de resultados de FAT inconcluyentes, o en todos los casos de exposición humana, se recomienda analizar la misma muestra con otras pruebas, o bien repetir la FAT con otras muestras. Esto es especialmente importante cuando se ha confirmado o se sospecha de autólisis de la muestra.

a) **Protocolo analítico**

- 1) Se etiquetan cuatro portaobjetos: dos portas control para frotis de impresión de tejido encefálico control (uno positivo y uno negativo) y dos portas para análisis duplicado de las regiones del encéfalo apropiadas.
- 2) Se preparan frotis de impresión de tejido encefálico control (uno positivo y uno negativo), así como muestras problema, invirtiendo el porta del microscopio y aplicándolo contra el tejido situado sobre papel secante. Se retira el exceso de tejido poniendo en contacto el porta con papel secante limpio. Se trabaja con una única muestra cada vez, empleando papel secante limpio en cada paso y procesando el control positivo en último lugar.
- 3) Se dejan secar los portas al aire.
- 4) Dentro de la cabina de bioseguridad, se colocan todos los portas en una jarra Coplin que contenga acetona fría (–20°C) durante al menos 20 minutos.

- 5) Se retiran los portas de la jarra Coplin y se dejan secar al aire.
- 6) Se prepara conjugado de anticuerpo anti-rabia marcado con FITC siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 7) Se añade conjugado a la dilución de trabajo a los frotis control positivo y negativo y a todos los frotis de las muestras problema, en cantidad suficiente como para cubrir el frotis entero.
- 8) Se colocan los portas en una incubadora a 37°C en una caja húmeda durante 30 minutos (45 minutos como máximo).
- 9) Se retiran los portas y se lavan en PBS 0,1 M a pH 7,2 durante 5 minutos en una jarra Coplin, y después durante 5 minutos más con PBS fresco.
- 10) Se dejan secar los portas al aire.
- 11) Se montan los cubreobjetos sobre los portas empleando una solución de un 50% de glicerol y un 50% de PBS.

b) Resultados

Los portas se leen en un microscopio de fluorescencia capaz de generar excitación a 488 nm (FITC), empleando un filtro de excitación con ventanas de banda de paso estrecha en el espectro azul (475–490 nm). Este último filtro reduce la excitación a longitudes de onda situadas fuera de este rango. En cada impresión se comprueba si presenta fluorescencia específica del virus de la rabia (lo cual indicaría la presencia del antígeno vírico) a un aumento de 200x o superior. La fluorescencia específica se denota por una fluorescencia verde “manzana” llamativa, en general en la zona perinuclear de las células, o en neuronas filiformes más largas. Los gránulos auto-fluorescentes de color verde o rojo/verde mate no deben contarse como positivos para antígeno. Siempre debe leerse el control positivo en primer lugar.

Se leen los portas de la muestra. Se examinan las muestras de tejido cuidadosamente, si es necesario volviendo al control positivo para compararlas.

Un segundo técnico deberá examinar todos los portas, y los diagnósticos de ambos técnicos deberán coincidir.

ii) Inmunohistoquímica directa rápida (dRIT)

La dRIT puede utilizarse como alternativa a la FAT en el diagnóstico de rutina de la rabia porque tiene una sensibilidad y una especificidad similares (Lembo *et al.*, 2006). El principio es similar al de la FAT excepto porque en la dRIT se utiliza la tinción estreptavidina-biotina peroxidasa (Coetzer *et al.*, 2014; Madhusudana *et al.*, 2012; Rupprecht *et al.*, 2014). Esta prueba se puede utilizar en laboratorios que no tengan acceso a un microscopio de fluorescencia. Los anticuerpos primarios deberán estar totalmente validados en cuanto a especificidad y sensibilidad antes de ser utilizados, teniendo en cuenta la diversidad regional de lyssavirus.

a) Protocolo analítico

- 1) Se preparan impresiones de contacto a partir de los tejidos del SNC sospechosos (incluyendo tronco encefálico) en portaobjetos de vidrio marcados (siempre debe incluirse un control positivo y uno negativo que sean estándar).
- 2) Se secan los portas al aire durante unos 5 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Los portas se sumergen en formalina tamponada al 10% a temperatura ambiente durante 10 minutos en una jarra Coplin u otro recipiente adecuado.
- 4) Los portas se mojan-enjuagan varias veces para eliminar el exceso de fijador en tampón de lavado (PBS más Tween 80 al 1% – TPBS).
- 5) Los portas se sumergen en peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos.
- 6) Se retira el exceso de peróxido de hidrógeno mojando-enjuagando los portas en TPBS. Los portas se transfieren a otro enjuague con TPBS. Se trabaja con un solo porta a la vez (se deja el resto sumergido en TPBS), se retira el porta, se agita para eliminar el exceso de tampón, y elimina el exceso de tampón secando los bordes de la impresión tisular con papel absorbente.

- 7) Se añade suficiente conjugado de anticuerpo primario (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales anti-nucleoproteína biotinilados) para cubrir la impresión. Se incuba durante 10 minutos en una “cámara húmeda”. Ello puede lograrse colocando los portas sobre papel de cocina humedecido con la tapa de plástico de una placa de cultivo celular u otra cobertura sencilla.
- 8) Tras la incubación, se sacude el exceso de conjugado. Los portas se mojan-enjuagan con TPBS. Se sacude el exceso de TPBS y el tampón se seca aplicando papel absorbente a los bordes de la impresión.
- 9) Se trata cada uno de los portas con complejo estreptavidina-peroxidasa, añadiendo suficiente reactivo al porta como para cubrir la impresión. Se incuba en la cámara húmeda a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras la incubación, se sacude el exceso.
- 10) Se mojan-enjuagan los portas con TPBS. Se sacude el exceso de tampón, y se seca aplicando papel absorbente a los bordes de la impresión.
- 11) Se incuban los portas con el sustrato amino-etilcarbizol (AEC) (téngase en cuenta que pueden utilizarse otros cromógenos). Para preparar la solución primaria de AEC, se disuelve un comprimido de 20 mg de 3-amino 9-etil carbizol en 5 ml de N,N, dimetil formamida en un vial o jarra de vidrio. La solución primaria de AEC debe conservarse a 4°C durante ~ 1–2 meses. Para preparar la solución de trabajo de AEC, se añaden 7 ml de tampón acetato a un tubo de centrifuga de 15 ml empleando una pipeta de plástico de 10 ml. Se añaden 0,5 ml de la solución primaria de AEC (arriba) empleando una pipeta Pyrex o de vidrio de 1 ml. Se añaden 75 µl de peróxido de hidrógeno al 3%. Se filtra a través de un filtro de nylon (0,45 µm) a otro tubo de 15 ml. Una vez preparada, esta mezcla solo será estable durante 2–3 horas, de tal forma que debe prepararse justo antes de ser utilizada. Se añade suficiente cantidad de este reactivo al porta para cubrir la impresión, y se incuba en la cámara de humedad a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras la incubación, se sacude el exceso de sustrato.
- 12) Los portas se mojan-enjuagan en agua destilada.
- 13) Se les aplica una contratinción con hematoxilina diluida durante 2 minutos.
- 14) Inmediatamente después, se tiñen los portas procedentes de agua desionizada/destilada mojándolos-enjuagándolos. Se lleva a cabo un segundo mojado-enjuague de los portas con agua desionizada/destilada limpia para asegurar que se elimina el exceso de tinción.
- 15) Los portas se transfieren a agua destilada limpia. Trabajando con un solo porta cada vez, se sacude el exceso de agua desionizada/destilada, se seca el exceso tocando los bordes de la impresión con papel secante, se aplica medio de montaje hidrosoluble y se coloca el cubreobjetos. No se debe permitir que los portas se sequen al aire antes de aplicar el cubreobjetos. Si se tiñen varios portas, se pueden dejar en el enjuague con agua desionizada/destilada antes de aplicar el cubreobjetos.
- 16) Los portas se observan con microscopio óptico utilizando un objetivo de 20x para examinar a fondo todo el campo, y uno de 40x para una inspección más detallada. Los antígenos de los lyssavirus son inclusiones rojizas intracitoplasmáticas sobre un fondo neuronal azul, y pueden observarse empleando una contratinción de AEC y hematoxilina.

iii) Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Existe un ELISA que detecta antígeno del virus de la rabia y que es una variación de la prueba inmunoquímica. Es fundamental en los estudios epidemiológicos a gran escala (Xu *et al.*, 2007). Antes de utilizar estas pruebas, debe comprobarse su especificidad y sensibilidad para las variantes víricas predominantes a nivel local. En caso de contacto humano, estas pruebas deben utilizarse en combinación con otras pruebas de diagnóstico.

1.3.2. Aislamiento del virus

Estas pruebas detectan el virus de la rabia viable (en replicación) a partir de muestras en cultivos celulares o animales de laboratorio. Deben emplearse como pruebas de confirmación si la FAT, la dRIT u otras pruebas de detección de antígeno o la PCR dan resultados inciertos. Siempre que sea posible, el aislamiento del virus en un cultivo celular debe considerarse

preferible a la prueba de la inoculación en ratón (PIR). Los cultivos celulares son tan sensibles como la PIR (Robardet *et al.*, 2011; Rudd & Trimarchi, 1989) pero más baratos, dan resultados en menor tiempo y evitan la utilización de animales. Para el aislamiento del virus a partir de muestras durante el diagnóstico de rutina de la rabia, el uso de técnicas de cultivo celular para el aislamiento del virus de la rabia siempre debe prevalecer sobre el uso de PIR.

i) Prueba de cultivos celulares

Las células de neuroblastoma, como las células Neuro-2a, CCL-131 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) son muy susceptibles a la infección por lyssavirus. Las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un 5% de suero fetal bovino (SFB) y se incuban a 37°C con un 0,5% o un 5% de CO₂, dependiendo del recipiente de cultivo que se utilice. Las pruebas de cultivo celular se pueden llevar a cabo en placas de plástico multi-pocillo, portaobjetos de vidrio multi-cámara o cubreobjetos de vidrio. Podría considerarse la posibilidad de realizar más pases, incluyendo el uso de frascos T25, para aumentar la sensibilidad; normalmente, para confirmar un resultado negativo deben llevarse a cabo tres pases consecutivos. La citotoxicidad es un factor limitante de la robustez de la prueba que se observa con frecuencia. Las técnicas que se proponen para reducir la citotoxicidad son añadir antibióticos, reducir el tiempo de incubación antes de cambiar los medios (incluso apenas 35 minutos) y diluir las muestras. Las pruebas de cultivo celular y sus variaciones deben validarse por completo antes de ser utilizadas.

a) Protocolo para placa de 96 pocillos

- 1) Se añaden 100 µl de homogenado de encéfalo clarificado (en PBS 0,1 M al 20% p/v, pH 7,4) a 200 µl de una suspensión de 2×10^5 células/ml, recién preparada a partir de un recipiente sub-confluyente en cuatro de los 96 pocillos de una placa.
- 2) Tras 24 horas de incubación al 5% de CO₂ y a 37°C, se retira el sobrenadante de cada pocillo y se añaden 200 µl de medio fresco a cada pocillo.
- 3) Pasadas 72 horas más de incubación, se retira el sobrenadante mediante una pipeta y se guarda para posteriores pases por si es necesario.
- 4) Las células se fijan con acetona al 80% y se tiñen a 37°C durante 30 minutos con anticuerpos fluorescentes según las recomendaciones de la casa comercial.

Las variaciones incluyen una reducción del tiempo de incubación antes del cambio de medio para reducir la toxicidad celular, la utilización de agentes de permeabilidad celular (como por ejemplo DEAE-dextrano), y un aumento del número de pases. Para aumentar la sensibilidad se puede considerar la posibilidad de realizar hasta tres pases.

b) Protocolo para la utilización en portas de 8 cámaras

- 1) Se añaden 50 µl de homogenado de encéfalo clarificado (20% en un sustrato triturador preparado con PBS 0,1 M, pH 7,4, con suero de ternero neonato inactivado por calor) a 400 µl de una suspensión de 10^5 células/ml, recién preparada a partir de un recipiente sub-confluyente.
- 2) Tras 24 horas de incubación al 5% de CO₂ y a 37°C, se retira el sobrenadante de cada cámara y se añaden 400 µl de medio fresco a cada cámara.
- 3) Pasadas 24 horas más de incubación (o más) se retira el sobrenadante, se retira la estructura de la cámara, se seca la capa celular y se fija con acetona fría pura de grado alto al 80%.
- 4) A continuación, la capa celular fijada se tiñe con anticuerpos fluorescentes a 37°C durante 30 minutos según los procedimientos del laboratorio.

c) Protocolo alternativo

- 1) 500 µl de homogenado de encéfalo clarificado (al 20% [p/v] en medio de crecimiento [90% de DMEM, 1,0% de suero fetal bovino (FBS) y 2% de antibióticos] centrifugados a aproximadamente 700 *g* durante 10 minutos) y se mezclan con 500 µl de una suspensión de trabajo DEAE-dextrano de 2×10^6 células/ml acabada de preparar a partir de un frasco subconfluyente (0,2 ml de solución primaria Dextran en 25 ml de DMEM). La solución primaria Dextran consiste en 0,50 g de DEAE-dextrano disueltos en 100 ml de PBS [Hanks], con filtración esterilizante.

- 2) Tras la incubación de 30 minutos a un 5% de CO₂ y 37°C (se agita la suspensión celular cuidadosamente dos o tres veces durante el periodo de incubación), la suspensión celular se centrifuga suavemente y el precipitado celular se resuspende en 10 ml de DMEM nuevo.
- 3) Se ponen 8 ml de la suspensión celular en un frasco de cultivo tisular (T25) y 2 ml en una placa de 6 o 24 pocillos o una placa de petri (35/10 mm) para realizar un seguimiento de la infección mediante FAT.
- 4) Tras 3–4 días más de incubación, mediante pipeta se retira el sobrenadante de la placa y se desecha, y queda intacto el frasco T25.
- 5) La placa de seguimiento se fija en acetona al 80%, a continuación se tiñe con anticuerpos fluorescentes según los procedimientos del laboratorio y se observa en un microscopio de fluorescencia inversa.
- 6) Si la placa de seguimiento es negativa, se tripsinizan células del frasco T25, se diluyen a una proporción de 1:2 a 1:4 en DMEM y la suspensión celular se pone en un frasco de cultivo tisular (8 ml) y en una placa de 6 o 24 pocillos o una placa de petri (2 ml).
- 7) Se repiten los pasos 4-6. Para confirmar un resultado negativo, Se llevan a cabo tres pases consecutivos.

