



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

## **Facultad de Ciencias.**

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO POST INOCULACIÓN PARA LA  
OBTENCIÓN DE CONTROLES POSITIVOS 1+ Y 4+ PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE RABIA MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
INOCULACIÓN EN RATÓN LACTANTE

**Tesis para obtener el título de:  
Biotecnólogo**

**PRESENTA:**

AKETZALI NALLELY COLÍN VIVAS

**DIRECTORES DE TESIS:**

Dra. Leticia Buendía González

MCS. Isaac R. Velázquez Quiróz



# ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas y Figuras	4
Abreviaturas	5
Resumen	7
1. Introducción	9
2. Antecedentes	11
2.1. Historia de la Rabia	11
2.2. Generalidades de la enfermedad	14
2.2.1. Virus	14
2.2.1.2. El Virus de la rabia	18
2.2.1.3. Estados de la Replicación	21
2.3. Diagnóstico	23
2.3.1. Pruebas de laboratorio	24
2.3.1.1. ELISA	24
2.3.1.2. Anticuerpos monoclonales	25
2.3.1.3. Inhibición de focos fluorescentes RIFFT	25
2.3.1.4. Direct Rapid Immunohistochemical Test dRIT	25
2.3.1.5. Detección de antígenos	26
2.3.1.6. Técnica de inmunofluorescencia directa	26
2.3.1.7. Técnicas para el aislamiento del virus	29
2.3.1.7.1. Cultivo celular	29
2.3.1.7.2. Inoculación de ratón lactante	30
2.4. Epidemiología e impacto en salud pública	32
3. Justificación	35
4. Hipótesis	36

5. Objetivo	37
6. Materiales y Método	38
6.1. Prueba biológica en ratón lactante.	39
6.2. Sacrificio de ratones	42
6.3. Extracción e impronta del encéfalo	42
6.4. Inmunofluorescencia directa	43
6.5. Preparación del conjugado	43
6.6. Análisis estadístico	44
7. Resultados	45
8. Conclusiones	50
9. Bibliografía	52

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla.1 Puntos a considerar para la clasificación de resultados obtenidos por IFD para el diagnóstico de RABV.	28
Tabla 2. Micrografías de muestras de encéfalo de ratón con RABV técnica de ID (40X)	48
Tabla 3. Clasificación de las muestras tratadas con la técnica de inmunofluorescencia	49
Fig.1 Métodos de entrada de los virus a las células	16
Fig.2 Esquema de la replicación de los virus de RNA cadena negativa	17
Fig.3 Representación del virión de la Rabia.	18
Fig.4 Organización del genoma de RABV	19
Fig.5 Dominio N-terminal y C-terminal de la proteína P.	20
Fig.6. Ciclo Viral.	23
Fig.7 Proceso general de Inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de Rabia.	27
Fig.8 Proceso general de inoculación del virus de la rabia en ratón lactante.	31
Fig.9 Casos de rabia humana por animales silvestres reportados a nivel nacional durante los años 2000-2015	32
Fig.10 Metodología general empleada	38
Fig.11 Preparación del inóculo	39
Fig.12 Mesa de trabajo para la inoculación	40
Fig.13 Sujeción del ratón	41
Fig.14 Inoculación en ratón lactante	41
Fig.15 Extracción de encéfalo de ratón	42
Fig.16 Impronta en laminilla	42
Fig. 17. Camada de ratones BALB C. 8 días de edad	46
Fig.18 Control negativo. Técnica de inmunofluorescencia directa	47
Fig.19 Control positivo. Técnica de Inmunofluorescencia directa.	47

## ABREVIATURAS

Inmunofluorescencia	IF
Inoculación de ratones	IR
Virus de la Rabia	RABV
Acido desoxirribonucleico	DNA
Acido ribonucleico	RNA
Nanómetro	nm
Noncoding regions	NCRs
Transcription Initiation signals	TISs
Transcription Termination Polyadenylation signals	TTP
Secuencia líder	Le
Secuencia tráiler	Tr
Nucleoproteína	N
Rapid rabies enzyme inmunodiagnosis	RREID
Direct rapid Immunohistochemical test	dRIT
Fosfoproteína	P
Glicoproteína	G
Ribonucleoproteína	RNP
RNA viral	vRNA
Sistema nervioso central	CNS
Organización mundial de la salud	OMS
Inmunoglobulina G	IgG
Inhibición de focos fluorescentes	RIFFT

---

Anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia	RVNA
Líquido cefalorraquídeo	LCR
Células de riñón de hámster	BKH-21
Células de embrión de pollo	CER
Revoluciones por minuto	rpm
Centro nacional de programas preventivos y control de enfermedades	CENAPRECE
Secretaría De agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación	SAGARPA
Sistema Nacional de epidemiología veterinaria y salud	DIVESA
Secretaría de salud	SSA
Dirección general de sanidad animal	DGSA
Residuos peligrosos biológico infecciosos	RPBI
Retículo endoplasmático	ER
Single strain RNA	ssRNA
Double strain RNA	dsRNA
RNA-dependent RNA polymerase	RdRp
Laboratorio Estatal de Salud Pública	LESP
Challenge virus strain	CVS
ISEM	Instituto de Salud del estado de México

## RESUMEN

La rabia es una enfermedad que existe desde hace millones de años, afecta a mamíferos y es causada por un *Lyssavirus* de la familia Rhabdoviridae que provoca encefalitis aguda. No existe un tratamiento médico para la enfermedad por lo tanto una vez que aparecen los síntomas es mortal sin embargo se puede prevenir mediante la vacunación. Aunque gracias a las medidas de prevención y vacunación la rabia transmitida por perro se ha logrado controlar, en México, la rabia transmitida por animales silvestres es la principal preocupación ya que causa pérdidas económicas de millones de dólares principalmente en la industria ganadera y al sector salud por el diagnóstico, investigación de mordeduras de animales, tratamientos, indemnizaciones por pérdida de ganado, cuarentenas, vacunas, mantenimiento de los laboratorios de diagnóstico y programas de control animal. En el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Instituto de Salud del Estado de México (LESP-ISEM) se realiza el diagnóstico de Rabia por la técnica de inmunofluorescencia directa, la cual requiere de controles negativos y positivos que se obtienen mediante la técnica de inoculación en ratón lactante. En 2015 se registraron 14 casos positivos provenientes del Estado de México por lo que la generación de los controles es un punto crítico en la prueba diagnóstica. La literatura reporta la obtención de resultados mediante la técnica de inoculación de ratones lactantes en un lapso de 14-21 días post inóculo siendo lo más aceptado el período de los 21 días. El presente trabajo se realizó debido a que el tiempo que lleva la obtención de controles positivos permite que la enfermedad se establezca y se manifiesten los síntomas en el ratón, lo cual no es necesario ya que lo que se busca sólo es la presencia del virus, la cual podemos determinar mucho antes de que se presente la sintomatología. Por otro lado aunque la técnica es de uso general en todos los laboratorios, no hay reportes que indiquen el tiempo en que se puede obtener un control con los diferentes grados de positividad, que se puedan usar como referencia en el diagnóstico sin que afecte la sensibilidad y especificidad de la técnica (95-99%). Por lo que el principal objetivo establecido fue la determinación de los tiempos post inóculo, requeridos para la obtención de un control positivo 1+ y un control positivo 4+.

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Rabia del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Instituto de Salud del Estado de México (LESP-ISEM). La determinación del tiempo para la obtención de controles positivos se realizó mediante las técnicas de inoculación intracerebral del virus de la rabia en ratones lactantes e inmunofluorescencia

directa, siguiendo los lineamientos establecidos en el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en Humano emitido por la Dirección General de Epidemiología y el Manual de Calidad de Rabia del LESP. El experimento se realizó por triplicado utilizando camadas de ratones BALB-C de entre 8-10 días de nacidos, el inóculo se realizó con una muestra testigo positivo de virus rábico pase 30 (CVS ATCC VR-321). Los sacrificios se realizaron desde las 24-216 hrs. post inoculación. Se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA y una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher empleando el paquete estadístico STATGRAPHICS centurión.

El análisis de las micrografías del ensayo de inmunofluorescencia, permitió establecer el tiempo de obtención de un control positivo 1+ a las 72 hrs post inóculo y un control positivo 4+ a las 120 hrs post inoculación. Se logró un refinamiento en la técnica empleada para la obtención de controles positivos ya que se comprobó que dichos controles se pueden obtener en un lapso menor a los 21 días que establece la literatura sin que esto afecte la sensibilidad y especificidad de la técnica. Un aporte al diagnóstico fue la generación de controles positivos 1+ que pueden usarse como referencia y de esta forma se pueden incluir dos controles positivos con baja y alta carga, garantizando de esta manera la eficiencia de los reactivos utilizados y como referencia para el personal encargado del diagnóstico.

Al reducir el tiempo de obtención de controles positivos también se disminuyó el tiempo de convalecencia de los ratones empleados, durante la prueba ya que para la obtención de los controles no es necesario esperar el desenlace fatal del curso natural de la enfermedad sino que basta con establecer la presencia el virus en la muestra, lo cual ocurre antes de que se presente la sintomatología.



## 1. INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad aguda, infecciosa, viral que afecta a todos los mamíferos. Está presente en todos los continentes menos en la Antártida. Más del 95% de las muertes humanas se registran en Asia y África[1]. En América la rabia humana transmitida por animales silvestres es considerada como un problema de salud pública siendo la zoonosis viral de mayor importancia en México. Según reportes del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) de 2003 a 2014 el 91.9% de los casos reportados fueron de personas agredidas por perros mientras que solo el 8.2% fueron agredidas por otros mamíferos[2-3]. El 67% de la población ganadera se encuentran localizados en áreas endémicas de murciélago vampiro según los reportes del Sistema Nacional de Epidemiología Veterinaria y Salud (DIVESA), por lo que la disminución en la producción ganadera se debe a las muertes causadas por el virus, representando pérdidas económicas de millones de dólares en la industria ganadera y al sector salud por el diagnóstico, investigación de mordeduras de animales, tratamientos, indemnizaciones por pérdida de ganado, cuarentenas, vacunas, mantenimiento de los laboratorios de diagnóstico y programas de control animal[4].

El virus de la rabia (RABV) es un *Lyssavirus* de la familia Rhabdoviridae que causa encefalitis y se propaga por contacto con la saliva infectada en piel o membranas mucosas a través de mordeduras o arañazos. La enfermedad la encontramos en dos ciclos: rabia urbana cuyo principal reservorio es el perro y en menor incidencia los gatos; y rabia silvestre siendo de esta última los reservorios más importantes: quirópteros, zorrillos y zorros. Existen dos formas clínicas de la enfermedad: furiosa y parálitica; siendo la rabia furiosa la más común en humanos con aproximadamente el 80% de los casos. El período de incubación es variable pero generalmente es entre 2 y 8 semanas. Los primeros síntomas incluyen fiebre, cambio en el comportamiento, dolor de cabeza, depresión, somnolencia, confusión y parálisis progresiva [5-7]. Una vez que aparecen los síntomas la enfermedad es siempre fatal, sin embargo es 100% prevenible mediante la vacunación, por lo que es importante poder tener un diagnóstico temprano y oportuno de la enfermedad.

Entre las técnicas utilizadas para el diagnóstico de RABV se encuentran: Direct Rapid Immunohistochemistry (DRIT), ELISA, Inhibición de focos fluorescentes (RIFFT), Cultivos celulares, entre otras. En el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Instituto de Salud del Estado de México (LESP-ISEM) se realiza el diagnóstico de Rabia por la técnica de inmunofluorescencia directa, la cual requiere de controles negativos y positivos que se obtienen mediante la técnica de inoculación en ratón lactante. En 2015 se registraron 14 casos positivos provenientes del Estado de México por lo que la generación de los controles es un punto crítico en la prueba diagnóstico.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. HISTORIA DE LA RABIA

De acuerdo a Baers (1991) la historia de la rabia se remonta desde antes de la época de Homero quien se piensa que se refirió a la enfermedad cuando en la *Ilíada* menciona que Sirius (el perro de Orión) ejercía una maligna influencia sobre la salud de los hombres. El perro fue asociado con los perros locos a lo largo de todo el este del Mediterráneo, Egipto y Roma. Los griegos la llamaban Rabia *Lyssa* o *Lytta* que significa locura. La enfermedad en los hombres fue descrita como hidrofobia en la que la persona enferma es atormentada al mismo tiempo con sed y miedo al agua.

