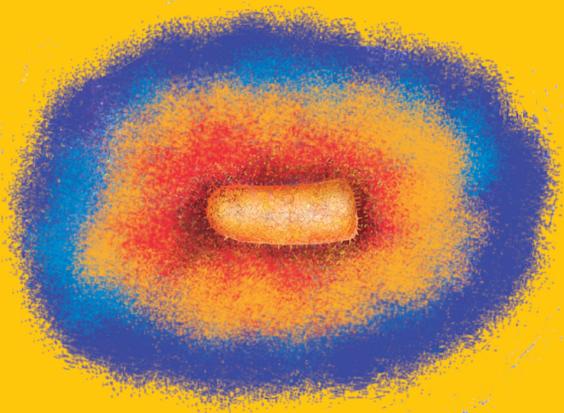




RABIA, RIESGOS Y CONTROL ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN EN ESPAÑA



Dr. Elías Fernando Rodríguez Ferri







Comisión para posicionamiento en la lucha antirrábica
Consejo General de Colegios Veterinarios de España

D^a Consuelo Rubio Montejano
D. Ramón García Janer
D. Luis Alberto García Alía
D. Elías Fernando Rodríguez Ferri
D. Rufino Alamo Sanz
D. Felipe Vilas Herranz
D. Elías Fernándo Rodríguez Ferri
D. Federico Vilaplana Valverde
COORDINADOR:
D. Luis Alberto Calvo Sáez



RABIA. RIESGOS Y CONTROL. ANALISIS DE LA SITUACIÓN EN ESPAÑA

Dr. Elías Feernando Rodríguez Ferri

Catedrático de Sanidad Animal (Microbiología e Inmunología)
Universidad de León



RABIA. RIESGOS Y CONTROL.
ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN EN ESPAÑA

Elías Fernando Rodríguez Ferri

Catedrático de Sanidad Animal (Microbiología e Inmunología).
Universidad de León

Índice

1-Antecedentes y justificación

2-La rabia

2.1. Antecedentes históricos

2.2. Importancia de la rabia en el mundo

2.3. Presentación clínica y patogénesis de la rabia

3-El virus de la rabia

3.1. Tipos de *Lyssavirus*

3.2. Divergencia genética en las especies de *Lyssavirus*

3.3. Interrelaciones genéticas y antigénicas en el género *Lyssavirus*

4-Epidemiología

4.1. La rabia del perro o rabia urbana

4.2. Rabia en el gato

4.3. Rabia de quirópteros

4.4. Rabia de animales salvajes o rabia salvaje

5-Riesgo

5.1. Importación de casos del Norte de África

5.2. Importación de casos de Europa Central y del Este

5.3. Riesgo ligado a la presencia de rabia en otras especies y especies exóticas

5.4. Riesgo de rabia de murciélagos

6-Control de la rabia

6.1-Control de la rabia en las poblaciones animales

6.1.1- Profilaxis sanitaria. Ordenación y control de las poblaciones animales en riesgo de contagio de rabia

6.1.2. Vacunas y vacunación contra la rabia en los animales domésticos

6.1.2.1. Inmunidad y respuesta inmune en la rabia

6.1.2.2. Base inmune de las vacunas frente a la rabia

- 6.1.2.3. Las primeras vacunas. Vacunas de tejido nervioso
- 6.1.2.4. Adaptación del virus rábico a cultivos de tejidos y celulares
- 6.1.2.5. Adaptación del virus rábico a embriones de pollo y pato
- 6.1.2.6. Cepas vacunales obtenidas por aislamiento y adaptación del virus rábico a diferentes especies de animales de experimentación
- 6.1.2.7. Cepas vacunales obtenidas por el pase del virus rábico por cultivo celular y embriones de pollo y pato
- 6.1.3. Catálogo de vacunas disponibles en la actualidad para el control de la rabia en los animales

- 6.1.4. Vacunas nuevas
 - 6.1.4.1. Vacunas recombinantes
 - 6.1.4.2. Vacunas de subunidades
- 6.1.5. Vacunación y Programas de Vacunación contra la rabia canina y felina
- 6.1.6. Vacunación en otros animales domésticos exóticos: hurón, perro-mapache y otros
- 6.1.7. La vacunación de los animales salvajes. El caso de Europa
- 6.1.8. Protección por vacunación, en los animales
- 6.1.9. Control de la rabia en quirópteros
- 6.2-Control de la rabia en el hombre. Tratamientos post-exposición.
 - 6.2.1. Tratamientos primarios de las heridas por mordedura
 - 6.2.2. Vacunas e inmunoglobulinas disponibles
 - 6.2.2.1. Vacunas y vacunación en el hombre
 - 6.2.2.2. Protocolos de vacunación en el hombre
 - 6.2.2.3. Las propuestas en el Plan de Contingencia para la rabia en España
 - 6.2.2.4. Tratamientos antirrábicos mixtos (suero-vacunación) para casos especiales
 - 6.2.2.5. Anticuerpos monoclonales y otros sistemas nuevos de inmunización pasiva
 - 6.2.2.6. Eficacia de las vacunas actuales contra la rabia canina y



humana, frente a los nuevos *Lyssavirus*

6.2.3. Nuevas estrategias en el diseño y desarrollo de vacunas frente a la rabia

6.2.3.1. Vacunas de DNA

6.2.3.2. La genética inversa y otras estrategias para el diseño de vacunas frente a la rabia

6.2.3.3. Vacunas derivadas de plantas (vacunas de plantas transgénicas)

6.3. Adyuvantes para vacunas inactivadas frente a la rabia y perspectivas

7. Consideraciones finales

8. Posicionamiento de la Comisión de Rabia del CGCVE

9. Conclusiones y propuestas finales

10. Bibliografía





1-Antecedentes y justificación

Con toda probabilidad, España sufrió tradicionalmente y desde el principio de los tiempos, los efectos de la rabia, aunque los testimonios que han llegado hasta nosotros son más bien escasos.

San Isidoro, arzobispo de Sevilla (560 a 636 d.C) en las *'Etimologías'*, su obra cumbre, en la que recopila el saber del mundo conocido, ya sostenía que el contacto con la saliva de un perro rabioso era la causa del contagio de la enfermedad y definía la rabia o hidrofobia como *'... el miedo al agua, produciéndose por la mordedura de un perro rabioso o por su baba, caída en la tierra y tocada por un hombre o un animal, que son invadidos por la locura y arrastrados a la rabia'*¹.

En el siglo XII, el médico cordobés **Maimónides** (1135-1204) en su obra *'Tratado sobre los venenos y sus antídotos'* escrita en 1199, se ocupa de la rabia proponiendo tratamientos anteriores a su desarrollo clínico, con referencias al largo periodo de incubación, recomendando que la herida permaneciese abierta, sin coser, durante al menos 40 días.

En el siglo XIII, el médico catalán **Arnau de Vilanova** (1238-1311), probablemente el médico latino más importante del mundo medieval, escribió *'Regimen Sanitatis ad regum Aragonum, Medicinalium introductionum speculum'* y fue conocido como médico de reyes y papas. Vilanova planteaba que era el consumo de cadáveres de animales muertos de rabia la causa del contagio de los perros.

En el siglo XIV, **Alfonso XI** (1312-1350), en el libro segundo del Tratado del Venar o Montería (de la caza), tal vez el más importante de los tratados en esta materia, se refiere también a la rabia canina describiendo con detalle sus tipos clínicos (muda o paralítica, melancólica y furiosa) con especial detalle a la peligrosidad de la forma furiosa (cit por Abeilán *et al.*, 2004)².

Una referencia más precisa puede encontrarse en 1441, cuando por instrucción del cabildo de Sevilla se ordena el pago de 500 maravedíes al 'saludador' **Pero Alonso** en atención *'al afán y trabajo que se había tomado en curar a las personas atacadas de rabia, en la ciudad hispa-*



*lense y su tierra, y por el provecho y el bien común conseguidos*³. La hegemonía de los ‘saludadores’, como mantenedores de la salud, se prolongó en España a lo largo de los siglos XVI, XVII e incluso en el XVIII. Utilizaban el aliento, la saliva y ciertas fórmulas secretas y depreciaciones para curar y precaver la rabia y otros males, dando a entender que disponían ‘de gracia y virtud’ para dicha curación. **Juan Bravo de Piedraita**, autor de *‘De hidrofobia natura causis’*, fechada en ¹Salamanca, en 1571, se refiere a la rabia *‘...como una manía (....) que se produce por la baba del perro, depositada en el fondo de las dentelladas’*⁴. En 1500, se ha descrito, que en España existían ‘muchos perros rabiosos’ (G. Baer, 2000, ver después).

Así pues, desde que se tiene noticia, España fue un país con casos frecuentes de rabia humana derivada, principalmente de la rabia en el perro y, en menor extensión, de otras procedencias animales (en especial lobo y zorro). A partir de datos y referencias recogidas en distintas publicaciones, se sabe de los numerosos ataques y mordeduras producidas por perros y lobos tanto a los animales domésticos como al hombre, que después de cada episodio, motivaban batidas encarnizadas de caza con todo tipo de armas y estrategias, incluyendo el uso de venenos. Alude Saiz Moreno⁵ a que en 1604 se produjo en España, probablemente procedente de Francia, una grave epizootia de rabia, que se extendió por todo el país, con grave incidencia en la población humana. En 1755, J. Santelli, médico y albéitar con ejercicio en Llerena (Badajoz), escribió *‘Diálogos de un Mayoral’* en el que se ocupa de diversas enfermedades del ganado, dedicando uno de sus capítulos a la rabia (Saiz Moreno, 2000).

En 1786, por un edicto de la Real Junta de Sanidad, de 23 de Noviembre, se dictaron en España medidas ‘para evitar la transmisión de la rabia, controlar, proteger perros y gatos, estableciendo sanciones contra sus dueños, en caso de incumplimiento. En la misma publicación se ordena ‘el sacrificio inmediato de cualquier perro hallado en la calle, sin propietario’. Se obligaba a los dueños a llevar los animales provistos de un collar de hierro, latón, cuero u otro material y en ningún caso a dejarles abandonados. La Orden fue ratificada en 1793, por Acuerdo

1 *Las ‘Etimologías’ (también llamadas ‘Origenes’) fueron escritas hacia el año 634 y reflejan la evolución del conocimiento de la época, desde la antigüedad pagana y cristiana hasta el siglo VII. Está dividido en 20 libros y tuvo una enorme influencia en la Edad Media siendo copiado hasta diez veces entre 1470 y 1529. Fue el centro del Concilio de Toledo, del año 633. Isidoro de Sevilla fue declarado Doctor de la Iglesia Universal por el papa Inocencio XIII en 1722.*



Real de Carlos IV, de 13 de septiembre (Abellán *et al.*, 2004).

Según Escobar (cit. por Saiz Moreno, 2000), en 1791, se produjo en Madrid un grave brote de rabia y poco más tarde otro, de igual naturaleza, en Cádiz, siendo descrita, ésta última, con gran detalle, por un albéitar llamado Cristóbal. Con la creación de la primera Escuela de Veterinaria en Madrid, en 1792, sita en el convento de San Felipe Neri, extramuros de la Puerta de Recoletos, comenzaron a presentarse en el establecimiento todo tipo de animales, para consulta, diagnóstico y tratamiento (y muchas veces sus propietarios mordidos por aquellos) por mordeduras de perros con rabia, consistente éste último en la limpieza y lavado de la mordedura y su cauterización completa y profunda mediante la aplicación de 'un punto de fuego'.

Prácticamente, en el primer tercio del siglo XIX, España debe acometer la Guerra de la Independencia y otros conflictos por lo que las referencias a disposiciones relativas a la rabia, como en el caso de otros procesos que afectaban esporádicamente a la salud, no reciben demasiada atención. Entre 1800 y 1802 se remitieron al Consejo de Castilla varios informes, así como una propuesta de Reglamento para la *'eliminación de los perros sueltos que vagaban por Madrid'*. Merece hacer referencia, no obstante, que con fecha 28 de noviembre de 1855 se promulgó la primera Ley de Sanidad, en la que se estableció que en el Consejo Nacional de Sanidad figurase un Vocal Veterinario, así como en todas las Juntas Provinciales de capitales de provincias y poblaciones de más de cien mil habitantes, y en 1868 se promulgó la primera legislación referida a la rabia en la etapa moderna⁶. En la Gaceta de Madrid y bajo la forma de Real Orden, de 17 de julio (publicada el 13 de agosto) de 1863, se publicó una Instrucción Preventiva sobre la rabia a requerimiento de la Reina Isabel II, en la que se daban instrucciones para prevenir la enfermedad y **curar** a las personas o animales contagiados, reconociendo la necesidad urgente de poner en práctica medidas contra la rabia. Se dan instrucciones precisas en relación con las heridas, *'comprimiendo en todas las direcciones para forzar el sangrado y que la saliva no pueda penetrar, la aplicación de una ligadura por encima de la herida, limpieza con lejía, con agua y jabón, con agua de cal, con sal o con cualquier liquido astringente, con agua pura e incluso con orina'*. Se indica también *'la conveniencia de la cauterización con un hierro al rojo'*. La disposición establecía que se recurriera rápidamente *'al auxilio del médico, cirujano o, a falta de aquellos, al veterinario,.. sin tener en cuenta las supercherías de los saludadores..'*



A finales del siglo XIX, los acontecimientos que en aquella época se estaban sucediendo en la vecina Francia y su capital, París, de la mano de L. Pasteur y otros insignes científicos (ver después) eran seguidos con atención en todo el mundo y, desde luego, también en España. Se ha señalado, que el primer español en ser tratado por Pasteur con su famosa vacuna antirrábica, fue un soldado español llamado Alberto Bravo Méndez, quien en 1886 había sido mordido por un perro rabioso en Granada. Acompañado por el médico militar D. José Albert, viajó a París donde fue tratado con éxito. El médico permaneció después algún tiempo en la capital francesa, en el laboratorio de Pasteur, aprendiendo su técnica⁷. De esta iniciativa, seguramente derivó que en 1890 se confiase la vacunación en el ejército, al Cuerpo de Sanidad Militar y que, por Real Orden de 26 de diciembre de aquél año, se ordenara la creación del 'Instituto Central de Vacunación'. Más tarde, por Real Decreto de 27 de octubre de 1899, se dispuso la creación del Instituto de Sueroterapia, Vacunación y Bacteriología Alfonso XIII', dedicado, entre otras actividades, a los análisis e investigaciones encargados por la Dirección General de Sanidad o a propuesta del Real Consejo de Sanidad y la Real Academia Nacional de Medicina. Dalmacio García Izcara fue jefe del Área de Veterinaria y Santiago Ramón y Cajal, el director.

La Ley de Sanidad estuvo vigente hasta 1904 en que fue sustituida por el Decreto de la 'Instrucción Nacional de Sanidad' en la que intervinieron D. Santiago de la Villa y D. Dalmacio García Izcara. El 3 de julio del mismo año se publicó el Reglamento de Policía Sanitaria de los Animales Domésticos, que establecía el nombramiento, dentro de la Inspección General de Sanidad, de tres Inspectores, uno por cada una de las ramas sanitarias (Medicina, Farmacia y Veterinaria). El primer Inspector Veterinario fue D. Bonifacio Estrada Viloría, seguido por D. José Coderque Navarro en 1922 y por D. José Niceto García Armendariz, que lo fue hasta 1931 en que los Servicios Veterinarios pasaron del Ministerio de la Gobernación al de Fomento, donde permanecieron hasta 1944 en que volvieron nuevamente a Gobernación, siendo designado como Inspector General Veterinario, D. Salvador Martí Güell (Saiz Moreno, 2000).

En el 'Instituto de Sueroterapia, Vacunación y Bacteriología' Alfonso XIII, D. Dalmacio García Izcara, desarrolló una gran labor, organizó un laboratorio de análisis y, bajo su dirección además, comenzaron a impartirse cursos de perfeccionamiento. García Izcara, que había sido catedrático de Anatomía en la Escuela de Veterinaria de León (1883-89),

llevó a cabo interesantes estudios sobre rabia, entre otras enfermedades. En el XIV Congreso Internacional de Medicina celebrado en Madrid en 1903, presentó una comunicación sobre el valor de las lesiones macro y microscópicas en el diagnóstico de la rabia en el perro, y como fruto de su colaboración con D. Santiago Ramón y Cajal en el Instituto Alfonso XIII, publicó el resultado de sus estudios de la acción del virus sobre las células nerviosas⁸. García Izcara estudio la impermeabilidad de ciertas mucosas íntegras al virus rábico, su trayectoria, la velocidad de propagación en los nervios, que calculó en 1 mm por hora (trabajo realizado en conejos cuyas orejas eran objeto de profundas escarificaciones, a los que en el curso del experimento sumergía en un líquido que contenía virus fijo concentrado, amputando después los órganos en diversos tiempos, 5 mm por debajo de las heridas) y la ausencia de participación de la corriente sanguínea, la inmunidad antirrábica, etc. En 1921 publicó una monografía sobre la rabia y su profilaxis.

La primera Ley de Epizootias fue promulgada el 1 de diciembre de 1914 y su Reglamento Provisional el 7 de junio de 1915 y como consecuencia de discrepancias manifestadas por el Ministerio de la Gobernación (en que 'se menospreciaban los aspectos sanitarios de las enfermedades de los animales transmisibles al hombre'), se dispuso en su artículo 4º que *'cuando las enfermedades que padezcan los animales sean transmisibles a la especie humana, corresponderá al Ministerio de la Gobernación dictar, en el interior, las medidas conducentes a evitar los peligros de contagio al hombre, pudiendo disponer del personal dependiente del Ministerio de Fomento, el cual estará obligado a poner inmediatamente en conocimiento del de Gobernación la aparición de las mismas'*. *'La Real Academia de Medicina, previo informe de la Escuela de Veterinaria de Madrid, señalará las enfermedades epizooticas de los animales transmisibles al hombre'*. La Ley de Epizootias de 1914 fue una necesidad, acuciado el país por la presión ejercida por el gobierno francés como consecuencia de casos de pústula maligna en tenerías francesas que manejaban pieles procedentes de ovinos españoles, seguramente portadores de esporos de *Bacillus anthracis*. En palabras de Gordón Ordás *'El padre de la Ley fue la carbuncosis, la madre Francia y la partera, la Asociación de Ganaderos'*. El Reglamento de Epizootias creó 'Laboratorios Bacteriológicos', como centros de diagnóstico y estudio de las enfermedades, de los que llegaron a funcionar catorce, con la colaboración de la Asociación General de Ganaderos del Reino⁹.

De este modo el 15 de mayo de 1917 se promulgó el Reglamento de



Zoonosis en el que se incluían un total de diez enfermedades de declaración obligatoria, incluida la rabia, con normas sobre su prevención y profilaxis médica, aunque tal disposición nunca llegó a tener gran predicamento. No así la Ley de Epizootias de 20 de diciembre de 1952 en la que figura la rabia conjuntamente con el muermo, el carbunco bacteridiano, la triquinosis, tuberculosis y brucelosis como las zoonosis de declaración oficial obligatoria, y su Reglamento de 1955, que se mantuvieron vigentes durante muchos años pues la nueva Ley de Sanidad Animal no se promulgó hasta 2003 (Ley 8/2003, de 24 de abril), manteniéndose todavía vigente el Reglamento de 4 de febrero de 1955, que dedica a la rabia la totalidad del capítulo 44, de medidas específicas.

En 1927, por Real Orden de 1 de julio del Ministerio de la Gobernación, se dictaron normas sobre la recogida de perros vagabundos o abandonados, a cargo de los Ayuntamientos en todos los pueblos de España.

En 1952, por Decreto de 17 de mayo del Ministerio de la Gobernación (Dirección General de Sanidad (DGS)) se declaró obligatorio el registro y matrícula de los perros y la vacunación por cuenta de sus propietarios así como la consiguiente organización por los Ayuntamientos, de un servicio de recogida de perros vagabundos o indocumentados.

Antes de esta fecha, los datos registrados sobre los **casos humanos** de rabia en España son muy escasos e inciertos. Abellán *et al.* (2004) recogen cifras del Instituto Nacional de Estadística, sobre defunciones según la causa de muerte¹⁰ que entre 1900 y 1940 alcanzan un total de 1.680 casos, que suponen una media global de 42 casos por año. La primera de estas décadas (1900-1910) arroja la media más alta, con 45,7 casos por año, siendo la más baja la comprendida entre 1920 y 1930, con 37,2 casos por año. En los años de 1941 a 43 no se dispone de información y entre 1944 y 1966, en que la rabia se extingue, solo se describen 248 casos, lo que hace una media de 11,2 casos, aunque desde el principio se va produciendo un progresivo descenso que se hace efectivo ya en 1958, en el que se describen menos de cinco casos anuales y en los años de 1961 a 63 no se describieron casos.

Varios autores hacen mención a un gran brote de rabia en la provincia de Murcia, en el que prácticamente la totalidad de la misma resultó infectada, no disponiéndose sin embargo, de datos concretos y Albadalejo (cit. por Álamo, 1996) recoge una media de 31 defunciones anuales en el periodo 1931-35, que estima escasos y justifica en la eficacia de los tratamientos. También C. López (1948, citado por Álamo, 1996) se

refiere en los años 40 a 'decenas de miles de tratamientos antirrábicos a personas mordidas por perros sospechosos de rabia'. Este aspecto, sin embargo, ya está documentado por Abellán *et al* (2004) que desde 1945 y con algunos años sin datos (1946 y 1948-49) recogen, hasta 1966 (incluido, extinción de la rabia), 74.621, que producen una media anual de 3.927 tratamientos, aunque en 1951 se superaron los 8.000 tratamientos post-exposición. No obstante, los tratamientos continuaron a lo largo del resto de años, con una subida particular coincidiendo con el brote de Málaga (ver después).

En el **caso de los animales**, Enrique Zarzuelo recoge un total de 5.052 casos entre los años 1911 y 1920 (una media de 505,2 casos al año), siendo de 6.850 los que corresponden al periodo 1941 a 1950. La comparación entre las medias de estos dos intervalos representa nada menos que un incremento del 35,6%, lo que pone de manifiesto que en la primera mitad del siglo XX la incidencia de la enfermedad entre los animales (los perros) era importante; los datos de la DGS para el bienio 1950-51 arrojan un total de 1.057 casos en los animales (528,5 al año, en la línea con los anteriores).

Los datos registrados a partir de 1952 en la DGS entre esta fecha y 1965, último año con datos animales (pues en 1966 la enfermedad se declaró erradicada), suman 2.688, situándose el pico en el año 1953 con 606 casos, mientras que desde 1959 la cifra no superó los 100, con mínimos en 1964 (7 casos). Entre 1966 y 1975, España estuvo exenta de rabia y en este año tuvo lugar un brote en la provincia de Málaga a consecuencia, según todos los indicios, de un animal enfermo propiedad de algún turista procedente del norte de África (lo más verosímil) o de algún país del centro de Europa. El brote de Málaga se declaró extinguido en 1978 y a su término el balance arrojó un total de 133 animales positivos en los que se incluyen 2 perros positivos localizados en Madrid en 1976 y 2 gatos en Granada (en 1976 y 1977), predominando claramente la rabia canina (76 animales positivos, el 57,6%) e igualmente importante también la rabia felina (49 animales positivos, el 36,9%), correspondiendo el resto a otras especies animales. En el brote citado, falleció una persona en Málaga en 1975, propietario de un animal mordido por el perro considerado la fuente de infección¹¹.

Desde 1975 se vienen recogiendo, también, casos de rabia canina y felina en las ciudades autónomas del norte de África (Ceuta y Melilla). Según se recoge en el *Bulletin* para la Rabia en Europa, editado en Tübingen (Alemania), en este periodo se han descrito un total de 98



casos de rabia en perro y 6 casos de rabia en gatos en el conjunto de las dos ciudades. La distribución alcanza, en el primer caso, todos los años en la serie (1975 a primer trimestre de 2013), excepción hecha de los años 1978, 1979, 1985, 1986, 1988, 1990, 1993, 2003, 2007 y 2011, en los que no se describieron casos; por su parte, los registros que hacen referencia a la especie felina se produjeron en una u otra de ambas ciudades en los años 1977, 1979, 1987 y 1995. Además se describieron dos casos en caballo, en los años 1997 y 2002.

Es preciso señalar, igualmente, por cuanto se refiere a la rabia de murciélagos (quirópteros), que su presencia en la península ibérica o en las islas, no se documenta hasta el año 1987 aun cuando ya desde los años 50 se habían descrito casos de rabia en murciélagos en Alemania, Dinamarca y Holanda. Primero en Valencia (El Saler) y después en Granada¹², se produjo una alerta por dos agresiones de murciélago, que resultaron positivos en el diagnóstico de rabia (IFD y prueba biológica en ratón). El primero de los casos se trataba de un niño que dormía en su casa y que fue mordido en la espalda por el animal, que fue capturado y, debido a su extraño comportamiento, fue examinado para descartar la presencia de rabia. El segundo caso se produjo como consecuencia de la agresión, también sin provocación, de un murciélago a un adulto en la capital granadina. La sorpresa hizo que se eliminase a los animales sin un examen riguroso para determinar su especie, razón por la que la identificación de uno y otro, no puede ser aceptada como totalmente segura. El primero de los animales fue identificado como probable *Pipistrellus pipistrellus* y el segundo como probable *Eptesicus serotinus*¹³.

Desde 1987, hasta la fecha, el número de casos acreditados de rabia de quirópteros en España, asciende a un total de 28, afectando a capturas realizadas bien de animales agresores o de animales no agresores, obtenidos en el curso de estudios de distinto tipo, en las provincias de Valencia (El Saler) (aislado vírico identificado como 'semejante al serotipo IV'), Granada (3 casos, respectivamente en 1987, ya descrito, en 1994 –un adulto fue mordido en un parque público de Granada, cuando se acercó a recoger un murciélago que se encontraba en el suelo- y el tercero en 2007, en todos los casos virus EBL-1 y los dos últimos de *Eptesicus isabellinus*), Huelva (5 casos de EBL²-1 en murciélagos no agresores, capturados en una cueva en el curso de un estudio sobre la distribución de estas especies, en 1989), Sevilla (9 casos, 5 de ellos

aislados de murciélagos no agresores en el año 2000, de *E. serotinus*; el resto, en 1999 y 2007, siempre EBL-1, de *E. serotinus* y *E. isabellinus*, a partes iguales), Murcia (2 casos de EBL-1, a partir de *E. isabellinus*) y Badajoz (2 casos, en 2008 y 2009, ambos por EBL-1, a partir de *E. isabellinus*). A estos, es preciso añadir 6 casos adicionales, de los que se carece de información precisa, uno de ellos en la provincia de Lérida, que ha resultado ser un genotipo diferente y que como tal ha sido propuesto (ver después). Sin duda, la circulación de EBL-1 en España, ha sido la más común en lo que a este tipo de *Lyssavirus* se refiere¹⁴.

Finalmente, en lo que se refiere a la rabia de animales salvajes, que en Europa afecta principalmente al zorro rojo (*Vulpes vulpes*), ha representado un gran problema ya desde el siglo XIX. Sin duda fue el comienzo un foco originado en zorro y tejón detectado entre 1930 y 1935 en la región más occidental de Polonia, probablemente derivado de brotes en los zorros de Groenlandia, Rusia y Norte de Canadá, que como consecuencia de la II Guerra Mundial (en la que se suspendieron o relajaron las medidas de contención, sumado con la desorganización del equilibrio ecológico), se facilitó la extensión de la epidemia en dirección noreste y suroeste. Este último frente se aproximó al Canal de la Mancha e hizo peligrar su entrada en la península Ibérica, si no hubiera sido por la eficacia de las medidas adoptadas por las autoridades de Bélgica, Francia y Luxemburgo, a las que después se sumaron el resto de países. Entre ellas merece referencia especial el éxito obtenido mediante vacunaciones orales del zorro utilizando cabezas de pollo que contenían virus atenuado o proteína G recombinante.

El espectacular descenso de los casos de rabia vulpina en Europa puede observarse si se comparan las cifras correspondientes a 1989 (con un total de 22.615 casos de rabia en Europa, de los que el zorro fue responsable de 15.830 casos, el 70% del total) y 2012, el último año del que se dispone de datos completos (6.065 casos totales de rabia y 2.511 casos de rabia vulpina, que representan 41,4%) en lo que además de un descenso en la rabia del zorro del 84,1%, la repercusión lo es sobre todas las especies, domésticas y salvajes; por ejemplo, comparando los mismos años, se produjo un descenso del 83,2% en la rabia de animales salvajes y del 39,5% en el caso de la rabia de animales domésticos, cuya relación es evidente. Francia, y la mayoría de países de Europa Central, se consideran desde entonces, libres de rabia.