Aunque los protocolos (a) y (b) anteriores solo permiten el pase consecutivo del sobrenadante, el sistema de pases del protocolo (c) se basa en la dilución de la monocapa celular potencialmente infectada, facilitando así el aislamiento del virus en muestras de carga vírica baja.

ii) Prueba de inoculación en ratón (PIR)

Se anestesian e inoculan por vía intracerebral de tres a diez ratones de 3–4 semanas (12–14 g), o una camada de ratones recién nacidos de 2 días. El inóculo (0,01 ml en el caso de los ratones neonatos o hasta 0,03 ml en el caso de ratones de más edad) es el sobrenadante clarificado de un homogenado de material encefálico al 10–20% (p/v) que incluye el tronco encefálico (p.ej., corteza, pie del hipocampo, tálamo, bulbo raquídeo) en una solución isotónica tamponada que contenga antibióticos. Para la inoculación, los ratones deben anestesiarse. Los ratones se observan diariamente durante 28 días, y en cada ratón muerto se determina si presenta rabia, mediante FAT o dRIT. Para resultados más rápidos con ratones recién nacidos, es posible analizar un ratón neonato a los 5, 7, 9 y 11 días post-inoculación. Cualquier muerte durante los 4 primeros días se considera inespecífica (debida al estrés, las infecciones bacterianas, etc.).

Una vez exista en el laboratorio una unidad de cultivo celular validada y fiable, debe considerarse la posibilidad de sustituir la prueba de la inoculación en ratón (PIR) por el cultivo celular siempre que sea posible, puesto que la segunda evita la utilización de animales vivos, es menos cara y proporciona resultados con mayor rapidez. Sin embargo, las ventajas de la PIR son que, cuando la prueba es positiva, puede aislarse una gran cantidad de virus a partir del encéfalo de un solo ratón con el fin de identificar la cepa, y que puede aplicarse de forma fácil y práctica en situaciones en que no se dispone de los conocimientos y los medios para realizar otras pruebas (como el cultivo celular).

1.3.3. Identificación histológica de lesiones celulares características

Los corpúsculos de Negri se corresponden con agregados de proteínas víricas, pero las técnicas clásicas de tinción solo detectan una afinidad de estas estructuras por colorantes acidófilos. Las técnicas para la tinción de cortes de tejidos encefálicos incluidos en parafina (como la técnica de Mann) son lentas, menos sensibles y más caras que la FAT y la dRIT. El método de Seller en frotis de tejido no fijado tiene una sensibilidad muy baja y solo es adecuado para muestras perfectamente frescas. Estos métodos ya no se recomiendan para el diagnóstico sistemático.

1.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las PCR son pruebas sensibles para la detección de ácido ribonucleico (ARN) derivado de lyssavirus en muestras sospechosas, con la ventaja de que no requieren la presencia del virus vivo.

Las PCR que van dirigidas al gen vírico proximal 3' se consideran las más sensibles, puesto que el ciclo de replicación de los lyssavirus dicta que el gen N que codifica la nucleoproteína

vírica se transcribe principalmente con un gradiente transcripcional que tiene lugar en genes de sentido 3' a 5'.

Las PCR deben cumplir las Normas de la OIE respecto a la validación (véase el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*) y deben permitir detectar un amplio espectro de cepas del virus de la rabia en circulación a nivel mundial. Existen varios métodos de extracción del ARN (manual, columna convencional comercial o métodos de extracción del ARN rápidos basados en perlas magnéticas), que pueden diferir en cuanto a sensibilidad.

Las PCR que se ha comprobado que cumplen las normas de la OIE (Capítulo 1.1.6) habrán mostrado una sensibilidad y una especificidad similares a las de la FAT o la DRIT, y teóricamente permiten detectar todos los lyssavirus conocidos y pueden utilizarse como alternativa a la FAT o la DRIT para el diagnóstico de rutina de la rabia. Las PCR que se emplean como método de diagnóstico principal deben llevarse a cabo a partir de una muestra compuesta de tejido encefálico que incluya tronco encefálico y cerebelo, como se ha explicado en la Sección B.1.1. Las PCR que tienen poca sensibilidad y especificidad o que no permiten detectar todos los lyssavirus, deben tenerse en cuenta para el diagnóstico confirmativo en los casos en los que las pruebas principales den resultados indeterminados.

Se describen dos métodos de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para la detección de ARN de lyssavirus en muestras clínicas. El primero es un ensayo de RT-PCR semi-anidado para cualquier especie de lyssavirus convencional (basado en gel) (hnRT-PCR). El segundo es un ensayo de RT-PCR para cualquier especie de lyssavirus en tiempo real (basado en una tinción de ADN fluorescente). Las principales ventajas del ensayo hnRT-PCR incluyen la aplicabilidad a laboratorios que solo tienen un aparato de PCR convencional y la capacidad de obtener datos genéticos a partir de los amplicones generados. Las ventajas del ensayo basado en la tinción con ADN fluorescente incluyen una mayor sensibilidad con respecto al ensayo convencional y un tiempo de respuesta significativamente reducido. Ambos ensayos se basan en un método de un solo paso, que reduce los riesgos de contaminación y durante la manipulación. El ensayo basado en la tinción de ADN fluorescente es aproximadamente un logaritmo más sensible que la RT-PCR convencional semi-anidada.

Existen numerosas metodologías PCR alternativas para el diagnóstico de la rabia que son aptas para este propósito (por ejemplo, Freuling *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2013; Hayman *et al.*, 2011; Suin *et al.*, 2014; Wadhwa *et al.*, 2017; Wakeley *et al.*, 2005). Es posible que otros ensayos vayan dirigidos a otros genes utilizando distintos cebadores, y también podrían considerarse para su uso cuando se hayan obtenido datos de validación adecuados (véase el capítulo 1.1.6).

i) Técnicas de RT-PCR convencional

El uso de PCR convencional resulta ventajoso para los laboratorios que carecen de plataformas de PCR en tiempo real o que desean obtener datos de secuencias de genes parciales. Se requiere más equipamiento para lograr la resolución electroforética de los amplicones en un gel. Antes de la prueba, el ARN se extrae de muestras biológicas sospechosas utilizando un método validado de extracción de ácido nucleico. El ensayo de RT-PCR de un solo paso combina la transcripción inversa y la primera ronda de PCR en un solo tubo, utilizando una transcriptasa inversa para generar una copia de ADN de cualquier ARN vírico presente, que luego actúa como molde para la ADN polimerasa para amplificar exponencialmente el molde de ADNc. Tiene la ventaja adicional de reducir el tiempo de respuesta del ensayo. El ensayo que se describe a continuación es un ejemplo de una RT-PCR convencional, totalmente validada y reproducible y con una alta sensibilidad y especificidad (modificado de Heaton *et al.*, 1997). Es posible una amplificación de segunda ronda opcional (PCR semi-anidada [hn]) para aumentar la sensibilidad y/o confirmar la especificidad del producto de PCR de la primera ronda.

a) Secuencias del cebador

1) Cebador JW12: 5'-ATG-TAA-CAC-CYC-TAC-AAT-G-3'

7,5 pmol/μl (primera ronda)

3,5 pmol/μl (segunda ronda)

- 2) Cebador JW6UNI: 5'-CAR-TTV-GCR-CAC-ATY-TTR-TG-3'
7,5 pmol/μl (primera ronda)
- 3) Cebador JW10UNI: 5'-GTC-ATY-ARW-GTR-TGR-TGY-TC-3'
3,5 pmol/μl (segunda ronda)

b) Procedimiento analítico

Cada prueba debe contener muestras de tejido de control positivo (PC) y negativo (NC), así como un control sin molde (NTC), que se ejecutan junto con las muestras problema.

Primera ronda de la RT-PCR de un paso (OS)(JW6UNI/12)

En sala limpia:

- 1) Se limpia la mesa con un desinfectante apropiado antes de usar o se prepara la estación de trabajo para la PCR. Para prepararlo, se abren las puertas de la estación de trabajo para la PCR y se limpia la superficie de la cabina con un desinfectante apropiado. Se coloca un balde de hielo y una pipeta y puntas adecuadas dentro de la estación y se cierran las puertas. Se enciende la luz UV durante 10 minutos.
- 2) Se obtienen los reactivos de la prueba requeridos. Se asegura que la mezcla de enzimas se mantiene en hielo. Los reactivos restantes se pueden descongelar a temperatura ambiente.
- 3) Se pone el número requerido de tubos de 0,2 ml en una rejilla y se identifican claramente con los datos de la muestra, indicando que esta es la primera ronda de la reacción. Se incluye PC, NC y NTC.
- 4) Se prepara una mezcla primaria de reacción JW6UNI/JW12 del siguiente modo:

Mezcla primaria JW6UNI/12 para primera ronda

Reactivo	Volumen para la reacción (μl)
Agua de grado molecular	29,0
Tampón 5x	10,0
dNTPs (10 mM)	2,0
JW12 (7,5 pmol/μl)	3,0
JW6UNI (7,5 pmol/μl)	3,0
Mezcla enzimática	2,0
Total	49

Se mantienen todos los reactivos en hielo, se descongelan y se someten a vortex antes de usar. Se tiene en cuenta la variación derivada del pipeteado preparando un volumen de mezcla primaria a una reacción mayor a la requerida.

- 5) Se somete enérgicamente a vórtex la mezcla primaria, se centrifuga y se distribuyen 49 μl en cada uno de los tubos de 0,2 ml. Se cierran las tapas
- 6) Se transfieren los tubos sellados al bloque de hielo/enfriamiento de la sala de moldes en una bandeja. Una vez que se ha retirado una bandeja, no debe devolverse a la sala limpia sin una previa descontaminación con un desinfectante adecuado.

Sala de moldes – adición del molde

- 1) Se limpia la mesa con un desinfectante apropiado antes de usar.
- 2) Se descongelan las muestras y el ARN control (controles positivo y negativo) sobre hielo.

- 3) Se añade 1 µl de ARN problema (cuando sea posible a una concentración de 1 µg/µl en el caso de las muestras extraídas) por debajo de la superficie de su tubo de mezcla primaria asignado y se mezcla suavemente. Se desecha la punta directamente en el desinfectante después de su uso. Se repite este proceso hasta que todas las muestras y controles se hayan agregado a sus tubos asignados
- 4) Se presionan las tapas hacia abajo con la mano y se sellan firmemente.
- 5) Se transfieren los tubos sellados a la máquina de PCR y se realiza el ciclo como se detalla a continuación: La validación interna de los parámetros de ciclado es esencial para garantizar la optimización de las máquinas de PCR locales.

Parámetros de ciclado para la primera ronda de la RT-PCR semi-anidada:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50°C	30 minutos	1
95°C	15 minutos	1
94°C 45°C 50°C 72°C	30 segundos 45 segundos 15 segundos 1 minuto	45
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	n/a

Una vez completa, los amplicones resultantes se pueden visualizar en un gel de agarosa al 1,5-2% usando técnicas de electroforesis en gel estándar y escalas de ADN marcadoras adecuadas para asegurar que se haya generado el amplicón de tamaño apropiado en las muestras de control positivo (para comparación con muestras problema). Se debe agregar una sustancia química adecuada para la detección de ADN al gel y una caja de luz ultravioleta para visualizar los productos.

Segunda ronda de la RT-PCR (JW10/12)

Cuando no se genera un amplicón en la reacción de la primera ronda, se debe realizar una segunda ronda de reacción semi-anidada.

En sala limpia:

- 1) Se prepara la estación de trabajo PCR como se describe en la Sección B.1.3.4.i.c.1.
- 2) Se obtienen los reactivos necesarios. Se asegura que la mezcla de enzimas se mantenga en hielo. Los reactivos restantes se pueden descongelar a temperatura ambiente.
- 3) Se coloca la cantidad requerida de tubos de 0,2 ml en una rejilla y se identifican claramente con los datos de la muestra, indicando que esta es la reacción de la segunda ronda etiquetándola con '10 / 12' o '2'. Se etiqueta el negativo de PCR como '-2' o 'NC2' y el control sin molde como 'NTC2'. Este control negativo adicional debe incluirse en cada ejecución de PCR de segunda ronda para confirmar que la mezcla primaria no está contaminada.
- 4) Se prepara una mezcla primaria de reacción JW10UNI/JW12 del siguiente modo:

Mezcla primaria de reacción JW10UNI/12

Reactivo	Volumen para reacción (µl)
Agua de grado molecular	22,0
Polimerasa Taq de alta fidelidad (2x)	25,0
JW12 (3,5 pmol/µl)	1,0
JW10UNI (3,5 pmol/µl)	1,0
Total	49

- 5) Se descongelan y agitan con vórtex todos los reactivos antes de usar. Se tiene en cuenta la variación derivada del pipeteado preparando un volumen de mezcla primaria al menos una reacción mayor a la requerida.
- 6) La mezcla primaria se agita enérgicamente en vórtex, se centrifuga a 700 **g** y se distribuyen 49 µl en cada uno de los tubos de 0,2 ml. Se sellan los tubos.
- 7) Se transfieren los tubos sellados a la sala de moldes en una bandeja desechable. Una vez que se ha retirado una bandeja, no debe devolverse a la sala limpia sin una descontaminación adecuada.