La palabra en latín rabia viene del sanscrito “*rabhas*” que se traduce como “actuar con violencia”. Demócrito fue el primero en realizar un registro de rabia canina hace unos 500 años a.C., Aristóteles en el siglo 4 a.C. escribió en “*Natural History of Animals*” libro 8 capítulo 22, “*los perros sufrían de locura, la que causaba que se volvieran muy irritables y que todo animal que mordieran enfermaría*”. La infectividad de la saliva de perros rabiosos es descrita por Cardanus, un escritor romano. Por esa época lo romanos describían el material infeccioso como un veneno para el cual su palabra en latín es “*virus*”.

Otra causa de la rabia, mencionada por primera vez por Pliny y Ovid, es el llamado gusano de la lengua del perro. Para prevenir la enfermedad en esos tiempos se cortaba el frenillo lingual y se removía el pliegue donde se pensaba estaba el gusano, práctica que se mantuvo hasta el siglo XIX.

El primer gran brote de la enfermedad fue descrito en Franconia en 1271, ocasionada por lobos. En los años de 1759 a 1760 hubo un gran brote de la enfermedad en Londres y sus alrededores. En 1763 se reportó la enfermedad en Francia, España e Italia. Para 1768 la rabia era alarmantemente frecuente en Boston y otras ciudades de Norteamérica, reportándose la primer gran epizootia en Norteamérica ese mismo año. En 1803 aparece por primera vez en Perú e invade Chile en 1835.

Zinke fue el primero en demostrar que la rabia podía ser transmitida por saliva: tomaba saliva de un perro infectado tan pronto de que había sido sacrificado con ayuda de un pincel y luego la esparcía en incisiones que había hecho en la pata delantera de un dachshund de 1 año de edad. Según sus reportes el perro seguía en condiciones normales hasta el séptimo día, y en el octavo el perro dejaba de comer y beber, y permanecía echado en un rincón. Para el décimo día ya manifestaba rabia.

En 1826 Krugelstein escribió un libro describiendo cada fase de la rabia, él también pensaba que el agente causante era la saliva pero creía que el agente aparecía de nuevo bajo varias condiciones. Hasta ahora no se tenía idea de un agente vivo, sin embargo Krugelstein decía que la rabia era una enfermedad del sistema nervioso central, incluso afirmaba que si un nervio terminal era infectado con saliva de algún animal rabioso, éste enfermaba localmente y luego se diseminaba la enfermedad a lo largo de los nervios simpáticos hasta que llegaba al plexo celiaco donde el “veneno” afectaba a todo el sistema nervioso. De ahí se dispersaba vía medula espinal y alcanzaba su cumbre. Para 1860 el virus de la rabia se había dispersado por toda América y fue atribuida al gran número de perros callejeros.

Pasteur publicó su primer reporte de rabia durante 1881. Él llegó a la conclusión de que el sistema nervioso central y especialmente el bulbo raquídeo, el cual une la médula espinal al cerebro, tenían un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Después tuvo éxito produciendo rabia inyectando materia del sistema nervioso central y fluido espinal, demostrando así que la fuente del virus no era solamente la saliva. También encontró que si inoculaba materia cerebral de animales rabiosos directamente en el cerebro de perros el tiempo de incubación se acortaba a 1 o 2 semanas. Tiempo después señaló que la saliva no era una fuente satisfactoria del virus para trabajos experimentales ya que sus efectos eran inciertos y el tiempo de incubación podría ser muy largo. Diferenció entre rabia silenciosa, caracterizada por la parálisis, y la rabia furiosa en la cual el animal se ponía agresivo. Encontró que la inoculación en el sistema sanguíneo primero afectaba la médula espinal y que era más probable que produjera rabia paralítica, lo que es más descubrió que un animal que se había recuperado a los primeros síntomas de rabia, era inmune a posteriores exposiciones al virus y que algunos perros parecían tener inmunidad natural. Pasteur aporta el primer reporte detallado sobre un método de profilaxis en 1885 a la Academia de Ciencia.

Las primeras observaciones de la patogénesis de la rabia fueron hechas por Morgagni en su trabajo en 1769 en el que establece que el virus no parece ser transportado por las venas sino por los nervios. En 1903, Negri observó ciertos “microorganismos” en el asta de Ammon (tanto en perros como en humanos); aunque también en los ganglios espinales y en la médula espinal, cabe decir que en el asta de Ammon era donde se observaban en mayores cantidades. Los cuerpos de Negri como posteriormente se llamaron, son de varios tamaños y pueden ser observados mejor si se tiñen con eosina metileno azul.

En otro artículo, Negri usa la presencia de los cuerpos para el diagnóstico de la enfermedad. No fue hasta 1958 y con el uso de la técnica de inmunofluorescencia (IF), introducida por Goldwasser y Kissling, que se demostró que los cuerpos de Negri estaban asociados con el virus.

Un gran avance en el diagnóstico de rabia fue la inoculación de ratones (IR) de Webster y Dawson en 1935. Ellos encontraron que los ratones son más susceptibles a virus neurotrópicos y que la rabia se producía fácilmente inoculando de manera intracerebral, materia cerebral con cuerpos de Negri. La enfermedad podía ocurrir dentro de los primeros 7 días pero en algunos casos la incubación se prolongaba hasta 28 días. La prueba de los ratones se convirtió en la prueba estándar para todas las pruebas negativas de los cuerpos de Negri y actualmente se usa en los diagnósticos negativos en laboratorios que no usan IF.

En el siglo XX se descubrió un murciélago con rabia en Brasil. En 1936, Pawan mostró que los humanos que habían sido mordidos por murciélagos desarrollaban síntomas sensoriales en el sitio de la mordedura, seguido por parálisis y muerte.

La llegada de las técnicas con anticuerpos monoclonales, en la primera mitad de los años setenta por Milstein y Köhler [9], abrió las puertas en el estudio de los virus. Más recientemente la técnica se ha empleado en la epidemiología de la rabia para describir el origen geográfico de las variantes virales y para el estudio de la patogénesis [8].

## 2.2.GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD

La rabia es una enfermedad zoonótica que afecta a mamíferos. Es causada por el virus de la rabia (RABV) que afecta el sistema nervioso central, provoca encefalitis aguda y se propaga por contacto con la saliva infectada en piel o membranas mucosas a través de mordeduras o arañazos. El virus no puede traspasar la piel intacta pero se han documentado casos de infección por inhalación del mismo. La enfermedad la encontramos en dos ciclos: rabia urbana cuyo principal reservorio es el perro y en menor incidencia gatos; y rabia silvestre cuyos reservorios más importantes son: quirópteros, zorrillos y zorros. Existen dos formas clínicas de la enfermedad: furiosa y paralítica; siendo la primera la forma más común en casos humanos representando el 80% de los casos. El periodo de incubación es variable pero generalmente es entre 2 y 8 semanas, rara vez puede ser un período de 10 días o de años. Los primeros síntomas incluyen fiebre, cambio en el comportamiento, dolor de cabeza, depresión, somnolencia, confusión y parálisis progresiva. Una vez que aparecen los síntomas la enfermedad es siempre fatal sin embargo es 100% prevenible mediante la vacunación [5-7].

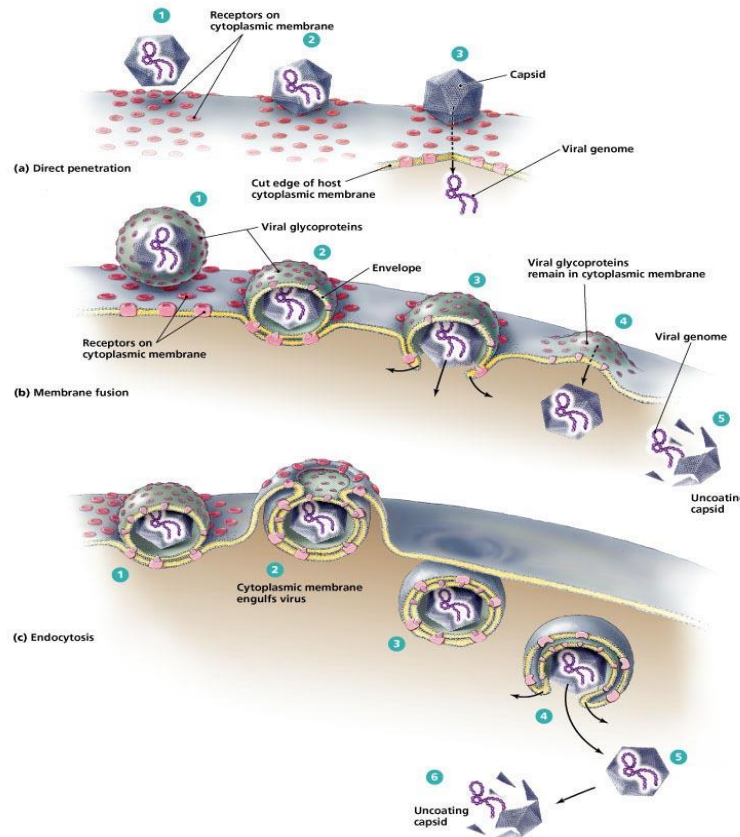
### 2.2.1. Virus

Los virus son elementos genéticos que no pueden replicarse independientemente de una célula viva por lo tanto son parásitos obligados. Pueden existir de forma extracelular e intracelular. En la primera son partículas que contienen ácido nucleico rodeado por proteínas y otras moléculas. En esta forma la partícula vírica se llama virión y es metabólicamente inerte, no obstante es la estructura en la que el genoma vírico se desplaza de una célula a otra. El genoma vírico es generalmente pequeño y codifica principalmente para aquellas funciones que los virus no pueden adaptar de sus hospedadores, puede ser de ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA) y de ahí subdividirse en monocatenario, bicatenario, lineal o circular[10].

Según Knipe y Howley (2001) los virus pueden dividirse en envueltos o no envueltos dependiendo si poseen capa lipídica o no. La mayoría de los virus envueltos obtienen su membrana al emerger a través de alguna membrana de la célula hospedera: membrana citoplasmática, membrana del Retículo endoplasmático (ER), el aparato de Golgi o membrana nuclear. Usando los mecanismos de compartimentalización de la célula, estos virus dirigen la inserción de sus glicoproteínas de superficie en la membrana en cuestión de la célula.

El brote del virus es dirigido ya sea por interacciones entre las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas y el ensamblaje o pre-ensamblaje de estructuras internas, por interacciones laterales entre las subunidades de glicoproteína, o por una combinación de ambos. En algunos casos el ensamblaje de una estructura interna en la cara citoplasmática de la membrana es suficiente para dirigir la salida del virus. Los lípidos de la bicapa resultante se derivan de la célula mientras que las proteínas son codificadas viralmente. Los virus que emergen a través de la bicapa lipídica contienen fosfolípidos y colesterol mientras que los que emergen del ER casi no contienen colesterol, el cual tiende a incrementar el grosor de la bicapa.

El primer paso para la infección requiere de la unión de proteínas virales a receptores específicos de la célula y en algunos casos también co-receptores o receptores secundarios. Después de esta unión hay al menos 2 mecanismos de entrada viral que se pueden distinguir por su requerimiento de un ambiente con pH bajo. El mecanismo de entrada independiente de pH ocurre supuestamente a pH neutro e involucra la entrada viral ya sea directamente en la membrana plasmática o desde dentro de endosomas seguido de la endocitosis del complejo virus-receptor. Por otro lado el mecanismo dependiente de pH involucra el tráfico de los complejos virus-receptor a endosomas con pH ácido, donde la alta concentración de protones sirve para facilitar la entrada (Fig. 1).