En lo que se refiere a España, debe recordarse que en contexto del brote de rabia urbana en Málaga, entre 1975 y 1978, se produjeron



dos casos de rabia en zorro, ambos en 1977 en julio y noviembre respectivamente, el primero en las inmediaciones de Málaga capital y el segundo en Casabermeja, distantes entre sí aproximadamente 12 km, lo que hizo temer que pudiera tratarse del comienzo de un foco nuevo con el zorro como protagonista. Afortunadamente el tiempo demostró que fueron probablemente contagios ocasionales y singulares, sin ninguna relación entre ellos.

En el presente año se produjo la declaración oficial de rabia canina en España como consecuencia de un caso importado, procedente de Marruecos¹⁵. Los sucesos tuvieron lugar el día 1 de junio, cuando un perro pitbull mordió a cinco personas en Toledo capital (primero a una niña de 6 años y después a un niño de 2, a su padre y a dos jóvenes de 12 y 17 años respectivamente). El perro, con comportamiento agresivo, fue abatido por las fuerzas de orden público y, muestras procedentes de su cadáver (encéfalo en glicerina al 50%), fueron remitidas al Instituto de Salud Carlos III, para su estudio. El día 5 se confirmó el diagnóstico y el 6 se produjo la declaración oficial de la enfermedad¹⁶. Por Resolución de 9 de junio, de la Dirección General de Agricultura y Ganadería, se puso en práctica las medidas contempladas en el Plan de Contingencia¹⁷ para el nivel 1 de alarma (declaración oficial de un caso de rabia en perro), que se han mantenido por un periodo de 6 meses y que se refieren, entre otras medidas a la vacunación obligatoria en un plazo de 15 días de perros, gatos y hurones, además de otras especies susceptibles, en un área de restricción que afectó a un total de 56 municipios de la provincia. Por Resolución de 7 de junio de la Dirección General de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, se incluyó también dos polígonos del municipio de Aranjuez. El suceso conmocionó el sector de los animales de compañía y habida cuenta del tratamiento distinto que en algunas comunidades autónomas se da a la vacunación contra la rabia, numerosos colectivos veterinarios, incluyendo Colegios Oficiales de numerosas provincias, solicitaron la obligatoriedad de esta medida y la unificación de criterios. Finalmente, habiendo transcurrido 6 meses de la declaración de las zonas de restricción, con fecha 23 de diciembre pasado, por Resolución conjunta de la Directora General de Salud Pública, Calidad e Innovación (del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad) y del Director General de Sanidad de la Producción Agraria (del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), se dio por concluido el nivel de alerta 1 y se re-instauró el nivel de alerta 0, sin casos de rabia animal¹⁸.



2-La Rabia

2.1. Antecedentes históricos

Pocas enfermedades, como la rabia, poseen una historia tan rica en interés y detalles, se refiera éste a la enfermedad en sí misma o al agente productor. Señala G. Baer (2007)¹⁹ en el que probablemente sea el mejor ensayo histórico sobre la enfermedad, que la rabia es 'única' para señalar que 'un paciente humano casi siempre sabe cuándo y dónde se produjo la mordedura que originó el contagio'.

El primer registro histórico de que se tiene noticia en relación con la rabia puede situarse en el Código o Leyes de **Eshunna**, primer código acadio en la antigua Mesopotamia, fechado entre 1.930 y 2300 años a.C en el que textualmente se dice '*si un perro está loco y las autoridades lo han puesto en conocimiento de su propietario; si el propietario no le encierra y el animal muerde a un hombre y le causa la muerte, el propietario deberá pagar dos tercios de una mina de plata*' (40 siclos de plata); si muerde a un esclavo y le ocasiona la muerte, habrá de pagar la mitad (15 siclos de plata). En el Código babilónico de **Hammurabi**, una recopilación de leyes fechado en 1792-1850 años a.C se describió la rabia en el hombre.

En los años posteriores al Código de Hammurabi, las ciencias médicas avanzaron durante siglos envueltas en una nube de magia, superstición y divinidad, condicionando los conocimientos a la interpretación de los sacerdotes acerca de las dolencias y enfermedades. En la antigua Mesopotamia, el **sanador** de animales, describía las enfermedades atendiendo solamente al cuadro de signos que la denunciaban, señalando el síntoma y su órgano. Los sanadores describieron la rabia y preparaban remedios para ella a base de ungüentos²⁰.

El papiro de **Kahun**, encontrado en 1889, es el texto veterinario más antiguo que se conoce (2230-1900 años a.C, más probablemente entre 1900 y 1800 a.C) y atestigua la presencia de la veterinaria en el antiguo Egipto, probablemente de carácter sacerdotal²¹. Además de su relación con las matemáticas, el papiro refiere diversas enfermedades de los animales (ganado, perros y gatos) y los peces, sospechándose que entre ellas se incluyese la rabia, aunque hasta la fecha no se ha demostrado.



Existen pocas dudas que la rabia era bien conocida tanto en Grecia como en Roma. En la mitología griega, **Hécuba**, la viuda de Priamo, rey de Troya, con quien tuvo numerosos hijos (según algunos autores 50, entre ellos Héctor, Paris y Casandra) se decía que se había transformado en un perro rabioso y **Homero**, 900 a.C, en la Iliada, compara a Héctor con un perro 'rabioso' y se refiere a la constelación '*Canis Major*', que ejerce una influencia maligna sobre el hombre. **Demócrito**, 500 a.C, realiza la primera descripción conocida del cuadro clínico de la enfermedad en el perro y **Aristóteles**, 400 a.C en su obra '*Historia Natural de los Animales*', se refiere a que los perros sufren de locura, lo que les hace muy irritables y que todos los animales que muerden se vuelven enfermos, tomando en consideración la saliva como un elemento fundamental del contagio, aunque Aristóteles consideraba que el hombre no se afectaba por la enfermedad. **Demócrito y Epicarmos** denominaron a la enfermedad '*lyssa*' (con el significado de locura o furia) y **Platón**, en el siglo 4º a.C utiliza este término para describir la pasión erótica.

Aurelio Cornelio Celso, en el siglo I a.C, escribió '*De Medicina*' y utilizó el término virus (como sinónimo de veneno) para describir el agente que producía la rabia, confirmando creencias anteriores de que la saliva del perro rabioso era fundamental para el contagio. Celso utilizó por primera vez el término '*hidrofobia*' para referirse al rechazo del agua en los enfermos, y describió el uso de la cauterización para el tratamiento de las mordeduras y sangrías, con el propósito de eliminar el humor corrupto producido por el veneno.

Lucio Junio Moderato Columela, fue el que usó por vez primera la palabra veterinario en el siglo I y recomendaba el ajo molido tanto en la sarna del bovino, como en la mordedura del perro rabioso. En la misma época, **Cornelius Celsus** recomendó el tratamiento de las mordeduras de perros con agentes cáusticos y fuego, para eliminar el veneno presente en la saliva y de igual modo, la inmersión del paciente en una piscina después de la mordedura. También, en esa época del emperador Vespasiano (siglo I), **Cayo Plinio Segundo** recomendaba prevenir la rabia en el perro dándole leche de una nodriza que estuviese amamantando a un niño y recomendaba tratar las mordeduras de los perros rabiosos aplicando en la herida cenizas de una cabeza de perro, o también ser bebidas éstas; de igual modo **Galeno** (130-201 d.C) relacionó la rabia humana con la mordedura de los perros rabiosos y recomendaba la exéresis quirúrgica de las heridas para evitar el



desarrollo de la enfermedad.

500 años d.C, **Caelius Aurelianus** sugirió que Homero había sufrido algún tipo de hidrofobia cuando describió el tormento de Tántalo, incapaz de beber agua. En general, muchos autores griegos o latinos conocieron sin duda la rabia, como **Jenofonte**, que habla de ella en 'Anabasis', **Virgilio** en las 'Georgicas' u **Ovidio** en la 'Metamorfosis'.

Los romanos atribuían la rabia a la estrella Sirius (los romanos adoptaron el sistema estelar babilónico y la llamaban estrella del perro o 'canis' llamando a los días más calurosos del año, 'dies canicularis'—días de canícula-' o días del perro). **Plinio** creía que en los días de canícula, los perros eran más susceptibles a la rabia, una idea, que por otra parte, todavía se mantiene en muchos lugares del mundo (Baer, 2000).

Otro mito, muy extendido, sostenía que la rabia estaba causada por un pequeño gusano instalado en la base de la lengua. **Grattius Faliscus** (en el siglo I d.C) mantenía que extrayendo el gusano se curaba el perro, además de que tal gusano poseía poderes curativos mágicos en la prevención de la rabia cuando era inyectado en la persona mordida, aunque solo después de haber dado 3 vueltas alrededor de un fuego. La prevención también se conseguía comiendo el cerebro de una)gallina joven y en idéntica línea fueron surgiendo a lo largo de los tiempos otros muchos remedios y talismanes, aunque uno de los más comunes consistía en invocar la intervención divina a través de los santos, hecho que a lo largo de la Edad Media, en la que no se produjo adelanto científico, hizo que se consagrasen al cuidado de los animales y sus enfermedades toda una pléyade de santos; **San Huberto y Santa Quiteria** lo fueron contra la rabia o en su protección frente a ella.

San Huberto (637-727 d.C) fue primer obispo de Lieja y evangelizador de las Ardenas. Se le considera el protagonista de la leyenda del ciervo crucífero, mientras cazaba, cambiando después su vida. Es el protector en Europa contra la rabia y patrono de cazadores, matemáticos y ópticos. Como protección del Santo se utilizaba un anillo de hierro insertado en la pared de la casa.

En el medioevo, también, proliferaron las recetas contra la rabia. En 'Hortus Sanitatis'. *De Herbis*²² se refiere la receta de Plateario³ que a propósito del **ajo**, dice 'cura la mordedura del perro rabioso'.

3 *El maestro Plateario, de la Escuela Médica de Salerno, escribió (se le atribuye) Practica Brevis, un manuscrito en el que se describen los síntomas y tratamiento de diferentes enfermedades. La obra fue escrita en el s. XII.*



En el **Talmud**, que recoge los criterios de los rabinos de Israel sobre las leyes, tradiciones y costumbres del pueblo judío, basadas en los preceptos del Pentateuco, se considera que la enfermedad es una manifestación del pecado. Cuando los judíos asimilaban la medicina helénica y adoptaron la doctrina hipocrática de los cuatro humores para explicar la causa de las enfermedades, se produjo un cambio en la forma de entender la medicina. En este libro sagrado se mencionan varias enfermedades, en las que se describen sus síntomas, como sucede con la rabia, que se relaciona con hechizos o malos espíritus (Rosner, 1974, cit. por Baer, 2000). Según describe Álamo (1996, opus cit.) *'la boca se queda abierta y se derrama abundante saliva, las orejas permanecen péndulas y el rabo pegado al cuerpo, siendo vacilante la marcha'*. Era tal el pánico que provocaba, considerada mortal de necesidad, que se recomendaba dar muerte a los animales rabiosos, *'incluso en sábado'*. En el párrafo 83-A del Talmud de Jerusalén y Babilonia²³ se señala: *'si alguien es mordido por un perro rabioso, no puede comer el lóbulo de su hígado, pero Rabi Matia Ben Jeresh, si lo permite'* en lo que hace referencia a la creencia de que si se comía un hígado de un perro con rabia, se producía cierta protección frente a la enfermedad, permitiendo la entrada de la enfermedad en modo débil o inocuo.

Los médicos árabes **Rhazes** (siglo IX) y **Avicena** (siglo XI) sugerían que la rabia podía deberse a cambios en la temperatura del ambiente y aportaron interesantes avances en su conocimiento y **Maimónides** (siglo XII) escribió un 'Tratado sobre los venenos y sus antídotos', centrándose su atención en el tratamiento previo a la enfermedad, dado que una vez que comenzaban los síntomas, la muerte era inevitable.

En la Edad Media, las epidemias de rabia fueron comunes en muchos países y en Europa es precisamente a partir de entonces cuando la enfermedad adquiere una gran importancia a partir de la mordedura de perros rabiosos, aunque en ocasiones también se implicaban lobos. Precisamente se atribuye a los lobos un gran brote de rabia que tuvo lugar en Francia en 1271, con más de 30 fallecimientos por causa de la enfermedad²⁴.

Girolamo Fracastoro, en 1546 escribió *'De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione'* donde describió con detalle la rabia en el hombre y confirmó la transmisión a través de la herida producida por la mordedura. El paciente, señala, *'no puede estar ni de pie, ni acostado, moviéndose de aquí para allá como un loco, se desgarran la piel y siente una sed intolerable. Se asusta tanto del agua y de cualquier*

otro líquido, que preferiría morir antes de beber o acercarse a ella. Es entonces cuando muerden a otros, tienen espuma en la boca, los ojos desencajados, quedan exhaustos y emiten su último aliento' (Fracastoro, 1930²⁵, cit. por Martínez Pérez, 2014).

En 1586 se describieron brotes de rabia en Flandes, Austria, Hungría y Turquía y a comienzos del siglo XVII (1604) parece que la enfermedad era muy común en París y en el siglo XVIII, lo era ya en toda Europa, en especial en Europa Central, particularmente en lobos y zorros, igual que a comienzos del siglo XIX, en particular en Francia, Alemania e Inglaterra. En 1803 se describió una epidemia de rabia en el este de Francia (en Jura) descrita como la más grande jamás vista, con cientos de zorros muertos en las estribaciones de los bosques y decenas de personas mordidas. En 1804 la enfermedad apareció en Alemania difundándose por todo el país, excepto en el norte y en 1913 la enfermedad era muy común en Ucrania. Probablemente en América, los primeros casos descritos lo fueron en México en 1709, en la península del Yucatán, como consecuencia de ataques de murciélagos vampiro.

Pese a su conocimiento y difusión, hasta 1804 no se demostró la transmisibilidad de la saliva por **George G. Zinke**, quien utilizando saliva de un perro rabioso la transmitió a un perro sano por escarificación en pequeñas incisiones realizadas en su pata delantera. El perro enfermó al 7º día y el 8º ya rechazaba agua y alimento, permaneciendo recogido en una esquina de su jaula. Después transmitió de igual modo la enfermedad desde un perro enfermo a un conejo y una gallina, probando definitivamente la naturaleza infecciosa de la enfermedad. En 1821, **F. Magendi y G. Breschet** infectaron perros con saliva de enfermos humanos de rabia, reproduciendo también la enfermedad. No obstante, la susceptibilidad de especie animal no estuvo clara hasta que **Victor Galtier** demostró en 1879 la transmisión de un perro al conejo y de un conejo a otro, en serie²⁶ tanto por inyección como por mordedura.

2.2. Importancia de la rabia en el mundo

Como se verá, más adelante, a nivel mundial, el problema de la rabia como zoonosis, esto es, en su relación con el ser humano que se infecta a partir de reservorios y vectores animales, está relacionado en el 99% de los casos, a la rabia canina. Aunque es cierto que en los países occidentales, principalmente en los Estados Unidos, Canadá y Europa, la rabia es en la actualidad un problema controlado, no ocurre así en otros lugares del planeta; de hecho, según la Organización Mundial de



la Salud (OMS), cada año mueren aproximadamente entre 55.000 y 60.000 seres humanos como consecuencia de la rabia, aunque algunos informes señalan que esta cifra todavía debería aumentarse sustancialmente (hasta 100.000, según otras estimaciones) toda vez que en algunos países asiáticos y africanos los diagnósticos relacionados con los fallecimientos no siempre se realizan y si lo hacen no se notifican. El problema de la rabia, pues, se concentra en Asia, principalmente en la India, en África y en algunas regiones de Sudamérica.

Solo en la India, la rabia se cobra al año entre 25.000 y 30.000 vidas humanas, especialmente entre los niños, que aportan más de la mitad de estos valores²⁷ y es sobre ella, en la que se han publicado la mayor parte de las estimaciones sobre las que se apoyan tales cifras, como que solo el 47% de los pacientes que requieren vacunación, la reciben²⁸, o que de éstos, debido a su coste y a la duración de los programas de tratamiento post-exposición, en muchos casos, solo se limita de forma totalmente inoperante, a la primera de las dosis. Menezes (2008) ha señalado que en India, cada 2 segundos, un perro muerde a un ser humano y que cada 30 minutos, en algún lugar de la misma, se produce un fallecimiento por esta causa, por lo que no es de extrañar que todas las estadísticas que se puedan hacer se quedan cortas y en la práctica los valores seguramente son muy superiores. En aquél país, el costo anual a causa de los días perdidos por persona debido a las mordeduras, alcanza la cifra de 25 millones de dólares y los humanos que se vacunan después de la exposición por mordedura pierden, de media, 2,2 días de sus ingresos²⁹.

En el caso de China, aunque existe un gran desconocimiento de la situación, se afirma que la incidencia de la enfermedad está aumentando y alcanza ya niveles preocupantes³⁰ y en el de África, en la mayoría de los países, simplemente se carece de datos o donde existen, no son fiables³¹.

Por lo que se refiere a Europa, aunque en la mayor parte de los países occidentales está bajo control tanto la rabia canina como la vulpina, todavía se mantiene en niveles importantes en algunos países de Europa del Este (en 2012, un total de 9 casos humanos, principalmente en Rusia, y 6.061 casos animales, aproximadamente a partes iguales en animales domésticos y salvajes, destacando Belarus, Croacia, Moldavia, Polonia, Rumanía, la Federación Rusa, Turquía y Ucrania). De importancia creciente, puede considerarse los casos de rabia de quirópteros (en 2012, 46 casos, principalmente en Francia, Alemania y Holanda).



2.3. Presentación clínica y patogénesis de la Rabia.

Como hemos señalado, la rabia es una encefalitis letal, transmitida principalmente por la mordedura de animales infectados o enfermos, debido a la importante presencia de virus en la saliva.

Aunque se considera que los murciélagos son los únicos que pueden portar el virus sin cambios clínicos, existen evidencias crecientes de que pueden existir casos no letales en varias especies animales y en el hombre^{32, 33, 34}, incluyendo también animales de experimentación como el ratón³⁵, en el que el aclaramiento del virus requiere una inducción del sistema de inmunidad innata en el sistema nervioso central, a la vez que la respuesta adaptativa en el sistema nervioso periférico y una infiltración de efectores inmunes capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que una de las conclusiones más unánimes, tiene que ver con la posible presencia de anticuerpos en el líquido cerebro espinal que, presumiblemente, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica³⁶.

En un ensayo publicado recientemente (Gnanadurai *et al.*, 2013)³⁷ se han estudiado infecciones no letales en perros infectados con una cepa de virus salvaje aislada de un perro en México, comprobando la presencia de anticuerpos neutralizantes en niveles elevados en el líquido cerebroespinal y una débil acumulación de células inmunes en el sistema nervioso central, mientras que en los perros que fallecían como consecuencia de la infección o no mostraban anticuerpos o estos eran muy escasos (ni en el suero ni en líquido cerebro espinal) y sin embargo la inflamación del sistema nervioso central era grave.

Después de la mordedura, la segunda vía de transmisión más común es el contacto con mucosas, como sucede, por ejemplo entre los animales salvajes, que puede contraerse por consumo de carroña procedente de animales fallecidos como consecuencia de la enfermedad. La vía aérea se describe también con frecuencia como consecuencia de accidentes en laboratorios de diagnóstico o investigación, o en condiciones de campo, en lugares de gran concentración de animales enfermos; se ha descrito al menos en 4 ocasiones entre 1956 y 1977, casi siempre en relación con cuevas habitadas por murciélagos.

También se han descrito algunos casos de transmisión iatrogénica interhumana, como consecuencia de trasplantes desde donantes humanos infectados y no diagnosticados, principalmente de córnea, pero también de otros órganos como hígado, riñones, arterias, pulmones, y



riñón-páncreas. Entre 1978 y 2005 se recogen un total de 15 casos de rabia por este origen, principalmente en Estados Unidos y Alemania, pero también en la India, Francia o Tailandia³⁸.

En la patogenia y cuadro clínico de la rabia se diferencian varias fases, bien estudiadas en el caso del perro y en el hombre. El **periodo de incubación** varía ampliamente y ocupa desde que se produce la infección hasta que el virus alcanza el sistema nervioso central (raíces dorsales de los ganglios espinales) y comienzan los primeros síntomas. Aunque el virus posee tropismo nervioso, se ha descrito multiplicación en el tejido muscular en el punto de inoculación, que incrementa la dosis infectante inicial, facilitando en consecuencia su capacidad de difusión; después el virus inicia su difusión centrípeta a través del sistema nervioso periférico, hasta alcanzar el sistema nervioso central. En animales se han descrito casos extremos de periodo de incubación, desde 10 a más de 200 días, por lo general entre 14 y 90, aunque ello depende de la distancia entre el punto de infección y el SNC (por lo tanto el camino que ha de recorrer el virus), la densidad de terminaciones nerviosas en el punto de inoculación y la dosis de exposición y cepa del virus implicada. En perros y gatos en cuarentena se han descrito habitualmente periodos de incubación de 10 días.

El **periodo prodrómico** se prolonga hasta que el virus se fija en las neuronas cerebrales. Durante su migración por el sistema nervioso periférico el virus evade el sistema inmune y se replica en los ganglios espinales iniciándose la activación del sistema inmune y la producción de anticuerpos, que llegan demasiado tarde para neutralizar el virus, que avanza y se fija en el cerebro, donde se replica y escapa de las defensas adquiridas. Los primeros síntomas son inespecíficos, con fiebre, dolor muscular, agitación, ansiedad, vómitos y dolor en la extremidad mordida. Este periodo, en el caso del hombre, suele ser corto, de 2 a 4 días.

La crisis fundamental constituye el **periodo neurológico agudo**, que tiene lugar rápidamente (en cuestión de horas), con replicación del virus a nivel del tálamo, ganglios basales y médula espinal. Aunque los títulos de viremia son bajos, puede encontrarse el virus en la leche (en animales en lactación), tracto respiratorio, riñones, músculos, mucosas, piel y, en títulos altos, en la saliva⁴. Comienza a producirse después

4 *La importancia epidemiológica de la mordedura como procedimiento de transmisión del virus, está condicionada a la presencia de éste en la saliva de los animales enfermos; en el caso de los murciélagos, por ejemplo, como resultado de estudios experimentales, se ha determinado la presencia de virus en la saliva (mediante RT-PCR) en un 22% de los casos.*



la inflamación a nivel cerebral (encefalitis) y el enfermo fluctúa entre la consciencia y la confusión. También se inician cambios en el comportamiento, que derivan a cambios agresivos, con episodios violentos, con convulsiones y ataques (rabia furiosa). En el hombre se describen alucinaciones e hidrofobia inducida por espasmos faríngeos. En algunas especies, como sucede en los gatos, se describe aerofobia y, en general, hay elevada sensibilidad a la luz, a los sonidos y a los olores. Son visibles los espasmos respiratorios.

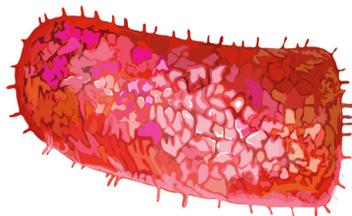
En las últimas fases comienzan a disminuir los espasmos respiratorios que dan paso a episodios de parálisis, arritmias y colapso de los órganos principales, como consecuencia de la encefalitis. Las pupilas no responden a la luz y al final se produce la muerte por fallo respiratorio y multisistémico.

En el hombre el curso varía entre 3 y 6 días, con un porcentaje de mortalidad superior al 99% y los escasos casos que se han descrito como supervivientes (ver después), mantienen secuelas cerebrales importantes, que no se recuperan.

Por su interés actual y probablemente futuro, habida cuenta del creciente número de especies de *Lyssavirus* aisladas de los murciélagos y su demostrada capacidad para producir saltos de la barrera de especie y casos humanos, igualmente fatales, parece de interés conocer lo que se refiere a la patogénesis por estas variantes virales. En los casos humanos a partir de virus de murciélagos europeos (EBL) se ha descrito la presencia de mareos, adinamia, anisocoria (pupilas asimétricas y desiguales), prolapsos y dificultades ambulatorias³⁹. En los animales de experimentación parece que EBL-2 es menos virulento que EBL-1⁴⁰ y en los últimos años, igual que ha sucedido en el caso de la rabia canina, se han descrito también gradaciones en el cuadro clínico (que se han denominado ‘casos de rabia atípicos’) que incluyen síntomas como dolor neurológico, signos focales del tronco encefálico y mioclonias⁴¹. Recientemente, Healy *et al.* (2013)⁴² llevaron a cabo un estudio en ratones inoculados periféricamente con ambos virus de murciélagos observando variaciones en la aparición de signos clínicos, incluso en el periodo de incubación, además de la pérdida de peso en el curso de la enfermedad, aunque la distribución del antígeno en las regiones cerebrales examinadas era similar, por lo que se entendía que la distribución antigénica no se asociaba con la presentación clínica; sin embargo a nivel del cerebelo, médula caudal, hipotálamo y tálamo sí que se observaban diferencias cuantitativas, sugiriendo su interés re-



lacionado con el tipo de virus.



3-El Virus de la Rabia

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus*, de la familia *Rhabdoviridae*⁴³, orden Mononegavirales⁴⁴. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus señala que los criterios para la diferenciación de especies incluyen la distancia genética, los patrones antigénicos obtenidos en reacciones con paneles de anticuerpos monoclonales o de sueros policlonales frente a la nucleocápsida y los caracteres ecológicos (distribución geográfica y rango de hospedadores).

El virus de la rabia es un virus ARN de cadena sencilla, estructuralmente compuesto por dos unidades estructurales y funcionales; la **envoltura**, formada por una bicapa lipídica procedente de la célula hospedadora, cubierta con proyecciones o espículas de trímeros de proteína G, que se reconocen y se unen a los receptores celulares de la célula diana, hecho que le confiere la condición de proteína esencial para el ejercicio de la patogenicidad y para la inducción de inmunidad protectora. Debajo de la envoltura se dispone la matriz, a base de proteína M (de la matriz), que se responsabiliza de la gemación del virus y la morfología típica de la partícula, en forma de bala de cañón, y la **ribonucleocápsida**, de estructura hélica, que está integrada por el genoma de ARNmc (de 11 a 12 kb, lineal, no segmentado y de polaridad negativa), al que están íntimamente asociadas las proteínas N, L y P (NS), formando un complejo que asegura la transcripción y la replicación del genoma en el citoplasma de las células nerviosas.

En la clasificación del virus rábico se utilizó, inicialmente, el sistema de serotipos, atendiendo a pruebas de neutralización cruzada, una situación que se mantiene para las primeras propuestas (serotipos 1 al 4) que se corresponden cronológicamente con el virus de la rabia clásico (RABV), virus de Lagos (LBV), virus Mokola (MOKV) y virus Duvenhage (DUV). A partir de los virus de murciélagos europeos (EBL-1 y EBL-2) y *Lyssavirus* australianos (ABL), comenzó a utilizarse un sistema de ge-



notipado, que en el caso de los cuatro primeros tipos se corresponde exactamente con el serotipo, pero que para los siguientes aislados se utiliza solo (genotipos 5 al 12 para los virus EBL-1, EBL-2, ABL, virus Aravan, Khujand, Irkut y del Cáucaso Oeste). Los virus más recientemente aislados (Shimoni, Bokeloh, Ikoma y Lleida), están pendientes de aceptación por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus⁴⁵. Todavía, se reconoce que dentro de cada serotipo y genotipo, existen numerosas variantes caracterizadas por sus epitopos que se identifican mediante anticuerpos monoclonales, aunque tal variación no parece que se refleje en propiedades de interés, como la patogenicidad, que si se expresa en otro nivel (ver después).

3.1. Tipos de *Lyssavirus*

El virus de la rabia se divide en 3 Filogrupos^{46, 47}, considerando que cada uno de ellos agrupa tipos de *Lyssavirus* con diferentes propiedades biológicas, incluyendo patogenicidad, capacidad para inducir apoptosis celular, reconocimiento de receptores celulares, etc.. El **Filogrupo I** incluye el virus de la rabia clásico (RABV, que incluye los tipos de virus terrestres aislados en todo el mundo y los de murciélagos en el continente americano y los virus vacunales: cepas Pasteur-Paris, etc.), el virus Duvenhage (DUV), los *European Bat Lyssavirus* (EBL) 1 y 2, el *Australian Bat Lyssavirus* (ABL), el virus de Aravan (ARAV), el virus Khujand (KHUB) y el virus Irkut (IRKB). En el **Filogrupo II** se incluyen el virus de Lagos (LBV, aislado de *Megachiroptera*, grandes murciélagos africanos, *Eidolon helvum* y *Micropterus pusillus*), el virus Mokola (MOKV) y el virus de Shimoni (SHIBV). El virus del Cáucaso Occidental (WCBV), que no reacciona cruzadamente con ningún otro tipo, se ha propuesto como miembro del **Filogrupo III** (aunque se mantiene provisionalmente en el Filogrupo II ó III), igual que un nuevo virus aislado en África de un tipo de civeta (virus Ikoma, IKBV) y otro tipo nuevo descrito por un grupo de investigadores españoles en 2013 (LLBV), a partir de un murciélago insectívoro 'de alas dobladas' (*Miniopterus schreibersii*).