Sala de moldes – adición del molde:

- 1) Para reducir la contaminación cruzada, la plantilla se puede agregar dentro de una estación de trabajo de PCR.
- 2) Para prepararla, se abren las puertas de la estación de trabajo de PCR y se limpia la superficie de la cabina con un desinfectante apropiado. Se coloca un cubo de hielo, una pipeta y puntas adecuadas dentro de la estación y se cierran las puertas. Se enciende la luz UV durante 10 minutos.
- 3) Se agrega 1 µl de producto de PCR de primera ronda sin diluir por debajo de la superficie de la mezcla primaria de segunda ronda preparada para minimizar los aerosoles y se mezcla suavemente. Se desecha la punta directamente en un desinfectante apropiado después de su uso. Se asegura que la tapa del tubo de PCR esté sellada firmemente. Se repite este paso hasta que se hayan añadido todos los productos de PCR de la primera ronda y el PC, NC y NTC a los tubos de mezcla primaria de segunda ronda asignados. Se cambian los guantes regularmente y en los puntos adecuados para evitar la contaminación cruzada.
- 4) Si se usa la estación de trabajo de PCR, se retiran las muestras y los suministros y se enciende la luz UV durante 10 minutos.
- 5) Se ejecuta la PCR utilizando los siguientes parámetros de ciclado de segunda ronda. La validación interna de los parámetros de ciclado es esencial para garantizar la optimización de las máquinas de PCR locales.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	15 minutos	1
94°C 45°C 50°C 72°C	30 segundos 10 segundos 15 segundos 1 minuto	35
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	n/a

Se analizan las reacciones de amplificación por electroforesis en geles de agarosa usando una escala de ADN apropiada.

ii) Técnicas de RT-PCR en tiempo real

Cuando las capacidades lo permiten, las plataformas de PCR en tiempo real permiten una evaluación más rápida de la presencia o ausencia de ARN de lyssavirus en muestras sospechosas. El procedimiento detallado aquí es un ejemplo que usa el mismo cebador directo que el ensayo de RT-PCR convencional descrito en Heaton *et al.*, 1997. El uso de un kit universal de RT-PCR de un paso que usa una tinción de ADN fluorescente para la detección de especies de *Lyssavirus* en muestras clínicas ha demostrado que es altamente sensible y específico para el ARN de lyssavirus. Además, al usar una tinción de ADN fluorescente como sistema de detección, es capaz de detectar todos los lyssavirus basándose en la especificidad del cebador pan-lyssavirus. Este método incluye un ensayo de RT-PCR independiente que contiene una tinción de ADN fluorescente para la amplificación del ARN de mantenimiento que se usa como control interno, que consiste en un ARNm para beta-actina como molde control para la extracción de ARN.

a) **Secuencias del cebador**

- 1) Cebadores específicos pan-lyssavirus (sintetizados a 0,05 µmoles, purificados con HPLC) y diluidos a 20pmol/µl:
 - a) JW12 RT/PCR primer 5'-ATG-TAA-CAC-CYC-TAC-AAT-G-3'
 - b) N165-146 PCR primer 5'-GCA-GGG-TAY-TTR-TAC-TCA-TA-3'
- 2) Cebadores Beta Actina multiespecie (sintetizados a 0,05 µmoles, purificados con HPLC) y diluidos a 20pmol/µl:
 - a) Cebador intronico Beta-Actina BatRat 5'-CGA-TGA-AGA-TCA-AGA-TCA-TTG-3'
 - b) Cebador inverso Beta-Actina BatRat 5'-AAG-CAT-TTG-CGG-TGG-AC-3'

b) **Fiabilidad de la prueba**

La instrumentación y el equipo se monitorean para comprobar si tienen un rendimiento satisfactorio y se calibran una vez al año. Se incluye un PC de ARN de VRAB calibrado en cada prueba y puede analizarse una Beta-actina interna como control de extracción. Se incluye un NC y un NTC en cada prueba para confirmar la ausencia de contaminación. Todas las muestras problema se deben ejecutar al menos por duplicado.

c) **Procedimiento analítico**

Se deben usar guantes y una bata de laboratorio en todo momento.

En sala limpia/cabina de luz UV:

- 1) Se prepara la estación de trabajo PCR como se describe en la Sección B 1.3.4.i.c.1.
- 2) Se obtienen los reactivos necesarios. Se asegura que la mezcla de enzimas se mantenga en hielo, los reactivos restantes se pueden descongelar a temperatura ambiente.
- 3) Se pone el número requerido de tubos de 0,2 ml en una rejilla y se identifican claramente con los datos de la muestra. Se incluyen tubos para PC, NC y NTC.
- 4) Se prepara una mezcla primaria de reacción como se indica a continuación y se mantienen todos los reactivos en hielo. Se tiene en cuenta la variación derivada del pipeteado preparando al menos dos mezclas de reacción adicionales.

Reactivo	Volumen para reacción (µl)
Agua de grado molecular	7,55
Mezcla de reacción universal que contenga una tinción de ADN fluorescente (2x)	10,0
JW12 (20 pmol/µl)	0,6
N165-146 (20 pmol/µl)	1,0
Mezcla enzimática a temperatura ambiente	0,25
Total	19,4

- 5) Se prepara una mezcla primaria de reacción para el ARNm de β -actina que evalúe la calidad en las muestras extraídas del tejido sólido. El ensayo para β -actina debe ser positivo para tener la confianza de que se aisló ARN del material de partida.

Reactivo	Volumen para reacción (μ l)
Agua de grado molecular	7,55
Mezcla de reacción universal que contenga una tinción de ADN fluorescente (2x)	10,0
Intrónico (20 pmol/ μ l)	0,6
Inverso (20 pmol/ μ l)	1,0
Mezcla enzimática a temperatura ambiente	0,25
Total	19,4

- 6) Se agitan en vórtex las mezclas primarias preparadas y se distribuyen alícuotas de 19l a cada uno de los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos o de tiras de 8 pocillos.

Sala de moldes/cabina de luz UV – adición de molde

- 1) Se prepara la estación de trabajo PCR como se describe en la Sección B 1.3.4.i.c.1.
- 2) Se descongelan las muestras y el ARN control sobre hielo.
- 3) Se agregan 2 μ l de ARN problema (cuando sea posible a una concentración de 0,5–1 μ g/ μ l en el caso de las muestras extraídas) debajo de la superficie de su tubo de mezcla primaria asignado y se mezclan suavemente. Se desecha la punta directamente en el desinfectante después de su uso. Se repite este proceso hasta que todas las muestras y controles se hayan agregado a sus tubos asignados.
- 4) Se presionan las tapas hacia abajo con la mano y se sellan firmemente.
- 5) Se transfiere la placa/tiras de PCR a la máquina en tiempo real para el ciclado térmico.

Configuración del ciclador térmico en tiempo real

- 1) Se cargan las muestras en la máquina, asegurando que estén orientadas de la manera correcta. Se asegura que todas las tapas estén firmemente selladas, y luego se cierra la tapa y la puerta de la placa de la máquina. Se configuran los parámetros de ejecución de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 2) Se configura el perfil térmico de la siguiente manera:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50°C	10 minutos	1
95°C	5 minutos	1
95°C 60°C	10 segundos 30 segundos	40
95°C 55°C 55–95°C	1 minutos 1 minuto 10 segundos	80

Los perfiles térmicos pueden estar sujetos a optimización dependiendo de las máquinas de PCR utilizadas.

- 3) En caso de resultado no concluyente, se puede ejecutar un gel de agarosa para confirmar la presencia/ausencia de un amplicón y su tamaño aproximado (100 pb).

1.4. Otras pruebas de identificación

Las pruebas anteriores describen métodos para diagnosticar con exactitud la rabia y para aislar e identificar el virus. La tipificación del virus puede aportar información epidemiológica útil y debe llevarse a cabo en laboratorios especializados (como los Laboratorios de Referencia de la OIE, la OMS o la FAO). Estas técnicas incluirían la utilización de MABs, así como una secuenciación parcial y total del genoma seguida de un análisis filogenético. Estas caracterizaciones permiten distinguir entre los virus vacunales y una cepa natural del virus, y, posiblemente, determinar el origen geográfico de esta última.

2. Pruebas serológicas

La principal aplicación de la serología para la rabia es determinar las respuestas a la vacunación en animales domésticos, particularmente los que son sometidos a viajes internacionales, o para monitorear campañas masivas de vacunación en perros y en especies salvajes que actúan como reservorio. La medición de los anticuerpos antirrabia clásicamente se ha realizado mediante pruebas de neutralización del virus (VN) para detectar anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia. Los enzoinmunoanálisis (ELISA) ahora también se reconocen como pruebas aceptables para detectar anticuerpos de unión. Se observa una correlación fuerte, pero no estricta, entre los niveles de anticuerpos detectados con estos dos métodos. Dependiendo de la naturaleza del ELISA, la sensibilidad y especificidad pueden variar. A diferencia del ELISA, los sueros de baja calidad pueden causar citotoxicidad en las pruebas de NV, lo que podría conducir a falsos positivos. Dependiendo de la finalidad prevista, ambas pruebas son útiles para detectar respuestas a la vacunación si se aplican valores de corte apropiados.

También se han utilizado estudios serológicos para proporcionar información sobre la dinámica de la infección por lyssavirus en murciélagos, aunque todavía debe llevarse a cabo una estandarización del uso de pruebas serológicas en esta especie.

2.1. Prueba de neutralización vírica en cultivo celular: neutralización con anticuerpos fluorescentes (FAVN)

El principio de la neutralización vírica con anticuerpos fluorescentes (FAVN) (Cliquet *et al.*, 1998) es la neutralización *in vitro* de una cantidad constante de virus de la rabia (cepa 'virus estándar de desafío' [CVS-11] adaptada al cultivo celular) antes de inocular células BHK-21 susceptibles al virus de la rabia.

El título del suero es la dilución a la que el 100% del virus resulta neutralizado en el 50% de los pocillos. El título se expresa en UI/ml comparándolo con la dilución neutralizante del suero de la OIE de origen canino en las mismas condiciones experimentales. Para calcular el título en UI/ml de los sueros problema, se puede utilizar el estándar de la OMS² para la inmunoglobulina contra la rabia (humana) n° 2 o un control interno calibrado respecto al control internacional.

En general, el título mínimo de anticuerpos VN neutralizantes medibles que se considera que representa un nivel razonable de seroconversión es de 0,5 UI por ml. Este mismo procedimiento se usa en perros y gatos para confirmar una respuesta adecuada a la vacunación antes del viaje internacional. Sin embargo, en el marco del seguimiento de las campañas de vacunación masivas, un único nivel de seropositividad de corte puede no ser universalmente aplicable entre las diferentes especies (Moore *et al.*, 2017).

En este método en microplaca se utilizan placas de 96 pocillos y es una adaptación de la técnica de Smith *et al.* (1973). La FAVN y la prueba rápida de inhibición de foco fluorescente (RFFIT) dan resultados equivalentes (Cliquet *et al.*, 1998).

2.1.1. Virus y suero estándar de la OIE

Virus: cepa CVS-11 (cuya referencia ATCC previa era VR 959), que está disponible en la ATCC o en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la rabia, en Nancy, Francia (véase la Tabla de la Parte 4 de este Manual Terrestre). Los viales se conservan a -80°C ;

2 Disponible en: *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Reino Unido.

Suero estándar de la OIE de origen canino³ conservado a 4°C y diluido a 0,5 UI/ml con agua estéril desionizada o destilada. Este suero control podría utilizarse para calibrar un control interno que se utilice para la prueba de la FAVN.

Suero control negativo: Un conjunto de sueros de perros nunca antes expuestos al virus, conservado a –20°C.

2.1.2. Producción de CVS

- i) Cultivo celular: Las células BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio Eagle modificado por Glasgow (GMEM) con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor al 10% y antibióticos, que se utilizan para producir el virus CVS (ATCC VR 959 CVS-11) se tripsinizan durante la fase de crecimiento rápido, es decir, cuando están en la fase exponencial de su crecimiento cinético. Si la confluencia de la capa es completa, debe hacerse un nuevo pase. Las células de la suspensión celular no deben agregarse; se necesitan 2×10^7 células por cada frasco de cultivo de 75 cm². Las células se recogen en un volumen de 20–30 ml en medio de cultivo con 10% de SFB inactivado por calor.
- ii) Infección de las células: Se ajusta la multiplicidad de la infección (número de partículas infecciosas por célula) a entre 0,1 y 0,5. El frasco de vidrio con la suspensión de virus/células se incuba 60 minutos a 35,5–37°C. El contenido del frasco se mueve suavemente cada 10–15 minutos.
- iii) Crecimiento vírico: La suspensión de virus/células se centrifuga a 800–1.000 **g** durante 15 minutos y el precipitado celular se resuspende en medio de cultivo mezclado con un 10% de SFB inactivado por calor. El virus se recoge 2 días después.
- iv) Recolección y conservación: El sobrenadante se centrifuga a 800–1.000 **g** durante 15 minutos a 4°C. Si se han usado varios frascos, se mezclan los distintos sobrenadantes centrifugados, y después se reparten en alícuotas y se congelan a –80°C. El título infectivo del material recogido se establece como mínimo 3 días después de la congelación.

2.1.3. Titulación del virus en DICT₅₀ (dosis infectiva en el 50% de los cultivos tisulares expuestos)

En este método de titulación se utilizan células BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) en placas de microtitulación.

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

- i) El día antes de la titulación se prepara una suspensión celular con 105 células/ml en medio de cultivo con un 10% de SFB inactivado por calor y se distribuye en las placas de microtitulación de 96 pocillos, a razón de 200 µl por pocillo. Se incuban las placas durante 24 horas a 35,5°C –37°C con un 5% de CO₂.
- ii) Se realizan diluciones seriadas en tubos de 5 ml usando como diluyente un medio de cultivo sin SFB. Se preparan diluciones decimales de 10⁻¹ a 10⁻¹² (0,9 ml de diluyente con 0,1 ml de la dilución previa).
- iii) El medio de las placas de titulación se elimina con un sistema aspirante. Se distribuyen en cada pocillo 50 µl de cada dilución del virus. Se usan seis réplicas por cada dilución. A continuación, se incuba la placa de microtitulación durante 1 hora a 35,5°C–37°C con un 5% de CO₂. Después se añaden 200 µl de medio de cultivo, que contenga un 5% de SFB.
- iv) Se incuba en una incubadora humidificada durante 3 días a 35,5°C–37°C en un 5% de CO₂.
- v) Las células se tiñen mediante FAT como se indica más adelante. La lectura es cualitativa, y se consideran positivos los pocillos que presentan fluorescencia. La determinación del título se hace empleando el método gráfico neoprobit o bien la fórmula de Spearman–Kärber (OMS, 1996).
- vi) La titulación de CVS debe realizarse mediante la prueba de la FAVN para establecer la dosis infectiva en DICT₅₀.

3 <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/veterinary-products/reference-reagents/>

2.1.4. Procedimiento analítico

- i) La placa control se utiliza para la titulación de CVS (filas 1 a 4), y se utilizan sueros estándar y suero control negativo. Todas las demás placas se utilizan para los sueros que se van a analizar.
- ii) El medio se añade a los pocillos del siguiente modo: placa control, filas 1 a 4 y pocillos A9 a A12: añadir 150 µl por pocillo; en las otras placas, filas 6 y 12: añadir 200 µl por pocillo; resto de los pocillos: añadir 100 µl.
- iii) Los sueros a analizar se inactivan por calor durante 30 minutos a 56°C. Se añaden 50 µl de cada suero problema sin diluir a cuatro pocillos adyacentes.
- iv) Las diluciones de los sueros se llevan a cabo en las microplacas del siguiente modo:
Suero de la OIE, suero de la OMS, control interno y suero canino de perros nunca antes expuestos al virus: con una pipeta multicanal de 50–200 µl se mezclan los pocillos de la primera dilución aspirando y expeliendo al menos ocho veces, transferir 50 µl de una fila a la siguiente, hasta alcanzar la última. Eliminar 50 µl de la última fila.