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig.1 Métodos de entrada de los virus a las células. Tomado de Robert W. Bauman (2014)

Hay dos vías endocíticas que permiten la absorción del virus de la superficie celular: una es dependiente de clatrina y la otra es independiente de clatrina. Los virus envueltos requieren de la fusión de su membrana con la membrana celular para entrar, y éste es un proceso que es dirigido por las glicoproteínas de la superficie del virus. Esta actividad es estrechamente regulada para prevenir una activación prematura durante la síntesis y el ensamblamiento del virus.

Los virus de RNA son los únicos organismos conocidos que utilizan RNA como material genético. Esto lo logran mediante la replicación de sus genomas de 2 maneras: la replicación del RNA o transcripción reversa (dependiendo si sus cadenas son positivas o negativas). Ambas rutas requieren de actividades enzimáticas que no se encuentran usualmente en las células hospedera sana y por lo tanto deben ser codificadas en el genoma viral y expresadas durante la infección.



Estos virus deben expresar sus genes como mRNAs (RNA mensajeros) funcionales temprano durante la infección para dirigir la maquinaria de traducción de la célula y producir las proteínas virales.

Mientras que los virus de DNA se replican en el núcleo de las células, los virus de RNA lo hacen en el citoplasma. El tipo de RNA genómico determina en gran parte si el primer paso de la síntesis de macromoléculas es la traducción, transcripción o la replicación del RNA. Los virus con sentido positivo ssRNA (single stranded RNA) entregan su RNA genómico directo a los ribosomas celulares y empiezan el ciclo infeccioso con la traducción, estos virus son infecciosos incluso cuando están completamente desproteinizados. Por otro lado los virus con genoma consistente en cadenas de sentido negativo ssRNA o de dsRNA (double stranded RNA) no son infecciosos por sí solos porque deben empezar el ciclo infeccioso transcribiendo el mRNA viral y las células que no están infectadas no poseen una RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) apropiada (Fig. 2) [11].

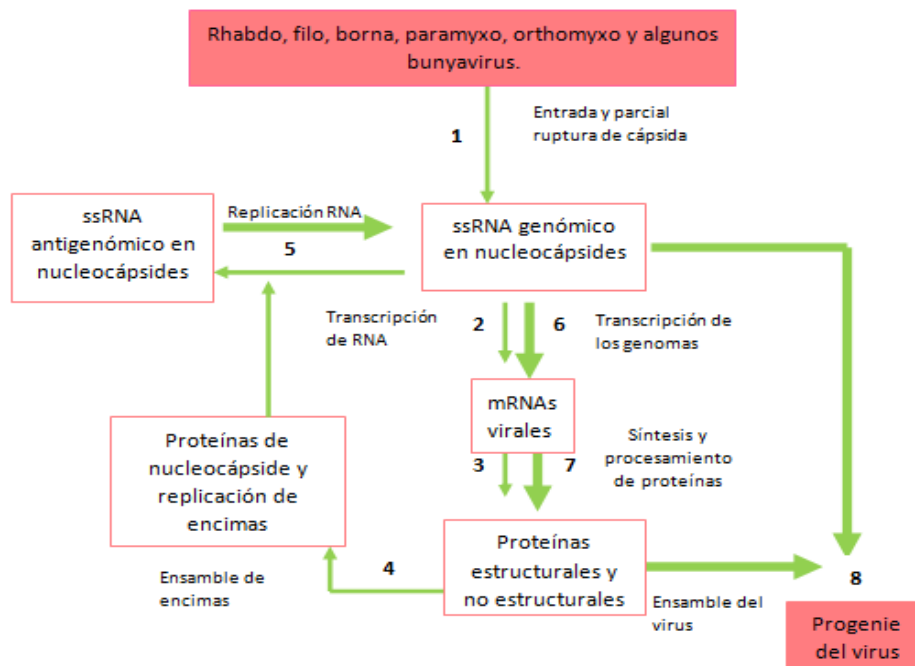


Fig. 2. Esquema de la replicación de los virus de RNA cadena negativa. Traducido de Knipe y Howley [2001]

### 2.2.1.2. El virus de la Rabia

RABV pertenece al género *Lyssavirus*, familia Rhabdoviridae, orden de los Mononegavirales[12]. Está compuesto por una cadena sencilla negativa de RNA genómico que contiene 5 genes que codifican, cada uno, para una proteína estructural del virión: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína (G) y polimerasa (L); en el orden 3'-N-P-M-G-L-5'[13]. El RNA y las proteínas N, L y P forman la nucleocápside helicoidal del virus mientras que las proteínas G y M forman la envoltura, siendo la proteína G la que proporciona las proyecciones como picos en la superficie del virus (Fig.4). Típicamente el virus de la rabia forma estructuras rígidas con forma de bala: redondeado de un lado y plano del otro (Fig.3). Llega a medir un promedio de 180 nm de largo y 75 nm de diámetro. Cada partícula contiene una nucleocápside con 30 a 35 espirales que forman la simetría cilíndrica de toda la partícula ya ensamblada. El largo total del genoma es de 11,932 nucleótidos[8].

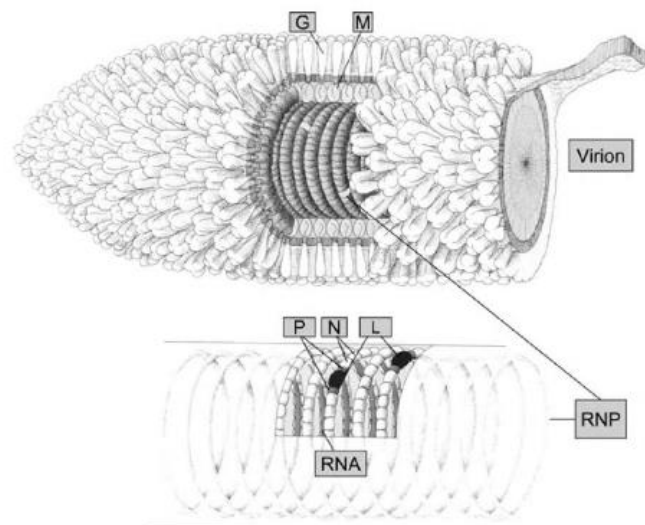


Fig.3 Representación del virión de la Rabia. Wunner y. Jackson [2007]

Cada gen está compuesto por una región codificante flanqueada por regiones no codificantes (**NonCoding RegionS**, NCRs) que a su vez están bordeadas por señales de iniciación de la transcripción (**Transcription Initiation SignalS** TISs): 3'-U-U-G-U-R-R-n-GA-5'; y por señales de terminación de la transcripción (**Transcription Termination Polyadenylation signals** TTP): 3'-A/U-C-U-U-U-U-U-U-U-G-5'.

Las TISs están conservadas en todos los *Lyssavirus*, pero ambas secuencias (TISs y TTP) modulan la actividad de la polimerasa durante la transcripción[14].

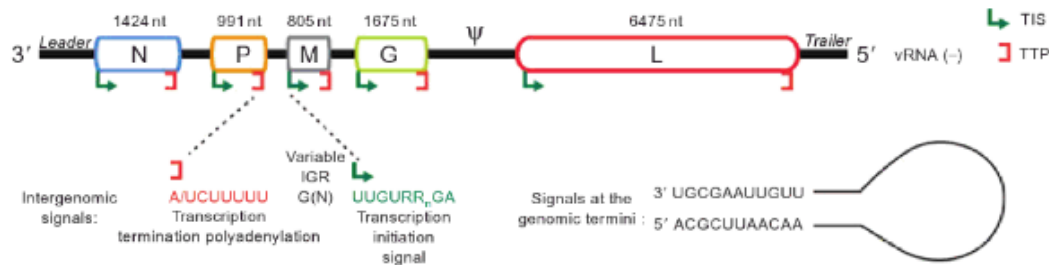


Fig.4 Organización del genoma de RABV.C. Jackson, A. [2010].

En los extremos 3' y 5' del genoma hay unas secuencias NCRs de 58 y 70 nucleótidos respectivamente, que son la secuencia líder (Le) y la tráiler (Tr). La secuencia líder sirve como promotor o señal para el reconocimiento por la RNA transcriptasa (L y P)[15]. Las secuencias Le y Tr son inversamente complementarias, esto es característico de los Mononegavirales[14]. Como el genoma es de sentido negativo RABV debe cargar con una RdRp en el virión. Esta RdRp está compuesta por las proteínas L y P del virus [11].

- Nucleoproteína (N): es una proteína de 2 dominios (Fig.5), por sí sola en células bacterianas y eucariotas, se une al RNA celular y forma complejos helicoidales N-RNA o bien anillos de N-RNA muy cerrados. El RNA es reconocido a través de la cadena principal de azúcar-fosfato mediante interacciones electrostáticas. Esto sugiere que ésta estructura mantiene almacenado el RNA de forma que lo protege de RNAsas celulares y de factores que reconocen ácidos nucleicos extraños para iniciar con la producción de interferones[14]. Ésta es la proteína blanco para las pruebas diagnósticas: Inmunofluorescencia directa, RREID (**R**apid **R**abies **E**nzyme **I**mmuno**D**iagnosis), dRIT (direct rapid Immunohistochemical test)

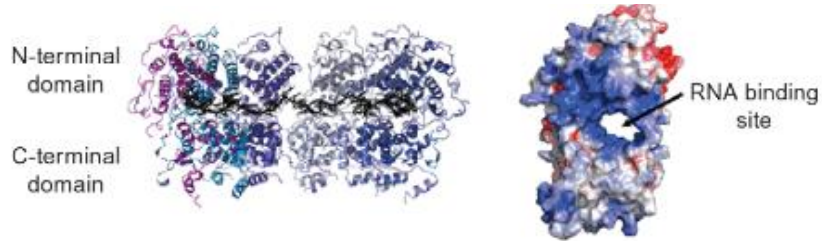


Fig. 5 Dominio N-terminal y C-terminal de la proteína P. A la derecha, se puede observar la cavidad entre los dominios donde se unirá el ARN. C. Jackson, A. [2010].

- Fosfoproteína (P): Esta proteína contiene 2 dominios:  $\text{NH}_2$  –terminal y  $\text{COOH}$ -terminal. La región N-terminal interactúa con la proteína L y muy débilmente con la proteína N. El dominio C-terminal tiene un sitio de unión fuerte con N-RNA[16]. Algunos experimentos de proteólisis muestran que si retiras este dominio de N, evitas la unión de P a N-RNA. La proteína P en combinación con la L forman el complejo transcriptasa-replicasa. P es fosforilada por caseína quinasa II en los residuos de serina y treonina localizados en el extremo N-terminal, esta reacción es requerida para generar la actividad polimerasa. La fosfoproteína forma trímeros después de la fosforilación y sólo después de esa reacción es capaz de unirse a la proteína L y al complejo N-RNA para formar la transcriptasa activa.[11]
- Proteína L: Componente enzimático del complejo polimerasa L-P y es responsable de la adición de nucleótidos a la cadena sintetizada de RNA[14]. Como en otros *Rhabdovirus*, la RNA polimerasa es el polipéptido más grande con un peso molecular de 244,206 Da. Sin embargo el número de moléculas de la proteína L por virión es muy pequeña en comparación con las otras proteínas estructurales. Además el número de moléculas de proteína L varía entre las diferentes cepas del virus[8].
- La proteína M es una pequeña proteína interna no glicosilada que da la pauta para que la envoltura viral forme una capa interna entre la envoltura y la nucleocápside[15]. También es la responsable de la salida del virus. Hay 3 características que son importantes en esta proteína para que pueda haber un correcto desprendimiento del virus: habilidad para interactuar con la bicapa lipídica, habilidad para formar homo-oligómeros y la presencia de dominios “tardíos” (L-dominios) que medien la separación del virus de la célula.

Estos dominios interactúan con proteínas de la célula hospedera, componentes de la vacuola y del complejo endosomal requerido para el transporte.

- Glicoproteína: interactúa con receptores de la célula hospedera y es responsable de neutralizar la formación de anticuerpos. Esta proteína tiene 4 dominios: péptido señal, ectodominio (responsable de patogenicidad), péptido transmembranal y el citoplasmático. Esta proteína es sintetizada en retículo endoplasmático y liberada en membrana citoplasmática.