El **genotipo 1 (virus de la rabia clásico, RABV)** se corresponde con el serotipo 1, al que son susceptibles un amplio rango de mamíferos (perro, gato, bovino, ovejas, camellos, zorro, tejón, lobo, etc., y murciélagos) siendo el único que cubre tanto animales terrestres como aéreos o voladores. Para este tipo se consideran hospedadores primarios (reservorios) el zorro, el coyote, la mofeta, la mangosta, lobos, chacales y otros félidos (aunque estos últimos no desempeñan un papel clave en la transmisión) y los murciélagos, tanto insectívoros como frugívoros

y hematófagos. Entre los reservorios domésticos o peri-domésticos se incluyen el perro (prácticamente en todo el mundo), el gato (aunque el número de casos de rabia felina puede superar ocasionalmente el de rabia canina, pero el virus no se mantiene) y el hurón (que no solo se muestra susceptible al virus de la rabia clásico, sino también al EBL-1 y menos al EBL-2). Algunas especies de animales no desempeñan ningún papel en la transmisión y mantenimiento del virus (se consideran hospedadores finales) como sucede con los bovinos, ovejas, camellos, etc.

El **genotipo 2**, que se corresponde con el serotipo 2 (**virus de murciélagos de Lagos, LBV**), fue aislado en 1958 de murciélagos frugívoros (*Megachiroptera*, *Eidolon helvum*) en Lagos Island (Nigeria)⁴⁸ y se distribuye en el África Subsahariana. Fue el primer virus relacionado con el de la rabia (o el segundo *Lyssavirus*) en ser identificado, aunque no se ha descrito como causa de enfermedad humana. Posteriormente se han obtenido otros aislados a partir de gatos, perros y mangostas, siempre en África, incluyendo Sudáfrica. Algunos de los gatos infectados experimentalmente con este virus, habían sido vacunados con vacuna frente a la rabia, pero sucumbieron a la infección, lo que traduce falta de protección. Mediante la aplicación de técnicas recientes de biología molecular se ha propuesto la existencia de una mayor diversidad genética dentro de la especie, que se traduce en hasta 4 *clusters* o linajes independientes, con diferente distribución geográfica.

El **genotipo 3** se corresponde con el serotipo 3 (**virus Mokola, MOKV**)⁴⁹, que fue aislado de una musaraña (*Crocidura* spp) en Nigeria en 1968 y, después, también de niños, en el mismo país, con cuadros de enfermedad del sistema nervioso central. El virus se considera ampliamente distribuido en África y se ha aislado también de otras musarañas y roedores en Camerún y en la República Centro Africana y de animales domésticos en Zinbawe, particularmente en gatos, probablemente por consumo de roedores infectados. Se ha propuesto que musarañas, roedores y murciélagos podrían actuar como reservorios del virus. Hasta la fecha se han denunciado dos fallecimientos humanos como resultado de la infección por estos virus, en Nigeria, de muchachos jóvenes, aunque la fuente de infección no se pudo identificar.

El **genotipo 4** se corresponde con el serotipo 4 (**virus Duvenhague, DUV**)⁵⁰, aislado de murciélagos insectívoros. Recibió este nombre después de que se sucediera la primera víctima humana, ocurrida en la localidad con ese nombre, en Sudáfrica en 1971, a consecuencia de la mordedura por un 'murciélago de dedos largos, de Schreibers' (*Mi-*



niopterus schreibersii). Una segunda víctima humana correspondió a un hombre de 77 años mordido en la cara por un murciélago en 2006⁵¹ y un tercero corresponde a una mujer alemana⁵² de vacaciones en Kenia, que durante un safari también fue mordida en la cara por un murciélago.

El **genotipo 5** (*European Bat Lyssavirus, EBL-1*), se aísla habitualmente en Europa de murciélagos insectívoros (*Eptesicus serotinus*). El primer caso se registró en Alemania (Hamburgo) en 1954⁵³ y en los años siguientes los casos descritos en Dinamarca⁵⁴ y Holanda fueron particularmente numerosos⁵⁵. Entre 1977 y 1987, se recogieron 860 casos en el Centro de Vigilancia de la Rabia para Europa, la mayoría identificados como EBL-1, además de en los tres países citados también en Francia, la antigua Yugoslavia, Polonia y en España, asociándose de forma particular con *Eptesicus serotinus* (el murciélago hortelano) y pese a la abundancia de esta especie en el Reino Unido, nunca se ha descrito allí ningún caso (los dos casos descritos hasta la fecha lo han sido a partir de *Myotis daubentonii*, el murciélago de Daubenton, ver después). Mediante estudios filogenéticos, se ha propuesto dividir este genotipo en dos **subgrupos (1a y 1b)**. Varios investigadores españoles han señalado seropositividades en otras especies de murciélagos, que podrían actuar como portadores asintomáticos, liberando el virus en la saliva, mientras que en el caso de *E. serotinus* se desarrollan signos clínicos y el animal muere. Se han descrito casos de infección en otras especies, incluyendo murciélagos frugívoros egipcios y martas (en Alemania), ovejas (en Dinamarca), gatos domésticos (en Francia, ver después). De igual modo, estudios experimentales llevados a cabo con perros, gatos, hurones, zorros, ovejas y ratones, han puesto de manifiesto que todas estas especies son susceptibles y que pueden desarrollar rabia clínica indiferenciable de la producida por el virus de la rabia clásico. Se han descrito fallecimientos humanos después de la exposición a murciélagos infectados en países de la antigua Unión Soviética, aunque no existen virus aislados ni caracterizados. Un caso que tuvo lugar en Rusia en 1985, a partir de un murciélago si pudo ser aislado y caracterizado como EBL-1.

El **genotipo 6** (*European Bat Lyssavirus, EBL-2*), también se aísla de murciélagos insectívoros en Europa, aunque de especies diferentes (*Myotis daubentonii* o *M. dasycneme*, según la localización geográfica) y, además, los aislamientos se han producido mucho menos frecuentemente que el EBL-1, además de que hasta la fecha ha estado limitado a



Holanda, el Reino Unido, Suiza y Alemania. El primer aislamiento tuvo lugar a partir de un zoólogo que falleció en Finlandia con diagnóstico de rabia en 1985⁵⁶ y después se han producido otros aislamientos en Escocia, Holanda o Alemania⁵⁷. En este caso no se han descrito saltos de especie a otros animales mamíferos, pero si ha sido responsable de dos fallecimientos humanos, el primero en Finlandia y el segundo en el Reino Unido, en ambos casos con historial de contacto estrecho con los animales y consecuente exposición al virus, y sin prevención post-exposición con vacunación antirrábica.

El **genotipo 7** (*Australian Bat Lyssavirus, ABL*) se aisló en Australia, por primera vez en 1996⁵⁸, a partir de material de cerebro de murciélagos frugívoros (*Megachiroptera, Pteropus alecto*) aunque también se ha aislado después de murciélagos insectívoros. Se han descrito dos casos humanos en mujeres, la primera (de 39 años) trabajaba en un centro de recuperación de animales salvajes, y podría haber estado en contacto con murciélagos enfermos y el segundo se produjo en 1998 en otra mujer que había sido mordida dos años antes por un gran zorro volador y falleció después a consecuencia de la enfermedad⁵⁹. Hasta la fecha no se han descrito casos en mamíferos terrestres.

El **genotipo 8** (**virus Aravan, ARAV**) se aisló de murciélagos insectívoros (*Myotis blythi*), en Asia Central (en Kirgystan)⁶⁰ en 1991, diferenciándolo del resto de *Lyssavirus* sobre la base de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del genoma y proteínas. El análisis filogenético ha demostrado que este virus se relaciona con el virus Duvenhage y EBL-1 y, en menor extensión, con el EBL-2, pero no con el resto⁶¹.

El **genotipo 9** (**virus Khujand, KHUV**) se aisló de murciélagos⁶², también insectívoros (*Myotis mistacinus*), en Asia Central, en el norte de Tajikistgan, en 2001. Igual que antes, la consideración de una especie independiente derivó de la secuencia del genoma viral. Está relacionado con el virus Aravan y con EBL-2.

El **genotipo 10** (**virus Irkut, IRKV**) es oriundo de una región del Este de Siberia (región de Irkut)⁶³ y se aisló de un murciélago insectívoro (*Murina leucogaster*) capturado en 2002. Se ha documentado un caso humano mortal en 2009.

El **genotipo 11** (**virus de murciélagos del Cáucaso Occidental, WCBV**), está distribuido en la región caucásica. Se aisló por primera vez en 2002 de un murciélago insectívoro (*Miniopterus schreibersi*) capturado en Krasnodar, en el sur de Rusia, cerca de la costa este del Mar Negro⁶⁴.



Se han descrito anticuerpos frente a este virus en murciélagos de Kenia, aunque ello no significa más que la existencia de cierta relación de proximidad con otros virus circulantes en aquella región. Hasta la fecha no se ha aislado en África.

El **genotipo 12**, finalmente (**virus de los murciélagos Shimoni**, de nariz de hoja, **SHIBV**), se aisló de murciélagos insectívoros (*Microchiroptera*, *Hipposideros commersoni*) en Kenia⁶⁵, en el este de África. Fue descrito por primera vez en 2009, a partir de murciélagos hembras encontradas muertas en una cueva de la costa sur de Kenia como parte de un estudio que incluyó 22 especies de murciélagos (616 murciélagos en total). Se ha demostrado su patogenicidad para el ratón y hámster, manteniendo relaciones con el virus LBV y MOKV. Fue aceptado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus en 2012.

El resto de virus descritos hasta la fecha, permanecen aún **pendientes de aprobación** por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, incluyendo el virus de murciélagos **Bokeloh**, aislado de murciélagos insectívoros (*Myotis nattereri*) en Europa, el virus **Ikoma**, aislado de civetas (*Civettictis civetta*) en África y el virus de murciélagos de **Léri-da** (LLB), aislado de murciélagos ‘de cueva’, insectívoros (*Miniopterus schreibersii*).

El **lysavirus de murciélagos Bokeloh (BBLV)** fue descrito en 2010 a partir de un murciélago de Natterer (*Myotis nattererii*)⁶⁶ recogido para su recuperación y eventual retorno a la vida salvaje en Alemania en noviembre de 2009, pero en febrero de 2010 comenzó a comportarse de forma agresiva contra cualquier objeto en movimiento e intentando morder. Murió 10 días después de los primeros síntomas y fue diagnosticado positivo a rabia, aunque el patrón obtenido con un panel de anticuerpos monoclonales frente a antígenos de la ribonucleocápsida no se correspondían ni con el EBL-1 ni con el EBL-2, ni con otros *Lysavirus*, igual que sucedió con otros estudios de secuenciación genómica⁶⁷.

Por su parte, el **virus Ikoma** fue aislado en 2009 a partir de civetas africanas (*Civettictis civetta*)⁶⁸ con signos de rabia, que fueron sacrificadas en el parque del Serengeti, en Kenia, las cuales, sin provocación, habían agredido a un niño que hubo de ser tratado frente a rabia, post-exposición. El virus fue estudiado en Weybridge (UK), comprobando que se trataba de una especie genéticamente diferente de las conocidas, denominándose virus Ikoma.



Finalmente, en julio de 2011, en el Centro de Recuperación de Animales Salvajes de Vallcalent, en **Lérida**, se recibió un murciélago de alas dobladas (*Miniopterus schreibersii*) en condiciones clínicas extremas, muriendo al poco tiempo de su recepción, siendo congelado a -20°C. En marzo de 2012 se descongeló el cadáver como parte del Programa de Vigilancia de la Rabia, resultando positivo por RT-PCR e IFD, aunque no se consiguió el aislamiento del virus; en cualquier caso, la secuencia del fragmento genómico procedente del diagnóstico molecular, no mostró similitud con ninguno de los *Lyssavirus* conocidos, proponiéndose como una nueva especie, a la que se ha denominado **Lyssavirus de murciélagos de Lérida (LLBV)**⁶⁹. No se han acreditado exposiciones humanas a este virus, definiéndose como próximo al WCBV, con el que comparte especie de murciélago hospedadora.

3.2. Divergencia genética en las especies de *Lyssavirus*:

Como hemos señalado antes, dentro del EBL-1 ya se han separado **dos linajes** que se solapan en lo que a su distribución geográfica se refiere; por un lado el **EBL-1a** se distribuye de forma predominante en el norte de Europa (Dinamarca, Holanda y Finlandia), en tanto que el **EBL-1b** se ha descrito en Alemania, Francia y España. Ambos linajes asocian la infección con *Eptesicus serotinus fuscus*, aunque también es importante la infección en otras especies de murciélagos serotinos como *E. fuscus* y meridionales, como *E. isabellinus* (especialmente), lo que ha hecho sugerir la posibilidad de incluir y diferenciar, por lo menos, una tercera variedad o linaje⁷⁰.

Aunque, como hemos señalado, se han producido saltos de la barrera de especie, hasta la fecha la infección no se ha mantenido de forma estable en los nuevos hospedadores^{71, 72, 73}. EBL-2 se asocia, principalmente, con *Myotis daubentoni* y, hasta la fecha, no se han descrito saltos de la barrera de especie aunque ya dispone en su haber dos casos fatales humanos. En el caso del virus de Lagos (LBV) se han descrito hasta la fecha **4 linajes** que se denominan con letras mayúsculas. El **linaje A** se corresponde con aislados de Kenia, Senegal y Francia. El **linaje B** se corresponde con el aislado original del genotipo, en Nigeria. El **linaje C** está muy distribuido en Zimbawe, Sudáfrica y la República Centroafricana y finalmente, el **linaje D**, se corresponde también con aislados de Kenia. Algunos autores han planteado la posibilidad de que esta especie pudiera subdividirse en varios genotipos atendiendo a los criterios adoptados por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus por lo que todos los aislados pertenecientes a la misma especie po-



seen identidades superiores al 80%. Dentro de la especie, los linajes son más divergentes que el resto de especies, por lo que es posible que sean reclasificados en un futuro próximo.

Tabla 1. Serotipos, genotipos, linajes y hospedadores naturales de *Lyssavirus*

Denominación	Serotipo	Genotipo	Linajes	Hospedadores y letalidad para el hombre
Virus de la rabia clásico (RABV)	1	1		Virus de la rabia terrestres, de murciélagos hematófagos (<i>Desmodus rotundus</i>) e insectívoros y virus vacunales
Virus de Lagos (<i>Lagos Bat Virus</i> , LBV)	2	2	A,B,C y D. Posible varios genotipos	Megachiroptera: <i>Eidolon helvum</i> y <i>Micropteropus pusillus</i>
Virus Mokola (MOKV)	3	3		<i>Crocidura</i> spp. 2 casos humanos letales. No murciélagos (musarañas, perros y gatos)
Virus Duvenhague (DUVV)	4	4	-	<i>Miniopterus schreibersii</i> , <i>Nycterus</i> spp. 3 casos humanos letales
Virus europeo de murciélagos-1 (<i>European Bat Lyssavirus</i> , EBL-1)	-	5	1a y 1b	<i>Eptesicus serotinus</i> y otros. Varios casos humanos
Virus europeo de murciélagos-2 (<i>European Bat Lyssavirus</i> , EBL-2)	-	6	-	<i>Myotis daubentoni</i> , <i>M. dasycneme</i> . 2 casos letales en el hombre
Virus australiano de murciélagos (<i>Australian Bat Lyssavirus</i> , ABL)	-	7		Macrochiroptera: <i>Pteropus alecto</i> , <i>P. poliocephalus</i> , <i>P. scapulatus</i> . <i>Saccolaimus flaviventris</i> . 2 casos letales en el hombre ⁷⁴
Virus Aravan (ARAV)	-	8		<i>Myotis blythi</i>
Virus Khujand (KHUV)	-	9		<i>Myotis mistacinus</i>

Virus Irkut (IRKV)	-	10		<i>Murina leucogaster</i> . 1 caso letal en el hombre
Virus de murciélagos del Cáucaso Occidental (WCBV)	-	11		<i>Miniopterus schreibersii</i> Es el más divergente de todos
Virus de murciélagos de Shimoni (SHIBV)	-	12	Intermedio entre genotipos 3 y 11	Microchiroptera: <i>Hipposideros commersoni</i>
Lyssavirus de murciélagos Bokeloh (BBLV)	-	Pendiente		<i>Myotis nattererii</i>
Lyssavirus de Iko-ma (IKOV)	-	Pendiente	Genéticamente divergente de todos	<i>Civettictis civetta</i> . No en murciélagos aunque puede que sea su origen
Lyssavirus de murciélagos de Lérida (Lleida) (LLBV)	-	Pendiente		<i>Miniopterus schreibersii</i>

3.3. Interrelaciones genéticas y antigénicas en el género *Lyssavirus*.

Como ya se ha señalado, dentro del género *Lyssavirus*, las distintas especies se han clasificado tanto a partir de la estructura antigénica (serotipos) como desde el punto de vista genético (genotipos) y a partir de ambos se diferencian Filogrupos. La diferenciación se basa principalmente en el grado de protección cruzada proporcionada por las vacunas disponibles, para cada uno de los tipos de virus caracterizados, un aspecto del máximo interés desde el punto de vista práctico.

Los datos genéticos permiten una comparación cuantitativa fiable de la divergencia de los *Lyssavirus* y se dispone de los datos de secuencias para al menos un aislado de las especies aceptadas por el ICTV, estando el resto en espera de clasificación.

A través de los marcos de lectura abierta (ORF) que codifican para la proteína G, los *Lyssavirus* presentan una divergencia máxima del 50% a nivel de los nucleótidos, mientras que comparten solamente una identidad del 46%. Genéticamente, el virus IKOV es el más divergente de todos los *Lyssavirus*. Sin embargo, el uso de datos genéticos para predecir la protección cruzada de las vacunas, está limitado por el efecto



impredecible de las sustituciones de aminoácidos sobre la variación antigénica, que depende de su naturaleza y localización.

La medida de la variación antigénica se basa, típicamente, en ensayos serológicos, menos fiables que los genotípicos, que se afectan por la variación individual en la respuesta de anticuerpos, por lo que se considera que los datos procedentes de estudios serológicos poseen una resolución baja y habitualmente solo se utilizan cualitativamente.

En el caso de los virus influenza, la mejora de la resolución de los mapas antigénicos generados utilizando cartografía antigénica, unido a los datos de estudios serológicos ha permitido una comparación más precisa de los datos antigénicos y genéticos. La aplicación de estas técnicas a un panel global de *Lyssavirus* ha permitido también la integración de ambos tipos de datos.

La investigación de las discrepancias entre la distancia genética y antigénica muestra, por ejemplo, que IRKV y ARAV están relacionados más estrechamente con EBL-2 que con EBL-1 y que KHUV está más relacionado con el virus de la rabia clásico (RABV) de lo que podría esperarse a partir de las relaciones filogenéticas. LBV y MOKV son antigénicamente muy diferentes y han sido situados en un filogrupo diferente en base a la distancia genética y a una neutralización cruzada limitada.



4-Epidemiología

Como ya hemos señalado, la rabia puede definirse como una encefalitis fatal [estadísticamente un 100% de mortalidad, aunque se han descrito unos pocos casos de supervivencia (6 ó 7 casos, solamente en los EE.UU.^{75, 76, 77}, asociados al denominado protocolo de Milwaukee, MP⁷⁸ y también en algunos en animales, por ejemplo en hurón⁷⁹) aunque siempre con secuelas importantes; en todos los casos con presencia de anticuerpos a nivel del líquido cerebro espinal en el momento de la hospitalización o después del tratamiento] debido a la infección con virus del género *Lyssavirus* de origen o fuentes animales. La rabia es una zoonosis principal muy destacada y también se la considera en el ámbito internacional un tipo de enfermedad desatendida (“*neglected*”).

Como se ha señalado, la mayoría de los *Lyssavirus* son capaces de causar rabia clínica en mamíferos (de forma natural o experimental, aunque se desconoce la situación en algunos de los virus descritos más recientemente) y con excepción del genotipo 2 (Virus de murciélagos de Lagos) y los más recientemente incorporados (Virus Aravan, Virus Khujand, *Lyssavirus* del Cáucaso Occidental, *Lyssavirus* de Shimoni, *Lyssavirus* de Bokeloh y *Lyssavirus* de Lérida), han sido ya hasta ahora, responsables de casos humanos.

En términos relativos, la infección humana es consecuencia habitualmente de la mordedura de un animal infectado (por lo general el perro y en menor medida otras especies como el gato o el hurón o el mapache) con el virus de la rabia clásica y en menor medida como consecuencia de la mordedura de algunas especies salvajes (zorro, lobo, mapache), incluyendo los murciélagos.

Epidemiológicamente, la rabia se desenvuelve en ciclos, en cada uno de los cuales suele situarse una especie animal como principal protagonista, que asume el papel de reservorio y/o vector del virus.



4.1. La rabia del perro o rabia ‘urbana’

No existe duda del papel principal del perro en la epidemiología de la rabia, en lo que se refiere a su condición de zoonosis. De todos modos, este tipo de rabia, denominada ‘urbana’, aunque más precisamente debería denominarse ‘rural’ pues son los asentamientos rurales en la mayoría de los países en desarrollo, los que más sufren del problema, mantiene conexiones con otras especies, principalmente salvajes (zorros, chacales, mangostas y otros) que pueden vehicular el virus rábico.

En cualquier caso aún existen lagunas importantes en el conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad relacionadas con regiones de rabia endémica, con fluctuaciones moderadas en la prevalencia, que no pueden explicarse bien, como cuanto se refiere al **contexto social** que permite la transmisión desde un perro infectado a otro sano. Sobre esto se especula que el virus en estos individuos podría excretarse desde animales sin signos, durante un periodo prolongado, y que estos animales podrían transmitirle como consecuencia de mordeduras. A este respecto, por ejemplo, se cita la existencia de animales con anticuerpos neutralizantes en áreas endémicas, que podrían ser el resultado de una inmunización con cantidades subletales de virus⁸⁰.

Como ya se ha referido, en el curso de estudios experimentales, algunos animales infectados con virus rábico han sido capaces de recuperarse de la enfermedad, con presencia detectable de anticuerpos neutralizantes en el suero y en líquido cefaloraquídeo⁸¹, confirmándose después la posibilidad de un verdadero estado de portador con aislamientos víricos a partir de animales sanos^{82, 83}.



4.2. Rabia en el gato

Como señalan Hanlon *et al* (2005), aunque ningún genotipo o serotipo del virus de la rabia se asocia en exclusiva con el gato y tampoco se ha definido felino alguno como reservorio del virus y la enfermedad, existe unanimidad en la consideración de que estos animales son vectores importantes de la rabia al hombre. Cualquiera que sea la región geográfica que se considere, por ejemplo los Estados Unidos o Europa, la presencia de casos de rabia en gatos es siempre una constante muy importante. En los Estados Unidos, en el quinquenio 1995-2004, la media de casos de rabia en gatos osciló entre 249 y 321, mientras que en Europa los casos en rabia en gato en los últimos años ascendieron a 5.257 casos con una media de 1.051 casos por año, por lo general, casi siempre más que en el perro. Este importante número de casos se refleja, además, en el número de exposiciones humanas en personal de cuidado de estos animales y veterinarios⁸⁴.

El riesgo de contagio de rabia, en el caso de los gatos, se relaciona con sus excursiones fuera del domicilio de sus propietarios, en zonas libres y a sus hábitos nocturnos, en lo que el mantenimiento de colonias de estos animales, sin dueño, por parte de algunas personas que les proporcionan alimento representa un riesgo importante. Algunas iniciativas con participación veterinaria para lograr la castración de las hembras, con el propósito de controlar su extensión, tienen el mejor sentido en este y otros propósitos, aunque muchas veces estas intervenciones se neutralizan en la práctica por la incorporación de miembros nuevos a esas colonias. En países en desarrollo, la transmisión al gato procede principalmente de perros enfermos. En otras regiones, los contagios se suceden a partir de animales salvajes como zorros, mofetas o mapaches y también se han descrito casos en los Estados Unidos a partir de murciélagos insectívoros, que proporciona una fuente potencial constante de infección en lo que juega además, los hábitos nocturnos referidos antes. Los gatos son susceptibles a vi-



rus de quirópteros y pueden eliminar virus en la saliva, razón que justifica las cifras estimadas. En la práctica, el número de animales que se vacunan es muy inferior al de los perros.

Los cambios en el comportamiento de estas especies, cercanas al hombre, igual que las salvajes y en sentido contrario (los animales salvajes en libertad), son típicos de la rabia. Sucede con los zorros, por ejemplo, que pierden el temor al hombre y se acercan a las zonas habitadas, mientras que los animales domésticos, como los perros o gatos, se vuelven agresivos y atacan sin provocación.

Como quiera que sea, es importante señalar que tanto el perro, como el gato o los hurones, eliminan virus rábico no menos de 3 días antes de que aparezcan signos (síntomas) indicadores de la infección, manteniéndose después a lo largo de todo el periodo clínico hasta que se sucede la muerte del animal, que suele tener lugar entre 3 y 5 días después de la aparición de síntomas, lo que justifica el aislamiento de los animales sospechosos por un periodo entre 10 y 14 días. No obstante debe tenerse presente que en las tres especies, el periodo de incubación depende (igual que sucede en el caso humano) del lugar donde se produjo la mordedura, pudiendo prolongarse por periodos de entre 45 días y seis meses, que justifican las cuarentenas que describen las legislaciones de algunos países. En el caso particular del perro se dan medias de entre 3 y 8 semanas, con intervalos desde los 10 días a los 6 meses, mientras que en los gatos los intervalos van desde 9 a 51 días con una media de 18 días siendo entre 10 y 41 días en el caso de los hurones. En el caso del hombre la media va de 1,5 a 4 meses, con intervalos tan amplios como 9 días a 7 años, límite, en función del tipo de exposición y la dosis, además de la presencia de terminaciones nerviosas en el punto de la mordedura, la resistencia individual al virus y, probablemente, la variante de *Lyssavirus*.



4.3. Rabia de quirópteros

El caso más claro de participación total de murciélagos en la rabia de otras especies se refiere al genotipo 1 (RABV), en particular en el con-



tinente americano y especialmente en el caso de murciélagos hematófagos.

También es preciso considerar, no obstante, que un pequeño número de casos, hasta la fecha, han sido debidos a la mordedura de murciélagos **insectívoros o frugívoros**. A este respecto debe recordarse que los murciélagos mantienen el virus (reservorios) y pueden transmitirlos a otras especies de animales (además de al hombre) que por lo general se infectan, desarrollan la enfermedad y mueren, antes o después de haber transmitido a su vez la infección a otros animales. Muchas especies de murciélagos están implicadas, por tanto, en el ciclo natural de la enfermedad en esa vía muerta representada por un animal vertebrado que fallece antes de transmitir el virus. Como han señalado recientemente Calisher y Ellison (2012)⁸⁵, aunque la epidemiología de la rabia parece simple, está lejos de serlo. Más bien podría definirse como muy compleja.

En estos murciélagos, el virus puede transmitirse directamente entre individuos de esta especie, pero también al hombre, caballos, ganado bovino, perros y otros cánidos, mapaches, zorros, mofetas y otros animales (generalmente por mordedura, aunque en algunos casos también puede serlo mediante el consumo de murciélagos enfermos o de la carroña de sus cadáveres) y de este modo los vertebrados terrestres infectados pueden servir como fuente temporal (hasta que mueren) para otros mamíferos terrestres, organizando un ciclo biológico en el que ahora no se implican los murciélagos; de hecho se ha comprobado la existencia de esa correlación entre unos y otros en un área geográfica determinada.