Si hay un suero problema en la placa control, ver más abajo el paso de dilución.

Se requiere un mínimo de cuatro diluciones a un tercio.

Sueros problema (todas las placas): como antes, transferir sucesivamente 50 µl de una fila a la siguiente hasta las filas 5 y 11 (dil. $10^{-2,39}$). Con una pipeta multicanal de 5–50 µl, transferir 10 µl de las filas 5 y 11 a las filas 6 y 12, respectivamente (de la dil. $10^{-2,39}$ a la dil. $10^{-4,23}$). Utilizando una pipeta multicanal ajustada a 90 µl, mezclar las filas 6 y 12 y eliminar 180 µl. Luego añadir a estas filas 70 µl de medio. Este paso final no lleva por sí mismo a un alto rendimiento de la prueba. Para alcanzar o superar la dilución final recomendada pueden usarse procedimientos alternativos. Esto puede requerir modificaciones en la distribución de la placa.

2.1.5. Adición del virus estándar de desafío

- i) La solución primaria de CVS se conserva en microtubos de 1 ml a -80°C . Se descongela rápidamente un tubo con agua corriente fría y se coloca en hielo.
- ii) Se prepara una dilución de este tubo para obtener 100 DICT₅₀ en 50 µl. De esta dilución se añaden 50 µl a cada pocillo lleno de suero (ver Figura 1). Para la titulación del virus se añaden 50 µl a los pocillos H1 a H4 (placa control). A continuación, se transfieren 50 µl de fila a fila (placa control, líneas 1–4). Se eliminan 50 µl de la última fila (placa control, pocillos A1 a A4). No se añade virus a los pocillos A9 a A12 de la placa control. El rango adecuado para el título del virus debe estar comprendido entre 30 y 300 DICT₅₀/50 µl.
- iii) Se incuban las microplacas a 35°C – 37°C en una incubadora con humedad y un 5% de CO₂ durante 1 hora.
- iv) Adición de células: Se tripsiniza un cultivo sub-confluyente de células BHK-21. Se resuspenden las células para obtener una suspensión de 4×10^5 células/ml en DMEM suplementado con un 10% de SFB inactivado por calor. Se añaden 50 µl de la suspensión celular a cada pocillo.
- v) Se incuban las microplacas durante 48 horas a 35°C – 37°C en una incubadora con humedad y un 5% de CO₂.

2.1.6. Fijación y tinción

- i) Después del período de 48 horas de incubación, se elimina el medio, y las microplacas se lavan una vez con PBS, pH 7,2, y una vez con acetona al 80%. Luego se fijan con acetona al 80% a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se secan a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.
- ii) A cada pocillo se añaden 50 µl del conjugado de anticuerpos anti-rabia marcado con FITC a la dilución de trabajo, se agitan las microplacas ligeramente y se incuban a 35°C – 37°C durante 30 minutos. Se elimina el conjugado fluorescente y las microplacas se lavan dos veces con PBS. Se elimina el exceso de PBS invirtiendo brevemente las microplacas sobre papel absorbente.

2.1.7. Lectura e interpretación de los resultados

- i) Se observa la superficie total de cada pocillo. La evaluación de la lectura es cualitativa (más o menos): si no hay células fluorescentes, se asigna un signo menos (-) al pocillo; si hay células fluorescentes, (una o más células), se asigna un signo más (+) al pocillo. Se utiliza un microscopio de fluorescencia adecuado para fluorescencia de FITC equipado con un ocular x10 y un objetivo x10. El aumento total del microscopio oscilará entre x100 y x125 debido al aumento adicional de ciertos sistemas de epi-fluorescencia.
- ii) Se leen primero los controles de células y de virus. Para la titulación del suero control negativo y del suero estándar de la OIE, los títulos se calculan por el método de Spearman-Kärber o por el método gráfico neoprobit (OMS, 1996).
- iii) Los resultados de la titulación del CVS (DICT₅₀), del suero de perros nunca antes expuestos al virus (D₅₀ [mediana de la dosis]) y del estándar positivo (D₅₀) se reflejan en una tarjeta de control en cada uno de estos tres casos. Los resultados de la prueba obtenidos con el control actual se comparan con las pruebas realizadas con control en ocasiones anteriores en las que se haya empleado el mismo lote de control. La prueba se valida si los valores obtenidos para los tres controles de la prueba actual no son estadísticamente diferentes de la media (± 2 SD) de los valores obtenidos en las pruebas anteriores según esta técnica.
- iv) El resultado de la prueba corresponde a los virus no neutralizados tras la incubación con el suero de referencia o con el suero problema. Estos títulos se calculan con el método gráfico neoprobit o con la fórmula de Spearman-Kärber (OMS, 1996). La comparación del título medido en los sueros problema con el del suero estándar positivo de la OIE de título neutralizante conocido permite la determinación del título neutralizante de los sueros problema en IU/ml. La conversión a IU/ml se puede hacer usando el valor logD₅₀ del día o el valor medio del suero estándar de la OIE.

2.1.8. Fórmula para convertir el valor logD₅₀ en título de IU/ml:

$$\text{Título del suero (IU/ml)} = \frac{[(10^{(\text{valor log } D_{50} \text{ del suero)}) \times \text{título teórico del suero estándar positivo de la OIE 0,5 IU/ml}]}{(10^{(\text{log } D_{50} \text{ del suero estándar positivo de la OIE 0,5 IU/ml)})}$$

Ejemplo de conversión:

- log D₅₀ del suero = 2,27
- Título teórico del suero estándar positivo de la OIE 0,5 IU/ml = 0,5 IU/ml
- log D₅₀ del suero estándar positivo de la OIE = 1,43

(Para el valor log D₅₀ del suero estándar positivo de la OIE se puede tomar el valor del día o el valor medio)

$$\text{Título del suero (IU/ml)} = \frac{10^{2,27} \times 0,5}{(10^{1,43})} = 3,46 \text{ IU/ml}$$

Se tienen que respetar estrictamente los siguientes parámetros:

- Virus de la rabia: solo debe utilizarse la cepa CVS-11
- Cultivo celular: solo se deben usar células BHK-21 (Número ATCC= CCL 10).
- La prueba FAVN debe realizarse solamente en microplacas de 96 pocillos.
- Se deben emplear listas de control para el virus de la rabia, suero control negativo y suero estándar positivo de origen canino.
- La titulación por retroceso del virus CVS, la del suero control negativo y la del suero estándar positivo de origen canino deben estar presentes en la placa control.
- Se necesita un mínimo de cuatro diluciones de los sueros a un tercio. El método de lectura es solo de 'todo o nada'.
- Deben diluirse cuatro réplicas de cada suero.

- En la conversión del logD₅₀ a UI/ml, los laboratorios deben emplear solamente el valor logD₅₀ del suero estándar positivo de origen canino.

2.2. Prueba de neutralización del virus en cultivo celular: Prueba rápida de inhibición de foco fluorescente (RFFIT)

2.2.1. Preparación de la suspensión del virus inóculo

- Se tripsiniza un cultivo de 3 días de células de neuroblastoma de ratón (MNA) en un frasco de 150 ml. Puede obtenerse una línea celular similar (CCL-131) por petición a la ATCC.
- En un tubo cónico de centrifuga de 50 ml, se resuspenden 3×10^7 células en 2,7 ml de medio mínimo esencial de Eagle suplementado con un 10% de suero fetal bovino (MMEE-10).
- Con procedimientos estándar de seguridad contra la rabia, se añaden 1×10^7 unidades infecciosas del virus de la rabia CVS-11 (cuya referencia ATCC previa era VR959) y se somete al vórtex/se mezcla 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/se mezclan.
- Se añaden 10 ml de MMEE-10, se someten al vórtex/se mezclan, y se centrifugan las células a 500 **g** durante 10 minutos.
- Se elimina el sobrenadante. Se resuspenden las células en 30 ml de medio de cultivo y se transfieren a un frasco de 150 ml.
- 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.
- Se incuban el frasco y los portas a 37°C en una incubadora con humedad con un 0,5% de dióxido de carbono (CO₂). El frasco debe incubarse como cultivo cerrado (debe ajustarse el tapón).
- A las 20, 40 y 64 horas de la infección, se fija con acetona y se tiñe un porta por la técnica de inmunofluorescencia para determinar la infectividad vírica. Veinticuatro horas después de que las células muestren un 100% de infectividad (generalmente a las 40 horas de la infección), debe recogerse el sobrenadante.
- Se transfiere el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifuga a 4.000 **g** durante 10 minutos.
- Se distribuye el sobrenadante en alícuotas de 0,5 ml y se conserva a –70°C.

2.2.2. Titulación de la suspensión vírica del inóculo

- Se descongela una alícuota del virus del inóculo y se preparan diluciones decimales seriadas (de 10⁻¹ a 10⁻⁸) en MMEE-10.
- Se distribuyen 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 MMEE-10 (concentración de 5×10^4 células por 0,2 ml).
- Se mezclan las células y el virus moviendo suavemente el porta y se después se incuban durante 40 horas a 37°C en una incubadora con humedad y un 0,5% de CO₂.
- Se fija con acetona y se tiñe el porta por la técnica de inmunofluorescencia. Se debe observar la infección vírica con la dilución 10⁻⁶ del virus, lo que indica que la suspensión primaria de virus contiene al menos 1×10^6 unidades infecciosas por 0,1 ml. Es preciso preparar suficiente virus de inóculo para que no sean necesarios frecuentes pases seriados del virus.

2.2.3. Preparación de la suspensión primaria del virus

- Se infectan 3×10^7 células MNA con 1×10^7 unidades infecciosas de la suspensión vírica del inóculo (véase más arriba).
- Se recoge el sobrenadante 24 después de que las células alcancen el 100% de infectividad (generalmente a las 40 horas de la infección).
- Se distribuye y conserva el sobrenadante a –70°C en alícuotas de 0,5 ml.

2.2.4. Titulación de la suspensión primaria del virus

- i) Se descongela una alícuota del virus de inóculo y se utiliza para preparar diluciones decimales seriadas (de 10^{-1} a 10^{-6}) en MMEE-10.
- ii) Se distribuyen 0,1 ml de cada dilución de virus en un pocillo de un porta con cámara para cultivo de tejidos con ocho pocillos. Se añaden a cada pocillo 0,2 ml de células MNA suspendidas en MMEE-10 (concentración de 1×10^5 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 un 0,5% de CO_2 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 de ocho pocillos contiene 25–50 campos microscópicos distintos cuando se observan a $\times 160$ – 200 aumentos, o 20 campos microscópicos distintos cuando se observa a $\times 100$ aumentos. Una unidad de virus para 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, FFD₅₀). La suspensión primaria del virus debe contener al menos 1×10^4 FFD₅₀ 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). Por ejemplo, una suspensión primaria del virus con este título (1×10^4 FFD₅₀ por 0,1 ml) se puede diluir luego a $10^{-2,3}$ para obtener una suspensión de virus que contenga 50 FFD₅₀. Para calcular la dilución de trabajo, se resta el log de 50 (1,7) del logaritmo de la dosis vírica (en el ejemplo de arriba, $4,0 - 1,7 - 2,3$).

2.2.5. Sueros de referencia

En cada prueba debe incluirse un suero estándar de referencia nacional o internacional conocido ((OMS⁴, OIE⁵) diluido a una potencia de 2,0 UI/ml. El suero de referencia debe mantenerse en alícuotas congeladas en una cantidad suficiente para 1 semana de pruebas. El laboratorio también debe preparar e incluir en cada prueba un suero control estándar positivo diluido a una potencia de 0,5 UI/ml y un suero control estándar negativo diluido a una potencia de $<0,1$ IU/ml.

2.2.6. 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 a 1/5 directamente en una cámara de cultivo tisular de ocho pocillos o en una placa de 96 pocillos y transferirse a los pocillos del porta con cámara. La RFFIT se puede llevar a cabo como prueba de cribado empleando 2 diluciones o como prueba de punto final empleando 4 diluciones. Es suficiente con cribar diluciones a 1/5 y 1/50 para una evaluación sistemática de la eficacia vacunal. El análisis a punto final en general se realiza empleando diluciones de 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625.

Para la prueba de cribado:

- 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 MMEE-10. Se mezcla mediante una agitación suave del porta.
- ii) Se transfieren 0,05 ml de la dilución 1/2,5 a un segundo pocillo que contenga 0,45 ml de MMEE-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.

Para la prueba a punto final:

- 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 MMEE-10. Se mezcla mediante una agitación suave del porta.
- ii) Se transfieren 0,05 ml de la dilución 1/2,5 a un segundo pocillo que contenga 0,2 ml de MMEE-10. Se desecha todo excepto 0,1 ml del pocillo que contiene la dilución 1/2,5 (primer pocillo).

4 Disponible en: *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Reino Unido.

5 <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/veterinary-products/reference-reagents/>

- iii) Se transfieren 0,05 ml de la dilución 1/2,5 a un tercer pocillo que contenga 0,2 ml de MMEE-10. Se desecha todo excepto 0,1 ml del pocillo que contiene la dilución 1/5 (segundo pocillo).
- iv) Se transfieren 0,05 ml de la dilución 1/2,5 a un cuarto pocillo que contenga 0,2 ml de MMEE-10. Se desecha todo excepto 0,1 ml del pocillo que contiene la dilución 1/25 (tercer pocillo).
- v) Se mezcla el cuarto pocillo que contiene la dilución 1/125 y se desecha todo menos 0,1 ml.

2.2.7. Adición de virus

- i) Se añade 0,1 ml de la preparación del virus de desafío (dilución de trabajo) a todas las diluciones de suero.
- ii) Se prepara una titulación inversa 1/10 y 1/100 de la dilución de trabajo del virus de desafío y se añade 0,1 ml de cada uno a un pocillo del portaobjetos.
- iii) Se mezcla e incuba a 37°C en una incubadora humidificada con 0,5% de CO₂ durante 90 minutos.