Las otras proteínas se expresan en el citoplasma y libres de polirribosomas[14].

#### 2.2.1.3. Estados de la Replicación

Baers sugiere que el virus se replica en fibras musculares antes de invadir sistema nervioso. El virus se une a la célula mediante la interacción de la glicoproteína (G) con receptores de la superficie de la célula hospedera. Se ha propuesto que el receptor de acetilcolina sirve como receptor en las células hospederas para el virus de la rabia [8]. Una vez unido, el virus es endocitado a través de la vía dependiente de clatrina [11]. Las subsecuentes reducciones de pH (la capacidad del virus para entrar a la célula depende de que el pH en la vesícula endosomal sea bajo) en el compartimiento endosomal eventualmente desencadenan la fusión de la membrana del virión con la membrana endosomal. Esta reacción es catalizada por la proteína G y resulta en la liberación del contenido viral (RNP ribonucleoproteína) en el citoplasma de la célula [8,11].

Una vez desnudado el virus, se transcribe una copia de RNA para producir mRNAs monocistrónicos complementarios, es decir de cadena positiva, que representen cada uno de los cistrones (genes) en el genoma[8]. En este punto el complejo P-L accede al RNA viral reconoce un promotor en 3' y empieza a realizar los transcritos: Le, N,P,M,G,L; de los cuales todos a excepción de Le poseen la caperuza de G y la cola poli A[14].Estos mRNAs son entonces traducidos para crear proteínas utilizando la maquinaria de la célula hospedera[8]. El complejo P-L ahora produce una cadena positiva de RNA y se une N para formar la nucleocápside[14].

Los mRNAs de las proteínas N, M, P y L son traducidos sin unirse a ribosomas, mientras que la proteína G se une a ellos y pasa al retículo endoplasmático y posteriormente al aparato de Golgi. De aquí, empieza la conformación del complejo viral RNP y ensamblaje del virus, que continúa mientras la célula hospedera siga metabólicamente activa.

La morfogénesis del virus de la rabia en células infectadas es asociada con la formación en el citoplasma de una sustancia o matriz filamentosa, que constituyen los cuerpos de Negri que precede la formación de las partículas víricas[8]. Dentro de estos cuerpos se lleva a cabo la transcripción y replicación.

RABV regula su expresión viral de tal forma que produce los componentes necesarios para su propagación pero no tantos como para que esto afecte la supervivencia de la célula y también para poder evadir de la respuesta antiviral de la célula [14].

El ensamblaje del virus comienza con la encapsidación del vRNA (RNA viral) y la formación de RNP (ocurre en el citoplasma), esto es cuando se adiciona la proteína N al extremo 5' del vRNA y se forma el complejo vRNA-N-P.

Conforme se van acumulando N y P, van formando complejos homólogos y heterólogos. N en grandes concentraciones tiende a formar agregados consigo mismo, lo que forma los cuerpos de Negri. Cuando P interactúa con N en una proporción 1:1 evita que N forme agregados consigo misma y la mantiene soluble para eficientar la encapsidación del RNA durante la replicación. Aún no se sabe con exactitud cómo es que se adiciona la proteína L pero estudiando el comportamiento de otros virus de cadena negativa se piensa que la proteína P media esta acción [15]. Después de la encapsidación, el complejo RNP se asocia con la membrana plasmática, siendo la proteína M la siguiente en asociarse al complejo RNP encargándose de condensar todo el material, seguida por la proteína G. La interacción entre la proteína M y G es esencial para la formación del virus ya que si no existiera, el empaquetamiento sería ineficiente y el virus no sería infeccioso (Fig.6)[11,15].

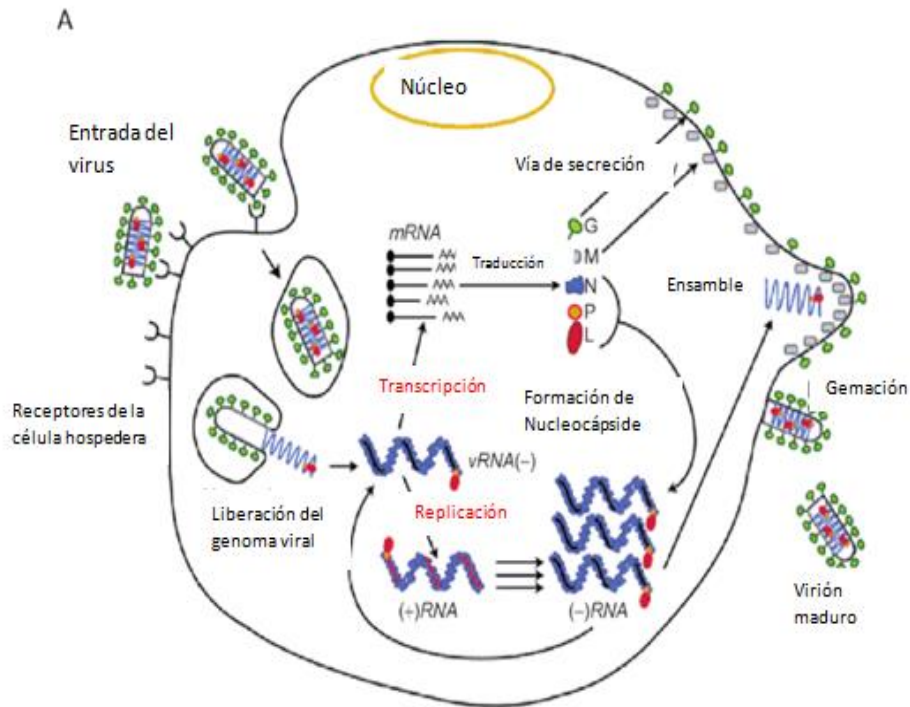


Fig.6. Ciclo Viral. Traducido de C. Jackson, A. [2010].

La replicación inicia en el sitio de inoculación y posteriormente se lleva a cabo en nervios periféricos (la diseminación ocurre célula-célula mediante los axones y la sinapsis) y se dispersa a CNS mediante transporte retrógrado o centrípeto, desde el cual llega a la médula espinal, tálamo, hipocampo y cerebelo, para finalmente infectar los demás órganos de manera centrifuga[16].

### 2.3. DIAGNÓSTICO

La OMS define como caso clínico de rabia a *“cualquier sujeto que presente un síndrome neurológico agudo dominado por hiperactividad o parálisis progresiva que lleve hacia un coma o la muerte, usualmente por fallo cardíaco o respiratorio, dentro de los primeros 7-10 días después de haber presentado el primer síntoma”*

Se puede utilizar uno o más de los siguientes criterios para la confirmación de la presencia del virus de la rabia:

- Presencia de antígenos virales
- Aislamiento del virus en cultivo de células o en animales de laboratorio
- Presencia de anticuerpos específicos del virus en fluido cerebroespinal o en suero de una persona no vacunada o la presencia de ácidos nucleicos virales en muestras colectadas post mortem[17].

Las muestras requeridas para el diagnóstico pueden ser: biopsia de cuero cabelludo, improntas de córnea, saliva, líquido cefalorraquídeo y suero sanguíneo si la prueba es ante mortem; para pruebas post mortem lo ideal es obtener el encéfalo completo.

### 2.3.1. Pruebas de laboratorio

#### 2.3.1.1. ELISA

Esta técnica se realiza para la detección de anticuerpos, generalmente para el personal de laboratorio. Utiliza la proteína G antirrábica purificada para medir la cantidad de anticuerpos neutralizantes del virus en las diferentes especies. La OMS considera que una titulación de anticuerpos iguales o superior a 0.5 UI/ml en suero es suficiente para estar protegido contra el virus[1].

Una variante de esta técnica es la prueba RREID por sus siglas en inglés **Rapid Rabies Enzyme ImmunoDiagnosis**, que fue diseñada para tener una prueba diagnóstica rápida, sensible y específica para rabia en laboratorios que no pudieran realizar la inmunofluorescencia ya que los resultados se pueden observar a simple vista sin necesidad de un microscopio.

Una ventaja de esta técnica es que puede escanear un número grande de especies lo cual es útil para encuestas epidemiológicas. Se basa en la detección del antígeno de la nucleocápside del virus de la rabia y para hacerlo reaccionar se utiliza la misma IgG conjugada con peroxidasa [8, 6].



#### 2.3.1.2. Anticuerpos monoclonales

Permiten identificar las variantes antigénicas del virus de la rabia que existen en determinadas áreas geográficas. Se producen por hibridomas de células de mieloma de ratón fusionados con esplenocitos de ratones inmunizados con el virus, estos hibridomas secretan anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína G del virus. El procedimiento se fundamenta en la utilización de 8 anticuerpos que se hacen reaccionar con la muestra de interés por separado y la reacción se hace evidente con un anticuerpo anti-ratón marcado con fluoresceína que se va a unir específicamente a los monoclonales. La prueba puede tardar de 15 -40 días, debido a que previamente se debe propagar la muestra de interés en ratones lactantes o líneas celulares de neuroblastoma[1,6].

#### 2.3.1.3. Inhibición de focos fluorescentes RIFFT

Es una prueba de Neutralización de suero, es decir que mide la habilidad o el nivel en que los anticuerpos específicos para rabia inhiben el virus en células infectadas. Estos anticuerpos se llaman anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia RVNA y en general la prueba nos va a dar una medida de la respuesta inmune al virus[19]. Consiste en incubar diluciones sucesivas de los sueros a titular y un suero de referencia cuyo título en UI/ ml es conocido, con una dosis constante de virus. A continuación se agrega una suspensión de células sensibles (BHK o BSR). Después de 24h. de incubación se podrá apreciar la diferencia en el número de focos de infección entre las celdillas que recibieron el suero de referencia y aquellas que han recibido los sueros desconocidos. La disminución del título infeccioso permite calcular el título de los sueros desconocidos por comparación con el suero de referencia. Es el método más usado en los países desarrollados y permite obtener resultados en 26 h. teniendo una sensibilidad equivalente al test de la seroneutralización [19].

#### 2.3.1.4. dRIT (Direct Rapid Immunohistochemical Test)

Se realiza en improntas de tejido cerebral. El antígeno viral aparece coloreado en magenta mientras que el resto del tejido neuronal es azul. Esta prueba puede ser utilizada para fortalecer la vigilancia de campo en fauna sospechosa[3,21].

#### 2.3.1.5. Detección de antígenos

Se puede hacer mediante técnicas histológicas como el método de coloración de Sellers a través de la observación de ciertas inclusiones (corpúsculos de Negri) que se pueden observar en el citoplasma de las neuronas. Esta tinción muestra a los corpúsculos diferenciados en un color magenta –rojo brillante, toda la célula nerviosa se colorea de azul y el tejido intersticial en color rosa. Sin embargo es un método muy lento y no asegura resultados confiables ya que si no hay presencia de los cuerpos de Negri (que se han encontrado principalmente en asta de Ammón) no puede determinar si el resultado es positivo o no, también debe tomarse en cuenta que puede haber reporte de “falsos” cuerpos de Negri lo que nos daría un resultado falso-positivo[8,22]. Por lo anterior la prueba de inmunofluorescencia directa la ha sustituido ya que es rápida y fácil de realizar.

#### 2.3.1.6. Técnica de inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia es una técnica utilizada para visualizar la distribución de una proteína o antígeno específico en células o secciones de tejido para dirigir marcadores fluorescentes a las biomoléculas diana de forma específica[23]. Se basa en la observación microscópica bajo luz ultravioleta de impresiones de secciones de tejido nervioso o de cerebro después de haber sido tratados con suero antirrábico o con globulina conjugada con isotiocinato de fluoresceína para detectar epítomos de la proteína N del virus de la rabia. La reacción antígeno-anticuerpo es visible al observar la muestra en un microscopio de epifluorescencia que al emitir luz UV sobre la reacción, producirá una luz característica verde manzana[24]. Los resultados los obtienes en 30 minutos después de haber recibido la muestra pero para fines rutinarios en los laboratorios los tienes en 2-4 horas[6]. El procedimiento se encuentra descrito en la Fig.7.