4.4. Rabia de animales salvajes o rabia salvaje

En el ciclo salvaje de **mamíferos terrestres**, el zorro posee un interés particular como ya hemos visto, particularmente en Europa, donde actúa como reservorio principal. Como hemos señalado antes, todavía el número de casos de rabia vulpina en Europa, sigue siendo importante (2.511 casos en 2012), aunque vinculados a determinados países del este (Federación Rusa, Polonia, Rumanía, Belarus, Ucrania y Croacia). En estas regiones, también, los perros mapache recientemente introducidos, pueden representar un riesgo futuro de interés. Como quiera que sea, dentro de una región geográfica en particular pueden coincidir simultáneamente diferentes ciclos de infección salvaje con distintos reservorios protagonistas, con la particularidad ya comentada de que



esporádicamente la rabia salvaje se transmite a los animales domésticos, habitualmente al perro, pero también al ganado bovino o los équidos, y a los seres humanos.



5-Riesgo

Con carácter general, definimos el riesgo de contagio de rabia al hombre en relación con las especies animales que actúan como vector o reservorio del virus y respecto de su presencia en un espacio particular a partir de una región geográfica en la que la presencia de vectores o reservorios es abundante y que de forma legal o clandestina se desplazan hacia países libres de rabia, lo que comporta la adopción de medidas especiales para su control y pronta erradicación.

En el caso particular de este estudio, la referencia lo es a Europa y España en particular y a cualquiera de las especies que pueden ser causa de rabia humana o animal dentro de nuestras fronteras. Es evidente que el perro tiene el protagonismo principal e igualmente lo son otras especies salvajes, como el zorro o el tejón y algunas domésticas por su condición de animales que han adquirido la condición de mascotas o animales de compañía (como sucede con los hurones) o de interés industrial (los visones). Los murciélagos y el riesgo de rabia por ellos transmitido al hombre, serán tratados de forma particular.

5.1-Importación de casos del Norte de África

La situación de la rabia en el norte de África se considera el factor principal para la importación de casos en España y otros países europeos⁸⁶ y la eventual iniciación de un foco epidémico (como ya ocurriera en ocasiones anteriores, en particular, en la iniciación del brote que tuvo lugar en Málaga en 1975).

En lo que se refiere a la región norteafricana, correspondiente al bajo Mediterráneo, incluye principalmente 4 países, Marruecos, Argelia, Túnez y Libia, aunque también podría considerarse el interés de Egipto y Sudán. En los primeros países se completa una población de perros estimada entre 4 y 5 millones de animales⁸⁷, por lo general sometidos a un escaso control y en el que las medidas aplicadas hasta la fecha no han proporcionado resultados eficaces, tanto en lo que se refiere al control interno de la enfermedad, que supone un factor económico y social de gran importancia, como en la posibilidad de que desde ellos se originen casos de rabia importados, bien como consecuencia de la entrada ilegal de animales en Europa trasladados por el importan-



te número de efectivos que procedentes de aquellos países trabajan en Europa y visitan en vacaciones sus lugares de origen, como por el atractivo turístico de la zona que puede suponer también la tentación de traslado ilegal de animales, cuando no la posibilidad de sufrir ataques por animales enfermos incontrolados⁸⁸.

En el caso de **Marruecos**, la enfermedad es endémica, con una media de 386 casos animales por año, que en 2001 llegaron a alcanzar la cifra de 572, mientras que en los últimos años se observa una leve tendencia a la disminución (en 2010, 269 casos). Según los datos disponibles (El Harrak, 2011), en el periodo 2000-2010, se produjeron un total de 241 casos humanos, lo supone una media de 22 casos al año, relacionada directamente con la curva de incidencia de casos animales; por otra parte, el perro es la fuente principal de contaminación (39% de casos), siendo el ganado bovino la principal víctima (26%), seguidos de los équidos (19%), gatos (10%) y pequeños rumiantes (5%). Todo el país está afectado (excepto la zona de desierto) aunque existen diferencias entre las provincias.

En **Argelia**, la enfermedad es igualmente endémica, con picos estacionales en primavera que pueden llegar a los 950 casos en animales. Entre 1996 y 2006 se describieron un total de 8.956 casos, que arrojan una media de 814 casos por año, la mitad de los cuales correspondieron a rabia canina (48%) seguida de los bovinos (29%) y porcentajes menores en el caso de otras especies (gatos, ovinos, caprinos y équidos). Las regiones más afectadas se sitúan en el centro del país y en las áreas costeras, mientras que el sur permanece libre de rabia. Por lo que respecta a **Túnez**, aunque existe menos información disponible, en el periodo entre 2000 y 2005, los casos anuales oscilaron entre 250 y 175, con un mínimo en 2003, de aproximadamente 70 casos; como en los casos anteriores la rabia es endémica, ocupando el perro el primer lugar con casi el 70% de los casos, seguido de los bovinos, con un 12% y cantidades menores en otras especies; no describen casos de rabia en animales salvajes⁸⁹. Se carece de datos que correspondan a **Libia**.

En conclusión, en el norte de África, el perro es el principal vector y reservorio de la rabia⁹⁰, con una participación sobre el total de casos que oscila entre el 40 y 70%, según regiones, produciéndose la mayoría de estos en las zonas rurales (hasta el 85% de los casos), siendo las víctimas principales el ganado bovino y equino. En cualquier caso, el grado de fiabilidad de estas informaciones, pese a que la rabia es una enfermedad declarable en los 4 países, es muy cuestionable⁹¹.

De igual modo, aunque solamente se conocen datos de rabia humana en el caso de Marruecos (22 casos de media), Argelia (12 a 35 casos por año) y Túnez (1 a 3 casos anuales), es presumible pensar que el número de casos y fallecimientos por esta causa sea todavía mayor, siendo los niños las víctimas principales. En el caso de Marruecos, alrededor de 20.000 personas reciben tratamiento post-exposición anualmente⁹², en un 98% de los casos debido a mordeduras de perros enfermos señalándose deficiencias importantes en la aplicación de los programas de control (ya iniciados en 1986) en lo que se refiere a la falta de coordinación entre los departamentos responsables, debido a la indefinición de sus responsabilidades, a una deficiente educación sanitaria y a que la cobertura de la vacunación en el perro es insuficiente para romper el ciclo de transmisión de la enfermedad, además de la ausencia de datos fiables en lo que se refiere al conocimiento de la dinámica de la población canina rural. Desde 2001 y después en 2003, se inició una nueva estrategia de control con resultados parecidos, en la que sigue siendo insuficiente la colaboración de los propietarios de los animales, la falta de implicación en las campañas de vacunación de los veterinarios privados y un deficiente conocimiento de la población de perros. El resultado es de una cobertura de vacunación insuficiente que necesita de nuevos refuerzos en la estrategia que se planteó a partir de 2007 y para la que todavía no se ofrecen datos, estudiándose la posibilidad de poner en práctica un sistema de vacunación oral a fin de poder mejorar la actual cobertura.

Para Marruecos, se han señalado costes anuales de 1,5 M de \$. Según las mismas fuentes, las estrategias de control pasan por la reducción de la población de animales (perros) vagabundos y la vacunación de los domésticos, además de la vacunación de los bovinos (en Argelia, desde 2003).

Ya nos hemos referido, en la primera parte de este Informe, al caso de rabia que tuvo lugar recientemente en Toledo y que ha provocado la declaración oficial de la enfermedad y la activación del nivel 1 de alerta, actualmente ya desactivado. Una situación similar se ha producido con anterioridad en otras ocasiones afectando a Francia y también a Holanda. En un artículo recientemente publicado (*Eurosurveillance*, www.eurosurveillance.org) se recogen desde 2001 un total de 9 casos de rabia canina importada en Francia, de animales procedentes de Marruecos, que incluye también un caso procedente de Gambia y otro de España en 2008 (según se señala en la comunicación, el perro ha-



bía sido hallado en una carretera de montaña en el sur de España y el virus aislado se relacionaba con cepas procedentes de Marruecos). En 2004, por ejemplo, se diagnosticó un caso de rabia canina en Burdeos, en un cachorro que había sido importado de forma ilegal, procedente de Marruecos (vía España) lo que obligó a poner en marcha una serie de medidas, en el contexto de la correspondiente alerta sanitaria, con el fin de controlar los numerosos contactos que habían sido expuestos al animal alcanzando, en el caso humano, nada menos que el tratamiento post-exposición de 187 personas y 57 animales. La crisis puso a prueba la importancia del papel del sistema de alerta rápido existente en la UE, en el caso de esta enfermedad.

En 2011, en el mes de agosto, volvió a repetirse una situación similar, con un cachorro de 3 meses importado ilegalmente desde Marruecos (vía España) por una familia que había pasado allí sus vacaciones y que 5 días después de su llegada a Francia manifestó cambios de comportamiento y otros signos que motivaron atención veterinaria, muriendo el animal al día siguiente⁹³. El diagnóstico positivo a rabia fue confirmado en un plazo breve, de 5 días, exigiendo nuevamente la puesta en prácticas de las medidas correspondientes a la alerta sanitaria, incluyendo los contactos animales y los humanos expuestos, tanto en Francia como en España, hasta un total de 29 personas. En el conjunto de los 9 casos citados antes, desde 2001, el número de tratamientos post-exposición en el hombre, ascendió a 424 personas.

En el caso de Holanda, el más reciente tuvo lugar en 2012, después de que fuese importado también, un cachorro en Amsterdam procedente de Marruecos, nuevamente vía España⁹⁴.

También se han descrito casos importados procedentes del norte de África, en Alemania, describiéndose un caso acaecido en enero de 2004 en que se sometió a aislamiento en el aeropuerto de Hannover un cachorro de 8 meses al carecer de documentación y no poder demostrar estar vacunado frente a la rabia; el perro había sido importado en un equipaje de mano y había pasado ilegalmente el control. Aunque se dispuso su vacunación y cuarentena, a consecuencia del padecimiento de una enteritis, ésta se pospuso por decisión del funcionario correspondiente y el 2 de febrero el animal desarrolló parálisis y se sospechó rabia, que fue confirmada al fallecer al 5º día de la cuarentena, identificándose 20 contactos humanos que fueron objeto de un tratamiento post-exposición, además de un gato, que fue eutanasiado y 2 perros, que fueron vacunados⁹⁵.



Igualmente, en Suiza y Bélgica, también se han descrito en estos últimos años casos de rabia importados del norte de África. En el primero, que tuvo lugar en mayo de 2003, se diagnosticó en un cachorro abandonado (procedente del norte de África) de menos de 1 mes de edad, que fue llevado a un refugio de animales en Ginebra y después adoptado por una familia en el mes de junio y menos de 1 mes después, el animal se volvió muy agresivo y fue eutanasiado, confirmándose la presencia de rabia en el mes de julio. El segundo caso se produjo en Bélgica, en otoño de 2007, cuando un cachorro de 4-5 semanas fue llevado ilegalmente, metido en una maleta, procedente de Marruecos. El animal comenzó a manifestar cambios en su comportamiento en octubre de ese año, con signos neurológicos, por lo que fue eutanasiado el 20 de noviembre, dando positivo a rabia.

5.2-Importación de casos de Europa Central y del Este

Varios países de Europa Central han declarado casos importados de rabia procedentes de diferentes regiones de Europa del Este o de Asia. Alemania, por ejemplo, en 2001, notificó un caso de rabia en un perro procedente de Nepal, en teoría vacunado frente a rabia en Irán. En 2002, declaró también un caso importado procedente de Azerbaiján en un cachorro de 1 mes cuyo propietario trabajaba en Baku, que supuso que 6 personas recibiesen tratamiento post-exposición. En 2008, se notificó también un caso en un cachorro de 6 semanas procedente de Croacia y, finalmente, en 2010, se notificó otro caso de rabia en un cachorro de 8 semanas procedente de Bosnia-Herzegovina, con historia de haber sido mordido por un animal, en origen, sospechoso de padecer rabia. También en Francia, en 2009, se notificó un caso de rabia en un perro importado de Afganistán.

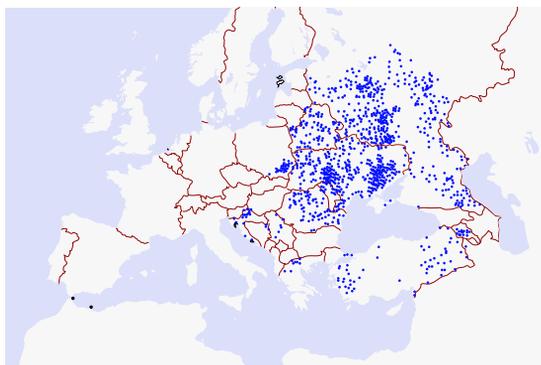


Figura 1. Casos de rabia reportados en Europa 4º trimestre 2012. 2113 casos. 7 casos de rabia en murciélagos y 2 casos humanos. (WHO Rabies Bulletin Europe 2012, 36:4)

Reemergencias: Pese al control efectivo de la rabia vulpina en Europa Central desde los años 88-89 mediante la aplicación de vacunas orales para el zorro, en los últimos años se han producido reemergencias en Francia⁹⁶, Grecia e Italia⁹⁷.



Figura 2. Vacunación oral contra la rabia en Europa 2012
Zonas de actuación. (WHO Rabies Bulletin Europe 2012, 36:4)

En lo que más nos interesa, en Francia, se insistió particularmente en la importancia crítica de la densidad de estos animales por km², afirmándose que por encima de 5 zorros por km², el riesgo de transmisión con la implicación de esta especie, era muy elevado. Ante una eventualidad de este tipo (como estuvo a punto de suceder en 1977) en España, se carece de estimas de abundancia del zorro a nivel nacional. Las densidades pueden variar regionalmente entre 0,4 y 20 individuos/km² en función de la abundancia de recursos tróficos (basuras y carroñas). En Aragón, por ejemplo, se han declarado densidades absolutas entre 0,8 (estepa) y 2,5 (regadíos) individuos/km² antes de la época de partos. En Ceuta y Melilla no existen, que se sepa, poblaciones residentes y las observaciones se deben a ejemplares errantes, procedentes de Marruecos, pero se carece de datos fiables.

Respecto de Grecia, es destacable que desde 1970 no había declarado casos humanos, estando libre de rabia desde 1987, pero en el último año (2012) se produjo una reemergencia en el norte del país, tanto en animales domésticos como en fauna salvaje que, en el mes de marzo de 2013 totalizaba 17 animales positivos, incluyendo 14 zorros, dos pe-



rros pastores y un gato, llevándose a cabo un total de 104 tratamientos humanos post-exposición⁹⁸.

En cuanto a Italia, en las regiones del Noreste, estuvo afectada de rabia vulpina en diversas ocasiones, en las décadas de los años 70 y 80 y más recientemente, entre 1991 y 95. En la mayoría de los casos, por lo general, se estimó como consecuencia de brotes de rabia vulpina relacionados con otros correspondientes bien en Austria o en la antigua Yugoslavia, que penetraban a través de la frontera natural con Italia⁹⁹. Siempre de particular riesgo, en aquellas ocasiones, los brotes obligaron a poner en práctica campañas de vacunación con vacunas orales en distintas épocas, en 1989 y entre 1992 y 2004¹⁰⁰. En 1997 Italia se declaró libre de rabia, pero en 2008 la rabia volvió a reemerger, como otras veces a partir de casos en las fronteras de Austria y Eslovenia (especialmente), con un total de 287 casos en febrero de 2011, difundándose después hacia el oeste, pese a la puesta en práctica de nuevas campañas de vacunación oral (un total de 4 campañas de vacunación en 2010 y dos campañas anuales en 2011 y 2012) alcanzando el pico de casos en la primera mitad de 2010 (199 casos).

El último caso confirmado, en un zorro, se produjo en febrero de 2011. Aunque los brotes han afectado, principalmente, al zorro rojo (el 84,32% de los casos), también se han producido saltos en la barrera de especie en otros animales salvajes (principalmente en tejones, 15 casos, el 5,23% del total, además en mustélidos y roedores) y domésticos (9 casos en gatos y 1 caso en cada uno de bovinos y equinos). Fusaro *et al* (2013)¹⁰¹ llevaron a cabo un análisis evolutivo de 113 cepas seleccionadas del virus rábico aisladas de estos brotes a partir de las secuencias de la región hipervariable del gen de la nucleoproteína, el gen completo de la glicoproteína G y la región intergenica G-L, identificando dos grupos genéticos (Italia-1 –principalmente- e Italia-2) que también se han identificado en los años anteriores en la región balcánica occidental y en Eslovenia, demostrando así su procedencia.

5.3. Riesgo ligado a la presencia de otras especies y especies exóticas.

Otros animales, como gatos y hurones, son igualmente objeto de atención aunque su importancia relativa es mucho menor que la del perro. En el caso de los **gatos**, aunque su asociación con el perro es evidente en los ecosistemas urbanos donde pueden infectarse a partir de aquellos, desde el punto de vista epidemiológico no desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la cadena de infección. Además,



la desaparición de la rabia felina va ligada a la erradicación de la enfermedad en los perros. En cualquier caso, su papel como vehículo al hombre, desde el reservorio canino, es innegable, razón que justifica sobradamente las intervenciones preventivas sobre estos felinos, siempre que sea posible. En el caso de otras especies animales, como los hurones y los perros mapache, aunque su importancia actual en nuestro país, como especies, es relativamente residual pero no por ello no preocupante, dado su carácter invasor, no puede menospreciarse su posible interés como vectores de rabia.

Recientemente se ha descrito un brote importante de rabia por mordedura de **hurones** (más de 87 casos en el mes de julio) en la isla de Taiwan, que había permanecido libre de rabia desde hacía más de 50 años y, en general, su importancia se ha descrito como muy importante en el sudeste de China, donde está reemergiendo como un grave problema de Salud Pública^{102, 103}. En los EE.UU., la asociación americana de hurones (AFA) recomienda la vacunación de estos animales frente a la rabia.



Los hurones domésticos (*Mustela putorius*) se han introducido en los últimos años como mascotas en muchos hogares de nuestro país, siguiendo costumbres procedentes de otros países, aunque aquí ya se habían domesticado desde hace muchos años y se venían utilizando, entre otros menesteres, en la caza de conejos de monte, una actividad por la que ya hace siglos que se conocen a estos animales. Los hurones son animales susceptibles al virus de la rabia y así se reconoce, por ejemplo, su interés en la reglamentación europea sobre los requisitos aplicables al movimiento no comercial de animales de compañía, en la Regulación EC 998/2003, en cuya lista (apartado B) del anexo I figuran, igual que lo hacen el perro y el gato en el apartado A)¹⁰⁴. Además de ello, en un estudio llevado a cabo por Niezgodá *et al.* (1997)¹⁰⁵ sobre 55 hurones domésticos inoculados intramuscularmente con una dosis letal media ratón e intracerebral de $10^{5,5}$ a $10^{1,5}$ obtuvieron los siguientes datos de interés: periodo de incubación medio de 33 días (intervalo de 16 a 96 días), signos clínicos de parálisis ascendente, ataxia, caquexia, atonía de la vejiga urinaria, fiebre, hiperactividad, tremor y parestesia.



El periodo medio de morbilidad osciló entre 4 y 5 días, con un intervalo de 2 a 10. Diecisiete de los 55 animales sobrevivieron a la rabia por lo que los autores recomendaron incluir esta enfermedad en los estudios de diagnóstico diferencial en el caso de parálisis aguda o cambios del comportamiento. Precisamente tal situación de supervivencia al virus de la rabia, en condiciones experimentales, ha sido objeto recientemente de un nuevo trabajo¹⁰⁶ en el que se describe un caso nuevo de supervivencia a la inoculación experimental con un virus de la rabia aislado de una mofeta. Después de mostrar signos típicos de rabia, el hurón se recuperó después de un periodo de 181 días y los estudios antigénicos demostraron la ausencia de virus como consecuencia del aclaramiento. Las estadísticas europeas no recogen casos de rabia en hurón.

Los **mapaches** (*Procyon lotor*) son animales originarios de América, también conocidos como osos lavadores, con capacidad prensil en las garras delanteras, de tamaño poco mayor que un gato y una característica mancha de pelo negro que le cubre cada ojo, a modo de antifaz. Los mapaches son animales particularmente susceptibles a la rabia y en los EE.UU. son la especie transmisora más importante, con casi el 37% de todos los casos de origen animal (entre 6.000 y 7.000) en 2010, localizados principalmente a lo largo de la costa Este, desde Nueva York a Florida.

En Europa está considerada una especie invasora, aunque en la mayoría de los países los controles sobre el comercio no son muy eficientes, y no es difícil su venta como mascota de compañía (debe recordarse que se pusieron de moda con ocasión de la película 'Pocahontas' de Disney, cuya mascota era un mapache). En España, el Real Decreto 1628/2011, de 14 de noviembre, que regula el catálogo de plantas y animales exóticos invasores, incluye el mapache. Beltrán-Beck, del IREC⁵, ha realizado a la prensa diferentes declaraciones en este sentido, que justificarían en particular hasta 2011, su actual distribución en distintas comunidades, probablemente como consecuencia de su abandono por los propietarios cuando los animales llegan a edad adulta y se vuelven agresivos, o simplemente como consecuencia de escaparse del domicilio familiar. En España se detectaron mapaches por primera vez en 2003 en el Parque Regional del Sureste de Madrid, extendiéndose después por las cuencas del Jarama y Tajo y en estos momentos constituye un problema relevante tanto en Madrid como



en Toledo o Guadalajara, donde existen poblaciones asentadas. Como consecuencia de su extensión en la última década, se han descrito avistamientos en el norte, sur y este peninsulares (hasta en 28 localidades de grandes zonas urbanas en Barcelona o Valencia), además de su constatación también en las islas (Canarias y Baleares) y, con gran preocupación, en el parque de Doñana donde se detectaron a comienzos del mes de septiembre de 2011^{107, 108}. Son animales que se adaptan bien y que carece de depredadores naturales, por lo que su expansión resulta relativamente sencilla, facilitada también por su condición de omnívoros. Se ha estimado que en Madrid podrían habitar unos 500 ejemplares.

En Europa central, la presencia del mapache se relaciona con la industria peletera. En Alemania se introdujeron en los años veinte con el propósito de utilizar su piel en la industria peletera, con algunas sueltas intencionadas, selectivas, con el propósito de ‘enriquecer la fauna alemana’. En la actualidad las estimas de esta especie podrían situarse sobre 400 mil ejemplares e incluso cifras superiores. El mapache está extendido ahora, también en Rusia, Austria, Polonia o Ucrania. Los datos estadísticos de casos de rabia debido a esta especie en Europa, recogidos en el *Bulletin* de la rabia, desde 2008 a 2005, ascienden a un total de 36 casos, el 97% de los cuales corresponde a Ucrania y en una única ocasión se describió un caso en Turquía. Antes de este periodo, entre 1990 y 2007, se describieron también casos en Estonia (14 casos en 1997-98), Alemania (5 casos, en 1990-91-92 y 2000) y en Lituania (2 casos en 2004)¹⁰⁹.

En un trabajo recientemente publicado (Vos *et al.*, 2013)¹¹⁰ estudiaron en Alemania la susceptibilidad de esta especie al virus de la rabia y otros *Lyssavirus*, con el fin de evaluar el riesgo potencial que las poblaciones de mapaches en aquél país, podrían jugar como reservorios para la reemergencia de la rabia, comprobando que eran muy susceptibles a aislados procedentes de perros y de la misma especie. También, 5 de 6 animales inoculados con un virus de origen vulpino, mostraron signos clínicos de infección, mientras que ninguno de los infectados con EBL-1 murió como consecuencia de la rabia y todos los animales seroconvirtieron, concluyendo que el riesgo más alto para que la población de mapaches pudiera infectarse de rabia, se debería a la presencia de rabia canina importada que podría actuar como foco iniciador para esta especie, sin dejar de lado la posibilidad de transmisión desde zorros infectados.



Respecto de los **perros-mapache** o **tanukis** (*Nyctereutes procyonoides*), un carnívoro de la familia *Canidae* originario de la porción oriental de China y Japón, de aspecto semejante al mapache, que desde hace ya más de cincuenta años fue introducida por la industria peletera en Ucrania, Bielorrusia y el Cáucaso, formando parte en la actualidad de su fauna natural y la de casi toda Europa, incluyendo los países escandinavos, Polonia, Alemania, Francia, Suiza, Rumanía, Rusia o la República Checa. Posee hábitos semejantes al zorro y se califica como una especie invasora, omnívora, capaz de alimentarse de pequeños mamíferos, aves, reptiles, peces, basura, frutas o raíces. La gestación dura alrededor de 60 días y el tamaño de la camada es de 5 a 8 cachorros. Es capaz de trepar por los árboles e hibernar. El perro-mapache está incluido en el catálogo español de especies exóticas invasoras, aprobado por Real Decreto 1628/2011¹¹¹, estando prohibida en España su introducción en el medio natural, posesión, transporte, tráfico y comercio, lo que no impide la posesión ilegal de ejemplares, que después se liberan inconscientemente en el campo.

Los perros-mapache se han descrito como hospedadores nuevos para la rabia del zorro en Europa. Según datos del *Bulletin* de la Rabia, entre 2008 y 2012 se han descrito en Europa 1.395 casos de rabia en estos animales, con una media anual de 279 casos (la más alta después del zorro, que representa alrededor del 4% del total de casos de rabia en Europa), en ligero descenso en los últimos años, con especial incidencia en los países del Báltico, en la Federación Rusa (alrededor de 150 casos cada año) y cifras importantes en Belarus y Ucrania. En este periodo se han descrito casos, también, en Rumanía, Lituania, Latvia, Polonia, Croacia.

La importancia epidemiológica del perro mapache en el contexto de la rabia es grande, pues puede ser responsable de introducir la enfermedad en zonas libres de rabia, particularmente entre las poblaciones propias y de zorros, como ha ocurrido en el sur de Finlandia, habiéndose señalado que su capacidad hibernante resulta un factor de comportamiento que puede influenciar positivamente la epidemiología de los brotes, pero que puede verse alterado como consecuencia del cambio climático. De hecho, se ha señalado que dependiendo de la hibernación invernal, los perros mapache podrían contribuir a la persistencia de la rabia y a acelerar la difusión del virus¹¹². Algunos autores lo han definido como una nueva amenaza para los estados libres de rabia en Europa¹¹³.



5.4-Riesgo de rabia de murciélagos¹¹⁴

Aunque algunos autores afirman que la rabia de murciélagos no comporta riesgo de reintroducción de rabia en perros y otros carnívoros (Echevarría, 2013) y que los virus de murciélagos mantienen su propio ciclo en estos animales (Sánchez *et al*, 2003), tal opinión es difícil de compartir en todos los casos o al menos no, de forma absoluta; de hecho hay que tener en cuenta el interés que posee en el continente americano el genotipo 1, que afecta indistintamente a mamíferos terrestres y aéreos y los casos de salto de especie sucedidos en Europa (ver después), aunque después el virus no se haya mantenido de forma estable en las nuevas especies animales, lo que no excluye que esto no pueda suceder en el futuro¹¹⁵.

En el verano de 1998, se encontró muerta una oveja en Dinamarca después de la infección por un EBL-1¹¹⁶ y una marta en Alemania¹¹⁷, datos que también son recogidos por el propio plan de contingencia para la rabia en España, aunque les califica de meros accidentes. En el mismo lugar, al poco tiempo, y en otro rebaño próximo al primero, en Dinamarca, se diagnosticaron 2 nuevas ovejas con rabia, que fueron confirmadas en Weybridge (UK), como la primera, mediante inmunofluorescencia; la primera de ellas padecía, también, un cuadro de listeriosis¹¹⁸. McColl y Tordo (2000)¹¹⁹ sugieren que aunque estos casos son raros, una de las posibles causas de la falta de información detallada sobre el particular podría residir en que la tipificación de aislados a partir de animales solo se lleva a cabo de forma infrecuente, y a los datos anteriores añaden el caso de una variante de virus rábico de origen quiróptero (probablemente de un *Myotis* spp) que se recuperó en Canadá (Ontario) de un bovino y de dos zorros en la isla del Príncipe Eduardo, donde se había establecido una población de zorros, por lo que llaman la atención a que estos casos pudieran reconocerse con mayor frecuencia en el futuro.

En otros estudios recientes, distintos autores se han ocupado del salto de barrera de especie de EBL-1 a las ovejas. Ronsholt (2002)¹²⁰ se refiere a un caso esporádico de rabia en una oveja de una explotación cercana a la primera de las explotaciones danesas en las que se había diagnosticado rabia en ovejas y que fue confirmado por anticuerpos fluorescentes. Además, Tjornehoj *et al.* (2006)¹²¹ y después Brookes *et al.* (2007)¹²², analizaron experimentalmente la susceptibilidad de ovejas al EBL-1 y EBL-2 después de la inoculación intramuscular e intracraneal con preparados del virus, comprobando que por la primera de



estas vías el 75% de los animales inoculados con EBL-1 y el 100% de los infectados con EBL-2 desarrollaban signos clínicos de rabia, incluso recuperándose estos últimos después de 94 días. El EBL-1 dio lugar a signos clínicos sobreagudos que sugerían la implicación de las neuronas motoras. En cualquier caso, los autores señalaban que la dosis necesaria para establecer la infección era alta, superior a 5 log por ml, aunque desconocían la dosis infecciosa en casos de campo.