2.2.8. Adición de células

- i) Durante el período de incubación, se tripsiniza un cultivo madre de 3–5 días de células MNA.
- ii) Se resuspenden las células en MMEE-10 a una concentración final de 1×10^5 células por 0,2 ml.
- iii) Se distribuyen 0,2 ml de la suspensión celular en cada pocillo del porta y se incuba a 35°C en una incubadora humidificada y un 0,5% de CO₂ durante 20 horas.

2.2.9. 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 virucida.
- ii) Se lavan los portas una vez con PBS y luego se fijan con acetona fría (–20°C) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Nota: si se usan portas de plástico, debe utilizarse acetona fría al 80%.
- iii) Se dejan secar los portas durante 10–30 minutos antes de añadir el suero conjugado antirrábico marcado con FITC. El conjugado se puede preparar en MMEE-10 o PBS; no hay necesidad de adsorber el conjugado con papel ni células. La dilución de trabajo del conjugado debe determinarse por titulación. Los portas se tiñen durante 20–60 minutos a 37°C (el tiempo óptimo se determina por cualificación del conjugado) y después se lavan con PBS y agua destilada, respectivamente.
- iv) Se observan los portas con un microscopio de fluorescencia. Se anota el número de campos (de un total de 20 por pocillo) en los que se observa infección vírica en las células.

2.2.10. Determinación de los títulos de los anticuerpos neutralizantes

Los virus residuales se detectan mediante un microscopio normal de fluorescencia. El título a punto final de neutralización 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. Como alternativa, 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 (OMS, 1996).

Se tienen que respetar estrictamente los siguientes parámetros:

- i) Virus de la rabia: solo debe utilizarse la cepa CVS-11. Virus: Cepa CVS-11 (anterior referencia en ATCC: VR 959), que está disponible en la ATCC o en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Rabia, Nancy, Francia (véase la tabla que figura en la Parte 4 de este Manual Terrestre). Los viales se conservan a -80°C . La titulación por retroceso debe indicar una dosis de 30–100 FFD₅₀.
- ii) Cultivo de células: solo se deben usar células BHK-21 (Número ATCC= CCL 10) o células MNA (Número ATCC= CCL131)
- iii) La prueba debe realizarse solamente en portas con cámaras adecuados.
- iv) Se deben emplear controles para el virus de la rabia, suero no inmune y suero estándar positivo de origen canino.
- v) La titulación por retroceso del virus CVS, así como la del suero no inmune y la del suero estándar positivo de origen canino de referencia la OIE debe estar presente en la placa control.
- vi) Método de lectura de la prueba: cada cámara debe contener 25–50 campos que deben ser observados con aumentos de 160–200x o 20 campos que deben ser observados a x100 aumentos.
- vii) Se convierte el log D₅₀ a UI/ml de los sueros problema empleando el valor D₅₀ del suero estándar conocido diluido a una potencia de 2,0 UI/ml.

2.3. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Los ELISA constituyen una prueba serológica rápida que evita el requisito de manejar el virus de la rabia en vivo. Estas pruebas detectan anticuerpos que pueden unirse específicamente a los antígenos del virus de la rabia, principalmente la glicoproteína y la nucleoproteína del virus de la rabia. Ninguno de los ELISA directos, indirectos o competitivos disponibles está todavía validado para el desplazamiento o comercio internacional de animales (Wasniewski *et al.*, 2014). Sin embargo, los ELISA también son una herramienta útil para monitorear las campañas de vacunación contra la rabia en fauna salvaje siempre que estén debidamente validadas para este propósito. Se ha recomendado un ELISA comercial para controlar las campañas de vacunación contra la rabia en zorros y mapaches (Wasniewski *et al.*, 2016).

3. Garantía de calidad

Se anima mucho a los laboratorios a participar en las pruebas anuales interlaboratoriales de competencia como parte de las actividades destinadas proporcionar una garantía de la calidad; los Laboratorios Nacionales de Referencia deberán organizar dichos ensayos para los Laboratorios Regionales, mientras que los segundos, a su vez, deberían participar en las pruebas de competencia internacionales organizadas por los Laboratorios de Referencia de la OIE. Siempre que sea posible, se debe tener en cuenta la acreditación internacional de los laboratorios (véase el Capítulo 1.1.5 *Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias*).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Revisión de antecedentes

La prevención y control de la rabia suele ser una responsabilidad de nivel nacional y, en muchos países, la vacuna puede utilizarse solo bajo el control de la Autoridad Competente. Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se especifican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices indicadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden complementarse con requisitos de tipo nacional o regional. En cada país o región son aplicables requisitos específicos relativos a la calidad, seguridad y eficacia necesarias para que los fabricantes obtengan la aprobación de una vacuna de uso veterinario por parte de las autoridades reguladora. Siempre que sea posible, los fabricantes deben intentar obtener esta licencia o autorización para sus vacunas contra la rabia como verificación independiente de la calidad de su producto. En todas las etapas del desarrollo y la producción de la vacuna contra la rabia, se deben seguir las normas internacionales y nacionales relativas a la experimentación animal.

Pueden utilizarse virus virulentos de la rabia para producir vacuna inactivada contra la rabia; como consecuencia, las instalaciones en las que se produzcan vacunas contra la rabia deberán trabajar aplicando los procedimientos y prácticas de bioseguridad adecuados. Las instalaciones deberán cumplir los requisitos de contención indicados en el Capítulo 1.1.4 y por la OMS (2005).

Las vacunas contra la rabia se definen como una formulación estandarizada que contiene cantidades definidas de inmunógenos. Estos inmunógenos pueden estar inactivados (muertos), atenuados, o bien pueden derivar de la ingeniería genética, como se describe en el capítulo 1.1.8.

Existen vacunas autorizadas para la vacunación parenteral de animales domésticos y vacunas para uso por vía oral para vacunar a animales salvajes y perros vagabundos. Estas vacunas a menudo se utilizan para usos distintos a los indicados en la ficha técnica.

La vacunación oral contra la rabia (ORV) se ha utilizado con éxito para controlar la enfermedad en ciertas especies de reservorios de vida salvaje (Cliquet *et al.*, 2012; Freuling *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a que la rabia humana transmitida por perros es candidata a la erradicación a nivel mundial, el perro debe considerarse un objetivo principal. Los países deben evaluar la necesidad tanto de la ORV en los perros como de vacunación parenteral en su estrategia de control de la rabia. La vacunación parenteral de los perros debe seguir siendo la base de las campañas de vacunación masivas. Además de la vacunación parenteral masiva (llevada a cabo de forma concomitante o secuencial), el uso de la vacunación oral, especialmente en perros vagabundos e inaccesibles, teniendo en cuenta la estructura y accesibilidad de la población canina, debe representar una medida complementaria para la mejora de la cobertura de vacunación en los programas de control de la rabia canina (OMS, 2013). Para la ORV de los perros, se debe usar el modelo de distribución y recuperación.

Debe establecerse una estrategia de vacunación individual o combinada óptima para la vacunación de la fauna salvaje (ORV con o sin sistema de trampa-vacunación-liberación) y de los perros (vacunación en un punto de encuentro, vacunación casa por casa, con o sin ORV) teniendo en cuenta el tamaño de la población de las especies objetivo. Con respecto a la ORV de la fauna salvaje y los perros, los posibles cebo para la vacuna contra el virus de la rabia deberían seleccionarse según los perfiles de eficacia y seguridad. Se debe llevar a cabo un seguimiento de la exposición humana a las vacunas orales del virus de la rabia y una gestión del riesgo. En determinadas circunstancias, la vacunación de otros animales de compañía y del ganado susceptible sería beneficiosa y debería considerarse como parte de cualquier programa nacional de vacunación..

2. La vacuna inyectable contra la rabia

2.1. Antecedentes

El principal motivo de uso de la vacuna inyectable contra la rabia es proteger a los animales y, en consecuencia, al ser humano.

Las vacunas vivas atenuadas se han utilizado mucho de forma inyectada en animales domésticos. No obstante, se ha documentado que varios de estos productos causan rabia inducida por vacuna en los animales vacunados, y que deben dejar de utilizarse mediante inyección (Bellinger *et al.*, 1983; Esh *et al.*, 1982).

Las vacunas vectorizadas obtenidas mediante ingeniería genética que contienen glucoproteína del virus de la rabia se preparan insertando ácido nucleico del virus de la rabia infeccioso que codifica glucoproteína del virus de la rabia en un vector, como por ejemplo el virus de la viruela aviar, para obtener la vacuna inyectable (OMS, 1996). Como estas vacunas no contienen virus vivo de la rabia, en ningún país se debería restringir la entrada de los animales vacunados con tales vacunas (Taylor *et al.*, 1991).

2.2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

2.2.1. Características del inóculo

i) Características biológicas

Cualquier cepa del virus de la rabia que se considere utilizar para la producción de vacuna debe proteger contra todas las variantes del virus de la rabia del filogrupo 1. Teóricamente, los virus del inóculo primario (MSV) deben escogerse en función de la facilidad de crecimiento en cultivo, del rendimiento del virus, de la estabilidad y del espectro antigénico (Wu *et al.*, 2011). Debe mantenerse un registro de la procedencia del MSV.

Las vacunas obtenidas mediante ingeniería genética se preparan en líneas celulares no tumorigénicas adecuadas empleando un vector que exprese la glucoproteína del virus de la rabia.

ii) Criterios de calidad

Solo el MSV que se haya caracterizado como puro y libre de agentes extraños y que se haya demostrado que lo es debe utilizarse para preparar el virus inóculo para la producción de vacuna, en cumplimiento del Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario* y de los indicados por las autoridades reguladoras correspondientes.

La eficacia de la vacuna resultante se evaluará en estudios en los que se utilizarán todas las especies de destino a vacunar, según se recomienda en el Capítulo 1.1.8 y en la Sección C.2.3.3 de este capítulo.

2.2.2. Método de fabricación

i) Procedimientos

a) En cultivo celular

El virus se utiliza para infectar una suspensión o monocapa de una línea celular determinada. Deberá demostrarse que este cultivo celular está libre de microorganismos contaminantes (véase el capítulo 1.1.8).

Los cultivos se infectan con MSV adaptado al cultivo celular, y se incuban a la temperatura adecuada durante un periodo definido. Dado que el virus de la rabia normalmente no causa efecto citopático, ello permite realizar varias recolecciones del mismo cultivo. Este material se procesa y se utiliza para formular la vacuna. En el caso de la vacuna inactivada (muerta), el virus se inactiva añadiendo un inactivante de primer orden, normalmente β -propiolactona (BPL) o etileneimina (EI) en forma de etileneimina binaria (BEI). Es importante que se respeten las precauciones necesarias de seguridad al trabajar con inactivantes. No deben utilizarse otros inactivantes, como la formalina o el ácido fénico. El inactivante se añade a una suspensión del virus para lograr una concentración final predeterminada. La inactivación debe validarse debidamente y documentarse para mostrar la cinética de inactivación y los resultados de los controles de inactivación. El tiempo que dure el tratamiento con el inactivante y la temperatura empleada para la inactivación deberán validarse en función de las condiciones reales aplicadas y del equipo utilizado durante la producción a nivel industrial.

Las vacunas inactivadas contra la rabia suelen formularse para que sea líquidas o liofilizadas. La vacuna líquida se prepara mediante adsorción del antígeno al adyuvante, por ejemplo, gel de hidróxido de aluminio.

ii) Requisitos para los medios y los sustratos

La mezcla final debe incluir antiespumante, tinción rojo fenol (si lo permite el país que requiera la vacuna), hidrolizado de lactoalbúmina, caldo de triptosa fosfato, aminoácidos, vitaminas y sales de tampón. En el caso de vacunas contra la rabia para animales, podrían incorporarse como adyuvantes saponina u otros polisacáridos. En el caso de los viales multidosis se recomienda añadir conservantes. Para inyectar las vacunas liofilizadas, deben reconstituirse con el disolvente adecuado.

a) En células

Las líneas celulares que se utilizan para la producción de vacunas contra el virus de la rabia deben cumplir los requisitos especificados en el capítulo 1.1.8.

b) En huevos embrionados

Este método de cultivo se utiliza para producir vacunas vivas atenuadas que contienen la cepa Flury LEP o la variante HEP. Deben dejar de utilizarse, como se indica en la Sección C.2.1, arriba (Tao *et al.*, 2010; Wachendörfer *et al.*, 1982).

iii) Control durante el proceso

Durante el proceso de producción, se llevan a cabo pruebas en distintos momentos antes de constituir la mezcla final, lo cual permite verificar la constancia de la producción de acuerdo con el capítulo 1.1.8. Las pruebas de infectividad, esterilidad e inactivación son controles fundamentales durante el proceso. La formulación del producto final se puede

estandarizar utilizando otras pruebas para medir la integridad vírica tras el almacenamiento, la masa antigénica y el contenido en glucoproteína.

a) **Prueba de inactivación**

La inactivación se verifica empleando una prueba de virus vivo residual. Para ello, se inocula la recolección inactivada en el mismo tipo de cultivo celular que el utilizado en la producción de la vacuna o un cultivo celular que se haya comprobado que es al menos igual de sensible. La cantidad de virus inactivado recolectado utilizada es equivalente a no menos de 25 dosis de la vacuna. Tras la incubación durante 4 días, se realiza un subcultivo empleando células tripsinizadas; tras la incubación durante 4 días más, se comprueba si los cultivos presentan virus de la rabia vivo residual mediante la prueba de la inmunofluorescencia. La recolección de virus inactivado supera la prueba si no se detecta virus vivo (Farmacopea Europea, 2013a).

iv) **Pruebas en lotes/series de producto final**

Tras combinar todos los ingredientes, la mezcla final contiene la formulación definitiva de la vacuna. El último paso del proceso de producción de un lote/serie es llenar viales con la mezcla final. Este lote/serie final se somete a las pruebas descritas abajo.

a) **Esterilidad**

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se hallan en el capítulo 1.1.9.

b) **Inocuidad**

Muchas autoridades reguladoras no exigen pruebas de inocuidad en las especies de destino para la puesta en circulación de los lotes. Cuando sí se exigen, en general se llevan a cabo procedimientos estándar empleando menos animales que en las pruebas de inocuidad exigidas para la aprobación por parte de la autoridad reguladora correspondiente.