Para esta técnica se aceptaran las siguientes muestras: biopsia de cuero cabelludo, impronta de córnea, encéfalo completo, LCR (líquido cefalorraquídeo) e hisopo sublingual, estas dos últimas deben someterse a un método previo: aislamiento del virus en ratón lactante [3,24].

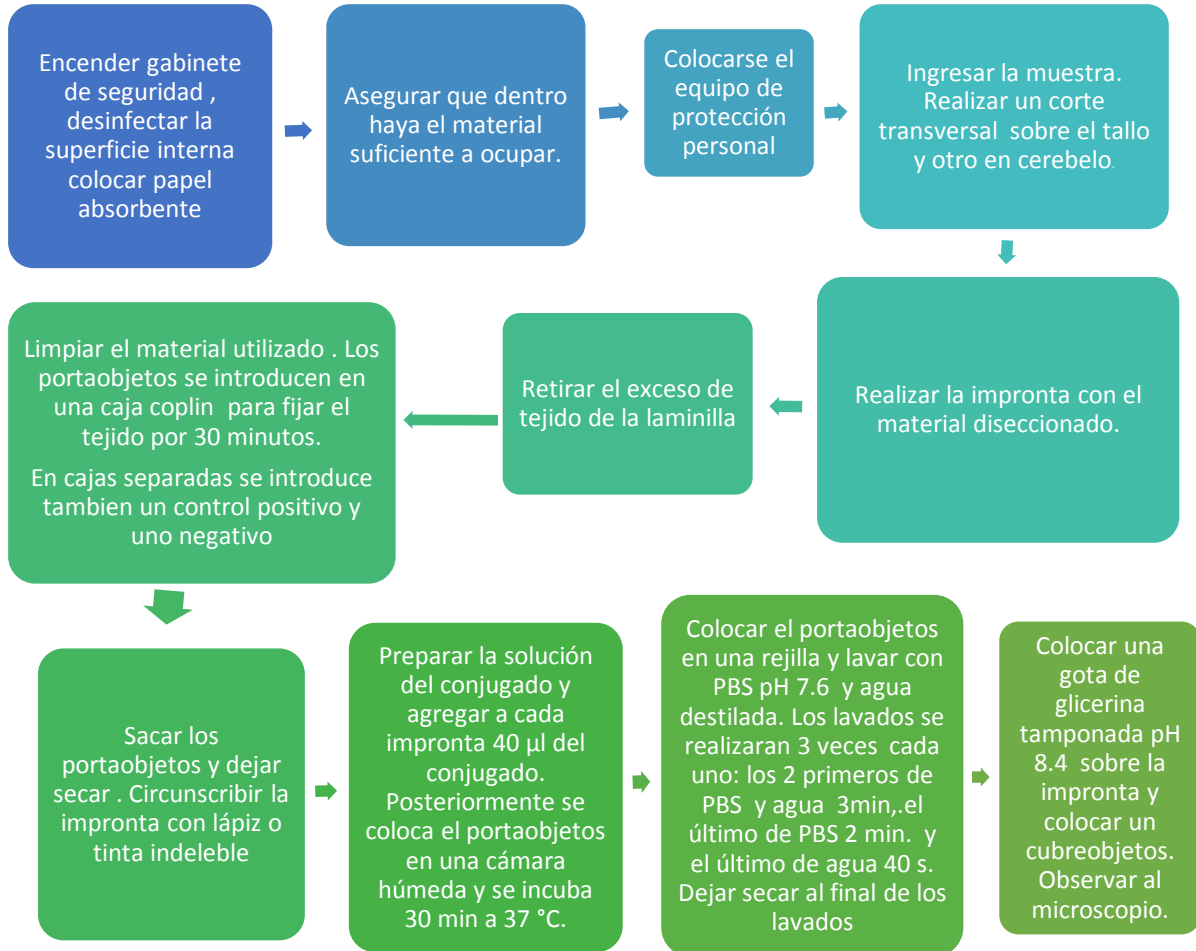


Fig. 7 Proceso general de Inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de Rabia. Datos tomados del Manual de calidad de Rabia del LESP-ISEM (2015)

El resultado de la prueba se clasifica dependiendo de la distribución del antígeno sobre el tejido, la intensidad del brillo y color de la fluorescencia presente (Tabla 1).

Tabla 1 Puntos a considerar para la clasificación de resultados obtenidos por IFD para el diagnóstico de RABV.

Atributos a considerar	Negativo	Positivo			
		1+	2+	3+	4+
Distribución	Ausencia de inclusiones con fluorescencia específica	Inclusiones de forma y tamaño variable presente en <10% de los campos	Inclusiones de forma u tamaño variable presente en 10 a 50% de los campos examinados	Inclusiones de forma, tamaño y cantidad variable en casi todos los campos	Infiltración masiva de inclusiones de forma y tamaño variable, en más del 90% de los campos
Intensidad	Se observa el tejido de un color rojizo oscuro. Sin brillo de fluorescencia específica	Intensidad débil notablemente opaca	Intensidad débil	Intensidad disminuida con ligera pérdida de reflejos	Intensidad alta semejante a un color verde manzana brillante

La prueba solo será válida si el control positivo presenta una distribución de antígeno correspondiente a 4+ y una intensidad de 3+ o 4+. En el control negativo no debe haber presencia de fluorescencia[24].

#### 2.3.1.7. Técnicas para el aislamiento del virus

La base del diagnóstico viral es la detección del virus o de sus componentes. El aislamiento viral es la técnica estándar ya que permite identificar al organismo, realizar estudios de sensibilidad a antibióticos y antivirales y tipificar el microorganismo con fines epidemiológicos [25,26].

Puede ser en cultivo celular o mediante la inoculación orbi-intracraneal en ratones. El cultivo de células reduce el tiempo de diagnóstico de 10-21 días con la prueba de inoculación de ratones a solo 1-2 días. Por otro lado la inoculación en animal requiere generalmente de ratones lactantes ya que son más susceptibles al virus que los ratones adultos. Los resultados pueden observarse a partir de los 14-21 días después de la inoculación[17]. Aunque la inoculación en ratones es lo recomendado, a falta de estos animales también se puede usar conejos, puerco de guinea, ratas y hámster. La identificación virus por cualquiera de las dos técnicas se realiza por una prueba de neutralización del virus pero se puede realizar más rápidamente usando la Inmunofluorescencia directa[8].

##### 2.3.1.7.1. Cultivo celular

Se han evaluado diferentes tipos celulares, siendo las células de neuroblastoma murino más susceptibles al virus, pero también se pueden emplear las líneas celulares BHK-21(células de riñón de hámster) y CER (células embrionarias de pollo) [17].

El mantenimiento y propagación de la línea celular de neuroblastoma murino, utilizada para el aislamiento del virus de rabia, se lleva a cabo utilizando medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios tales como vitaminas, aminoácidos, sales inorgánicas y glucosa que permiten que las células sobrevivan. Las células en cultivo, se mantienen como monocapa en condiciones estériles de temperatura (37°C) y concentraciones de CO<sub>2</sub> (0.5%) adecuadas para su desarrollo [18].

#### 2.3.1.7.2. Inoculación de ratón lactante

Esta técnica debe llevarse a cabo en conjunto con la técnica de inmunofluorescencia. Para la elección del tejido a examinar se puede usar tanto encéfalo como glándulas salivales, para estas últimas es más probable que se encuentre el virus en las submaxilares y conviene desmenuzar el tejido y después tritararlo. El diluyente a utilizar puede ser una solución salina fisiológica con suero animal, que es el más utilizado, pero también puede utilizarse leche descremada y albúmina de suero bovino en solución salina amortiguada. Para mantener la esterilidad bacteriana puede agregarse al diluyente estreptomycin y penicilina en cantidades suficientes para alcanzar concentraciones de 1,560 UI de la primera y 500 UI de la segunda. Es recomendable dejar reposar la suspensión 30 minutos antes de inocular. Las jeringas deben medir exactamente 0.03ml (dosis única para ratón), las agujas deben ser de calibre 26 o 27(0.40-0.45mm) y de 1-1.5 cm de longitud para evitar traumatizar el tejido encefálico[22].

Inóculo es el sobrenadante clarificado de un homogenizado de material encefálico al 10-20% en un diluyente con solución isotónica tamponada que contenga antibióticos.

Preparación del inóculo:

- a. Tomar fragmentos del encéfalo de 0.5g. de peso y colocarlos en un tubo con 2.5ml del diluyente para suspensión viral y macerar el tejido hasta obtener una solución homogénea.
- b. En caso de muestras de LCR, saliva e hisopo conjuntival, la suspensión se prepara agregando 0.5-1ml de la muestra.
- c. Centrifugar la suspensión a 2,500rpm durante 15 minutos a 5°C
- d. Separar el sobrenadante para realizar la inoculación y el sedimento se coloca en un tubo previamente identificado y etiquetado y se almacena a -70°C.

El proceso para la inoculación es el siguiente:

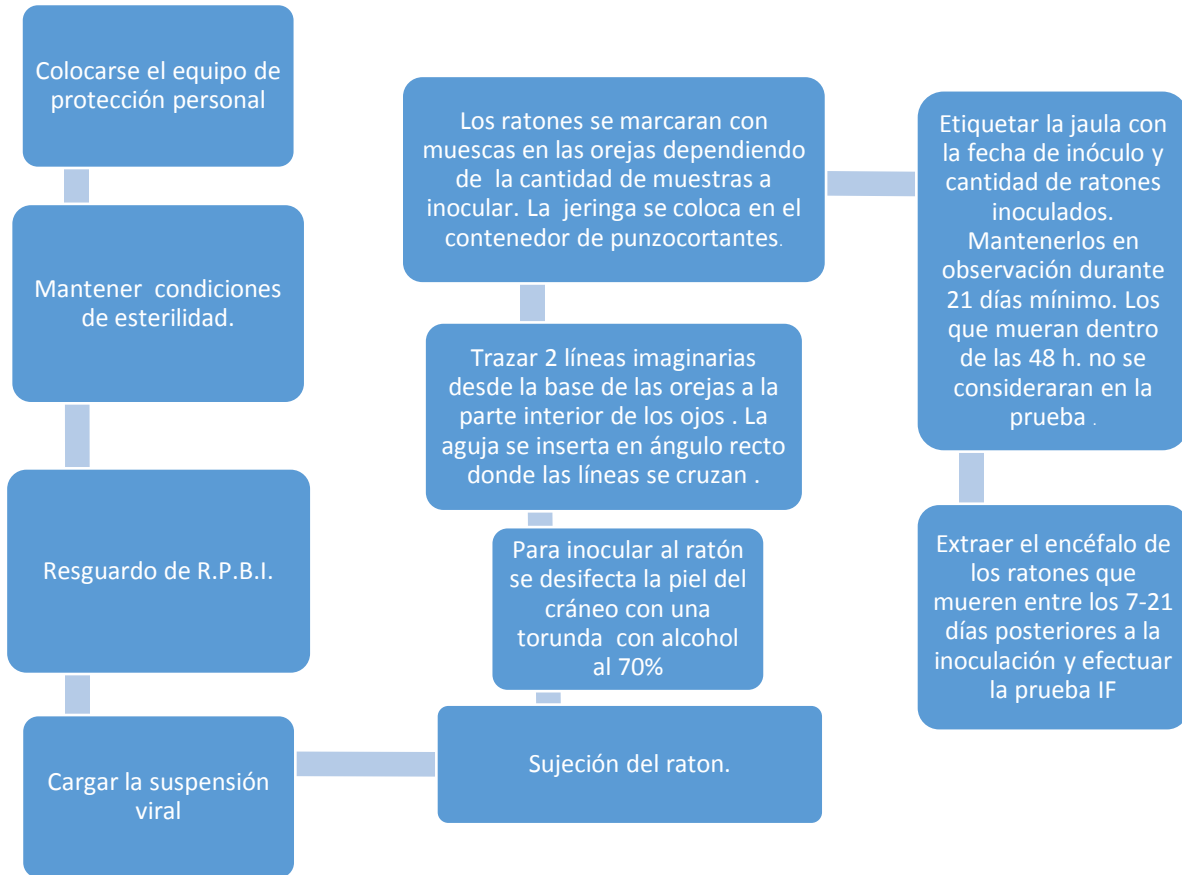


Fig. 8 Proceso general de inoculación del virus de la rabia en ratón lactante. Datos tomados del Manual de Calidad de Rabia del LESP-ISEM (2015)

Cabe destacar que la obtención de controles positivos y negativos también se realiza mediante esta técnica a partir de una muestra ya dada como positiva y negativa respectivamente[24].