En cualquier caso, la transmisión al hombre, tanto de EBL-1 como de EBL-2, ha sido señalada repetidamente, desde 1986, por varios autores.







6-Control de la rabia

Con carácter general, el control de la rabia no resulta una tarea fácil, en particular cuando se dan situaciones de falta de control de los animales domésticos y la existencia de reservorios salvajes que pueden entrar sin demasiados problemas en contacto con los primeros, los cuales, al final, son los que actúan directamente sobre la especie humana (particularmente niños), principalmente por mordedura. La OMS se viene pronunciando desde hace años sobre el particular.

6.1. Control de la rabia en las poblaciones animales

Existe total unanimidad sobre el papel principal del perro en relación con los casos de rabia humana, responsabilizándose de más del 99% de ellos. Por esta razón, la mayoría de los programas para el control de la rabia dirigen sus esfuerzos a la lucha contra la enfermedad en esta especie y la mayoría asientan en una serie de principios básicos que incluyen vigilancia, ordenación y vacunación.

La **vigilancia** supone el diagnóstico y declaración de casos sospechosos, control de fronteras, vigilancia de las especies salvajes posibles reservorios en lo que a densidad y control de su reproducción se refiere, en caso necesario. La **ordenación** se refiere al control de animales vagabundos o sin dueño reconocido, censado y registro de animales, reducción de los posibles contactos entre animales susceptibles, etc. En este capítulo se incluyen también actuaciones de educación y formación sanitaria a posibles contactos humanos con el propósito de promover su cooperación en los programas y modo de llevar a cabo los primeros tratamientos de la herida en caso de mordedura. Por último la **vacunación** pretende que no menos del 70% de la población susceptible y en riesgo, esté convenientemente vacunada (vacunación en masa^{123, 124}) con el fin de neutralizar un posible caso antes de que la aplicación de medidas contenidas en los sistemas de alerta (en España el Plan de Contención contra la Rabia) impongan medidas drásticas y complementarias. La tasa de cobertura del 70% mínimo se justifica en que tal porcentaje debe mantener la inmunidad de la población por encima de los niveles críticos requeridos para interrumpir la transmisión de la rabia, estimados entre el 25 y el 40%^{125, 126}.



Se consideran animales sospechosos, en el sistema de vigilancia, los que hayan sido sacrificados como medida de precaución, mostrando signos clínicos de la enfermedad, igual que aquellos otros que hayan mantenido con los primeros un contacto estrecho, o hayan sido mordidos por aquellos, aunque en algunos países si estos animales están convenientemente vacunados antes del contacto o mordedura, pueden ser indultados, a cambio del aislamiento y vigilancia en un centro especialmente acondicionado. En los animales está prohibido el tratamiento post-exposición.

6.1.1. Profilaxis sanitaria. Ordenación y control de las poblaciones animales en riesgo de contagio de rabia

Para reducir los contactos con los animales susceptibles se disponen medidas de cuarentena, restricción del movimiento de los animales (prohibición de salida fuera de los domicilios y granjas, utilización de bozales, correas, etc.), vigilancia de los animales dentro y fuera de las áreas infectadas, etc.

La Regulación 998/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre traslado de animales de compañía con fines no comerciales se ocupa de estos extremos, particularmente en el caso de perros, gatos y hurones. Además de su identificación (mediante un sistema de identificación electrónica estándar, capaz de ser leído por un *transponder*) los animales deben ir provistos del correspondiente pasaporte expedido por un veterinario autorizado por la autoridad competente que certifique la vacunación antirrábica y cuando se considere preciso, la adopción de medidas sanitarias preventivas para otras enfermedades, igual que en lo que se refiere a la entrada procedente de terceros países, en los que además se añade una titulación de anticuerpos neutralizantes antirrábicos al menos igual a 0,5 UI/ml, llevada a cabo al menos 30 días después de la vacunación y 3 meses antes del desplazamiento del animal.

La vacunación debe ser hecha con una vacuna autorizada no viva, bien una vacuna inactivada, con al menos una unidad antigénica por dosis o una vacuna recombinante que exprese la glicoproteína inmunizante del virus de la rabia en un vector vivo.

Si la vacuna se aplica en un Estado Miembro, debe garantizarse su autorización de acuerdo con la Directiva 2001/82/EC y con la Regulación EC Nº 726/2004, mientras que si la vacuna se administra en un país tercero, debe reunir al menos los requisitos que refiere el capítulo 2.1.13



del Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para animales terrestres, edición de 2008, de la OIE¹²⁷.

La vacunación se considera válida solamente si la vacuna se ha administrado en la fecha que se indica en el pasaporte (sección IV) o en la sección apropiada del certificado sanitario que acompaña al animal. Estos requisitos son válidos para perros, gatos y hurones.

El control de perros vagabundos o indocumentados está, igualmente, sometido a la disciplina de las leyes en todos los países europeos. Aunque la transferencia de estas materias a las diferentes autonomías ha vaciado algunas cuestiones, como ésta y otras, de competencias centrales, debe recordarse por su interés, que la Orden del Ministerio de la Gobernación (Dirección General de Sanidad) de 5 de diciembre de 1974, dictó normas complementarias al artículo 3 del Decreto de 17 de mayo de 1952 respecto de la recogida de perros vagabundos (BOE 308, de 25 de diciembre). El citado Decreto de mayo de 1952 (BOE de 26 de junio) declaraba obligatorio el registro y matrícula de los perros y la vacunación de los mismos y en su artículo 3 establecía que los Ayuntamientos debían organizar la recogida y captura de perros vagabundos, indocumentados o de dueño desconocido. El registro y matrícula de perros se consideró una de las bases del éxito alcanzado después, cuando se iniciaron las campañas anuales de vacunaciones obligatorias, aunque en no pocas ocasiones fueron objeto de crítica por quienes consideraron el procedimiento un sistema de recaudación de impuestos (Rodríguez Ferri, 1987).

La mayoría de los programas de control, en todo el mundo, establecen la captura y eliminación, con destrucción, de este tipo de animales a no ser que sea reclamado por su propietario y se haga cargo de los gastos y sanciones correspondientes.

En cualquier caso, la reducción de las poblaciones animales mediante captura y sacrificio de animales vagabundos o esterilización, no han dado los resultados esperados allí donde se han aplicado, probablemente como consecuencia de que las interrelaciones existentes entre densidad de las poblaciones, incidencia de la enfermedad y otros factores es mucho más compleja de lo previsto y que puede diferir entre especies y regiones, dificultando la interpretación de los datos de campo y las extrapolaciones, particularmente en lo que se refiere a políticas de control. En un reciente estudio (Morters *et al.*, 2013) en el que se revisan estos aspectos, se concluye que la vacunación es con



mucho el procedimiento más eficaz de control de la rabia, en todas las especies¹²⁸.

6.1.2. Vacunas y vacunación contra la rabia en los animales

6.1.2.1. Inmunidad y Respuesta inmune en la rabia

En la **respuesta inmune innata**, inespecífica, frente al virus de la rabia, están implicadas, como frente a otros agentes infecciosos, barreras físicas, químicas y celulares. En éstas últimas, particularmente a cargo de las células dendríticas y otras células fagocíticas, los denominados receptores *Toll-like* (TLR) están dispuestos a lo largo de la superficie externa, mientras que en su interior se disponen otros receptores denominados receptores NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*). Los TLR reconocen moléculas procedentes de los patógenos o de las células que han sufrido daño, independientemente de su causa, mientras que los NOD reconocen moléculas procedentes de agentes patógenos intracelulares. En ambos casos después del reconocimiento se produce una señal que activa el denominado Factor Nuclear (NF- κ B) que origina la producción de diverso tipo de citoquinas (IFN- α y β , IL-6, IL-1- α , TNF- α) y quimioquinas (CCL-5, CXCL-10, CCL-3 y CCL-4) que proporcionan el ambiente necesario que permite la iniciación o la regulación de la respuesta inflamatoria y antiviral², que suponen el comienzo de la **respuesta inmune adaptativa o específica**, permitiendo la activación de los linfocitos T.

Los interferones de tipo I (α y β) unen a sus propiedades antivíricas su condición inmunomoduladora con efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmune innato y adaptativo activando las células dendríticas, principales presentadoras de antígenos a los linfocitos T, iniciando así la respuesta. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen los antígenos exógenos procedentes del virus rábico y de las vacunas, presentados en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II de las células dendríticas, macrófagos o linfocitos B. La señalización a través del receptor de la célula T (TCR), con las moléculas coestimuladoras, conduce a la activación del linfocito T y su diferenciación, entre otras, en las subpoblaciones de células Th1 y Th2 en presencia de citoquinas polarizantes (principalmente IFN- γ para Th1 y IL-4 para Th2), además de que Th1 está bajo el control de IL-12 producido por macrófagos y dendríticas.

Al contrario que las células T CD4⁺, las T CD8⁺ reconocen antígenos endógenos (por ejemplo de origen viral, en el interior de las células infec-



tadas) presentados en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I. Su activación permite la producción de IFN-g y la eliminación de la célula infectada mediante la producción de perforinas (granzimas) y la activación de caspasas inductoras de apoptosis. El balance entre las respuestas CD4+ y CD8+ a un antígeno en particular, depende de su naturaleza. Los microorganismos vivos, intracelulares (como sucede con el virus de la rabia) inducen respuestas citotóxicas CD8+, mientras que el reconocimiento de péptidos inertes, de origen exógeno, activa linfocitos T CD4+.

En las primeras fases de la **infección** por el virus de la rabia, las partículas víricas se inoculan directamente en la piel y músculos por lo que puede activarse una respuesta inmune periférica antes que el virus alcance el Sistema Nervioso Central (Irwin *et al.*, 1999; Camelo *et al.*, 2000)[®]. Una vez que el virus alcanza el sistema nervioso, es poco probable que desencadene una respuesta primaria adaptativa, pues en el tejido nervioso no existen estructuras linfoides ni células presentadoras de antígeno, lo que le convierten en un lugar privilegiado para éste agente patógeno. Sin embargo, en el sistema nervioso si existen evidencias de una respuesta inmune innata precoz caracterizada por su condición antiviral, quimioattractiva e inflamatoria (Wang *et al.*, 2005)[®] modulándose en función la patogenicidad de la cepa vírica. En esta respuesta inespecífica las neuronas infectadas pueden desempeñar un papel activo (Jackson *et al.*, 2006)[®].

Además de ello, para aprovechar todavía más la falta de eficacia inmune del sistema nervioso, las cepas **virulentas** del virus de la rabia han desarrollado estrategias inmuno-subversivas de '**escape**', lo que puede entenderse como una forma de adaptarse al hospedador, aunque en la práctica todo ello resulte extremadamente limitado, habida cuenta de su porcentaje de letalidad absoluto.

Después de la inoculación experimental en una región periférica, en el caso del ratón, por cualquier vía (intramuscular, subcutánea o intranasal), las cepas virulentas invaden la médula espinal y casi todas las regiones cerebrales, causando encefalitis aguda. Las cepas **menos virulentas o atenuadas**, dan lugar a una enfermedad abortiva, no letal, caracterizada por un tipo de infección restringida y transitoria del sistema nervioso, seguida de una parálisis irreversible de las extremidades correspondientes al punto de inoculación. Siete días después de la inoculación experimental, en ratón, se observan niveles similares de células T secretoras de citoquinas en los nódulos linfáticos periféricos



y títulos de anticuerpos también semejantes, en el suero.

La encefalitis fatal inducida por las cepas virulentas se acompaña de inmunosupresión, caracterizada por una insuficiencia de la respuesta de linfocitos marcada por una pérdida de la inmunidad de base celular, aunque su intensidad depende de la virulencia de la cepa (las cepas atenuadas, abortivas, no inducen inmunosupresión), pero su origen es desconocido.

Después de la inoculación con cepas virulentas o atenuadas (abortivas) del virus de la rabia en las extremidades traseras de los animales de experimentación, se produce una infección progresiva de la médula espinal y del cerebro, que se acompaña de la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α , IFN- β y IL-6), así como de quimioquinas, indicios claros de que el sistema nervioso acusa la entrada del virus de la rabia y que desarrolla una reacción de inmunidad innata, hecho que se corresponde con la observación de que las células gliales y las neuronas expresan TLR-3, desarrollando después una respuesta inflamatoria clásica, además de antiviral y quimioattractante, que incluye la expresión de genes de IFN- β , Mx-1 y otros, además de citoquinas y quimioquinas inflamatorias. Parece que la actividad antiviral del IFN puede controlar la progresión del virus en el sistema nervioso y que solo las cepas virulentas son capaces de evadir la respuesta innata, habiéndose propuesto que la fosfoproteína P podría controlar la producción de IFN interfiriendo con la fosforilación del factor regulador de la transcripción, IRF-3. Quimioquinas y citoquinas proinflamatorias atraen, con toda probabilidad, linfocitos, que después se activan en la periferia.

La secuencia de acontecimientos que al final conducen a la encefalitis letal producida por el virus rábico se inicia cuando el virus penetra en las terminaciones del tejido nervioso, uniones neuromusculares y haces musculares, viajando a través de los axones de la red neuronal. El virus infecta principalmente neuronas y como consecuencia de la infección se producen quimioquinas y citoquinas inflamatorias que atraen linfocitos activados que migran a través de la barrera hemoencefálica. El virus de la rabia produce un tipo de infección no citopatógena que preserva la integridad física de la neurona y de la red neuronal, favoreciendo la neuroinvasividad a través del sistema nervioso al completo, desde la puerta de entrada en las terminaciones nerviosas, hasta las glándulas salivares, que representa su lugar de salida. La ausencia de una respuesta inmune se fortalece por la capacidad de las



cepas virulentas para inducir inmunosupresión periférica, como consecuencia de la cual el virus escapa de la respuesta inmune e invade la totalidad del sistema nervioso.

Aunque las cepas virulentas del virus rábico posean capacidad para disminuir la respuesta inmune innata, su control solo se consigue de forma parcial, toda vez que el sistema nervioso es invadido progresivamente por linfocitos T y B. En el caso de virus atenuados, el cerebro está protegido frente a la invasión por la respuesta mediada por células Tc, que elimina las neuronas infectadas, lo que se traduce en que el virus no alcanza los centros cerebrales y el animal sobrevive. Contrariamente a lo que sucede con las cepas de virus rábico atenuadas, los linfocitos T que han emigrado al cerebro no pueden bloquear el acceso al cerebro de las cepas virulentas y en pocos días se destruyen por apoptosis debido a la activación de las moléculas Fas que expresan en su superficie, después de la unión a ellas de sus ligandos (FasL) cuya sobreexpresión por parte de las neuronas parece ser uno de los mecanismos que contribuye a la subversión del virus rábico, aunque tampoco pueda excluirse la utilización de otras moléculas (inmuno-subversivas), por parte del virus virulento, para escapar de la vigilancia de las células T en el tejido nervioso, por ejemplo moléculas HLA-G (en el caso del hombre) del MHC-I, que promueven tolerancia (Lafon *et al.*, 2005)⁹, o que en el caso de los virus virulentos solamente se producen cantidades limitadas de IFN-g y de anticuerpos específicos frente a él, en el tejido nervioso.

En resumen pues, parece claro que el virus de la rabia ha desarrollado una serie importante de **mecanismos de escape** frente a la respuesta inmune en el tejido nervioso que, en el caso del hombre, ayudan a explicar que en ausencia de tratamientos post-exposición su tasa de mortalidad sea prácticamente del 100%.

6.1.2.2. Base inmune de las vacunas frente a la rabia.

Los linfocitos T desempeñan un papel crucial en la defensa frente al virus de la rabia, que en su conjunto puede ser considerado un antígeno T-dependiente. En el establecimiento de la defensa, participan tanto linfocitos T CD4+ como CD8+ y linfocitos B.

En la rabia, la inmunidad humoral posee una función protectora esencial. Los anticuerpos neutralizantes, IgG (pero no IgM) bajo el control de las células Th2, juegan un papel crítico en la protección, siendo la proteína G o glicoproteína, la única responsable de su inducción y, por



ello, la única capaz de proporcionar protección completa frente al desafío¹³⁵. En términos de protección, un título igual o superior a 0,5 UI en un ensayo de reducción de focos infecciosos¹³⁶ frente a un suero OMS de referencia, se considera protector en las especies de mamíferos probadas hasta la fecha.

La capacidad de los Ac neutralizantes (inducidos por la proteína G) en la protección, depende de su estructura; por ejemplo, una glicoproteína G soluble, delecionada en 58 aminoácidos terminales, induce 15 veces menos anticuerpos neutralizantes que la proteína entera y es incapaz de proteger al ratón en el desafío con el virus virulento. Sin embargo, los anticuerpos frente a la proteína N, que aparecen después de la inmunización con vacunas inactivadas o después de la infección natural, no son neutralizantes, desconociéndose su forma de actuación, aunque podría estar relacionada con la capacidad de bloqueo de la replicación vírica. En cualquier caso, la barrera hematoencefálica es impermeable a la mayoría de los anticuerpos, aunque la barrera sanguínea que rodea el tejido nervioso lo es menos, proporcionando a estos la oportunidad de aclarar el virus en las fases tempranas de la infección de los nervios, además de que la mayor parte de la capacidad protectora de los anticuerpos tiene lugar antes que el virus penetre en el SNC.

Las células B desempeñan en la protección frente al virus de la rabia un papel esencial, como lo demuestra que, en su ausencia, los animales vacunados no se protegen frente al desafío con el virus. Las células Tc, sin embargo, igual que el IFN-g, son dispensables. Entre los primeros estudios llevados a cabo en ratón pudo observarse que los animales vacunados con una cepa atenuada del virus de la rabia y, en menor medida, con vacunas inactivadas, producían células Tc capaces de lisar las células infectadas con el virus; por el contrario, las cepas virulentas no inducían Tc (Larson *et al.*, 1991)[®].

Varios autores han propuesto que las Tc solas son insuficientes para proporcionar protección frente al virus rábico (Lafon, 2007). De hecho, podría concluirse que la rabia es una excepción respecto de otras enfermedades producidas por virus, en que los linfocitos Tc representan la barrera de aclaramiento del virus más importante, mucho más que los anticuerpos, **puesto que en este caso sucede lo contrario.**

El modo principal de actuación de las vacunas frente a la rabia consiste pues en la inducción de una respuesta de anticuerpos con intervención



de los linfocitos T CD4+. Las vacunas inactivadas inducen principalmente la activación de los linfocitos B con la colaboración de las células Th2 (CD4+), por lo que representan la mejor elección para preservar la integridad del sistema nervioso. En el caso del hombre, las vacunas inactivadas post-exposición probablemente confieren protección porque priman una respuesta inmune en la periferia, en los órganos secundarios. Los linfocitos T CD4+ activados, las células plasmáticas y probablemente los anticuerpos, pueden migrar al parénquima del sistema nervioso.

De modo particular, las vacunas a base de microorganismos vivos, atenuados, inducen respuesta de células Tc CD8+, como sucede en el caso de productos a base de virus que se replican en el interior de las células infectadas. Las vacunas de DNA y recombinantes que incluyen vectores de expresión intracelulares (bacterias intracelulares facultativas o virus) pertenecen a la misma categoría. Por el contrario, las bacterinas y vacunas de virus inactivado o las de subunidades de partículas bacterianas o víricas, son presentadas por el MHC-II a los linfocitos T-CD8+ y su activación genera respuesta de tipo humoral en la que se implican células B, células plasmáticas y sus receptores solubles con actividad anticuerpo (anticuerpos).

En la actualidad, todas las vacunas comercializadas frente a la rabia, cualquiera que sea su destino (el hombre o los animales, ver después) son **vacunas inactivadas** que contienen proteínas víricas intactas (G, N, NS/P, M y L) de las que es esperable se induzca una respuesta humoral; las vacunas de subunidades, a base de **glicoproteína (proteína G)** poseen la misma consideración. El uso de **virus vivos atenuados o recombinantes** (virus *vaccinia* modificado y otros, ver después) se limita a la inmunización de los animales salvajes, en los que es esperable una respuesta de base celular y humoral.

6.1.2.3. Las primeras vacunas frente a la rabia. Vacunas de tejido nervioso:

La rabia permanece ligada, desde sus comienzos al propósito del hombre por lograr su prevención, desde que Edward Jenner describiera la forma de prevenir la viruela utilizando material de las pústulas de la viruela de las vacas (*vaccinia*). Lograda la herramienta hubo que esperar dos siglos para desarrollar la que permitiría la prevención vacunal de la rabia.

Victor Galtier describió en 1881 sus experiencias de inmunización de



corderos contra la rabia mediante la inoculación directa en su vena yugular de saliva procedente de animales enfermos de rabia ‘hasta 7 veces’, sin reproducir la enfermedad; después, uno de los animales fue inoculado con saliva de un animal rabioso, sin manifestar signos al cabo de 4 meses, por lo que Galtier consideró que estaba inmunizado². Aunque Galtier no acertó en la consideración del sistema nervioso como diana del agente de la rabia, sus experimentos (como reconocería Pasteur³) abrieron la puerta a la posibilidad del tratamiento preventivo de la rabia mediante vacunación.

En septiembre de 1907 se reconocieron sus méritos al concedérsele el Premio Nobel de Medicina, aunque su fallecimiento inesperado en abril de 1908 impidió culminar el éxito, en su lugar, la nueva propuesta distinguió a Ellia Metnickoff, quien describió por primera vez el fenómeno de la fagocitosis en la pulga de agua (*Daphnia*) y a quien se considera el iniciador de la Inmunología de base celular; Metcnikoff recibió el Premio Nobel, conjuntamente con Paul Ehrlich).

Los antecedentes pueden situarse en el verano de 1880, cuando Pasteur y su equipo, habían observado por casualidad que un cultivo virulento del agente del cólera aviar, envejecido, era incapaz de producir la muerte de las aves conservando, sin embargo, la capacidad para inducir un estado de protección que resistía la exposición con el agente original. Con este motivo Pasteur, que seguía con atención las experiencias y resultados de Galtier, expuso, por primera vez, el principio de los virus-vacuna y en 1881 escribió con C. Chamberland, Emile Roux y T. Thuillier su primer trabajo. Después adaptó su descubrimiento a otras enfermedades como el carbunco bacteridiano (1881), el mal rojo porcino (1883) y la rabia.

La atención que Pasteur prestó a la rabia, se atribuye a su relación con Bourrel, veterinario de Paris, ya conocido entonces por varias publicaciones sobre la enfermedad, quien parece que llevó a L. Pasteur en diciembre de 1880 un par de perros con rabia. En la Academia de Ciencias de Paris, se refería a ello Pasteur del siguiente modo: ‘... desde entonces, sin discontinuidad, la rabia se ha mantenido en mi laboratorio. Gracias a los servicios del director de la Escuela de Veterinaria, Monsieur Gourboux y del Prof. Nocard, hemos utilizado repetidamente los perros muertos de rabia en Alfort y el señor Rossignol, veterinario de Melun, nos ha proporcionado la cabeza de una vaca muerta de rabia, en la granja de un cliente, debido a las mordeduras de un perro rabioso’.



En 1884 comenzó sus trabajos de inmunización en perros con virus modificados por pases en monos, a la vez que seguía con la inoculación intracerebral en conejo con material virulento, experimentos ya iniciados en 1881. En aquellos primeros trabajos, Pasteur describe sus impresiones sobre la presencia del agente de la rabia en el tejido nervioso: *“primero se aloja y multiplica en la médula espinal y en el cerebro”*. *“cuando se transmite de un perro al mono y luego de un mono a otro mono, la virulencia disminuye en cada transmisión y si entonces se inocula de nuevo en perros, conejos o cobayas, el virus permanece atenuado. Sin embargo, la virulencia se incrementa seriadamente cuando se pasa de conejo a conejo o de cobaya a cobaya”*. El pase repetido en cerebro de conejo permitió la fijación del periodo de incubación de la rabia a ocho días a la vez que consiguió la atenuación, obteniendo virus con varios grados de virulencia en secciones de medula espinal expuestas al aire seco (mediante vapores de potasa) a 23°C y en la oscuridad, condiciones en las que la virulencia disminuía gradualmente con el paso del tiempo. Pasteur, en sus estudios sobre la rabia, llevó a cabo dos grandes descubrimientos que al final le permitieron alcanzar su famosa vacuna; en primer lugar, que el cerebro y la médula espinal, albergaban el virus y en segundo lugar, que la inyección de material que contenía virus, en el cerebro, originaba de forma invariable la parálisis y muerte del animal inoculado, como consecuencia de la rabia. De este modo, Pasteur produjo una vacuna atenuada con la que inmunizó con éxito a 50 perros⁸.

El momento crítico en que se puso a prueba el trabajo de Pasteur, tuvo lugar el lunes, 6 de julio de 1885, cuando llegó a Paris Joseph Meister, un niño alsaciano (de Meissengott) de 9 años, que había sido mordido repetidamente en varios lugares de su cuerpo por un perro guardián de una tienda de comestibles, rabioso, dos días antes (el 4 de julio), dejándole cubierto de sangre. El médico local diagnosticó rabia en el animal porque su boca estaba recubierta de espuma sanguinolenta, confirmando después ese diagnóstico al descubrirse en el cadáver, trozos de madera en el estómago. Al niño le habían cauterizado las heridas con ácido fénico 12 horas después de la mordedura. Aunque con reticencia (Pasteur no había probado su vacuna en humanos y, además, no era médico), pero persuadido por los Drs. Vulpian y Grancher, de la Academia de Medicina, proporcionó a éste último (Dr. Grancher) la emulsión de la médula espinal de un conejo que había muerto de rabia el 23 de junio y que había sido mantenida en aire seco durante 14 días. Después de ésta se le administró una segunda dosis procedente



del animal muerto el 25 de junio (12 días de desecación) y así siguió, reduciéndose el tiempo de desecación para cada preparación, hasta el 16 de julio, en que se le administró médula de un animal que solo había sido desecada durante un día. En total, al niño se le administraron 13 inoculaciones en 10 días con porciones de médula espinal cada vez más frescas (más virulentas; de mayor a menor grado de atenuación) y hasta después de 3 meses y 3 días no se anunció que la vida del niño ya no corría peligro y que su salud parecía excelente. El 20 de octubre se trató con éxito a Jean Baptiste Jupille, que había sido mordido por un perro enfermo 6 días antes. A lo largo de 1886 se trataron 350 pacientes de toda Europa, Rusia y América lo que se consideró un gran triunfo. Emile Roux, responsable con Pasteur del desarrollo de la vacuna, en 1887, resumía su protocolo de vacunación antirrábica del siguiente modo: *'Un total de 21 días de tratamiento, comenzando en la mañana del primer día con la administración de una dosis de 3 ml de médula desecada 14 días y en la misma mañana una segunda dosis de médula desecada 13 días. Por la tarde, una primera dosis de 3 ml de médula desecada 12 días y después una segunda dosis de 3 ml de médula desecada 11 días. El 2º día se administraban, igualmente, en la mañana, dos dosis de 3 ml de médula, desecadas 10 y 9 días, respectivamente y por la tarde, nuevamente dos dosis de 3 ml desecadas 8 y 7 días, respectivamente. El 3º día se reducía la dosis a la mitad, solo una administración por la mañana y otra por la tarde, de 2 ml de médula desecada durante 6 días. El 4º día, solo una dosis en la tarde, de 2 ml de médula desecada 5 días, igual que el 5º. El 6º día, también solo una dosis de 2 ml de médula desecada 4 días. El 7º día se reducía la dosis a 1 ml de médula desecada 3 días y en el 8º día se recuperaba los 2 ml de médula desecada 8 días. El día 9º se administraban 1,5 ml de médula desecada 3 días y el 10º se administraban 2 ml de médula desecada 5 días. El 11º día se administraban 2 ml de médula desecada 5 días y el 12º y el 13º se administraban 2 ml de médula desecada 4 días. El día 14º y 15º, se administraban 2 ml de médula desecada 3 días y el 16º 2 ml de médula desecada 5 días. El día 17º se administraban 2 ml de médula desecada 4 días y el 18º 2 ml de médula desecada 3 días. Los días 19, 20 y 21, finalmente, se administraban 2 ml de médula desecada 5, 4 y 3 días respectivamente'* (G. Baer, 2007).

Después de este gran descubrimiento, que inmortalizó la figura de Louis Pasteur, se sucedió un largo camino de nuevos hallazgos sobre la biología del agente y el desarrollo de la enfermedad, sobre diferentes modos de inactivar el virus para la preparación de nuevas vacunas o de



conseguir nuevos métodos de atenuación.