A no ser que se ponga de manifiesto una inocuidad uniforme en todo el producto y que se apruebe en el dossier de registro, y que además se apruebe la uniformidad del proceso de producción de acuerdo con los requisitos estándar indicados en el capítulo 1.1.8, deben realizarse pruebas de inocuidad en cada lote.

Esta prueba de inocuidad en el lote/serie de producto final se lleva a cabo para detectar posibles reacciones adversas locales o sistémicas anómalas. A los efectos de la puesta en circulación del lote/serie, al menos a dos animales de la especie de destino seronegativos y sanos se inocula una dosis doble de la vacuna por la vía recomendada. Estos animales se observan durante al menos 14 días. La vacuna supera la prueba si ningún animal presenta reacciones adversas ni muere por causas atribuibles a la vacuna (Farmacopea Europea, 2012b).

c) **Virus vivo residual**

Esta prueba se lleva a cabo empleando el contenido combinado de cinco recipientes.

En el caso de las vacunas que no contienen adyuvante, se lleva a cabo una prueba de amplificación adecuada de virus vivo residual empleando el mismo tipo de cultivo celular que el usado en la producción de la vacuna o un cultivo celular que se haya comprobado que es al menos igual de sensible. La vacuna supera la prueba si no se detecta virus vivo.

En el caso de las vacunas que contienen adyuvante, se inyectan 0,03 ml de una combinación de al menos cinco veces la dosis mínima establecida, por vía intraencefálica y a no menos de diez ratones, cada uno de los cuales debe pesar de 11 a 15 g. Para evitar la interferencia de cualquier conservante antimicrobiano o del adyuvante, la vacuna puede diluirse más de 10 veces antes de ser inyectada. En este caso, o si la cepa vacunal es patógena solo en ratones lactantes, la prueba se lleva a cabo en ratones de entre 1 y 4 días de vida. Los animales se observan durante 21 días. Si más de dos animales mueren durante las primeras 48 horas, la prueba se repite. La vacuna supera la prueba si, entre el día 3 y 21 post-vacunación, los animales no muestran signos de rabia y la prueba de la inmunofluorescencia

realizada en los encéfalos de los animales no indica la presencia del virus de la rabia.

d) Potencia del lote/serie

En el caso de las vacunas vivas atenuadas y de las vacunas obtenidas mediante ingeniería genética, las titulaciones del virus son indicadores fiables de la potencia de la vacuna una vez se ha establecido una relación entre el nivel de protección conferido por la vacuna en la especie de destino y los títulos de la vacuna viva modificada. La titulación del virus debe llevarse a cabo empleando cultivos celulares. Ello permite a los laboratorios actuar con arreglo a los principios 3R (Comisión Europea, 2010).

La potencia de las vacunas inactivadas se determina en ratones mediante una prueba serológica (Krämer *et al.*, 2010), o una prueba de exposición (Farmacopea Europea, 2013a; OMS, 1996). En el caso de las vacunas con virus inactivado, se ha documentado una prueba de identificación del agente *in-vitro* (Stokes *et al.*, 2012).

No es necesario llevar a cabo las pruebas de potencia descritas en la Sección C.2.2.2.iv.d.1 *Prueba serológica*, y en la Sección C.2.2.2.iv.d.2 *Prueba de exposición*, para cada lote/serie de vacuna que se produzcan, con tal de que al menos una de estas pruebas se haya llevado a cabo en un lote/serie previo de la vacuna y que se haya comprobado que este lote/serie cumple los requisitos de potencia mínima. En estas circunstancias, puede utilizarse un método alternativo validado para establecer la potencia del lote/serie, y los criterios de aceptación se fijarán con respecto al lote/serie de vacuna que haya dado resultados satisfactorios en la prueba serológica o la de exposición, según se describe a continuación:

1) Prueba serológica

La vacuna problema se compara con la vacuna estándar de referencia midiendo las cantidades de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus de la rabia en suero de ratón. La vacuna problema supera la prueba si induce más anticuerpos que la vacuna estándar de referencia. La prueba debe realizarse del siguiente modo:

Se utilizan cinco ratones, cada uno de los cuales debe pesar de 18 a 20 g. Cada ratón se vacuna por vía subcutánea o intramuscular empleando 1/5 del volumen de dosis recomendado. Se toman muestras de sangre 14 días después de la inyección y se analizan los sueros individualmente para determinar si contienen anticuerpos contra la rabia (véase la Sección B.2 y la Farmacopea Europea, 2013a).

La vacuna cumple el requisito si el título de anticuerpos contra la rabia en los ratones vacunados con la vacuna problema es significativamente superior al obtenido con una vacuna de referencia que haya dado resultados satisfactorios en la prueba descrita en la Sección C.2.2.2.iv.d.2 *Prueba de exposición*.

2) Prueba de exposición

La vacuna problema se compara con la vacuna de referencia midiendo la protección que confiere a ratones. La vacuna problema supera la prueba si induce más protección que la vacuna de referencia.

Según la Farmacopea Europea, la prueba descrita abajo emplea un modelo de líneas paralelas con al menos 3 puntos para la vacuna problema y la preparación de referencia.

i) Elección y distribución de los animales de la prueba

En la prueba deben utilizarse hembras de ratón sanas de unas 4 semanas de edad, preferiblemente de pesos vivos comprendidos entre los 18 y los 20 g, y procedentes de la misma reserva. Estos ratones deben distribuirse al menos en diez grupos de no menos de diez ratones cada uno.

ii) Preparación de la suspensión para la exposición

Se inocula a un grupo de ratones por vía intraencefálica la cepa CVS del virus de la rabia; cuando los ratones presentan signos de rabia, se sacrifican, se extraen sus encéfalos y se prepara un homogenado del tejido encefálico en un diluyente adecuado. Las partículas macroscópicas se separan por centrifugación y el sobrenadante se utiliza como suspensión de exposición. La suspensión se distribuye en volúmenes pequeños en ampollas que se sellan y guardan a una temperatura inferior a los -80°C . Se descongela una ampolla de la suspensión y se preparan diluciones seriadas en un diluyente adecuado. Cada dilución se asigna a un grupo de ratones, y a cada ratón se le inyecta por vía intraencefálica 0,03 ml de la dilución asignada a su grupo. Los animales se observan al menos a diarios durante 14 días y se registra el número de ratones de cada grupo que presente signos de rabia entre el día 5 y el día 14. Se calcula la mediana de la dosis intraencefálica letal en ratón (DI_{50}) de la suspensión no diluida.

iii) Determinación de la potencia de la vacuna problema

Para la prueba de potencia, se preparan al menos tres diluciones seriadas de la vacuna para junto con tres diluciones similares de la preparación de referencia. Las diluciones se preparan de tal forma que pueda esperarse que las que contienen la cantidad mayor de vacuna protegerán a más de un 50% de los animales en los que se inyecten, y que las que contienen las cantidades menores de vacuna protegerán a menos de un 50% de los animales en los que se inyecten.

Cada dilución se asigna a un grupo distinto de ratones, y a cada ratón se le inyectan por vía intraperitoneal 0,5 ml de la dilución asignada a su grupo. Se prepara una suspensión del virus de exposición 14 días después de la inyección, de tal forma que, en base a la titulación provisional, contenga alrededor de 50 DI_{50} por cada 0,03 ml. A cada ratón vacunado se le inyectan por vía intraencefálica 0,03 ml de esta suspensión.

Se preparan tres diluciones seriadas adecuadas de esta suspensión de exposición. La suspensión de exposición y las tres diluciones se asignan, una a cada uno de los cuatro grupos de diez ratones no vacunados. A cada ratón se le inyecta por vía intraencefálica 0,03 ml de la suspensión de la dilución asignada a su grupo (Stokes *et al.*, 2012). Se observan los animales de cada grupo al menos a diario durante 14 días. La prueba resulta no válida si más de dos ratones de cada grupo mueren dentro de los primeros 4 días tras la exposición. Se registra el número de ratones de cada grupo que presenta signos de rabia entre los días 5 y 14 post-exposición.

La prueba resultará no válida a no ser que:

- a) tanto en el caso de la vacuna problema como en el caso de la preparación de referencia, la dosis que resulta protectora en el 50% de los ratones expuestos se encuentre entre la dosis mínima y la máxima administradas a los ratones;
- b) la titulación de la suspensión de exposición muestre que 0,03 ml de la suspensión contienen al menos 10 DI_{50} ;
- c) los límites de confianza ($p = 0,95$) no sean inferiores al 25% ni superiores al 400% de la potencia estimada; cuando este criterio de validez no se cumpla, el límite inferior de la potencia estimada debe ser al menos de 1 UI en la dosis mínima prescrita;
- d) el análisis estadístico muestre una pendiente significativa ($p = 0,95$) y desviaciones no significativas de la linealidad o paralelismo de las curvas dosis-respuesta ($p = 0,99$).

La vacuna cumple el requisito de la OIE si la potencia estimada no es inferior a 1 UI en la dosis mínima prescrita.

- iv) Aplicación de criterios alternativos de finalización del periodo de observación

Una vez un laboratorio ha establecido el uso sistemático de la prueba anterior, en lugar de esperar a que el animal muera, se realiza una observación de los signos clínicos y se escoge un criterio distinto de la muerte para reducir el sufrimiento del animal. Véase un ejemplo.

En los ratones, la infección por el virus de la rabia tras la inyección intraencefálica evoluciona pasando por cinco fases definidas por signos clínicos característicos:

Fase 1: pelaje erizado, dorso encorvado;

Fase 2: desplazamientos lentos, pérdida de la atención (también pueden producirse desplazamientos circulares);

Fase 3: desplazamientos temblorosos, temblores, convulsiones;

Fase 4: signos de paresia o parálisis;

Fase 5: estado moribundo.

Los ratones se observan al menos dos veces al día desde el día 4 tras la exposición. Se registran los signos clínicos en cada observación. La experiencia ha demostrado que utilizando la fase 3 como criterio de finalización del periodo de observación se obtienen resultados equivalentes a los que se hallan cuando se utiliza la muerte como criterio. Cada laboratorio debe verificar este hecho puntuando un número adecuado de pruebas empleando tanto el criterio de los signos clínicos como el de la muerte del animal.

La prueba de potencia del *National Institute of Health* (NIH), como se describe en el *Code of Federal Regulations* de EE.UU. (9CFR) es similar a la prueba europea, excepto por el hecho de que se lleva a cabo una segunda inyección de la vacuna una semana después de la primera. La lectura y el cálculo son idénticos (Farmacopea Europea, 2013a; 9CFR, 2010).

2.3. Requisitos para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes

2.3.1. Proceso de fabricación

Para registrar la vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos pertinentes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véase la Sección C.2.2.1 y C.2.2.2). Deberá proporcionarse esta información relativa a tres lotes/series de vacuna consecutivos con un volumen no inferior a 1/3 del volumen del lote/serie industrial habitual.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

Las pruebas de seguridad para el registro de la vacuna inyectable inactivada contra la rabia son idénticas a las descritas en la Sección C.2.2.2.iv.d.1 y tienen que llevarse a cabo de acuerdo con la Directriz 44 de la VICH Apartado 2.1.2, como se describe aquí.

En el caso de las vacunas que implican una dosis única de por vida o solo un ciclo de vacunación primaria, debe utilizarse la pauta de vacunación primaria. En cuanto a las vacunas que requieren una sola dosis o ciclo de vacunación primaria seguidos de una vacunación de refuerzo, debe utilizarse la pauta de vacunación primaria y una dosis adicional. Por motivos de comodidad, los intervalos recomendados entre administraciones pueden acortarse hasta un intervalo de al menos 14 días. La evaluación de la prueba con dosis o dosis repetidas debe llevarse a cabo empleando o bien un lote piloto o bien un lote de producción que contengan la potencia máxima en el momento de la puesta en circulación o, en el caso de que no se especifique la potencia máxima en el momento de la puesta en circulación, deberá utilizarse un múltiple justificado de la potencia mínima en el momento de la puesta en circulación.

En general, deben utilizarse ocho animales por grupo a no ser que se justifique lo contrario. En el caso de las especies de destino, deberán utilizarse la clase, edad y género más sensibles propuestos en la ficha técnica. Deben utilizarse animales seronegativos. Cuando no se disponga de animales seronegativos, deberá justificarse el uso de alternativas.

Si para el producto en cuestión se especifican varias vías y métodos de administración, se recomienda la administración por todas las vías. Si se ha observado que una vía de administración causa los efectos más graves, en el estudio puede utilizarse solamente esta vía. Debe prestarse especial atención al punto de inyección, sobre todo en el caso de los gatos. Deben seguirse las recomendaciones relativas a este aspecto.

Las vacunas inyectables obtenidas mediante ingeniería genética no implican la excreción de virus de la rabia virulento, pero pueden conllevar otros problemas de seguridad (Roess *et al.*, 2012). Los requisitos específicos de seguridad con este tipo de vacunas se describen en el capítulo 1.1.8 para vacunas derivadas de la ingeniería genética.

Las pruebas de reversión a la virulencia en vacunas vivas modificadas (MLV) deben llevarse a cabo con arreglo a lo descrito en el capítulo 1.1.8.

i) Precauciones y peligros

En el caso de las vacunas con adyuvante, las vivas atenuadas y las obtenidas mediante ingeniería genética, los fabricantes deberán indicar que se precisará atención médica en caso de auto-inyección.

2.3.3. Requisitos de eficacia

En los herbívoros, como requisito mínimo, la eficacia puede demostrarse mediante serología (Farmacopea Europea, 2013a). En otras especies, la eficacia se demuestra mediante exposición a un virus de la rabia adecuado. Los animales problema deberán ser uniformes y no tener anticuerpos neutralizantes contra la rabia según pruebas de neutralización en suero (véase la Sección B de este capítulo).

Los animales problema deben ser uniformes y no tener anticuerpos neutralizantes contra la rabia, según pruebas de neutralización en suero, que son las pruebas prescritas para el comercio internacional (véase la Sección B de este capítulo).

En el caso de las pruebas de exposición, se prepara un virus de exposición para determinar la dosis y la vía que serán suficientes para inducir signos clínicos de la rabia en al menos un 80% de los animales control no vacunados. En cuanto se observen signos clínicos de la rabia, los animales serán sacrificados y la rabia se confirmará empleando las pruebas de diagnóstico que se describen en la Sección B de este capítulo.