Para el diagnóstico post mortem, la OMS recomienda el uso de la técnica de inmunofluorescencia directa en el 95-99% de los casos ya que se obtienen resultados confiables y en pocas horas; sin embargo existen otros métodos como la prueba de inmunohistoquímica DRIT (*Direct Rapid Immunohistochemistry*) que se ha visto tiene la misma sensibilidad y especificidad que la inmunofluorescencia. El diagnóstico ante mortem mediante técnicas *intra-vitam* es más difícil porque depende de qué tanto se haya diseminado el virus a través del sistema nervioso y la sensibilidad de estas pruebas también va a depender de la etapa de la enfermedad[6].

#### 2.4. EPIDEMIOLOGÍA E IMPACTO EN SALUD PÚBLICA

La Rabia en Humano se encuentra en más de 100 países y territorios donde cada año mueren de rabia más de 55,000 personas en todo el mundo. Es una enfermedad presente en todos los continentes (más del 95% de las muertes humanas se registran en Asia y África) menos la Antártida[1].

En América la rabia humana transmitida por animales silvestres es considerada como un problema de salud pública. En nuestro país podemos encontrar dos ciclos: rabia urbana cuyo principal reservorio es el perro y en menor incidencia el gato; y rabia silvestre siendo de esta última los reservorios más importantes: quirópteros, zorrillos y zorros. Según reportes del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) de 2003 a 2014 el 91.9% de los casos reportados fueron de personas agredidas por perros mientras que sólo el 8.2% fueron agredidas por otros mamíferos[2]. En la década de los 90's, la rabia en humanos se redujo drásticamente por las acciones emprendidas por el Programa Nacional de Control de la Rabia de México. En el país, la rabia en humano disminuyó de 69 casos en 1990, de éstos 62 ocasionados por perro, a un solo caso en el 2003. Sin embargo, la presencia de rabia en la fauna silvestre sigue siendo de preocupación, puesto que casi todos los años, se registra al menos un caso en humanos transmitido por animales silvestres[1]. En el periodo de 2000-2015 se tienen registros de 47 casos de rabia humana de los cuales el 89% (42 casos) fueron por agresiones de animales silvestres (principalmente murciélago y zorrillo)(Fig.9) [2].



Fig. 9 Casos de rabia humana por animales silvestres reportados a nivel nacional durante los años 2000-2015. Datos tomados de CENAPRECE (2015)



La rabia transmitida por murciélagos hematófagos prevalece en los estados de Hidalgo, Chiapas y Tabasco, donde afecta de manera importante a la ganadería[1]. Dentro de la ganadería no solo los bovinos son la especie de mayor riesgo, otras especies como son: porcinos, ovinos, caprinos y equinos también son susceptibles.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) señala que la rabia transmitida por murciélago hematófago se encuentra en 24 estados de la República que van desde el sur de Sonora por la costa del Pacífico hasta Chiapas, y desde el sur de Tamaulipas hasta la península de Yucatán; regiones donde las condiciones ecológicas favorecen la presencia de los murciélagos. La información de los focos rábicos indica que la prevalencia promedio fue de 3.86% durante 2000-2006. El 67% de la población ganadera se encuentran localizados en áreas endémicas de murciélago vampiro según los reportes del Sistema Nacional de Epidemiología Veterinaria y Salud (DIVESA), por lo que la disminución en la producción ganadera se debe a las muertes causadas por el virus, representando pérdidas económicas de millones de dólares en la industria ganadera y a su vez al gobierno y a las personas por el diagnóstico, investigación de mordeduras de animales, tratamientos, indemnizaciones por pérdida de ganado, cuarentenas, vacunas, mantenimiento de los laboratorios de diagnóstico y programas de control animal[4].

En México se han implementado diversos programas para la erradicación del virus de la Rabia como las campañas permanentes y a las Semanas Nacionales de Vacunación Antirrábica Canina establecidas por la Secretaría de Salud (SSA) a partir de 1990 y también se cuenta con un marco legal robusto: Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994 Para la vigilancia epidemiológica, Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002 Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano; Norma Oficial Mexicana NOM-042-SSA2-2006 Prevención y control de enfermedades. Especificaciones sanitarias para los centros de atención canina; Norma Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995 Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica y la NOM-011-SSA2-2011 Para la prevención y control de la rabia humana y en los perros y gatos[27,28].

Además se cuenta con otras instituciones que ayudan en la vigilancia epidemiológica como la Dirección General de Sanidad Animal (DGSA) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La rabia es una enfermedad mortal a corto plazo que tiene repercusiones no solo en el sector salud sino también en el sector agropecuario implicando pérdidas monetarias para todo el gobierno de nuestro país. La literatura maneja la obtención de resultados mediante la técnica de inoculación de ratones lactantes en un lapso de 14-21 días post inóculo siendo lo más aceptado el periodo de los 21 días.

El presente trabajo se realizó debido a que el tiempo que lleva la obtención de controles positivos permite que la enfermedad se establezca y se manifiesten los síntomas en el ratón, lo cual no es necesario ya que lo que se busca sólo es la presencia del virus lo que podemos determinar mucho antes de que se presente la sintomatología. Por otro lado aunque la técnica es de uso general en todos los laboratorios, no hay reportes que indiquen el tiempo en que se puede obtener un control con los diferentes grados de positividad, que se puedan usar como referencia en el diagnóstico sin que afecte la sensibilidad y especificidad de la técnica (95-99%).

## 4. HIPÓTESIS

Es posible llevar a cabo la obtención de controles positivos para el diagnóstico de rabia mediante la técnica de inoculación en ratón lactante en un lapso menor a los 21 días post inoculación, tiempo durante el cual se establece la infección y se puede obtener controles positivos con carga viral baja (1+) y carga viral alta (4+). La determinación de este lapso permitirá reducir el período de convalecencia del ratón.

## 5. OBJETIVO

### GENERAL

- Determinar el tiempo transcurrido post-inoculación de un pase seriado para la obtención de controles positivos 1+ y 4+ utilizados en el diagnóstico de rabia mediante la técnica de inoculación en ratón lactante.

### PARTICULARES

- Evaluar diferentes tiempos en la toma de muestra para obtener controles positivos 1+ post inoculación.
- Evaluar diferentes tiempos en la toma de muestra para obtener controles positivos 4+ post inoculación.
- Mejorar la calidad de vida de los ratones utilizados en la técnica reduciendo el tiempo de convalecencia.

## 6. MATERIALES Y MÉTODO

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Rabia del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Instituto de Salud del Estado de México (LESP-ISEM), durante los meses de febrero a junio de 2016. La determinación del tiempo para la obtención de controles positivos se realizó mediante las técnicas de prueba biológica del virus de la rabia en ratones lactantes e inmunofluorescencia directa, siguiendo los lineamientos establecidos en el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en Humano emitido por la Dirección General de Epidemiología y el Manual de Calidad de Rabia del LESP-ISEM. El experimento se realizó por triplicado desfasados en tiempo debido a la dificultad para la obtención de una camada numerosa; se utilizaron camadas de ratones BALB-C de entre 8-10 días de nacidos, el inóculo se realizó con una muestra testigo positivo de virus rábico pase 30 (CVS ATCC VR-321). Y los sacrificios iniciaron desde las 24 h. hasta las 216 h. post inóculo.

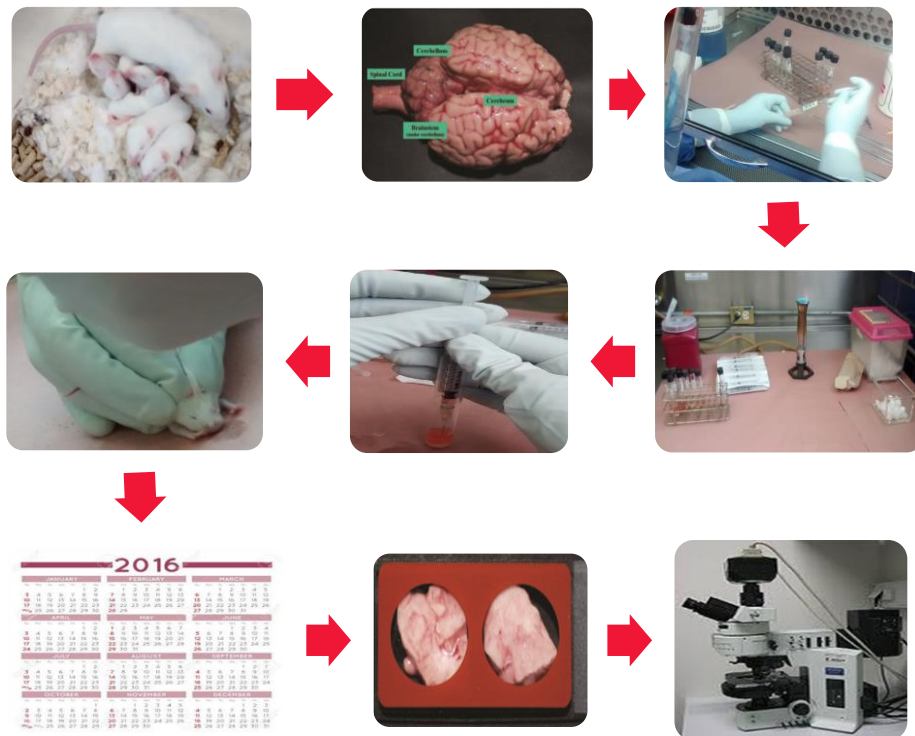


Fig. 10 Metodología general empleada

### 6.1. Prueba biológica en ratón lactante

Para la preparación del inóculo se encendió el gabinete de seguridad y se desinfectó con una solución de etanol al 70 % en benzal y se colocó papel absorbente sobre la superficie de trabajo. Se colocó un frasco con una solución de cloro, agitadores de vidrio y una gradilla con el tubo del diluyente, previamente preparado como indica el manual del laboratorio; y una muestra positiva (pase 30) para realizar el inóculo.

Haciendo uso del equipo de protección personal: guantes de nitrilo debajo de los guantes de látex, bata desechable, cubrebocas y mascarilla; se procedió a tomar la muestra con ayuda de un abatelenguas cortado a la mitad de manera vertical, y colocarla en el tubo del diluyente que se etiquetó con el número de pase de la muestra, y se maceró con el agitador de vidrio hasta obtener una mezcla más o menos homogénea. El agitador se colocó en el frasco con la solución de cloro y el abatelenguas utilizado se desechó en una bolsa roja de R.P.B.I. junto con el papel absorbente. El gabinete de seguridad se desinfectó con la solución de alcohol al 70% en benzal. Los guantes de látex se retiran dentro del gabinete de forma que uno quede dentro del otro y se desechan también en la bolsa roja de R.P.B.I.



Fig. 11 Preparación del inóculo. Laboratorio de Rabia LESP-ISEM

El tubo con el inóculo se llevó a la centrifuga, se procedió a balancear el peso y se centrifugó la suspensión a 2,500rpm durante 15 minutos a 5°C.

Durante ese tiempo se desinfectó la mesa de trabajo con solución de alcohol al 70% en benzal y se colocó papel absorbente fijándolo a la mesa con cinta adhesiva. Se dispuso un mechero, una jaula con algodón para la recuperación de los ratones, jeringas de insulina, tubos de ensaye estériles, un bote rojo para los desechos de punzocortantes, torundas y la jaula con los ratones a utilizar.

Una vez centrifugado el inóculo se llevó a la mesa de trabajo y se procedió a realizar la inoculación usando nuevamente todo el equipo de protección personal: bata desechable, doble guante, cubrebocas y mascarilla.