La técnica original de Pasteur fue modificada en 1888 por **Hogyes**, en base al uso de emulsiones diluidas de médulas no tratadas, que se correspondían en la práctica con un grado de desecación variable; por ejemplo, la dilución 1:200 correspondía a una médula desecada de 4 días, mientras que la dilución 1:1.000 lo era de una médula de 6 días, etc. y, después, **Calmette** todavía simplificó más el procedimiento sumergiendo la médula en glicerina y desecándola después por un periodo variable de entre 1 y 15 días. En cualquier caso, la técnica original de Pasteur resultaba excesivamente cara, cuando se trataba de preparar las docenas o cientos de médulas de conejo necesarias, una dificultad que, por otra parte, hacía imposible cualquier intento de vacunación de los perros. Como señaló Nocard (1884) en aquel tiempo, solo en Francia contabilizaban más de 2,5 millones de perros, sin contar los más de cien mil que corrían por las calles de París, por lo que *‘ni siquiera en Australia existían tantos conejos’*.

Jaime Ferrán, en 1886, modificó el procedimiento de vacunación de Pasteur mediante lo que se denominó un método supraincubado, más eficaz y sencillo, pero mucho más virulento, que ocasionaba más fallos y, consecuentemente más bajas. Ferrán fue reconocido en 1907 por la Academia de Ciencias de París (Polanco, 2012[®]. cit. por Martínez Pérez, 2014).

Entre 1903 y 1905, se incorporó al diagnóstico microscópico de la rabia la detección de los corpúsculos intracitoplasmáticos descubiertos por **Aldechi Negri** y a partir de 1907, **Fermi** utilizó un nuevo tipo de tratamiento, con fenol, del tejido nervioso para preparar un nuevo tipo de vacuna.

Con carácter general en los años siguientes se desarrollaron dos tipos de productos para la inmunización contra la rabia, en el hombre y los animales. Por un lado, vacunas de virus ‘inactivado’ y por otro, vacunas de virus ‘vivo’ (atenuado o modificado). En ambos casos, la cepa original de Pasteur para producir la vacuna de médula de conejo desecada ha representado la base de la mayoría de los productos, aunque en los últimos años se han utilizado nuevos aislados o modificaciones de los anteriores.

Después de la modificación de **Fermi** (una suspensión acuosa al 5% de tejido encefálico de cordero o cabra inoculados con virus fijo, tratada con ácido fénico al 0,5-1% en una primera fase durante 24 horas



a 22°C y después 4 días a 4°C, más 1 semana adicional a 2-5°C; la vacuna incorporaba una determinada cantidad de virus vivo, por lo que podría clasificarse como una vacuna parcialmente inactivada o mixta. Se utilizaba en una sola dosis de 5 ml por vía intramuscular en el perro, con revacunaciones anuales), se incorporaron nuevas formas de preparación de la vacuna antirrábica. **Semple**, en 1911, utilizó también ácido fénico para la inactivación del virus rábico (suspensión de cerebro y médula de conejo al 2-10% inoculados intracerebralmente con virus fijo, cepa Pasteur-Paris ó PV-11, tratada con ácido fénico a una concentración final del 0,5% hasta inactivación total y conservada con tiomersal, utilizada en perros, gatos y ganado bovino, en dosis única con revacunaciones anuales) y **Babes**, en 1912, hizo lo propio utilizando el calor.

Umeno y Doi, en 1921, utilizaron la acción combinada del fenol y la glicerina (suspensión de cerebro y médula de conejos al 60% en agua glicerina y cuatro partes de ácido fénico al 1,25%), destinada a la vacunación en perros, con revacunaciones anuales. **Finzi** modificó el protocolo de Umeno y Doi utilizando suspensiones de material nervioso al 25%, inactivando con ácido fénico al 1% y suspendiendo después el producto en agua glicerina al 60%).

Alivisiatos (1922), Remlinger y Hempt (1925) utilizaron éter para la inactivación; en ambos casos a partir de cerebro de conejo o corderos inoculados con virus fijo Pasteur Paris, con éter sulfúrico en tiempos sucesivos de 25, 20 y 15 horas para cada una de las tres dosis utilizadas en el perro, por vía intramuscular, con revacunaciones anuales (vacuna de Remlinger) o con una mezcla de éter, glicerina y ácido fénico al 1% (vacuna de Hempt), en este caso la vacuna se recomendada para perros, gatos o ganado bovino, intramuscular, en dosis única y revacunación anual.

En 1930, **Kelser y Schoening** propusieron una vacuna inactivada preparada con cloroformo, a partir de tejido nervioso de conejo o cordero inoculados con virus fijo Pasteur Paris, suspendido al 1% e inactivada con cloroformo al 1%, recomendada para perro y gato por vía intramuscular o subcutánea, con revacunaciones anuales.

Webster y Casal en 1940 introdujeron el uso de las radiaciones ultravioleta y en 1954 se preparó, por vez primera, por Eduardo **Fuenzalida** y Raul **Palacios**, en el Instituto Bacteriológico de Chile, una vacuna de encéfalo de ratón lactante (ratones de 4 días) inoculados con virus fijo



tipo CVS, recogiendo los encéfalos a las 96 horas y suspendiéndolos al 5% en agua bidestilada e irradiándolos con ultravioleta, añadiendo posteriormente fenol y mertiolato en concentraciones finales de 1‰ y 1‰ respectivamente, utilizable en perros, gatos y bovinos con revacunaciones anuales o cada 2 años (en los perros). Se produjo también una variante obtenida a partir de encéfalo de conejo lactante, igualmente inactivada con rayos ultravioleta.

Puntoni puso a punto, también, una vacuna preparada a partir de tejido cerebral de conejos inoculados con virus fijo, en suspensión al 10% e inactivado con formol al 1%, destinada para su aplicación en el perro, en una sola dosis, con revacunaciones anuales.

En 1955, **Peck** incorporó la b-propiolactona (BPL) como agente inactivante y en el Instituto Pasteur se preparó una vacuna de encéfalo de cordero de 1-2 meses inoculados con virus fijo Pasteur o PV-11 inactivando con BPL al 1/4.000 durante 3 h a 22-24°C, añadiendo después fenol al 0,25% y manteniendo por último 48h a 4°C. Una variante inactivada se obtenía del mismo modo a partir de encéfalo de ratón lactante. En ambos casos, con destino al hombre y aplicación subcutánea de una dosis de 2 ml.

Las primeras vacunas inactivadas, todas ellas obtenidas de tejido nervioso de animales inoculados intracerebralmente adolecían de sacrificar, como consecuencia del tratamiento, buena parte de los antígenos presentes en la preparación original, razón por la que se precisaba material nervioso con infectividades superiores a 10^5 DL₅₀ por 0,03 ml para inoculación intracerebral en ratón, administrando el producto al paciente en dosis altas e inoculaciones repetidas.

6.1.2.4. Adaptación del virus rábico a cultivos de tejidos y celulares:

La inoculación intracerebral en animales susceptibles (particularmente ratón, rata y conejo, pero también corderos) representó desde el comienzo y a lo largo de muchos años, el procedimiento general de obtención del virus rábico con fines experimentales y especialmente para la preparación de vacunas, aunque los propósitos de encontrar una alternativa más manejable que los animales vivos y de rendimiento comparable, fue siempre un objetivo largamente perseguido.

Levaditi (1913) fue el primero en lograr propagar el virus rábico en ganglios espinales mantenidos con plasma coagulado de mono y en 1936 y 1937, el japonés **Kanazawa** obtuvo éxitos en el cultivo seria-



do manteniendo cerebros de embriones de conejo, suspendidos en solución de Tyrode. A partir de esta fecha, en particular entre 1936 y 1941, ya fueron varios los autores que consiguieron propagar el virus en cerebro de embriones de rata y ratón¹⁴¹, comprobando incluso, en el caso de **Parker y Hollender** (1945) que los rendimientos eran más eficientes en cultivos de tejidos derivados del cerebro de los embriones, que de los animales adultos. **Plotz y Reagan** fueron los primeros, en 1942, en aislar el virus calle directamente en cultivo de tejidos, al infectarlos directamente con material tomado de un paciente humano y de un perro, ambos con rabia, manteniendo las cepas después de 11 y 9 pases, respectivamente.

Después de las primeras observaciones realizadas por diferentes autores acerca de que el virus de la rabia se multiplicaba de forma muy eficiente en cultivos de células procedentes de tumores de ratón (células de un astrocitoma) y conejo (carcinoma de Pearce), **Atanasiu y col.**, del Instituto Pasteur, entre 1957 y 1961, cultivaron virus calle y virus fijo en una línea de ependimoma de ratón en la que por primera vez, después de varios pases, obtuvieron corpúsculos de Negri, lo que representaba un avance fundamental tanto desde el punto de vista de la biología y cultivo del virus, como en su posible relación del uso de cultivos celulares con fines diagnósticos (Rodríguez Ferri, 1987).

En las décadas que siguieron se describió la susceptibilidad y adaptación del virus rábico a distintos tipos de células en cultivos primarios o continuos. **Vienchange et al** (1956)¹⁴² describieron la adaptación del virus al cultivo en células renales de ratón y **Kissling** (1958)¹⁴³ adaptó, después del pase seriado tanto de virus fijo como de virus calle, al cultivo de células de riñón de hámster, demostrando después el uso potencial del virus así cultivado, para la preparación de vacunas, comparable al uso de animales vivos. A mediados los años sesenta se adaptó el virus, previamente avianizado (cepa Flury HEP, ver después), al cultivo en fibroblastos de pollo, con producción de efecto citopático, un carácter que permitía la titulación de la infectividad viral.

Además de los anteriores, también se han utilizado cultivos derivados de glándulas salivares de perro, de tejido adiposo de murciélagos, de células de riñón de perro, de cerdo, hámster y de mono Rhesus, de células renales de cordero, de conejo y de células de embriones humanos, a partir de varios tejidos como piel, músculo y pulmones. En cualquier caso, las células BHK-21 (células renales de hámster lactante, clon 21, de **MacPherson y Stocker**, 1962¹⁴⁴) han sido siempre favoritas,



por su extrema susceptibilidad. Finalmente, se ha llevado a cabo una intensa investigación sobre células diploides humanas¹⁴⁵ con el propósito de ser utilizadas para la producción de antígeno vacunal y varias cepas de virus se han adaptado a su crecimiento en este sistema.

6.1.2.5. Adaptación del virus de la rabia a embriones de pollo y pato

De forma paralela a los ensayos y experimentos en cultivos de tejidos o en cultivos celulares, **Johnson**, en los EE.UU., en 1939, consiguió la inoculación del virus y su adaptación al embrión de pollo, inicialmente en membrana corioalantoidea. Debe reconocerse que la adaptación al embrión de pollo supuso al principio una gran dificultad, toda vez que su adaptación a los centros nerviosos del embrión representaba una cuestión particularmente delicada, con rendimientos muy inferiores a los obtenidos en las inoculaciones intracerebrales en los animales (hasta 10^9 Unidades Infecciosas, UI, por gramo de los animales inoculados intracerebralmente, mientras que en los embriones de pollo, en el mejor de los casos no se superaban las 10^4 UI por gramo). Los comienzos con éxito de adaptación del virus de la rabia al embrión de pollo han sido descritos por **Koprowski** (1954)¹⁴⁶ *“El 29 de marzo de 1939 falleció de rabia en Georgia, USA, una muchacha llamada Flury, después de 4 días de duración del periodo clínico. La chica se había expuesto a los lamidos de un perro con rabia algunos días antes de que el animal hubiera manifestado signos de la enfermedad. El perro murió 5 días después de que la muchacha enfermase. La chica no recibió tratamiento post-exposición. La autopsia fue realizada por el Dr. Harald Johnson, de la Fundación Rockefeller, encontrándose virus calle en los tejidos del Sistema Nervioso Central y en las glándulas lagrimales y salivares, mediante inoculación de muestras de los tejidos en ratones. El Dr. Johnson inoculó una suspensión de tejido cerebral en pollitos de un día, tardando 30 días para que el primer pase de este material produjese signos de parálisis en las aves inoculadas. Pases seriados en este hospedador acortaron el periodo de incubación a 6 días, llevando a cabo en total 136 pases por cerebro de pollitos”*. A partir de 1945 **Koprowski y Cox**¹⁴⁷ adaptaron la cepa a embriones de pollo de 7 días con resultados muy interesantes relativos a la patogenicidad de la cepa; ya en el pase 22, inoculando en masetero, carecía de capacidad infectante para el perro, sin signos evidentes y desde el pase 40 ocurría lo mismo en el caso del conejo inoculado por vía intramuscular. En el pase 75 se producía una marcada disminución de la virulencia para el cobaya y entre el 172 y 174 se anuló la morbilidad intracerebral en el ratón adulto, aunque



mantenía sus propiedades en el caso del cobaya con la particularidad que la resistencia de los ratones se vinculaba a los animales adultos, de más de 14 días¹⁴⁸; en una serie de cuatro experimentos, la tasa de mortalidad en ratón se anulaba, según el experimento, entre el pase 172 y 182, acompañándose de un descenso en la DL_{50} media en una o dos generaciones. En definitiva, a partir del pase 180, el virus perdía su poder patógeno para el ratón, cobaya, hamster, bovinos, perro y hombre aunque intracerebralmente conservaba este carácter para el ratón lactante y el mono, siendo débilmente patógeno para el cobaya y hámster y apatógeno para el ratón adulto, conejo y perro. A partir del pase 200 la cepa mataba al hurón, pero seguía siendo inocua para otras especies, no recomendándose entonces su uso para la fabricación de vacunas con destino al hombre o los bovinos aunque si para el perro y el gato. Entre los pases 40 y 50 la cepa se define como **LEP** (*Low Egg Passage*) y durante muchos años se utilizó profusamente para inmunización del perro y del gato, induciendo inmunidad duradera (3 años o más) y calificándose como un buen antígeno, aunque se produjeron varias alertas de posible riesgo de enfermedad vacunal, aunque otras opiniones descartaron el riesgo. La cepa **HEP** (*High Egg Passage*) utiliza el virus Flury a partir de su pase 180 por embrión de pollo y se recomendó en la vacunación de animales especialmente susceptibles a la rabia, en particular, perros, gatos y bovinos. Ambas cepas se han venido utilizando, indistintamente, en vacunas inactivadas a partir del crecimiento del virus en cultivos celulares, con destino a los animales.

La cepa **Kelev** (de Komarov y Horenstein, 1953) es una cepa avianizada, adaptada al embrión de pollo, que a partir de 60-70 pases no produce ya signos de rabia en diferentes especies como el hámster, cobaya y conejo por vía intracerebral, ni tampoco por vía intramuscular en los perros, mientras que el ratón lactante sigue siendo susceptible intracerebralmente. Con ella se han preparado vacunas con destino al perro y al ganado bovino, con protecciones acreditadas de hasta 3 años, en ocasiones con dos inoculaciones en el periodo de un mes.

6.1.2.6. Cepas vacunales obtenidas por aislamiento y adaptación del virus rábico a diferentes especies animales de experimentación:

La cepa **SAD** (*Street Alabama Duffering*) es una cepa de virus de la rabia adaptada mediante 130 pases en el ratón (intracerebrales) más 10 pases adicionales por saco vitelino de embrión de pollo y 25 pases alternados en ratón. Fue obtenida por **Fenje** en 1961. Como la cepa Flury, se utiliza en la producción de vacunas en cultivo celular.

De la cepa SAD se han obtenido algunas estirpes de interés en la producción de vacunas, como la cepa **ERA** (*Evelyn Rokitniki Abelseth*) obtenida por **Abelseth** en 1964, adaptada después de 227 pases a BHK-21, de riñón de hámster lactante y después a cultivos primarios de riñón de perro y porcinas (35 a 45 pases), resultando un producto despro-

visto de patogenicidad que solo produce signos de rabia en el ratón y por vía intracerebral. Se ha utilizado en vacunación del perro, bovinos, caballos, ovejas y cabras. También se ha utilizado en la vacunación oral de zorros¹⁴⁹. Debe tenerse en cuenta, como ya hemos señalado, que todas las cepas atenuadas, utilizadas vivas, no están exentas de riesgo y, este caso no es una excepción. En 1982 se describió que la cepa ERA se responsabilizó de casos letales de rabia en gatos¹⁵⁰, por otra parte, algo similar a lo acontecido, tanto en gatos como en perros, con el uso de la cepa Flury LEP¹⁵¹ habiéndose llegado a establecer tasas de 3 casos por millón de vacunaciones en el Estado de California¹⁵².

La cepa **Vnukovo-32** es un virus SAD adaptado a cultivos primarios de riñón de hámster después de 90-100 pases a una temperatura óptima de cultivo de 32°C (su variante la cepa Vnukovo-37, lo es a 37°C). Se ha utilizado para la producción de vacunas para el perro, gato, bovino, caballos, ovejas y cabras.

La cepa **Kissling** es un virus SAD obtenida por pases en hámster, utilizable para la vacunación en el perro, con revacunaciones anuales.

6.1.2.7. Cepas vacunales obtenidas del pase del virus rábico por cultivo celular y embriones de pollo y pato:

Un posible catálogo de cepas vacunales obtenidas por pases del virus rábico por cultivo celular y embriones, se recoge en la tabla siguiente:

Tabla 2. Cepas vacunales del virus de la rabia (RABV) y caracteres principales

Denominación	Obtención	Características	Observaciones
AVOI	Lafay <i>et al.</i> , 1991	Es un mutante avirulento de la cepa CVS del virus de la rabia portador una mutación en el aminoácido 333 de la glicoproteína	
CVS (<i>Challenge Virus Standard</i>)		La cepa CVS es una cepa de virus fijo de cerebro de ratón (WHO, 1973). Se aisló originalmente en 1882 de un bovino en Francia (Heaton <i>et al.</i> , 1999)	Es una cepa altamente neurotrópica (Thoulouze <i>et al.</i> , 1997)
SAD (<i>Street Alabama Dufferin</i>)		Virus calle atenuado, adaptado al ratón por 130 pases ic, más 10 pases por saco vitelino de embrión de pollo y 25 adicionales alternados por ratón	Se aisló originalmente de un perro en Alabama, en 1935. De ella derivan diferentes variantes
SAD-Berna		Variante de la cepa SAD obtenida en Berna (Suiza) utilizada en la vacunación oral de zorros	



SAD-B19		Idem. anterior (clon B19)	
ERA		Es una cepa derivada de la SAD adaptada a cultivo de células de cerdo (35-45 pases)	Se ha utilizado en la vacunación oral de zorros, tanto en ensayos de campo como en estudios de laboratorio. En vacunación parenteral produce inmunidad de larga duración (al menos 4 años en el bovino y 5 y 4, respectivamente, en el perro y gato. Los zorros vacunados mediante ingestión de cebos con la cepa vacunal, están protegidos durante 48 meses frente al desafío con virus virulento (Lawson <i>et al.</i> , 1997)
SAG-2		La cepa SAG-2 se obtuvo a partir de la cepa SDA-Berna, en un proceso en dos etapas mediante anticuerpos monoclonales anti glicoproteína. Los dos primeros nucleótidos que codifican para el aminoácido en posición 333 de la proteína G se mutan. La arginina, en posición 333, que se asocia con la patogenicidad, se sustituye por lisina, en la primera fase y después por el ácido glutámico.	Los cambios se traducen en una excelente estabilidad genética y atenuación para ratones adultos, zorros, gatos y perros. Zorros y perros vacunados por vía oral sobrevivieron al desafío letal con el virus rábico ⁵³
Vnukovo-32		Es una cepa de virus SAD adaptada en células de riñón de hámster (BHK-21) sobre un total de 90-100 pases a 32°C	Se utiliza tanto en vacunas vivas (atenuadas) como inactivadas (WHO, 1973). La vacunación con la cepa Vnukovo-32/107 se ha utilizado para producir la vacuna oral Kamark contra la rabia en carnívoros salvajes (Ondrejka <i>et al.</i> , 2001)

Flury-HEP		Adaptada al embrión de pollo (membrana corio-alantoidea) después de 227-230 pases (WHO, 1973). En general, a partir del pase 180	Tanto Flury-HEP como Flury-LEP se utilizan para producir dos tipos diferentes de vacunas en embrión de pollo (PCECV)(Moore <i>et al.</i> , 2002)
Nishigahara RCEH			Es una cepa semilla utilizada para la producción de vacunas para animales en Japón. Se cree que deriva de la cepa Pasteur, obtenida en París, en 1915. En Japón, el virus ha sido pasado a través de varias clases de animales y cultivos celulares (Sakamoto <i>et al.</i> , 1994). La cepa Nishigahara virulenta mata el ratón adulto después de la inoculación intra-cerebral (Takayama-Ito <i>et al.</i> , 2006)
Cepa RC-HL		Es una cepa atenuada derivada de la cepa Nishigahara. Se ha mantenido mediante pases intracerebrales en conejo, adaptada después de 294 pases en embrión de pollo, 8 pases en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo, 5 pases en células Vero y 23 pases en células de pulmón de hámster (Ito <i>et al.</i> , 2001)	Se utiliza para la producción de vacunas para animales en Japón (Ito <i>et al.</i> , 2001)
Cepa Ontario (virus vulpino)			En los años 40 la rabia vulpina se difundió en las provincias canadienses de las regiones árticas y aunque en la mayoría de estas regiones al final se extinguió, la enfermedad ha persistido en los zorros en Ontario (King, 1998)
Cepa Pasteur (virus PV)		Es la cepa Pasteur Paris, de virus fijo (WHO, 1973)	



Virus calle		Quando se aísla por primera vez de hospedadores humanos o animales, el virus de la rabia conserva sus propiedades naturales y se denomina ' virus calle '. Después de la adaptación en animales de experimentación mediante pases seriados intracraneales, se produce un virus con propiedades alteradas que se refiere como ' virus fijo ' (Cohen, 1969).	La mayoría de los virus calle aislados, producen por lo general una infección letal del SNC (Tsiang, 1988)
Cepa PM (Pittman Moore). También se designa como cepa PV-11 de virus fijo de Pasteur		Virus fijo tipo Pasteur	Derivan de la cepa aislada del cerebro de un bovino rabioso en Francia, en 1882 (CVS). Se utiliza para producir vacuna humana en células diploides (HDCV), en células Vero purificadas (PVRV) y en células de embrión de pato (PDEV) (Moore <i>et al.</i> , 2002).
Cepa Kissling		Cepa CVS adaptada a cultivo de células BHK-21	Idem.
Virus Eth2003		Se identificó como el agente de un brote de rabia en cánidos raros, como el zorro etíope (<i>Canis simensis</i>) en las Montañas Bale, en Etiopía, en 2003 y 2004 (Randall <i>et al.</i> , 2004)	
Genotipo 1 de Tailandia		Se aisló de dos murciélagos con cara de perro (<i>Cyanopterus brachyotis</i>) en Tailandia (Smith <i>et al.</i> , 1967)	

6.1.3. Catálogo de vacunas disponibles en la actualidad para el control de la rabia en los animales

En la actualidad, la mayor parte de las vacunas disponibles contra la rabia, en los animales, responden a dos patrones fundamentales; por un lado, vacuna de antígenos obtenidos en cultivo celular a partir de alguna de las cepas tradicionales, derivadas de la cepa Pasteur u otras, a las que nos hemos referido antes, e inactivadas. Por otro lado, vacunas

recombinantes, surgidas, fundamentalmente a partir de los éxitos alcanzados con la vacuna oral con virus *vaccinia* recombinante utilizada frente a la epidemia de rabia vulpina europea. En la Tabla siguiente (Tabla 3), se resume la situación de oferta disponible en la UE y España y en la Tabla 4, se presenta la correspondiente a los EE.UU. En el caso de los animales domésticos, particularmente perro y gato, pero también otros; se trata de vacunas que proporcionan buena inmunidad con una dosis inicial a partir de los tres meses y revacunación anual, o bien una dosis de recuerdo después de la primer vacunación, aproximadamente dos semanas después. La oferta de vacunas recombinantes es por el momento, escasa y se aplica oralmente para los animales salvajes, utilizando cebos trampa como vehículos. En los últimos años se están produciendo interesantes estudios para la aplicación de este tipo de vacunas orales también para el perro, particularmente en algunas regiones en las que abundan perros vagabundos, indocumentados, como un método alternativo de control de estos animales, compatible con otros.

Tabla 3. *Oferta europea y de España en vacunas frente a la rabia, para animales*¹⁵⁴

Nombre	Fabricante	Tipo y características	Destino	Dosis, primovacuna, duración inmunidad y revacunación
Canigen o Rabigen* (LR, MHA2PLR, 8)	Virbac	Inactivada, cepa VP-12; adyuvantada; >1UI;	perros	1ml; im o sc; >3m; duración 1año; revacunación anual
Dog-vac RB	Ovejero	Inactivada, cepa CVS, >1UI/ml, adyuvantada (hidróxido de Al)	Bovinos, perros y gatos	1ml; im ó sc (perro); >3m; 1año; anual
Etadex	CZ Veterinaria	Inactivada, cepa Flury LEP, >1UI NIH/ml	Bovinos, perros y gatos	1ml; im ó sc; >3m; 3-4 años; anual
Eurican (MHP-LR, R)	Merial	Inactivada, cepa G52 en cultivo de células de embrión de hámster NIL2, con hidróxido de Al	Bovinos, equinos, ovinos, perros, gatos, hurones y visones	1ml; im ó sc; >3m; 1-3 años (en perros); anual



Purevax* rabies	Merial	Canarypox virus recombinante (vCP65) en título > 10 ^{6,8} DIAF50 (dosis infecciosa 50% por IF). Expresa Gp del virus rábico, pero no se replica	gatos	1ml; sc; >3m (inmuniza 4 s después); duración de la inmunidad, 1 año; Revacunación al año y después revacunaciones cada 3 años
Nobivac (R y RL)	MSD-Inter-vet	Inactivada, cepa Pasteur/RIV; >2UI/ml; fosfato de Al al 2% y tiomersal como excipiente (1mg) RL lleva >3UI cepa Pasteur/RIV inactivada	Perro, gato, hurón, equino, ovino y bovino perro	1ml; im ó sc; >3-6 (bovino y ovino) meses; revacunación anual (hurón y ovino), cada 2 años (caballo, bovino) y 3 años (perro y gato); Duración 3 años
Rabdomun	Pfizer-Zoetis	Inactivada; cepa Flury LEP en cultivo de BHK-21, clon 13; >1UI	Perro, gato y bovino	1 ml; sc (gato) o im (perro y bovino); >3m; duración 1 año y revacunación anual
Vanguard R	id	Inactivada; cepa SAD Vnukovo-32; con hidróxido de Al y tiomersal; >2UI	Perro, gato y hurones. Bovino, porcino, ovino, caprino, equino	1 ml; im ó sc; >3meses; Revacunación al año y luego recuerdos cada 2 años
Versican DHP-Pi/L3R	id	Inactivada y multivalente (moquillo, parvo, adeno, para-influenza 3, leptospira y rabia); cepa SAD Vnukovo-32; >2UI	perros	1 ml; sc; >2meses; duración 1 año y revacunaciones anuales
Rabisyva VP-13	SYVA	Inactivada, cepa Pasteur VP-13; >1UI;	Bovino, perros y gatos	1 ml; im ó sc; >3meses; duración 1 año; revacunación anual (en los gatos, cada 2 años)

(*) También en EMA (European Medicine Agency, www.ema.europa.eu)

Tabla 4. Oferta de los EE.UU. en vacunas frente a la rabia, para animales¹⁵⁵

Nombre	Fabricante	Tipo y características	Destino	Dosis, primovacuna-ción, duración inmunidad y revacunación
--------	------------	------------------------	---------	--

Imrab (1, 1 TF, 3, 3 TF y Large Animal)	Merial	Inactivada, cepa G52 en cultivo de células de embrión de hámster NIL2, con hidróxido de Al	Perros y gatos (I-1 y I-1 TF), perros, gatos, ovinos, bovinos, caballos y hurones (I-3), perros, gatos y hurones (I-3 TF) y bovinos, caballos y ovejas (I- Large Animals)	1 ml; >3m; sc; revacunación anual (I-1 y I-TF). 1 ml (perros, gatos y hurones), 2 ml (ovinos, bovinos y caballos);
Purevax Feline rabies 3 y 4	Merial	Canaripox virus recombinante (vCP65) en título > 10 ^{6,8} DIAF50 (dosis infecciosa 50% por IF). Expresa Gp del virus rábico, pero no se replica	gatos	1ml; sc; >3m (inmuniza 4 s después); duración de la inmunidad, 1 año; Revacunación al año y después revacunaciones cada 3 años
Raboral V-RG TM	Merial	Virus vaccinia recombinante que expresa proteína G	Mapache, coyote	Contiene 150 mg de hidrocloreuro de tetraciclina como marcador y una cápsula de material plástico con 1,8 ml de vacuna. Con destino al zorro se utilizan cebos de cabezas de pollo
RabVac1	FortDodge	Inactivada, monovalente	Perros y gatos	1ml; im o sc; >3m y revacunación anual
Rabvac3 y Rabvac3TF	FortDodge	Inactivada	Perros, gatos y caballos	1m; im o sc; en perros y gatos >3m, revacunación al año y después cada 3 años; en caballos 2 ml; im, >3m y revacunación anual
Continuum Rabies, EquiRab y Prorab 1	Intervet	Inactivada, cepa Pasteur/RIV; >2UI/ml; fosfato de Al al 2% y tiomersal como excipiente (1mg)	Perro, gato y caballo (Continuum); Caballos (EquiRab) y perros, gatos y ovinos (Prorab 1)	1ml; im ó sc; >3 ó 4 (caballos) meses; revacunación anual y cada 3 años en perros (4 en gatos). En Prorab, revacunaciones anuales
Rabdomun y Rabdomun 1	Pfizer	Inactivada; cepa Flury LEP en cultivo de BHK-21, clon 13; >1UI	Perro, gato, ovino y bovino	1 ml; sc (gato) o im (perro y bovino); >3m; duración 1 año y revacunación cada 3 años (en perro y gato)



Defensor 1 y 3	Pfizer		Perros y gatos. Ovíno y bovino	1 ml; im ó sc; >3meses; duración 1 año; revacunación cada 3 años (en perro y gato)
Purevax feline Rabies	Merial	Glicoproteína G expresada en poxvirus del canario	Gatos	1ml; sc; primovacuna-ción a las 8 semanas y revacunación anual

6.1.4. Vacunas nuevas

Podría señalarse que representan una nueva generación de vacunas frente a la rabia, muy seguras y más baratas de producir que las tradicionales, de interés especial en países endémicos de rabia, en particular en África y Asia. Precisamente su justificación tiene sentido, en el hombre, para reemplazar a las vacunas de tejido nervioso, mucho más caras de producir y hasta cierto punto, menos eficaces. Para dar solución a estos casos, por tanto, se necesitan vacunas baratas, que solo requieran una o dos aplicaciones, que se puedan administrar por vía oral o que permitan su administración en poblaciones numerosas. El interés común reside principalmente en la seguridad y eficacia de las vacunas de virus recombinantes.