Para las pruebas de eficacia en animales vacunados, como por ejemplo, en perros, deberán utilizarse 25 o más animales como vacunados. La formulación de la vacuna empleada para la prueba de eficacia es la mínima que se utilice para la producción sistemática. Deben añadirse otros diez o más animales que ejercerán de controles. Al final del periodo afirmado de inmunidad, se expone a la dosis predeterminada tanto a los animales vacunados como a los que actúan como control, como se describe arriba. Los animales se observan al menos a diario durante 90 días tras la exposición. En cuanto se observan signos clínicos de la rabia, los animales se sacrifican y la rabia se confirma empleando pruebas de diagnóstico adecuadas. Al final del periodo de observación, todos los animales supervivientes se sacrifican por métodos compasivos y sus encéfalos se analizan mediante las pruebas de diagnóstico descritas en la Sección B de este capítulo.

Los requisitos de aceptación en pruebas de desafío deberán ser la muerte debida a la rabia en al menos un 80% de los animales control, y por otra parte, la ausencia de rabia durante un periodo de 90 días en al menos 22 de 25, en 26 de 30 o en un número estadísticamente equivalente de animales vacunados.

2.3.4. Estabilidad

Como se describe en el capítulo 1.1.8.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Como parte del procedimiento de autorización, debe exigirse al fabricante que muestre la duración de la inmunidad conferida por una vacuna determinada mediante la exposición o bien otra prueba validada, como la serología al final del periodo de protección afirmado.

3. Vacunas de uso oral contra la rabia

3.1. Antecedentes

Todas las vacunas que se utilizan actualmente en los programas de vacunación por vía oral son MLV o bien obtenidas mediante ingeniería genética (BDV). Debe tenerse en cuenta que las vacunas antirrábicas de uso oral generadas mediante genética inversa se consideran, desde el punto de vista de las autoridades reguladoras, como BDV, aunque no expresen un gen extraño. Para el uso de las vacunas orales es fundamental la inocuidad, no solo para las especies de destino, sino para el medio ambiente y para otras especies, incluido el ser humano, que podrían entrar en contacto con el producto (véase el capítulo 1.1.8). Se ha documentado que algunas de las MLV causan rabia derivada de la vacuna tanto en especies de destino como en especies no de destino (Fehlner-Gardiner *et al.*, 2008, Müller *et al.*, 2009, Hostnik *et al.* 2014, Pfaff *et al.*, 2018).

Se han establecido los requisitos para garantizar la inocuidad y la eficacia de las vacunas orales tanto en las especies de destino como en las especies no de destino (sobre todo el ser humano) que pudieran entrar en contacto con cebos o con un animal recién vacunado (OMS, 2007; 2013; Farmacopea Europea, 2013b). Además de los requisitos para las vacunas antirrábicas orales descritos arriba, para la ORV de la fauna salvaje y de los perros, también es fundamental disponer cebos y sistemas de exposición de cebos adecuados, lo cual puede requerir la adaptación a las circunstancias de cada caso. Podría ser necesario reevaluar la eficacia de los cebos y de los sistemas de exposición de los cebos cada vez que se produzcan variaciones significativas.

3.2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

Además de los requisitos definidos en el capítulo 1.1.8, deben cumplirse los siguientes requisitos específicos.

3.2.1. Características del inóculo

El inóculo es una preparación pura de una única cepa clónica inmunógena de vacuna de virus vivo modificado (MLV) o generada mediante ingeniería genética (BDV). Debe conocerse bien el historial del inóculo vírico primario (MSV), sus propiedades inmunógenas, la inocuidad y la ausencia de reversión a la virulencia, incluida la presencia de marcadores genéticos del MLV, incluida la presencia de marcadores genéticos de MLV. Debe presentarse a la autoridad reguladora una secuencia del genoma completo del virus inóculo, y depositarse en una base de datos pública para que se verifiquen la identidad y la estabilidad genética. En el caso del MSV obtenido mediante ingeniería genética, debe tenerse en cuenta información adicional sobre la recombinación, porque existe un riesgo teórico de posibilidad de transferencia e intercambio genético con otros virus.

3.2.2. Método de fabricación

i) Procedimiento

El virus inóculo se utiliza para infectar una suspensión o monocapas de una línea celular establecida. Debe demostrarse que estos cultivos celulares no son tumorigénicos y que están libres de microorganismos contaminantes.

ii) Control durante el proceso

Durante el proceso de producción, se llevan a cabo pruebas en distintos momentos antes de constituir la mezcla final, lo cual permite verificar la constancia de la producción. En los controles realizados durante el proceso son fundamentales las pruebas de infectividad y de esterilidad.

iii) Pruebas en lotes/series de producto final

Tras combinar todos los ingredientes, la mezcla final contiene la formulación definitiva, que se utiliza en forma liofilizada o líquida. El último paso de la producción de un lote/serie es la introducción de la mezcla final en bolsitas/cápsulas que se incluirán en cebos, o

introducirla la mezcla final directamente en el cebo. Este lote/serie final se somete a las pruebas descritas a continuación:

a) **Esterilidad**

Esta prueba puede llevarse a cabo antes o después del llenado del cebo. Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos *de uso veterinario* se describen en el capítulo 1.1.9.

b) **Identidad**

La identidad del inmunógeno se comprueba empleando suero anti-rabia monoespecífico de la glucoproteína G en el caso de la vacuna obtenida mediante ingeniería genética, y en el caso de la vacuna con MLV, se lleva a cabo una prueba para poner de manifiesto la presencia del marcador genético.

c) **Pureza del lote/serie**

En el caso del MLV, se inoculan diluciones de 1/10 y de 1/1.000 en cultivos celulares susceptibles. Las diluciones se incuban a 37°C. Pasados 2, 4 y 6 días, las células se tiñen con un conjunto de anticuerpos monoclonales que no reaccionen con la cepa vacunal pero que sí lo hagan con otras cepas de la vacuna antirrábica (por ejemplo, la cepa Pasteur del virus de calle). Como alternativa, pueden emplearse la caracterización genética. La vacuna supera la prueba si no muestra indicios de contener el virus de la rabia (Farmacopea Europea, 2013a).

d) **Seguridad**

Muchas autoridades reguladoras no exigen pruebas de inocuidad en las especies de destino para la puesta en circulación del lote o serie. Si se exigen, en general se llevan a cabo procedimientos estándar empleando menos animales que los que se utilizan en las pruebas de inocuidad exigidas para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes.

A no ser que se ponga de manifiesto y que se apruebe en el dossier de registro que el producto siempre es seguro, y que se apruebe la uniformidad en el proceso de producción de acuerdo con los requisitos estándar indicados en el capítulo 1.1.8, deben realizarse pruebas de la seguridad del lote del siguiente modo: se administran a dos perros sanos por vía oral diez dosis de campo. Además, se inyecta una dosis de 0,5 ml por vía intraperitoneal o subcutánea a ocho ratones. Todos los animales se observarán durante 14 días. Si durante el periodo de observación en cualquiera de estos animales aparecen reacciones adversas atribuibles a los productos, el lote/serie resultará insatisfactorio.

e) **Potencia del lote/serie**

En el caso de las vacunas MLV y las BDV, las titulaciones son indicadores fiables de la potencia de la vacuna una vez se ha establecido una relación entre el nivel de protección conferido por la vacuna en la especie de destino y los títulos de la vacuna. La titulación vírica debe llevarse a cabo empleando cultivos celulares. Ello permite a los laboratorios actuar de acuerdo con los principios 3R (Comisión Europea, 2010).

3.3. Requisitos para la autorización por parte de las autoridades reguladoras correspondientes

3.3.1. Proceso de fabricación

Para registrar una vacuna, deben presentarse a las Autoridades Competentes todos los datos relevantes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad. Esta información deberá presentarse para tres lotes/series consecutivos de la vacuna con un volumen no inferior a 1/3 del volumen del lote/serie industrial habitual.

Los controles realizados durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

3.3.2. Requisitos de inocuidad

De acuerdo con el capítulo 1.1.8, se requieren pruebas de inocuidad en todas las especies para las que está indicado el producto. A los efectos de esta clase de producto, solo se requieren las pruebas de inocuidad relativas a la sobredosis y a la reversión a la virulencia.

Las pruebas de reversión a la virulencia de las vacunas MLV y las pruebas de inocuidad de las BDV deben llevarse a cabo de acuerdo con el capítulo 1.1.8.

i) Vacunas vivas modificadas (MLV)

a) En especies de destino

Para la prueba de seguridad relativa a la sobredosis, se administra un título máximo de 10x de una dosis de campo, preferiblemente empleando una jeringa, por vía oral a diez animales (de menos de 6 meses de edad en el caso de los animales salvajes, y de menos de 10 semanas en el caso de los perros), que no tengan anticuerpos contra la rabia. Tras la administración, la posibilidad de excreción de virus vacunal en la saliva de los animales descritos debe evaluarse tomando hisopos varias veces durante las 24 horas posteriores a la inmunización oral, y a continuación a diario durante 7 días. Debe caracterizarse todo virus recuperado. Los animales se observarán durante 90 días. Debe prestarse especial atención a los signos neurológicos, y la muerte súbita debe investigarse empleando pruebas adecuadas (véase la Sección B de este capítulo). Al final del estudio, deberá comprobarse si el encéfalo presenta virus vacunal utilizando las pruebas de referencia descritas en Sección B.1.3.1.

La prueba resultará satisfactoria si no se observan reacciones adversas intolerables atribuibles a la vacuna y si no se detecta virus en el encéfalo. El virus recuperado de los hisopos debe corresponder a la cepa vacunal y ser constante a lo largo del tiempo y en cuanto a su cantidad, y presentar poca replicación vírica.

b) En especies no de destino

Debe investigarse un grupo representativo de especies susceptibles a la rabia y que sea probable que ingieran cebos, incluidos roedores, gatos y perros. Debe administrarse una dosis de campo de un título como máximo 10x el de la dosis de campo. Se observarán durante al menos 90 días según el periodo de incubación, que dependerá del vector que se haya utilizado

Dado que podría ser difícil analizar animales salvajes y que estos deben ser los mínimos indispensables, se recomienda llevar a cabo otras pruebas en roedores de laboratorio susceptibles al vector. Deben analizarse animales de laboratorio empleando al menos 20 animales en cada prueba, que se inocularán por vía oral con la cantidad de cepa vacunal equivalente a una dosis oral máxima. Un número igual de animales que hayan contactado con aquellos deberá utilizarse para investigar la transmisión del virus. Todos los animales deberán observarse a diario durante al menos 30 días. Los animales que mueran por causas no atribuibles a la rabia se eliminarán. Al final del estudio, deberá comprobarse si el encéfalo presenta virus vacunal utilizando las pruebas de referencia descritas en Sección B.1.3.1.

Deberá llevarse a cabo una evaluación del riesgo para determinar directamente el riesgo para el ser humano (inocuidad de la vacuna) y el riesgo de que el ser humano entre en contacto con la vacuna.

iii) Peligros y precauciones

La puesta en circulación de vacunas orales al medio ambiente deberá cumplir con los requisitos indicados en el capítulo 1.1.8. Las vacunas orales contra la rabia son inocuas cuando se presentan en forma de cebo y no suponen un peligro tóxico para el personal que las administra. En caso de fugas de bolsitas que contengan las vacunas, los fabricantes deberán advertir de que se precisa atención médica en caso de contacto inadvertido, sobre todo cuando el contacto tenga lugar con las mucosas, la piel o abrasiones de la piel.

Antes de iniciar campañas de vacunación, debe informarse a los funcionarios de la salud pública y se debe formar al público en general, sobre todo para que no toquen cebos ni contacten con animales que hayan consumido cebos recientemente.

La OMS (2005) aporta información sobre Salud Pública respecto al riesgo de las vacunas orales en grupos específicos de la población humana.

3.3.3. Requisitos de eficacia

La eficacia del producto final (cebo vacunal) (véase la Sección C.3.3.5) deberá ponerse de manifiesto en cada una de las especies para las que el fabricante afirme que puede utilizarse la vacuna. Para determinar si el animal está protegido, no podrán emplearse únicamente pruebas serológicas; es necesario llevar a cabo una prueba de exposición al virus con un virus de la rabia de desafío que sea apropiado. Preferiblemente, deberán utilizarse especies de destino adaptadas a la cepa del virus de la rabia. El título vacunal no deberá ser superior al de la dosis protectora mínima indicada.

Los animales utilizados en las pruebas deberán tener al menos tres meses de edad y no podrán tener anticuerpos neutralizantes contra la rabia, según pruebas de neutralización sérica (véase la Sección B de este capítulo).

En el caso de las pruebas de exposición, se realizarán estudios para hallar la dosis de exposición y determinar la dosis y la vía que son necesarias para inducir signos clínicos de la rabia en al menos un 80% de los animales control no vacunados para cada especie de destino. En cuanto se observan signos clínicos de la rabia, los animales se sacrifican y se confirma la rabia empleando las pruebas de diagnóstico descritas en la Sección B de este capítulo.

Para las pruebas de eficacia en animales vacunados, deberán utilizarse al menos 25 animales como vacunados. El título del virus vacunal que se utilice en la prueba de eficacia establece la dosis infecciosa inmunizante mínima. Pasados 180 días tras la presentación de una vacuna-cebo, vacunados y controles se exponen a la dosis predeterminada, como se describe arriba. Los animales se observan a diario durante 90 días tras la exposición y en cuanto se observan signos clínicos de la rabia, los animales se sacrifican por medios compasivos. Con pruebas adecuadas, debe confirmarse el diagnóstico de la rabia en los animales que mueran o que deban sacrificarse. Al final del periodo de observación, todos los animales supervivientes se sacrifican y sus tejidos encefálicos se analizan utilizando las pruebas de identificación del virus que se describen en la Sección B de este capítulo.

Los requisitos para la aceptación en pruebas de exposición deberán ser la muerte debida a la rabia en al menos un 80% de los animales control, así como 22 de 25, 26 de 30 o un número estadísticamente equivalente de animales vacunados libres de la rabia durante un periodo de 90 días.

Una vez se haya establecido la dosis inmunizante mínima en una especie, el estudio de eficacia para otras especies puede limitarse a un estudio en el que se empleen vacunas-cebos. Es posible que el envoltorio del cebo deba adaptarse a las nuevas especies de destino (véase la Sección C.3.3.5).

3.3.4. Estabilidad

Se incuban a 25°C durante 5 días un mínimo de cinco muestras del producto final. La vacuna se titula tres veces. El título vírico medio debe ser al menos el título vírico mínimo indicado en la ficha técnica o aprobado para el final del periodo de validez. El cebo se calienta a 40°C durante 1 hora, y el envoltorio del cebo supera la prueba si conserva su forma original y se adhiere al recipiente de la vacuna (Farmacopea Europea, 2013b).