Fig. 12 Mesa de trabajo para la inoculación. Laboratorio de Rabia LESP-ISEM

Cerca del mechero encendido se abre el tubo con el inóculo y cuidando de no tocar el sedimento, se carga la jeringa colocándola dentro de un tubo de ensaye para evitar contaminación aérea. Se tomó el ratón por la parte distal de la cola con el dedo pulgar e índice y posteriormente con los dedos anular y meñique se sujetó la base de la cola, liberando el dedo índice y pulgar para inmovilizar la cabeza y el cuello sosteniendo al ratón por el dorso. Se tomó una torunda y se desinfectó la piel del cráneo.





Fig.13 Sujeción del ratón. Laboratorio de Rabia LESP-ISEM

Para saber dónde realizar el inóculo se trazaron 2 líneas imaginarias: desde la base de las orejas a la parte interior de los ojos. La aguja se inserta en ángulo recto donde las líneas se cruzan y se realiza una descarga de 0.03 ml. Se vuelve a colocar la jeringa dentro del tubo de ensaye y al ratón se le colocó en la jaula con el algodón para que se recupere.

Se procedió de la misma manera para todos los ratones en las tres repeticiones.



Fig. 14 Inoculación en ratón lactante. Laboratorio de Rabia LESP-ISEM

Una vez terminando de inocular se rocía alcohol sobre el lomo de los padres y se regresan las crías. La jaula se marcó con la fecha y el número de ratones inoculados y se dejó en el bioterio para observación.

## 6.2. Sacrificio de ratones

Haciendo uso de una mascarilla filtrante para gases y guantes, se coloca una caja coplin con algodón humedecido con éter etílico y se deja al ratón dentro por unos minutos después de los cuales, tomando al ratón por la cola se envuelve en papel absorbente y se lleva a la campana para la extracción del encéfalo.

## 6.3. Extracción e impronta del encéfalo

El gabinete de seguridad se desinfecta con la solución de alcohol al 70% en benzal y se coloca papel absorbente. Se introducen gasas, pinzas, tijeras de disección, abatelenguas, 4 laminillas y tubos eppendorf que se etiquetaron poniendo el número de experimento y día de sacrificio. Usando la bata desechable, doble guante, cubrebocas y la mascarilla se introduce al ratón en la campana

Se coloca al ratón con la superficie dorsal hacia arriba, con ayuda de las pinzas y las tijeras se retiró la piel de la cabeza al cuello, descubriendo el cráneo, que se sujeta por las orbitas con la pinza y se corta la bóveda con las tijeras descubriendo el cerebro, el cual se retira con las mismas tijeras, sin cortarlo, y se coloca sobre un abatelenguas. Tomando la laminilla con la otra mano se presiona ligeramente la superficie del encéfalo para dejar una impresión en la laminilla. Por cada laminilla se realizaron dos impresiones y por cada ratón se hicieron 3 -4 laminillas.



Fig.15 y 16 Extracción de encéfalo e impronta en laminilla. LESP-ISEM

Las laminillas se colocaron en una rejilla, el encéfalo se almacenó en un tubo eppendorf ya etiquetado, se desinfectaron las pinzas y las tijeras con ayuda de gasas y la solución desinfectante, se desechó el abatelenguas, las gasas y el papel absorbente en la bolsa roja de R.P.B.I y el resto del ratón en la bolsa amarilla de residuos patológicos. Los guantes de látex se quitan dentro del gabinete y también se desechan en la bolsa roja.

Las tijeras y pinzas se colocan en otra solución de benzal para su completa desinfección y se limpió el gabinete con la solución de alcohol al 70% en benzal.

#### 6.4. Inmunofluorescencia Directa.

La rejilla con las laminillas se llevó al congelador y se introdujo en una caja coplin con acetona fría (5°C a -20° C), en cajas separadas, para evitar contaminación cruzada, se introdujo también un control positivo y uno negativo respectivamente. Esto para fijar el tejido y se dejó por 30 minutos.

Pasando ese tiempo, se vuelve colocar papel absorbente en la mesa de trabajo y las muestras se sacaron y colocaron con la muestra hacia arriba para que se pudieran secar. Con ayuda de un tubo de ensaye y barniz blanco se delimitaron las impresiones colocando un poco del barniz sobre una laminilla limpia y presionando ligeramente la boca del tubo para después marcar las laminillas de las muestras.

#### 6.5. Preparación del conjugado

El LESP-ISEM cuenta con un conjugado comercial que se estandarizó previo a los experimentos.

Se multiplicó el número de laminillas que se tenía por dos (el número de muestras por laminilla) y el resultado se volvió a multiplicar por 50 (los µl que se le adiciona a cada pozo) obteniendo así el volúmen total.

Ese volúmen posteriormente se divide entre 64 (título de trabajo) y ese resultado será la cantidad total de conjugado que tenemos que utilizar.

Esa cantidad se lleva al volúmen total con agua destilada estéril:

$$\text{Volúmen total} - \text{conjugado} = \text{cantidad de agua estéril}$$

Esa cantidad de agua y conjugado se colocaran en un tubo estéril.

A cada muestra se le agregaron 50  $\mu$ l de la solución anterior de manera que cubriera toda la superficie circunscrita de la impronta con ayuda de una pipeta de 50 $\mu$ l.

Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se llevaron a la incubadora por 30 minutos a 37°C. Este paso debe llevarse a cabo lo más rápido posible para evitar que el conjugado se seque pero con cuidado de que no se derrame. Pasando los 30 minutos las laminillas se colocaron en una rejilla y se lavaron dentro de una caja coplin chica con 200ml de PBS (fosfato de sodio monobásico  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , fosfato de sodio difásico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , cloruro de sodio  $\text{NaCl}$ ) pH 7.6 y un agitador magnético durante 3 minutos, después se desecha ese PBS y se realiza otro lavado con agua destilada durante el mismo tiempo.

Estos dos pasos se repitieron 2 veces más de manera que queda: PBS-agua-PBS-agua-PBS-agua. Adicionando a ese último lavado con PBS 10 gotas de azul de Evans el cual se desechó en un recipiente específico para desechos con ese colorante.

Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y una vez secas se les puso una gota de glicerina tamponada pH 8.4 sobre la impronta, se les colocó un cubreobjetos y se llevaron al microscopio.

#### 6.6. Análisis estadístico

Se utilizó el programa STATGRAPHICS centurión para realizar el análisis estadístico. Se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA para pruebas paramétricas y una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

## 7. RESULTADOS

La presencia de antígeno se evaluó con la técnica de inmunofluorescencia directa utilizando en cada experimento controles negativos y positivos como referencia (Fig.18 y 19). De acuerdo a la tabla 1 se clasificaron los resultados en: negativo o positivos considerando el grado: 1+,2+,3+ y 4+. Se tomaron micrografías de las muestras que se observan en la tabla 2. Los resultados muestran que solo hasta el 3er día se encontró intensidad débil en la fluorescencia y poca presencia de antígeno en 2 de las 3 muestras analizadas, por lo que le corresponde una clasificación de 1+. En términos generales, la intensidad y cantidad de antígeno fue directamente proporcional al incremento del tiempo del sacrificio del ratón siendo en el 5to día cuando se observó una infiltración masiva de inclusiones en toda la muestra con una alta intensidad de fluorescencia, características que corresponden a un positivo 4+.

El tiempo para la obtención de resultados con esta técnica es variable, según la Organización Mundial de la Salud los resultados pueden observarse a partir de los 10-21 días después de la inoculación [17]. Por otro lado, el Manual de Rabia del LESP-ISEM (2015) reporta resultados desde los 8 días post inoculación [3]. Con los datos reportados, actualmente se tiene un rango de entre 8-21 días para la obtención de resultados con esta técnica, sin embargo de forma generalizada los resultados se han reportado a los 21 días post inoculación. En el presente estudio se logró reducir el tiempo de diagnóstico en tres días, dado que la literatura reporta 8 días como mínimo.

Una variable que debe tomarse en consideración para estos estudios es el tiempo de obtención de una camada numerosa, de manera que se pueda realizar con ratones de la misma camada debido a la homogeneidad genética. En nuestro caso el tiempo de obtención de estas camadas fue de casi un mes entre cada una lo que retrasó hasta cierto punto el avance del experimento (Fig.17).



Fig. 17. Camada de ratones BALB C. 8 días de edad. LESP-ISEM

Siendo que los parámetros analizados son cualitativos, para poder ingresar los datos en el programa estadístico se le asignaron valores a los resultados: 0 si era negativa la muestra, 1 si la muestra se podía clasificar como 1+, 2 si la muestra se clasificaba como 2+, 3 para una muestra 3+, y 4 para una muestra positiva 4+.



Fig. 18 Control negativo. Técnica de inmunofluorescencia directa. LESP-ISEM

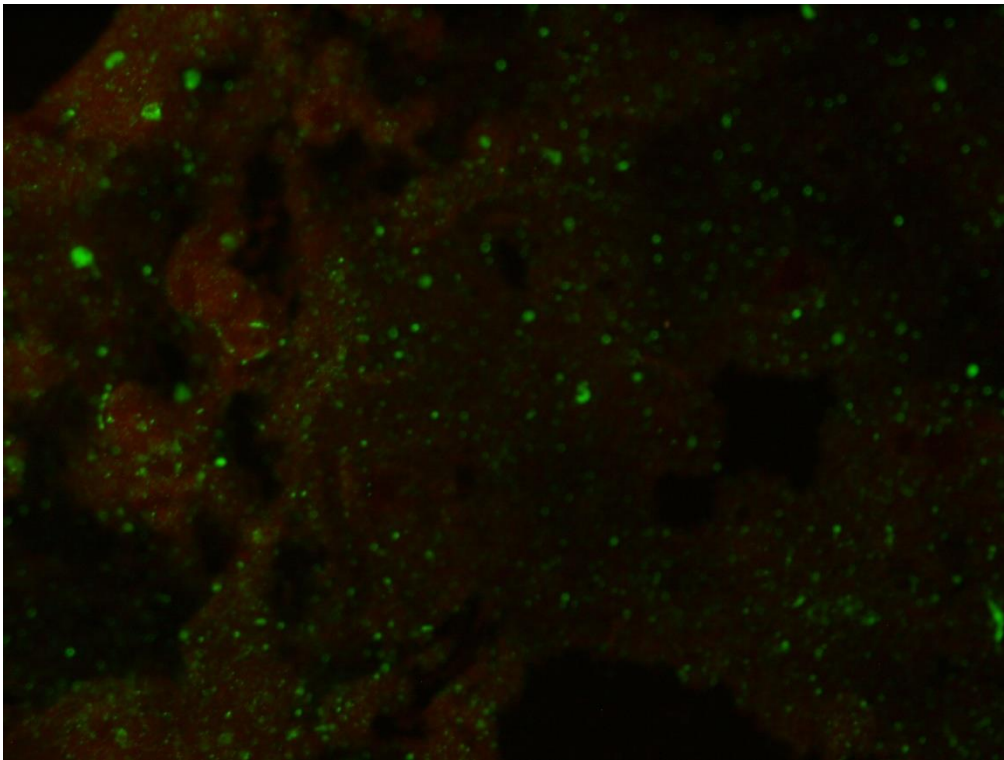
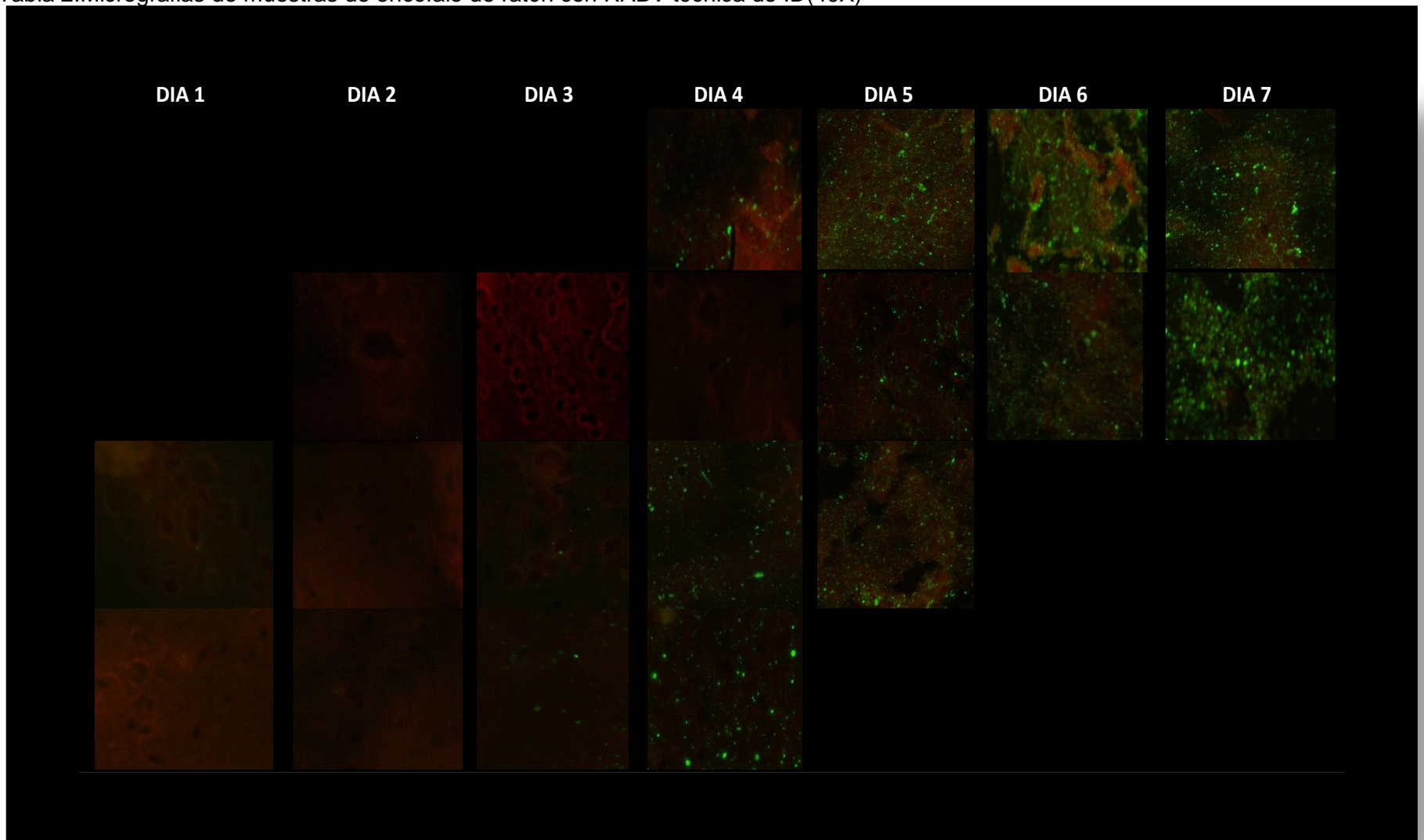