En los últimos 25 años se han investigado diferentes alternativas de vacunas recombinantes con diferentes vectores de expresión, estudiando la capacidad para expresar las proteínas de interés del virus rábico de interés por su capacidad para inducir inmunidad protectora en animales domésticos, particularmente perros¹⁵⁶.

6.1.4.1. Vacunas recombinantes.

Utilización de poxvirus. Las vacunas frente a la rabia basadas en el virus *vaccinia* figuran entre las primeras en las que se utilizó la tecnología recombinante, a comienzos de los años ochenta, cuando se clonó y secuenció por primera vez el gen de la glicoproteína G. El producto, un virus *vaccinia* recombinante (cepa Copenhague) por inserción del gen de la glicoproteína en la región de la timidin quinasa (TK) que expresaba proteína G de la cepa ERA del virus rábico, se propuso para la vacunación oral de animales salvajes frente a la rabia^{157, 158}.

Se ha de señalar que la aparición de esta primera vacuna recombinante coincidió en el tiempo con la descripción de variantes nuevas de la cepa SAD (cepa SAD-Berna y SAD-B19) utilizadas ambas con el mismo



propósito (administración en cebos a base de cabezas de pollo para la inmunización frente a la rabia vulpina en Europa), aunque las vacunas elaboradas con ambas cepas atenuadas adolecieron de problemas de seguridad cuando se administraban a algunas especies no diana, como roedores y otros¹⁵⁹, razón por la que desde entonces se ha trabajado para disponer de una vacuna segura, libre de virus rábico, que carezca de estos riesgos.

El virus *vaccinia* recombinante (V-RG) induce en el ratón una respuesta rápida de anticuerpos neutralizantes tanto por vía subcutánea como por administración oral, protegiendo a los animales frente al desafío con el virus rábico¹⁶⁰. La vacuna se probó en una serie de amplios experimentos llevados a cabo en EE.UU. y en Francia en muchas especies diana, con total éxito, siendo autorizada en 1995 para su destino a la prevención de la rabia en mapaches y después para prevenir la transmisión de la rabia en perros y coyotes, en la frontera entre México y los Estados Unidos. También se ha utilizado en Canadá.

Algunos autores han descrito reacciones adversas en individuos inmunodeficientes por lo que desde hace tiempo se iniciaron estudios dirigidos al uso de otros poxvirus, como los del canario (*canarypoxvirus*) o los poxvirus del mapache, con iguales propósitos. Entre 1991 y 1995, Taylor *et al*^{161,162} obtuvieron un virus de la viruela del canario recombinante para la expresión de la glicoproteína del virus rábico, que se ha utilizado para la vacunación de gatos contra la rabia, bien sola o en combinación con el virus de la panleucopenia felina, del parvovirus felino o del calicivirus felino. Con este virus vector también se han ensayado alternativas en relación con antígenos diferentes de la glicoproteína G, como sucede con la proteína N (nucleoproteína) con el propósito de obtener una buena respuesta celular. Los *canarypox* inducen buena respuesta Th2 CD4+ y buenas respuestas humorales frente a la proteína G, sin tipo alguno de signos adversos después de la inoculación.

Además del virus *vaccinia* o el *canarypoxvirus*, también se han utilizado con idéntico propósito otros poxvirus, como el *orthopoxvirus* del mapache¹⁶³, o el virus de la viruela aviar¹⁶⁴.

Adenovirus. Se ha utilizado, por ejemplo, el adenovirus canino tipo 2 (CAV-2) como un vector vivo que expresa la glicoproteína del virus de la rabia. El CAV-2 es un agente infeccioso natural del perro, productor de la hepatitis canina infecciosa, que se replica con eficiencia después



de su entrada a partir de diferentes vías, incluyendo la vía nasal, subcutánea o intramuscular, con buena capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes. La cepa YCA18 de este virus es una cepa atenuada y segura, no solo para el perro, sino también para otros carnívoros como el zorro, lobo y oso¹⁶⁵ por lo que su uso como vector de expresión es seguro y carece de efectos colaterales para los animales inoculados. En relación con el virus *vaccinia* y otros poxvirus y adenovirus humanos, esta cepa no causa infección en el hombre, lo que reduce el riesgo de infección humana.

Recientemente, Hu *et al* (2006)¹⁶⁶ desarrollaron una vacuna recombinante utilizando células MDCK sobre las que se transfectó la construcción genómica preparada *in vitro* insertando el casete de expresión del cDNA correspondiente a la glicoproteína, en la región E3 del adenovirus, previamente deletionada de fragmentos de E3a y E3b (la región E3 de los adenovirus no es esencial para la replicación en cultivo celular y está implicada en la regulación negativa de la expresión de las moléculas del MHC y, por tanto, de la respuesta inmune *in vivo*, protegiendo las células infectadas con adenovirus, de la destrucción por linfocitos T¹⁶⁷, manteniendo su capacidad de replicación). Aunque el nivel de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna recombinante no fue tan elevado como el obtenido con vacunas comerciales inactivadas, incluso después del *booster*, el nivel de protección obtenido en ratón y perro, fue razonable.

Se puede concluir que la posibilidad de vacunar los animales jóvenes y el hombre con una vacuna recombinante de adenovirus es interesante. Además, la vacuna es capaz de inducir títulos altos de anticuerpos frente al virus de la rabia en animales vacunados previamente con vacunas convencionales, esto es, es adecuada para la revacunación, siendo los niveles de anticuerpos neutralizantes más altos que los logrados en esquemas ordinarios de vacunación, lo que sugiere que la vacuna es capaz de inducir una fuerte respuesta anamnésica en los perros. Todavía quedan algunos asuntos que resolver en relación con este tipo de productos, como por ejemplo si puede inducir buena protección en animales vacunados antes de los 3 meses y otros.

El virus de la enfermedad de Aujeszky, un herpesvirus tipo 1, representa también otra alternativa de interés, que ha sido utilizado como vector para la expresión de antígenos virales en el caso del ganado porcino¹⁶⁸, aunque su espectro de hospedadores incluye numerosas especies de mamíferos y algunas especies de aves¹⁶⁹ y su genoma es



capaz de acomodar varias kb de ADN extraño, además de que se han identificado varios sitios de inserción apropiados y promotores de utilidad en ingeniería genética, incluyendo los genes de la timidin quinasa (TK), proteína quinasa (PK), gE, gI, y gG, todos los cuales no son esenciales para la replicación vírica¹⁷⁰ pero la inactivación o delección de uno o más de estos da lugar a un fenotipo atenuado¹⁷¹ que mantiene la capacidad de replicación. Algunas cepas atenuadas del virus de Aujeszky han sido utilizadas como cepas vacunales, como ocurre con la cepa Bartha, que tiene delecionados los genes TK y gE, manteniendo su capacidad inmunogénica (una de las pocas vacunas autorizadas en la UE, además de que sobre ella se ha desarrollado metodología DIVA). Yuan *et al.* (2008) han descrito la utilización de una cepa atenuada del virus de la enfermedad de Aujeszky recombinante como vector de expresión de la glicoproteína del virus rábico, estudiando también su seguridad e inmunogenicidad en perros¹⁷².

6.1.4.2. Vacunas de Subunidades

Está claro que la glicoproteína (proteína G) del virus de la rabia, es el objetivo central de las vacunas de subunidades. Además de las opciones de expresiones a las que ya hemos hecho referencia (poxvirus, adenovirus, herpesvirus), también se puede recurrir a otros vectores de expresión de naturaleza vírica (baculovirus por ejemplo), levaduras (por ejemplo *Sacharomyces cerevisiae*, con la ventaja de que la proteína es glicosilada) en células de insecto (con la misma ventaja), en otros tipos de células o incluso en plantas transgénicas (ver después). El éxito, en cualquier caso, es variable, pues por ejemplo en el caso de las levaduras se producen plegamientos incorrectos de la proteína que disminuyen su inmunogenicidad.

6.1.5. Vacunación y Programas de Vacunación contra la rabia canina

De forma un tanto sorprendente, el primer programa nacional de vacunación de perros contra la rabia solo comenzó 35 años después de los pioneros estudios de Pasteur sobre la rabia en 1880. Fueron los veterinarios japoneses Umeno y Doi en 1921 quienes pusieron en práctica el primer programa nacional japonés. Utilizaron vacuna fenicada iniciando las actuaciones en las ciudades de Nagasaki y Tokio.

Los servicios veterinarios húngaros fueron los primeros en demostrar, en ensayos de campo llevados a cabo en 1937 y en campañas de ámbito estatal entre 1939 y 1944, el valor de la vacunación en masa de los perros, complementada con las medidas ya clásicas de control del mo-



vimiento y de los perros vagabundos para la erradicación de la rabia¹⁷³. Desde entonces al presente, el plan ha acreditado su valor en muchos países, incluyendo el nuestro, aunque la relajación en las medidas de obligatoriedad y otros factores, han facilitado muchas veces reemergencias que se saldan con elevados costos económicos, cuando no en desgraciados accidentes humanos.

En el estado de Tennessee, en los EE.UU., se aplicó la vacunación en masa en 1948. En 1954 se aplicó la vacunación en masa para el control de la rabia en Malasia y en 1956 se hizo lo propio en Japón y Hong Kong. En Taiwan se aplicó en 1961 y en Filipinas en 1972. En diferentes países de Sudamérica se ha venido aplicando también desde 1981, incluyendo Brasil (1981), Perú (1985), México (1990), logrando importantes reducciones en todos ellos. El problema actual, en cualquier caso, reside fundamentalmente en África, particularmente en toda la región subsahariana y en Asia, atribuido al rápido crecimiento de las poblaciones de perros, el incremento de la urbanización, la densidad creciente y la movilidad de las poblaciones humanas y la implementación de medidas de control inadecuadas a la ecología de las poblaciones caninas^{174, 175} en lo que varios factores se consideran relevantes, como la subestimación de las poblaciones de perros y la cobertura insuficiente de las campañas de vacunación que no llegan ni de lejos al 70%, igual que la insuficiente frecuencia de las mismas para mantener una cobertura adecuada en las poblaciones, con una alta tasa de nacimientos y muertes, además de que todavía en muchas regiones se considera que las batidas para la eliminación de los perros vagabundos son el procedimiento más eficaz de control.

Entre 1950 y 1970 numerosos países, en todo el mundo, lograron la erradicación de la rabia canina, entre ellos el nuestro, como ya se ha señalado. Casi siempre, las reintroducciones se han podido explicar epidemiológicamente debido a la entrada de animales infectados procedentes de países o regiones vecinas o a partir de saltos en la barrera de especie desde animales salvajes. A partir de 1970 se pusieron en marcha nuevos programas que limitaron aún más su presencia en algunos países de Europa (este y sur) y en Sudamérica. No obstante, los brotes que se han sucedido de rabia canina en países o regiones previamente libres de la enfermedad son motivo de alarma ciudadana, encuentran a los sistemas de vigilancia de algún modo relajados y ello supone un cierto retraso en la activación y puesta en práctica de medidas de control que poseen consecuencias socio-económicas de gran



importancia, con nuevos esfuerzos que en ocasiones se mantienen durante meses o años para lograr nuevamente la erradicación de la enfermedad. Los ejemplos de este tipo de situaciones, son numerosos.

Como quiera que sea, en los últimos años y por una serie de coincidencias que tienen que ver con la falta de rigidez y rigor en la aplicación de los programas de erradicación (en el caso que se mantengan) no se ha producido la necesaria evolución para el control definitivo de la enfermedad, que todavía se cobra un saldo que según algunos autores se situaría por encima de las estimaciones de la OMS, como ya hemos señalado, y ello pese a la disponibilidad de mejores métodos de vigilancia y control y el incremento en el significado de salud de la enfermedad.

6.1.6. Vacunación en otros animales domésticos y exóticos: hurón, perro-mapache y otros

Los hurones figuran entre los animales más susceptibles al virus rábico incluyendo entre los signos clínicos la presencia de ataxia, hiper o hipotermia, falta de apetito, para-paresia en forma de debilidad en las extremidades, parálisis y letargia y, menos frecuentemente manifestaciones agresivas. Algunas de las vacunas que han sido señaladas antes, se prescriben también en el caso de los hurones recomendándose la vacunación anual. En el caso de animales expuestos a un animal enfermo o sospechoso, debe administrarse rápidamente un recuerdo vacunal. En el caso de un episodio que incluya la agresión por mordedura al hombre, los animales deben ser secuestrados y mantenidos en observación durante un periodo de cuarentena de 14 días, a la espera de manifestaciones clínicas de la enfermedad o muerte súbita, sometiendo al animal al diagnóstico presuntivo de rabia. El protocolo de actuaciones del Plan de Contingencia para la rabia señala la *'vacunación obligatoria de hurones, con perros, gatos y otros animales de compañía de especies sensibles al virus de la rabia'* cuando se haya declarado un nivel de alerta 1 (Presencia de un caso de rabia y posibilidad de transmisión autóctona).

6.1.7. La vacunación en los animales salvajes. El caso de Europa

El control de la rabia en animales salvajes es una cuestión compleja sobre la que influyen numerosos factores, desde el hábitat a la biología de la especie/s reservorios y vectores principales y otros. Hasta 1977, las intervenciones se reducían a políticas de reducción del censo de animales peligrosos (reservorios y vectores) mediante batidas de caza



directa u otras medidas más drásticas (gaseado de madrigueras, utilización de cebos envenenados, etc.) para la eliminación de los animales, aunque en la práctica con un éxito escaso, además de que su crueldad era rechazada unánimemente (con algunas excepciones). En Europa, coincidiendo con la onda epidémica de rabia vulpina que produjo miles de casos desde el final de la IIª Guerra Mundial, se sacrificaron miles de zorros en un intento de controlar la enfermedad, pero en el mejor de los casos la despoblación solo consiguió una disminución transitoria de la prevalencia de la rabia, además de que el procedimiento estaba abocado al fracaso toda vez que el número de animales que podían capturarse era siempre más bien escaso.

Por esta razón ya desde los años 60 las autoridades sanitarias internacionales se plantearon con firmeza explorar otras estrategias. El Comité de Expertos en Rabia de la OMS de 1966 convocó a los científicos para lograr un procedimiento de vacunación dirigido a los animales salvajes, con particular atención a la vacunación oral.

La lucha biológica por vacunación en el caso de los animales salvajes, sufrió un avance espectacular cuando Baer *et al.* (1971)¹⁷⁶ probaron con éxito, por primera vez, el uso de vacunas orales utilizando las cepas atenuadas Flury LEP y HEP. Años después también se demostró que era posible inmunizar mapaches y mofetas, en Canadá, mediante la inyección de vacunas inactivadas en animales capturados mediante trampas¹⁷⁷.

El camino recorrido en estos años ha sido enormemente provechoso. Utilizando la cepa SAD-Berna, derivada de la cepa ERA, se produjeron varios tipos de vacunas orales contra la rabia a base de virus vivos atenuados o modificados, para uso en cebos destinados a animales salvajes vectores, reconocidos en el mantenimiento y difusión de la rabia entre la fauna salvaje¹⁷⁸. Este tipo de vacunas se utilizaron extensamente en Europa desde 1977 y en Canadá desde 1989, con gran éxito en ambos casos^{179, 180}. El primer ensayo de campo, utilizando cebos que contenían vacunas orales se llevó a cabo en Suiza en 1977¹⁸¹ y en el año siguiente, Steck *et al* (1982) intentaron detener el avance de la ola epidémica en el Valle del Ródano utilizando como cebo cabezas de pollo que contenían como vacuna la cepa SAD-Berna, con tanto éxito que en 1985 la enfermedad estaba ya bajo control. En Alemania, los programas de control de la rabia vulpina con vacunas orales en cebos se iniciaron en 1983, igualmente con gran éxito, hasta el punto de que solo en 4 años, en 1987, se había logrado la práctica extinción de la



rabia de grandes regiones de Alemania Occidental¹⁸² y en los siguientes diez años, desde mitad de los 80 hasta los años 90 otros países europeos incorporaron la misma estrategia utilizando vacunas orales a base de la cepa SAD-B19 en Austria, Bélgica, Checoslovaquia, Alemania del Este, Francia, Italia, Hungría, Luxemburgo, Holanda y Eslovenia^{183, 184}. Con este mismo tipo de vacunas Finlandia llevó a cabo programas de control frente a los perros mapache en 1988.

Debe señalarse, como ya indicamos antes, que este tipo de virus atenuados mantienen algún grado de virulencia residual para los roedores salvajes¹⁸⁵ y otras especies, lo que dio lugar, por ejemplo, a respuestas inmunes inconvenientes en cachorros de zorro de menos de 8 semanas nacidos de zorras vacunadas con SAD-B19, proporcionando protección insuficiente frente a la rabia, lo que propició el interés por la búsqueda de vacunas más atenuadas y, sobre todo, seguras. Desde comienzos de los años 90, en 1991, la cepa SAD fue sustituida por la cepa SAG-1 en los programas de control de la rabia en Suiza y en Francia. Después se utilizó también la cepa SAG-2 (*SAD-Avirulent-Gif*)¹⁸⁶, un mutante doble derivado de la cepa SAD-Berna después de dos fases de selección sucesivas utilizando anticuerpos monoclonales anti-glicoproteína. Esta cepa es avirulenta después de la inoculación intracerebral en ratones inmunocompetentes y le protege frente al desafío con el virus de referencia (CVS). La cepa SAG-2 se distribuye en cabezas de pollo y se ha utilizado también en el control por vacunación en perros asilvestrados en África¹⁸⁷.

Los virus vacunales recombinantes que expresan proteína G también demostraron su eficacia en el control de la rabia vulpina, siendo utilizados en los programas de control en Francia y Bélgica desde 1989¹⁸⁸. Se ha utilizado un recombinante de virus *vaccinia* que expresa el gen de la glicoproteína G, desarrollado por inserción de cDNA del gen de la glicoproteína de la cepa ERA en el gen de la timidin quinasa de la cepa Copenhaguen del virus *vaccinia* (ver antes). En la primera mitad de los años ochenta se estudió en Francia y en los EE.UU., la conveniencia de esta vacuna para su uso en el control de la fauna salvaje frente a la rabia^{189, 190}, incluyendo su posible uso administrada en cebos orales, posibilidad de fallos vacunales en la protección frente al desafío con virus salvaje, desarrollo de rabia por parte de especies no diana que pudieran consumir los cebos, etc. con resultados favorables, de tal modo que la vacuna se autorizó también en los Estados Unidos para prevenir la difusión de la rabia en mapaches (Raboral V-RG™) y



después en coyotes, como ya comentamos, igual que se ha utilizado también en Canadá para el control de la rabia en el zorro.

Como quiera que sea, las vacunas orales, principalmente utilizadas en zorros y perros mapache, han reducido hasta la práctica eliminación, los casos de rabia salvaje en Europa, aunque ocasionalmente se han producido reinfecciones en Francia, Bélgica y Alemania como consecuencia de la imposibilidad de aislamiento, la contaminación cruzada entre estos países, el incremento de las poblaciones de zorros y las restricciones presupuestarias, por lo que las campañas tuvieron que reiniciarse en 2005 y 2006, estando bajo control en la actualidad. En otros países, sin embargo, como ocurre en Lituania, Latvia, Estonia, Polonia y Belarus, como consecuencia del incremento de las poblaciones de zorros, los casos de rabia se han incrementado, razón por la que las estrategias de control han tenido que rediseñarse buscando mayor eficacia en los resultados¹⁹¹ (ver antes).

En 2012 se describieron en Europa un total de 2.511 casos de rabia vulpina, que suponen el 41,4% del total, sin duda la cifra más baja de los últimos años, que tomada sobre la referencia de 1987, año en que se describieron 12.461 casos (el 74,7% del total), supone un descenso del 79,8%. En la actualidad, el mayor número de casos (>50) se concentran en Rusia, Ucrania, Rumanía, Belarus, Polonia y Croacia y cantidades muy inferiores en otros países, destacando el caso de Italia que sufrió un rebrote importante en los años pasados, alcanzando en 2010 los 172 casos.

6.1.8. Protección, por vacunación, en los animales

En atención a la importancia de la protección conferida por las vacunas, la OIE señala (por analogía a lo establecido por la OMS en el caso del hombre) la necesidad de un umbral de protección en el título de anticuerpos (determinado por una prueba de neutralización *in vitro* de Ac fluorescentes), no inferior a 0,5 UI/ml de suero, en los animales. Tal valor se considera la referencia en la normativa internacional en relación con los desplazamientos no comerciales (en la UE para perros, gatos y hurones, en el Reglamento CE 998/2003, de 26 de mayo de 2003).

La eficacia de la vacunación, depende de factores como el tipo de vacuna, el número de vacunaciones, la raza y tamaño del animal, la edad de vacunación y la distancia en días desde la fecha de vacunación a la toma de muestras. En un estudio recientemente llevado a cabo en Suecia que incluyó casi 7.000 muestras de animales de diferentes edades



y razas, pudo comprobarse que las razas de perros de gran tamaño presentaban un riesgo mayor de proporcionar títulos de anticuerpos inferiores a 0,5 UI/ml, aunque si se vacunaban 2 veces, el riesgo se reducía considerablemente, siendo mayor el riesgo, en cualquier caso, en animales de edad inferior a 6 meses o superior a 5 años, recomendándose por ello la revacunación¹⁹².

En los perros, respecto del número de vacunaciones, se considera relacionado tanto con la edad (siempre mejor a partir de los 6 meses y nunca inferior a los 3) como con el intervalo de muestreo, coincidiendo todos los estudios en que la aplicación de dos vacunaciones incrementa siempre el número animales (en este caso perros), que alcanzan el valor umbral mínimo, establecido. Además de ello, con carácter general, como es de esperar, a medida que aumentan las revacunaciones, los títulos son más elevados, en particular comparados con animales vacunados solo una vez, mientras que en animales primovacunados existe un porcentaje de animales que no alcanzan el valor umbral crítico. Este valor se incrementa a medida que aumenta el tiempo entre la vacunación y la toma de muestras³, llegando a cuantificarse el riesgo de fallo vacunal (título de Ac inferior al mínimo exigido) en 6 veces superior en el caso de perros vacunados una sola vez, respecto de los revacunados varias veces¹⁹⁴. Estos datos aconsejan que si se trata de primovacunación, es preferible administrar 2 dosis de vacuna separadas entre 3 y 4 semanas¹⁹⁵. En lo que se refiere a la relación entre edad y número de vacunaciones, después de una revacunación anual, los animales quedan perfectamente protegidos, incluso en el caso de razas de gran tamaño.

Habida cuenta de la regulación internacional en lo que se refiere al traslado de animales con fines no comerciales, parece que tanto la elección de la vacuna como el momento de llevar a cabo la extracción de sangre para comprobar la respuesta inmune mediante las determinaciones serológicas pertinentes, son factores críticos para lograr un resultado adecuado después de la vacunación¹⁹⁶

Si se trata de gatos, los fallos de eficacia postvacunal son muy inferiores, incluso ausentes en animales vacunados al menos 2 veces (Jakel *et al.*, 2008), sin diferencias significativas en animales vacunados varias veces.

6.1.9. Control de la rabia en quirópteros

Como hemos expresado en otros capítulos, los quirópteros, murciéla-



gos, por una u otra razón se han convertido en el epicentro de la rabia y sus formas de expresión a través de los nuevos tipos de *Lyssavirus* causantes de encefalitis indiferenciables de aquella. Hasta la fecha, además de lo que corresponde al tipo 1 (serotipo-genotipo), el virus de la rabia clásica, cuyos vectores incluyen murciélagos hematófagos, se han acreditado casos humanos, la mayoría de ellos letales, a partir del genotipo 3 (virus Mokola), genotipo 4 (virus Duvenhague), genotipo 5 (EBL-1), genotipo 5 (EBL-2), genotipo 7 (ABL) y genotipo 10 (virus Irkut).

Los murciélagos hematófagos o vampiros, como hemos señalado, se conocen como vectores de la rabia al hombre y otras especies desde hace muchos años. Se ha descrito que los primeros colonizadores americanos, como Fernández Oviedo, durante la conquista de Panamá ya sugerían la posibilidad de casos de rabia humana en los que podrían implicarse mordeduras de murciélagos vampiros, hecho que coincide también con algunas expresiones en guaraní que podrían traducirse como '*anca oscilante o vacilante*', referidas a la rabia paralítica (Rodríguez Ferri, 1987). El primer brote documentado de rabia transmitida por murciélagos en el continente americano tuvo lugar en la isla de Trinidad en 1927, confirmado en 1931, en el que se produjeron 55 fallecimientos humanos en un periodo de 7 años (1929-35)¹⁹⁷ y el segundo se produjo en México en 1951¹⁹⁸. Algunos años antes, **Carini y Haupt et al** (1911 y 1921, respectivamente) demostraron la presencia de corpúsculos de Negri en el cerebro de murciélagos, reproduciendo después un cuadro de rabia en diferentes especies de animales de experimentación y Queiroz Lima y Torres reprodujeron después la enfermedad en perros (Rodríguez Ferri, 1987).

En cualquier caso es preciso diferenciar entre murciélagos hematófagos y otros tipos de murciélagos (insectívoros y frugívoros). En la actualidad, la rabia de quirópteros vampiros está extendida por todo el continente americano, particularmente por América Latina, pero también en algunos Estados de los EE.UU. donde se ha convertido en la fuente principal de casos humanos (por lo general escasos), como sucedió en Wisconsin y en Louisiana en 2010 y en Michigan, Indiana y Texas en 2009. En Sudamérica, sin embargo, el número de casos humanos como consecuencia de la exposición a murciélagos hematófagos (principalmente *Desmodus rotundus*) es importante, alcanzando las cotas más altas de los últimos años en 2004 (46 casos) y 2005 (55 casos), la mayoría de ellos en la región del Amazonas de Perú y Brasil,



además de algunas remotas localidades de Colombia, Ecuador y Bolivia¹⁹⁹, superando incluso en estos años el número de casos de rabia humana transmitida por perros. En 2005, se contabilizaron también 5 casos por agresión debida a murciélagos en México, en este caso no hematófagos, igual que ha sucedido también con alguno de los últimos casos norteamericanos.