3.3.5. Requisitos y características del cebo

El cebo forma parte del producto y teóricamente debe cumplir los siguientes criterios:

- i) Que esté diseñado para la especie de destino y para que le resulte atractivo, y que se adapte al modo de distribución;
- ii) Que se adapte a las preferencias alimentarias de la población local de perros para la ORV;
- iii) Que la sustancia atrayente sea compatible con cebo y vacuna y que se adhiera al cebo, y que conserve la palatabilidad durante un cierto periodo de tiempo;
- iv) Que conserve su forma y aspecto en gran variedad de condiciones de temperatura y climáticas para que la vacuna quede protegida en las condiciones de campo;

- v) Que la forma del cebo permita una fácil ingesta por parte de animales de las especies de destino de todas las edades y tamaños;
- vi) Que optimice la liberación de la vacuna en la cavidad oral y a los tejidos diana;
- vii) Que sea seguro tanto en las especies de destino como no de destino;
- viii) Que los ingredientes no sean perjudiciales; que cumpla con las normas de alimentación animal y no interfiera con la actividad de la vacuna;
- ix) Que permita la incorporación de un biomarcador, tópico o sistémico (por ejemplo:
 - a. Marcadores de superficie (rodamina B, u otras tinciones);
 - b. Marcadores tisulares (ácido iofenólico, etc.);
 - c. Marcadores calcifílicos, como la tetraciclina (TC), que deben ser compatibles con otros componentes del cebo, seguros tanto en especies de destino como no de destino, detectables en las especies de destino durante un periodo definido mediante pruebas técnicamente sencillas, económicas y disponibles a nivel local, y ausentes o muy poco presentes en la población de destino. En el caso de la TC, debe tenerse cuidado de que en la formulación del cebo final, el cociente de TC respecto a epitetraciclina sea lo más alto posible para garantizar la efectividad del biomarcador.
- x) Que sea económico producir de la forma estándar, posiblemente en las condiciones locales;
- xi) Que disponga de un sistema de identificación con advertencias para el público e identificación del producto.

BIBLIOGRAFÍA

BADRANE H., BAHLOUL C., PERRIN P. & TORDO N. (2001). Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J. Virol.*, **75**, 3268–3276.

BARRAT J. (1992). Experimental Diagnosis of Rabies. Adaptations to Field and Tropical Conditions. Proceedings of the International Conference on Epidemiology, Control and Prevention of Rabies in Eastern and Southern Africa. Lusaka, Zambia, 2–5 June 1992, 72–83.

BARRAT J. & AUBERT M.F.A. (1995). Diagnostic de la rage animale en France de 1991 à 1993, bilan de CNEVA laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages en France. *Revue Méd. Vét.*, **146**, 561–566.

BARRAT J. & BLANCOU J. (1988). Technique simplifiée de prélèvement, de conditionnement et d'expédition de matière cérébrale pour le diagnostic de rage. Doc. WHO/Rab. Res./88.27.

BELLINGER D.A., CHANG J., BUNN T.O., PICK J.R., MURPHY M. & RAHIJA R. (1983). Rabies induced in a cat by high-egg-passage Flury strain vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **183**, 997–998.

BINGHAM J. & VAN DER MERWE M. (2002). Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Methods*, **101**, 85–94.

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.

CLIQUET F., AUBERT M. & SAGNE L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*, **212**, 79–87.

CLIQUET F., ROBARDET E., MUST K., LAINE M., PEIK K., PICARD-MEYER E., GUIOT A.L. & NIIN E. (2012). Eliminating rabies in Estonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **6** (2):e1535. doi: 10.1371/journal.pntd.0001535. Epub 2012 Feb 28.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (9CFR) (2010). Rabies Vaccine, Killed Virus, 9 CFR 113.209.

- COETZER A., SABETA C.T., MARKOTTER W., RUPPRECHT C.E. & NEL L.H. (2014). Comparison of biotinylated monoclonal and polyclonal antibodies in an evaluation of a direct rapid immunohistochemical test for the routine diagnosis of rabies in southern Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **8**, e3189.
- ESH J.B., CUNNINGHAM J.G. & WIKTOR T.J. (1982). Vaccine-induced rabies in four cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **180**, 1336–1339.
- EUROPEAN COMMISSION (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0. (2013a). Monograph 0451: Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0. (2013b). Monograph 0746: Rabies vaccine (live, oral) for foxes. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France.
- FEHLNER-GARDINER C., NADIN-DAVIS S., ARMSTRONG J., MULDOON F., BACHMANN P. & WANDELER A. (2008). Era vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J. Wildl. Dis.*, **44**, 71–85.
- FISCHER M., WERNIKE K., FREULING C.M., MÜLLER T., AYLAN O., BROCHIER B., CLIQUET F., VÁZQUEZ-MORÓN S., HOSTNIK P., HUOVILAINEN A., ISAKSSON M., KOOI E.A., MOONEY J., TURCITU M., RASMUSSEN T.B., REVILLA-FERNÁNDEZ S., SMREČZAK M., FOOKS A.R., MARSTON D.A., BEER M. & HOFFMANN B. (2013). A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses – results of a ring trial among European laboratories. *PLoS One*, **8**, e58372.
- FREULING C.M., HAMPSON K., SELHORST T., SCHRÖDER R., MESLIN F.X., METTENLEITER T.C. & MÜLLER T. (2013). The elimination of fox rabies from Europe: determinants of success and lessons for the future. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **368**, 1623.
- FREULING C.M., HOFFMANN B., FISCHER M., McELHINNEY L.M., MARSTON D.A., FOOKS A.R. & MÜLLER T.F. (2014). Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Demonstration of Lyssavirus Nucleic Acid. *In: Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research, and Prevention*, Volume 1, Rupprecht C. 1 Nagarajan T., eds. Academic Press, Elsevier, San Diego, USA.
- HANLON C.A., KUZMIN 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.
- HAYMAN D.T., BANYARD A.C., WAKELEY P.R., HARKESS G., MARSTON D., WOOD J.L., CUNNINGHAM A.A. & FOOKS A.R. (2011). A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. *J. Virol. Methods*, **177**, 87–93.
- HEATON P.R., JOHNSTONE P., McELHINNEY L.M., COWLEY R., O’SULLIVAN E. & WHITBY J.E. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2762–2766.
- HOSTNIK P., PICARD-MEYER E., RIHTARIC D., TOPLAK I. & CLIQUET F. (2014). Vaccine-induced Rabies in a Red Fox (*Vulpes vulpes*): Isolation of Vaccine Virus in Brain Tissue and Salivary Glands. *J. Wildl. Dis.*, **50**, 397–401.
- ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES) (2017). Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses: The Online (10th) Report of the ICTV.
- KRÄMER B., BRUCKNER L., DAAS A. & MILNE C. (2010). Collaborative study for validation of a serological potency assay for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. *Pharmeur. Bio. Sci. Notes*, **2**, 37–55.
- KUZMIN I.V., MAYER A.E., NIEZGODA M., MARKOTTER W., AGWANDA B., BREIMAN R.F. & RUPPRECHT C.E. (2010). Shimon bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. *Virus Res.*, **149**, 197–210.
- LEMBO T., NIEZGODA M., VELASCO-VILLA A., CLEAVELAND S., ERNEST E. & RUPPRECHT C.E. (2006). Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 310–313.
- MADHUSUDANA S.N., SUBHA S., THANKAPPAN U. & ASHWIN Y.B. (2012). Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Virol. Sin.*, **27**, 299–302.

- McELHINNEY L.M., MARSTON D.A., BROOKES S.M. & FOOKS A.R. (2014). Effects of carcass decomposition on rabies virus infectivity and detection. *J. Virol. Methods*, **207**, 110–113.
- MONTANO HIROSE J.A., BOURHY H. & SUREAU P. (1991). Retro-orbital route for brain specimen collection for rabies diagnosis. *Vet. Rec.*, **129**, 291–292.
- MOORE S., GILBERT A., VOS A., FREULING C.M., ELLIS C., KLIEMT J. & MÜLLER T. (2017). Review of rabies virus antibodies from oral vaccination as a correlate of protection against lethal infection in animals. *Trop. Med. Infect. Dis.*, **2**, 31.
- MÜLLER T., BÄTZA H.J., BECKERT A., BUNZENTHAL C., COX J., FREULING C., FOOKS A., FROST J., GEUE L., HOEFLECHNER A., MARSTON D., NEUBERT A., NEUBERT L., REVILLA-FERNANDEZ S., VANEK E., VOS A., WODAK E., ZIMMER K. & METTENLEITER T. (2009). Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. *Arch. Virol.*, **154**, 1081–1091.
- PFAFF F., MÜLLER T., FREULING C.M., FEHLNER-GARDINER C., NADIN-DAVIS S., ROBARDET E., CLIQUET F., VUTA V., HOSTNIK P., METTENLEITER T.C., BEER M. & HÖPER D. (2018). In-depth genome analyses of viruses from vaccine-derived rabies cases and corresponding live-attenuated oral rabies vaccines. *Vaccine*, pii, S0264-410X(18)30156-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.01.083.
- PICARD-MEYER E., BARRAT J. & CLIQUET F. (2007). Use of filter paper (FTA) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. *J. Virol. Methods*, **140**, 174–182.
- ROBARDET E., PICARD-MEYER E., ANDRIEU S., SERVAT A. & CLIQUET F. (2011). International interlaboratory trials on rabies diagnosis: an overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. *J. Virol. Methods*, **177**, 15–25.
- ROESS A.A., REA N., LEDERMAN E., DATO V., CHIPMAN R., SLATE D., REYNOLDS M.G., DAMON I.K. & RUPPRECHT C.E. (2012). National surveillance for human and pet contact with oral rabies vaccine baits, 2001–2009. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **240**, 163–168.
- RUDD R.J. & TRIMACHI 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.
- RUPPRECHT C.E., CLIQUET F., FEHLNER-GARDINER C., FOOKS A.R., MUELLER T., SABETA C. & SLATE D. (2014). Progress in the development of a direct rapid immunohistochemical test for diagnosing rabies. *OIE Bulletin*, No. 3, 87–95.
- SMITH J.S., YAGER P.A. & BAER G.C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO*, **48**, 535–541.
- STOKES W., MCFARLAND R., KULPA-EDDY J., GATEWOOD D., LEVIS R., HALDER M., PULLE G., KOJIMA H., CASEY W., GAYDAMAKA A., MILLER T., BROWN K., LEWIS C., CHAPSAL J.M., BRUCKNER L., GAIROLA S., KAMPHUIS E., RUPPRECHT C.E., WUNDERLI P., McELHINNEY L., DE MATTIA F., GAMOH K., HILL R., REED D., DOELLING V., JOHNSON N., ALLEN D., RINCKEL L. & JONES B. (2012). Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward. *Biologicals*, **40**, 369–381.
- SUIN V., NAZE F., FRANCAERT A., LAMORAL S., DE CRAEYE S., KALAI M. & VAN GUCHT S. (2014). A two-step lyssavirus real-time polymerase chain reaction using degenerate primers with superior sensitivity to the fluorescent antigen test. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 256175.
- TAO L., GE J., WANG X., ZHAI H., HUA T., ZHAO B., KONG D., YANG C., CHEN H. & BU Z. (2010). Molecular basis of neurovirulence of flury rabies virus vaccine strains: importance of the polymerase and the glycoprotein R333Q mutation. *J. Virol.*, **84**, 8926–8936.
- TAYLOR J., TRIMARCHI C., WEINBERG R., LANGUET B., GUILLEMIN F., DESMETTRE P. & PAOLETTI E. (1991). Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine*, **9**, 190–193.
- WACHENDÖRFER G., KIEFERT C. & FROST J.W. (1982). Safety tests with Flury HEP strain 675 in wild-living European mammals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **5**, 177–180.
- WADHWA A., WILKINS K., GAO J., CONDORI CONDORI R.E., GIGANTE C.M., ZHAO H., MA X., ELLISON J.A., GREENBERG L., VELASCO-VILLA A., ORCIARI L. & LI Y. (2017). A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **11**, e0005258.

WAKELEY P.R., JOHNSON N., McELHINNEY L.M., MARSTON D., SAWYER J. & FOOKS A.R. (2005). Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2786–2792

WARNER C.K., WHITFIELD S.G., FEKADU M. & HO H. (1997). Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome *in situ* in formalin-fixed tissues. *J. Virol. Methods*, **67**, 5–12.

WASNIEWSKI M., LABBE A., TRIBOUT L., RIEDER J., LABADIE A., SCHEREFFER J.L. & CLIQUET F. (2014). Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores. *J. Virol. Methods*, **195**, 211–220.

WASNIEWSKI M., ALMEIDA I., BAUR A., BEDEKOVIC T., BONCEA D., CHAVES L.B., DAVID D., DE BENEDICTIS P., DOBROSTANA M., GIRAUD P., HOSTNIK P., JACEVICIENE I., KENKLIES S., KONIG M., MAHAR K., MOJZIS M., MOORE S., MRENOSKI S., MÜLLER T., NGOEPE E., NISHIMURA M., NOKIREKI T., PEJOVIC N., SMRECAK M., STRANDBYGAARD B., WODAK E., CLIQUET F. (2016). First international collaborative study to evaluate rabies antibody detection method for use in monitoring the effectiveness of oral vaccination programmes in fox and raccoon dog in Europe. *J. Virol. Methods*, **238**, 77–85.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996). Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. WHO, Geneva, Switzerland.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). World Health Organization Expert Committee on Rabies, First Report; WHO Technical Report Series, **931**. WHO, Geneva, Switzerland, 1–87.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007). Oral Vaccination of Dogs against Rabies. Guidance for research on oral rabies vaccines and field application of oral vaccination of dogs against rabies. WHO, Geneva, Switzerland.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013). Expert Consultation on Rabies, Second Report. WHO Technical Report Series, **982**. WHO, Geneva, Switzerland, 1–150.

WU X., SMITH T.G. & RUPPRECHT C.E. (2011). From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development. *Exp. Rev. Vaccines*, **10**, 1597–1608.

XU G., WEBER P., HU Q., XUE H., AUDRY L., LI C., WU J. & BOURHY H. (2007). A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. *Biologicals*, **35**, 297–302.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Rabia
(puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Rabia, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.