Fig.19 Control positivo. Técnica de Inmunofluorescencia directa. LESP-ISEM.

Tabla 2. Micrografías de muestras de encéfalo de ratón con RABV técnica de ID(40X)





El análisis de varianza (Anova), muestra diferencias significativas en los días posteriores a la inoculación, para observar un diagnóstico positivo 4+ ( $p < 0.0000$ ). Después de ello, se realizó la prueba de Fisher (LSD) lo que arroja que la mayor intensidad en la fluorescencia de las muestras de encéfalo significativa para el estudio, ocurre desde el día 5 en adelante (4+, Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de las muestras tratadas con la técnica de inmunofluorescencia

Días de toma de muestra post-inoculación	Clasificación de positividad de acuerdo al Manual de LESP-ISEM
1	0 <sup>c</sup>
2	0 <sup>c</sup>
3	+ <sup>bc</sup>
4	++ <sup>b</sup>
5	++++ <sup>a</sup>
6	++++ <sup>a</sup>
7	++++ <sup>a</sup>

Los datos representan el promedio de al menos 2 repeticiones. Prueba de medias LSD ( $p \leq 0.05$ )

Mientras que los días 3 y 4, pertenecen a la clasificación positiva con un grado de 1+ a 3+. Finalmente, las muestras analizadas a los días 1 y 2, les corresponde una clasificación negativa, es decir no hubo presencia del antígeno.

## 8. CONCLUSIONES

El presente trabajo se desarrolló para determinar el tiempo transcurrido entre la inoculación intracerebral del virus de la rabia en ratones lactantes de la cepa BALB C y la detección del mismo mediante IFD, esto para la obtención de controles positivos 1+ y 4+ utilizados en el diagnóstico de rabia. Los ratones fueron sacrificados a intervalos establecidos y las muestras de encéfalo fueron analizadas con la técnica de Inmunofluorescencia directa. Se observó que durante los primeros dos días post inoculación no era posible detectar la presencia del virus en la muestra siendo hasta las 72 h. cuando se observa la presencia de focos fluorescentes, los cuales fueron aumentando en cantidad e intensidad conforme aumentaba el tiempo post inoculación. De esta manera se estableció el tiempo de obtención de un control positivo 1+ al tercer día post inóculo y un control positivo 4+ al quinto día post inoculación.

La Rabia es una enfermedad que aunque en nuestro país se ha ido controlando mediante los programas de prevención y control de enfermedades, no ha sido completamente erradicada siendo la rabia transmitida por quirópteros la que prevalece en gran parte del territorio mexicano representando pérdidas humanas y económicas de millones de dólares en tratamientos, indemnizaciones por pérdida de ganado, vacunas, etc. por lo que también se puede concluir que se logró un refinamiento en la técnica empleada para la obtención de controles positivos ya que se comprobó que dichos controles se pueden obtener en un lapso menor a los 21 días que establece la literatura sin que esto afecte la sensibilidad y especificidad de la técnica.

En el proceso de diagnóstico por laboratorio es posible que lleguen muestras con carga viral baja, dificultando la emisión de resultados, ya que si bien en la normatividad vigente especifica la utilización de controles positivos y negativos, no se indica el grado de positividad. Un aporte a éste es la generación de controles positivos 1+ que pueden usarse como referencia y de esta forma se pueden incluir dos controles positivos con baja y alta carga, garantizando de esta manera la eficiencia de los reactivos utilizados y como referencia para el personal encargado del diagnóstico.

El uso de animales para la investigación científica es un tema que genera controversia y por lo tanto se ha ido normativizando el uso y las condiciones en las que deben estar los animales antes, durante y después del experimento. En 1959 Russell y Burch introdujeron

las 3 R que se refiere a: refinamiento, reducción y reemplazo, siendo la base para la actual bioética. Al reducir el tiempo de obtención de controles positivos también logramos disminuir el tiempo de convalecencia de los ratones empleados, por lo tanto logramos reducir el sufrimiento del animal durante la prueba ya que para la obtención de los controles no es necesario esperar el desenlace fatal del curso natural de la enfermedad sino que basta con establecer la presencia el virus en la muestra, lo cual ocurre antes de que se presente la sintomatología. En este mismo sentido, también se logró reducir la generación de residuos peligrosos biológico infecciosos (R.P.B.I), específicamente de los desechos de la cama de los ratones y el material de protección utilizado por el personal para el bioterio, lo que ayuda a minimizar los posibles daños ocasionados al medio ambiente y también en la economía del laboratorio por los gastos en insumos del mismo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaría de Salud y Dirección General de Epidemiología (2012). *Manual de Procedimientos estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en humano*. México: IEPSA.
2. Secretaría de Salud subdirección de zoonosis/ CENAPRECE (2015) *Las agresiones por animales silvestres como riesgo de transmisión de rabia en humano. "Taller regional para la atención de personas agredidas expuestas a rabia"*. Metepec, México. Recuperado de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/PanoramaEpidemiologicoNacionalRabia.pdf>
3. InDRE-DGE-Secretaría de Salud (2015), *Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de rabia por laboratorio*. México: InDRE
4. *Plan regional de control de la Rabia en Norteamérica. Una Asociación para el control efectivo.* (2008).
5. Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. (2016), *Fichas de información general sobre enfermedades animales. Rabia [pdf]*. Recuperado de: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/RABI-ES-ES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/RABI-ES-ES.pdf)
6. World Health Organization WHO.(2016)*Rabies*. Recuperado de: <http://www.who.int/rabies/en/>.
7. World Health Organization WHO. (2015).*Epidemiological Alert Rabies*. Recuperado de: <http://www.who.int/rabies/en/>.
8. Baer, G.M.(1991).*The Natural History of Rabies*. 2nd ed. , United States: CRC Press
9. García Merino A.(2011) Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*. 26(5):301—306.
10. Madigan T.Michael, Martinko John M.,et.al.(2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. 12a ed., España: Pearson S.A. p.275-303.
11. Knipe David M., Howley Peter M.(2001).*Fundamental Virology*. 4<sup>th</sup> ed. USA:Lippincott Williams y Wilkins
12. Bischoff K., Chang W. (2004). *RHABDOVIRIDAE*. Recuperado de: <http://web.stanford.edu/group/virus/rhabdo/2004bischoffchang/Rhabdo.htm>.

13. Baptiste Fouquet, J.N., Florence Larrous, et.al.,(2015).*Focal adhesion kinase is involved in Rabies Virus infection through its interaction with viral phosphoprotein P*. Journal of Virology, 89: p. 1640-1651.doi:10.1128/JVI.02602-14.
14. C.Jackson, A., (2010). *Advances in virus research in research advances in rabies*, academic press. p. 488.
15. William H. Wunner, A.C.J.,(2007).*Rabies: scientific basis of the disease and its management*. Great Britain: Academic Press. p. 645.
16. Kuzmin I.V.,Rupprecht C.E., (2008). *Rabies Virus*. USA: Elsevier.
17. World Health Organization WHO,(2013).*WHO expert consultation on Rabies*, WHO: WHO library Cataloguing in publication data. Recuperado de: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789240690943\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789240690943_eng.pdf?ua=1)
18. Dirección General de Epidemiología(2015). Laboratorio de Rabia. Recuperado de:[http://www.indre.salud.gob.mx/interior/lab\\_rabia.html](http://www.indre.salud.gob.mx/interior/lab_rabia.html)
19. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. (2007). *Manual de normas y procedimientos para la vigilancia , prevención y control de la rabia*. Argentina.
20. University Kansas State.(2016).*Veterinary Diagnostic Laboratory*.Recuperado de: [www.ksvdl.org/rabies-laboratory/](http://www.ksvdl.org/rabies-laboratory/).
21. Lembo T.,Niezgoda M., Velasco A., Cleaveland S., Eblate E. and Rupprecht C. (2006).*Evaluation of a Direct, rapid immunohistochemical Test for Rabies Diagnosis*.Emerging Infectious Diseases, 12: p. 310-313.
22. Organización Mundial de la Salud, (1956).*Técnicas de laboratorio aplicadas a la Rabia*, Washington D.C.
23. Perez L.G., Alvarez Niño Y., Avellaneda A.R. (2014).*IFAT (inmunofluorescencia directa e indirecta)*, Recuperado de: <http://es.slideshare.net/AnclesPerez/prueba-ifat-inmunofluorescencia-directa-e-indirecta>.
24. Delgado Urbina C.(2015).*Manual de calidad de Rabia*. Laboratorio Estatal de Salud Pública.
25. Sandin y Algorta (2008)[Cited 2016 noviembre 6], Recuperado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MetodosdeEstudiodeBacteriasyVirus.pdf>
26. Sandin (2007)[Cited 2016 noviembre 6], Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/viruslocal/diagnostico%20viral.htm>
27. Dominguez O. (s/f). *Comportamiento epidemiológico de la rabia en México*. México.Recuperado de: <http://www.webveterinaria.com/merial/rabia.pdf>.
28. Secretaría de Salud (2012). *NOM-011-SSA2-2011*, México:Secretaría de salud.

29. Robert W. Bauman (2014). Microbiology with diseases by Taxonomy. 4<sup>th</sup> ed. United States: Pearson Education. p.391