Los casos debidos a murciélagos no hematófagos comenzaron a contabilizarse por parte del Servicio de Vigilancia de la Rabia en América Latina en 1996; en la década 1996-06, se recogieron 196 casos humanos de los que el 73% (146 casos) correspondieron a murciélagos vampiros y 16 (el 8%) a murciélagos no hematófagos (en Argentina, Chile, México y Perú). Como ya hemos señalado, la mayor parte de los casos por murciélagos hematófagos se producen en Brasil, México, Colombia y Perú. Por su parte, en los EE.UU., los murciélagos insectívoros también desempeñan un importante papel como vectores y transmisores de rabia o de encefalitis por *Lyssavirus*, semejante a la rabia; por ejemplo, entre 1980 y 2002, 22 de 36 casos de rabia humana contabilizados en aquél país, se asociaron a murciélagos no hematófagos y, aunque *Eptesicus* sp y *Myotis* sp fueron las especies más comunes asociadas con la enfermedad, también se asociaron con la misma, en importante número el murciélago de pelos plateados, *Lasionycteris noctivagans*²⁰⁰.

En Europa, sin embargo, los casos de rabia en murciélagos han sido hasta la fecha, en su totalidad, de murciélagos insectívoros, cuando se ha implicado EBL-1, principalmente por *Eptesicus serotinus*, mientras que cuando estuvo implicado EBL-2, las especies comúnmente implicadas han sido *Myotis daubentoni* y *M. dascyneme*.

Las primeras descripciones de rabia en murciélagos en Europa datan de 1954, año en el que se describió un primer caso en Alemania (en Hamburgo) y 3 en la antigua Yugoslavia, en la que según Kuzmin y Rupprecht (2007)²⁰¹ pudo identificarse la especie de murciélago implicada (*Nyctalus noctula*), no así en el caso descrito en Alemania. Entre 1954 y 1976 se describieron 11 casos más, 4 adicionales en Alemania (en Jena, Hamburgo y Berlín) y 1 en cada uno de Turquía, Ucrania y Polonia.

Entre 1977 y 2004, se describieron 725 casos de rabia en quirópteros en Europa, la mayoría en Dinamarca, seguido de Holanda, Alemania y Polonia mientras que en Francia o en España se han descrito unos pocos casos (ver antes) y todavía menos en Suiza, Eslovaquia, la República Checa, Hungría, Ucrania y Rusia. Los casos por EBL-1 se han descrito



prácticamente en toda Europa mientras que los casos por EBL-2 han estado más limitados a Holanda, Reino Unido y Suiza. Ambos tipos de virus causan rabia o una enfermedad semejante a ella en murciélagos y se han implicado en casos de salto de especie en diferentes hospedadores, incluyendo martas y ovejas, como ya hemos referido en otro lugar. Por EBL-1 se ha descrito un caso humano y 2 fallecimientos debidos a EBL-2, razón por lo que ha merecido la calificación de zoonosis emergente

Control. El control de la rabia en estos mamíferos alados resulta complejo, principalmente por su declaración de especie protegida por la mayoría de los gobiernos del mundo, incluyendo la UE²⁰² y España²⁰³, en el caso de los murciélagos insectívoros, además de que la eliminación sistemática de los murciélagos hematófagos, sería imposible en la práctica, como ya se ha demostrado en planes de control utilizando anticoagulantes aplicados en la espalda de murciélagos vectores que después sirven como elementos dispersantes del producto dentro de la colonia, con el resultado de eliminar entre 10 y 20 murciélagos por murciélago vector^{204, 205} además de que sería inevitable no afectar a los primeros (los murciélagos insectívoros).

Por otra parte, la proporción de murciélagos infectados que muestran síntomas de la enfermedad depende de la especie de murciélago afectado, además del genotipo de virus de la rabia implicado. El diagnóstico clínico en estos animales puede basarse en la presencia de signos que son semejantes a los encontrados en todas las especies de murciélagos, con independencia del serotipo/genotipo que pueda estar implicado. Los signos principales incluyen alteraciones en los reflejos nerviosos, pérdida de apetito, temblores y parálisis, además de postración. En los murciélagos hematófagos la aparición de síntomas se sucede entre 24 y 96 h antes de la muerte. El comportamiento agresivo, típico de los vampiros, es muy raro en los animales infectados experimentalmente, excepto si se utiliza la inoculación intracerebral, aunque también se ha descrito por otras vías.

En el caso de Europa, desde hace años se han puesto en práctica programas de control **basados en la vigilancia sistemática**. Por ejemplo, en Alemania, en muchos de sus Estados Federales, se recogen de forma sistemática muestras de murciélagos que son remitidas para análisis en el Laboratorio de Referencia de la OIE y Centro Colaborador de la OMS en Wusterhausen (Brandenburg). Según se ha descrito²⁰⁶, en los últimos 20 años se ha puesto en práctica un plan sistemático

de recogida de murciélagos para la vigilancia, siendo los Estados del Norte de Alemania (Sajonia, Baja Sajonia y Schleswig-Holstein) los que han proporcionado las cifras más altas (entre 110 y 130 muestras en total); entre 1985 y 2005 se estudiaron 843 muestras de murciélagos para investigar la presencia de *Lyssavirus* y de ellos, 181 (el 22,5%) resultaron positivos, que supone una media de 9 murciélagos positivos a rabia por año. Desde 1954, en Alemania, se han contabilizado 187 casos positivos de rabia en murciélagos, de los que se ha podido identificar la especie en 57 casos (el 30,4%) resultando *Eptesicus serotinus* la especie más común (en el 92,5% de los casos) y de forma puntual *Myotis myotis* (el murciélago de orejas de ratón), *M. daubentoni* (el murciélago de Daubenton), *Pipistrellus pipistrellus*, *Nyctalus noctula* y *Pipistrellus nathusii*. La caracterización de los virus aislados, cuando se produce, se realiza mediante un panel de diez anticuerpos monoclonales anti-nucleocápsida y hasta la fecha todos han pertenecido al genotipo 5 (EBL-1).

En cualquier caso, en Alemania, como en otros países de la UE, la vigilancia pasiva se ve gravemente obstaculizada como resultado de la Directiva del Consejo 92/43/EEC sobre la conservación de los hábitats y la flora y fauna salvaje, así como por otras legislaciones particulares de cada país que consideran a los murciélagos como especies altamente protegidas, restringiendo su recogida, manipulación y remisión para estudios de rabia, reduciéndose en la práctica a recogidas limitadas y casuales que hacen que el número de casos positivos no dependa solo de la incidencia actual de la rabia en murciélagos, sino también de la participación de los conservacionistas locales y del número de animales remitidos para análisis.

En España se da carácter oficial a la consideración de que *'el número de especies de quirópteros españoles infectados es relativamente elevado, por lo que todas las especies de murciélagos son potencialmente vectores de Lyssavirus, aunque la mayoría de los casos de exposición a humanos se centra en unas pocas especies'*²⁰⁷. En cualquier caso se ha señalado que hasta el 7,8% de las muestras procedentes de colonias de murciélagos investigadas serológicamente para la presencia de anticuerpos Anti-EBL-1 han dado positivas y que en algunas colonias la prevalencia ha llegado a alcanzar valores de entre el 20,8 y el 22,7% con algunas peculiaridades que se refieren al aumento de la prevalencia de algunas colonias que pasaron del 3,3% en 1995 al 59,3% en 1996 descendiendo nuevamente al 10% en 1999²⁰⁸.



El Plan de Contingencia para el Control de la Rabia en Animales Domésticos, de los Ministerios de Agricultura, Sanidad y Economía y Competitividad cuando se refiere al reconocimiento temprano de un caso de rabia, señala que *'en el caso de animales distintos a perros, cuyos detalles de la evolución clínica de la rabia no se conocen bien y no se puede establecer un periodo de observación, se recomienda la eutanasia, directamente, con toma de muestras para su envío al laboratorio (el de la Comunidad Autónoma o el Laboratorio Nacional de Referencia)'*. En la Encuesta Epidemiológica para Animales Sospechosos, a que se refiere el reconocimiento temprano de casos (un caso) de rabia, en el punto que hace referencia al 'animal sospechoso' se incluyen (entre otros) a los murciélagos y en las *'Normas para el envío de muestras al Laboratorio de Rabia del Centro Nacional de Microbiología'* se refiere al envío, en este caso, de los cadáveres enteros de los animales. Debe tenerse presente que en el caso de los murciélagos, los infectados, habitualmente se encuentran fuera de su refugio habitual y no es extraño que presente rasgos de parálisis e incluso actitudes agresivas, sin descartar que algunas especies no presenten síntomas (verdaderos reservorios). En cualquier caso debe considerarse que para los murciélagos, un comportamiento anormal puede ser volar durante el día, caminar sobre el suelo o chocar contra los objetos.

Actuaciones pasivas. Habida cuenta, como señalamos antes, de la consideración de que, simplemente por precaución, todos los murciélagos deben considerarse posibles vectores de *Lyssavirus* semejantes al virus rábico, se recomienda la práctica de una serie de medidas destinadas a evitar el contagio por parte de los posibles manipuladores. A este respecto, por ejemplo, se debe evitar todo contacto con murciélagos, sin excepción a la regla, muy especialmente en el caso de niños, incluyendo la posible tentación de su consideración como mascotas. Si se descubre un murciélago muerto, por ejemplo, lo mejor es no tocarlo y si se sospecha que puede estar enfermo o lesionado, se debe poner en conocimiento de los sanitarios de la zona.

En caso necesario, las posibles manipulaciones deben realizarse con protección suficiente en las manos para evitar cualquier tipo de agresión y en caso de mordedura (grupos de riesgo) debe notificarse al Centro de Salud, poniendo a su disposición (si es posible) el animal agresor para su estudio y el individuo mordido someterse al pertinente tratamiento post-exposición (ver después).

Actuaciones directas o activas sobre las colonias de murciélagos in-



fectadas. Como norma de cumplimiento elemental, se debe evitar el acceso de personal libre a cuevas naturales u otro tipo de lugares donde se hayan detectado colonias infectadas y, en cualquier caso, solamente cuando la colonia esté presente. No se debe intervenir impidiendo la entrada de los animales pues ello puede originar la dispersión de los individuos y la consiguiente propagación del problema. Lo más oportuno sería, por personal competente y adiestrado, llevar a cabo un seguimiento de las colonias infectadas procurando evitar contactos con personas o animales y una vez que haya finalizado el periodo de ocupación estacional se procede a desinfectar el refugio y bloquear los accesos de entrada.

Uso de anticoagulantes. El procedimiento, que se comenzó a utilizar en Sudamérica desde comienzos de los años 70, consiste en capturar una serie de murciélagos aplicando a su cuerpo un anticoagulante y después se liberan los animales tratados en la colonia contaminando a otros congéneres durante el aseo mutuo²⁰⁹. Otra estrategia consiste en aplicar anticoagulantes destinados a los vampiros, justo en las lesiones producidas por ellos en los animales domésticos, habida cuenta de que estos animales suelen reutilizar como fuente de sangre las heridas producidas en agresiones anteriores. Incluso se han utilizado los anticoagulantes administrados de forma sistémica al ganado bovino en concentraciones inocuas para los animales hospedadores pero letales para los murciélagos²¹⁰. Este procedimiento ha probado su utilidad en estrategias a largo plazo para el control de los vampiros aunque hay que reconocer que el uso reiterado bajo esta modalidad posee un efecto acumulativo que también produce efectos negativos sobre los depredadores y los carroñeros tanto de forma directa como indirectamente a través de la contaminación del medio ambiente.

Inmunización de murciélagos contra la rabia. Hace años que en el control de los murciélagos hematófagos se propuso una estrategia alternativa en base a la vacunación²¹¹, que podría respetar el papel ecológico de los murciélagos²¹². En un estudio realizado en 2002 (Aguilar Setien *et al.*, 2002)²¹³ compararon 4 vías de inoculación (intramuscular, escarificación, oral y por aerosol) para la inmunización frente a la rabia utilizando una vacuna recombinante de virus *vaccinia* que expresa proteína G (V-RG) ya utilizada en campañas de control de la rabia en animales salvajes en Europa y Norteamérica (zorros, coyotes y mapaches) mediante el uso de cebos, demostrando seroconversión por vía intramuscular y escarificación, pero no mediante aerosol o por vía oral,



aunque todos sobrevivieron al desafío por las tres vías citadas mientras que uno de los inmunizados mediante aerosol murió; en cualquier caso, poniendo de manifiesto la posible utilidad de la vacuna.

En un estudio similar²¹⁴, llevado a cabo en Brasil, se utilizó el mismo tipo de vacuna aplicado en un vehículo neutro (una pasta de vaselina) dispersándolo sobre la espalda de uno o dos murciélagos vectores, que luego fueron reintroducidos en la colonia. La tasa de supervivencia después del desafío osciló entre el 43 y el 74%, demostrando que el procedimiento podría ser útil en la prevención, habida cuenta que un importante número de animales que no recibieron directamente la vacuna, si que sobrevivieron a la infección. Estos mismos autores (Almeida *et al.*, 2008)²¹⁵ propusieron un nuevo método para concentrar la vacuna mediante ultrafiltración a través de una membrana de celulosa y después homogeneizada en una pasta de vaselina para su aplicación, como antes, sobre la espalda de los murciélagos vectores que después se reintroducían en la colonia aumentando de este modo la supervivencia al desafío intramuscular con una dosis de 10^5 MICLD₅₀ hasta valores de más del 71%, incluso del 100%, según el grupo de prueba.

6.2-Control de la rabia en el Hombre. Tratamientos post-exposición en el hombre.

El control de la rabia, en el hombre, está vinculado estrictamente a su relación con la enfermedad en los animales, terrestres (domésticos o salvajes) o aéreos. Como ya nos hemos referido repetidamente, si el principal vector es el perro y en menor medida otras especies como el gato, hurón, zorro, mapache o perro mapache, cualquier programa de control en la especie humana debe atender mediante una serie de normas o conductas a ordenar sus relaciones con aquellos, muy en particular en lo que se refiere a los niños (la franja más vulnerable), pero no solo y en especial a los animales de compañía o mascotas que de forma ocasional pudieran infectarse. Especial mención, en Europa, pero también en otros países y regiones industrializadas poseen los murciélagos a los que, como hemos podido explicar, se vinculan la gran mayoría de los genotipos de *Lyssavirus*, desde el virus de la rabia clásico a los nuevos serotipos y genotipos que se han ido describiendo en las últimas décadas. No debemos olvidar, tampoco, el personal técnico y científicos vinculados por razones laborales al uso y manejo de muestras peligrosas, procedentes de animales infectados o al cultivo o preparados con fines diagnósticos o vacunales, manejando productos o reactivos que por su concentración pueden representar graves ries-



gos. Nos referiremos a ello.

Como norma general de respeto universal, cualquier manifestación agresiva, con mordedura o sin ella por parte de una especie animal, muy especialmente si procede de algunas consideradas vectores tradicionales, a las que nos hemos referido en el párrafo anterior, debe ser evaluada y puesta en conocimiento de los responsables médicos, quienes decidirán a propósito de las medidas que correspondan, más allá del incuestionable tratamiento de las heridas producidas por la mordedura de los animales objeto de sospecha. En este sentido y respecto de los animales de compañía en general, parece oportuno recordar:

1-no molestar a los animales, bajo ninguna fórmula y, de modo muy particular en aquellos de temperamento agresivo

2-excepto en el caso de animales conocidos y en presencia de sus dueños, evitar cualquier tipo de provocación que pudiera resultar en una agresión por parte de aquellos. Especial cuidado en el caso de razas clasificadas como animales peligrosos, que deben estar reclusos o si hacen acto de presencia en lugares públicos, deben ir provistos de correa y bozal

3-en el caso de animales con síntomas de sospecha de rabia, corresponde a las autoridades su captura y aislamiento, sometiéndole a vigilancia bajo control veterinario. Del resultado de esta vigilancia dependerán un tipo u otro de actuaciones

4-si por su agresividad y peligro, la captura del animal supone un riesgo no superable y es necesario el sacrificio a cargo de las autoridades, se procederá a la toma de muestras para su análisis y confirmación o no de infección rábica. A tal efecto, en el Plan de Contingencia de la Rabia, se dan instrucciones precisas del cómo y el lugar correspondiente al análisis en el Laboratorio Nacional de Referencia o en Laboratorios Autorizados, dependientes de las Comunidades Autónomas.

5-si en ausencia de signos de sospecha y sin provocación manifiesta, se produce la agresión por mordedura de un animal, es igualmente pertinente su captura, aislamiento y observación durante un periodo razonable (10 a 14 días) con el fin de observar la posible evolución clínica del animal.

6-es importante, en cualquier caso, conocer la identificación del animal y si ha sido sometido a vacunación antirrábica.

7-aunque nos hemos referido en el apartado 6.1.8 (actuaciones pasi-



vas) sobre el comportamiento en relación con el hallazgo de murciélagos, debe insistirse en las advertencias que se refieren a no tocar o recoger murciélagos que puedan encontrarse en los lugares públicos, casas, naves, etc, ni de capturar los que vuelen por el día. Para el personal que por razones laborales (naturalistas, biólogos, científicos y técnicos) han de estar en contacto con estos animales la recomendación más oportuna es la profilaxis por vacunación y la certeza de su protección mediante la realización de perfiles serológicos relativos al título de anticuerpos neutralizantes.

6.2.1. Tratamiento primario de las heridas por mordedura

Lo mismo que sucede en relación con las prácticas de lavado previo a la desinfección en lo que a eficacia de ésta última, podría aplicarse respecto del tratamiento primario de las heridas, que incluye ambas prácticas (lavado y desinfección de la misma).

El protocolo de actuaciones ante mordeduras del Plan de Contingencia de la Rabia de los Ministerios competentes en la materia, en España, alude a la eficacia de la medida, que debe realizarse tan pronto como sea posible y que reduce marcadamente el riesgo de infección al eliminar o inactivar el virus inoculado, tanto físicamente (acción de limpieza) como químicamente (acción desinfectante). Señala el protocolo los siguientes puntos, que reproducimos:

1-El tratamiento local de la herida debe abarcar todas las zonas lesionadas.

2-Debe procederse al lavado exhaustivo de la herida con agua abundante y limpieza con jabón durante al menos 5 minutos, retirando todo tipo de cuerpos extraños y zonas desvitalizadas.

3-Aclarado de la herida con agua abundante para eliminar todos los restos particulados y de jabón.

4- Aplicación de un desinfectante mediante irrigación. Se recomienda alcohol etílico al 40-70% o la tintura o solución acuosa yodada (al 10%).

5-No se recomienda suturar la herida, salvo que sea inevitable (razones estéticas o de conservación de tejidos), en cuyo caso las suturas deberán dejarse flojas para que no interfieran el drenaje. Siempre debe valorarse la posibilidad, en función del riesgo, de llevar a cabo una infiltración de inmunoglobulina antirrábica humana.

6-Si la herida es susceptible de contaminación, puede procederse a la



administración local y/o general de antibióticos de amplio espectro.

6.2.2. Vacunas e inmunoglobulinas disponibles.

Las medidas para la prevención de la rabia en el hombre, particularmente el denominado tratamiento post-exposición, han sido objeto de rigurosos trabajos por parte de técnicos e investigadores de todos los países y la OMS se ha pronunciado repetidamente al respecto. El tratamiento post-exposición, una vez decidido en función de los datos de riesgo disponibles (animales mordedores con signos clínicos compatibles con rabia, no vacunados, localización de las heridas próximas a centros nerviosos, en la cabeza, etc., sacrificio o muerte del animal, confirmación de diagnóstico, consideraciones epidemiológicas, etc.) debe comenzar lo antes posible después de la exposición. A este respecto, el Plan de Contención de la Rabia (Protocolo de actuación ante mordeduras o agresiones de animales) se refiere al tipo de contacto o exposición, que condiciona la necesidad o no de iniciar un tratamiento post-exposición.

En el caso de una exposición o contacto de tipo I (tocar o alimentar animales, sufrir lamidos sobre la piel íntegra), no es necesaria la profilaxis. Si el contacto o exposición corresponde a un tipo II (mordeduras en piel desnuda, arañazos o abrasiones que no sangran), se recomienda la vacunación inmediata y, si se trata de una exposición o contacto de tipo III (mordeduras o arañazos únicos o múltiples que perforan la dermis, existe contaminación de las mucosas con saliva por lamidos o lamidos de lesiones cutáneas o exposición a murciélagos), se propone vacunación inmediata y administración de inmunoglobulina humana.

6.2.2.1. Vacunas y vacunación en el hombre.

Como nos hemos referido más atrás, desde las primeras vacunas disponibles en los trabajos originales de Pasteur, el objetivo fue siempre proteger la vida humana, en riesgo crítico después de la mordedura de animales rabiosos.

Desde el primer momento, las mejoras sobre la vacuna de Pasteur fueron constantes. Como hemos relatado antes, la primera innovación importante tuvo lugar en 1911, cuando Sir David Semple desarrolló en la India una vacuna contra la rabia a partir del cerebro de ovejas adultas inoculadas con virus rábico, inactivando con fenol, aunque al tiempo que la inactivación se alteraban con el tratamiento algunas de las estructuras protéicas principales reduciendo de este modo la antigeni-



cidad y potencia de la vacuna. Más tarde, como ya vimos, Fuenzalida y Palacios, desarrollaron un nuevo tipo de vacuna a partir del cerebro de ratones lactantes, en un intento de reducir los efectos neurológicos indeseables asociados a la mielina, presente en el tejido de animales adultos, como ocurría con la vacuna tipo Semple, consiguiéndolo solo en parte²¹⁶.

Los avances representados por la adaptación del virus rábico al embrión de pollo y, particularmente al crecimiento en cultivo de tejidos y de células, fueron aprovechados pronto para la producción de antígeno con fines vacunales que, en la práctica ha sustituido casi por completo a los primeros, por recomendación de la OMS desde 1983²¹⁷, aunque todavía se sigan utilizando aquellos en buena parte de Asia y en Sudamérica y algunas zonas de África, especialmente en el caso de pacientes de escasos recursos. En una excelente revisión sobre el particular, Wu *et al.* (2011)²¹⁸ describen la evolución de las vacunas antirrábicas con destino al hombre, incluyendo la tecnología biotecnológica utilizada en la actualidad.

El desarrollo de vacunas inactivadas producidas a partir del cultivo en embrión de pollo cambió el pensamiento de los expertos en materia de Salud Pública, desde la opción única de los tratamientos postexposición en el hombre, hacia una estrategia más sistemática, dirigida a la fuente de infección principal, causante de la inmensa mayoría de los casos humanos, esto es la rabia canina. De este modo, las primeras campañas en masa de vacunación en el perro, en los años 40, no solo redujeron la incidencia de la rabia en estos animales, sino también y de forma espectacular, los casos humanos. Así pues, la OMS apoyó la vacunación pre-exposición en los perros como una estrategia para reducir los casos de rabia humana en países endémicos.

En los años 50 comenzaron a utilizarse sistemas de células de origen aviar, bajo los auspicios de la OMS en Malasia e Israel y en estos años, también, se produjo y utilizó en los animales, con buenos resultados, una vacuna de células de embrión de pato inactivada con b-propiolactona. En este periodo, las vacunas producidas en cultivo celular fueron recomendadas con precaución para uso en el hombre y así se mantuvieron hasta los años 80, cuando surgieron las primeras vacunas producidas en células diploides humanas a las que se había conseguido adaptar el virus veinte años antes[®].

Las vacunas de células diploides humanas se desarrollaron en el Institu-



to Wistar y representan la segunda generación de vacunas antirrábicas producidas en la línea Wi-38 de células diploides humanas utilizando la cepa Pitman Moore (PM) del virus de la rabia clásica. Los resultados obtenidos en los estudios clínicos pusieron de manifiesto que inducían títulos altos de virus y que causaban menos reacciones adversas que las descritas para la vacuna de células de pato.

En 1973, el Comité de Expertos de la OMS recomendó que se probase la vacuna de células diploides humanas en unión de la inmunoglobulina antirrábica humana a fin de probar su eficacia en un ensayo de campo sobre humanos que habían sido mordidos por animales confirmados rabiosos, y tal oportunidad se presentó en 1976 sobre 45 personas que habían sido mordidas gravemente por lobos y perros con rabia en Irán, a los que se administraron ambos (vacuna e inmunoglobulina)⁹. Todos los pacientes sobrevivieron y otros ensayos posteriores confirmaron su eficacia, considerándose desde entonces la *'gold standard'* de las vacunas antirrábicas. Su seguridad fue mucho mejor que la de las vacunas hasta ese momento disponibles, hasta el punto que la OMS la consideró lo suficientemente segura para recomendarla en los planes de viajeros a zonas con riesgo de rabia. En cualquier caso, la vacuna de células diploides es cara de producir y ello implica cierta escasez en momentos de necesidad, hecho que se ha tratado de resolver reduciendo los esquemas de vacunación (ver después)⁹.

Sobre los cultivos de células primarias de origen aviar se desarrollaron dos tipos de vacunas inactivadas de **segunda generación**, la vacuna de células de embrión de pollo y la vacuna de células de embrión de pato, en ambos casos purificadas. La primera se produce utilizando células primarias de embrión de pollo, a partir de la cepa de virus Flury-LEP⁹ y se autorizó en Europa en 1984, y en EE.UU. en 1997 y desde 1985 se produce también en India, siendo una de las dos vacunas utilizadas a nivel mundial. La vacuna de células de embrión de pato se desarrolló y comercializó en Suiza y también se produce y comercializa en India. En los años ochenta se desarrolló en Francia una nueva vacuna, sobre cultivos de células vero, utilizando también la cepa PM⁹. Este tipo de vacunas, en la actualidad, se producen en cantidades importantes en India y China y la OMS ha publicado una lista de recomendaciones sobre buenas prácticas de producción e instalaciones con el propósito de velar por la mayor seguridad y eficacia del producto, otorgándoles la calificación de *'OMS Pre-cualificadas'*, en los que se incluyen las vacunas de células primarias de embrión de pollo (que se producen en



Alemania e India), las de células primarias de embrión de pato (producidas en India) y las de células vero, que se producen en Francia⁸.

Las vacunas orales recombinantes antirrábicas con destino a la prevención de la rabia animal, representan una **tercera generación** de vacunas frente a la rabia y, como hemos expuesto repetidamente, han desempeñado un papel crucial en el control de la rabia en animales salvajes, particularmente en el caso del zorro. La primera de estas vacunas (ver antes) se desarrolló incorporando el gen de la glicoproteína G del virus de la rabia en el virus *vaccinia* utilizado como vector de expresión (V-RG) y se aplicó en zorros y mapaches. Las vacunas orales recombinantes han representado una herramienta clave y decisiva en la prevención y control de la rabia salvaje en Europa y América. Con destino a los gatos, se ha desarrollado también una vacuna recombinante utilizando un *canarypoxvirus* (ver antes). Hasta la fecha, sin embargo, no se ha autorizado ninguna vacuna recombinante para su administración en el hombre, aunque nos referiremos a ellas, en profundidad, en el apartado de nuevas vacunas y experimentales (ver después).

6.2.2.2. Protocolos de Vacunación en el Hombre:

Es preciso reconocer que se dispone de una diversidad de propuestas de protocolos de vacunación frente a la rabia en el caso del hombre que incluyen los que corresponden a la vacunación pre-exposición, post-exposición, post-exposición para personas previamente vacunadas con vacunas de cultivos celulares, etc, en ocasiones complementados con la administración de inmunoglobulinas, si el riesgo de rabia lo aconseja. Todas estas alternativas están particularmente auspiciados por las organizaciones internacionales, como la OMS o la ACIP (*Advisory Committee on Immunization Practices*), y se resumen en la Tabla 5⁹.

Tales propuestas surgen, probablemente, por la necesidad de poner un cierto orden desde el principio de las vacunaciones frente a la rabia en el hombre, en particular porque las primeras vacunas de tejido nervioso, de escasa potencia inmunitaria, hacían necesario administrar varias dosis para conseguir una protección suficiente y, evidentemente, la propia idiosincrasia de la enfermedad, prácticamente un 100% letal, que obligaba a buscar una respuesta protectora que garantizase la supervivencia de las personas mordidas por un animal rabioso. Un argumento, no menos importante, en determinados países en desarrollo, es también el costo de las vacunas, que aumenta progresiva-



mente a medida que los protocolos propuestos aumentan el número de dosis necesarias para la protección.

De este modo, el primer régimen **post-exposición** utilizado en el caso de las vacunas de células diploides humanas incluía 6 dosis de vacuna administradas por vía intramuscular cada uno de los días 0, 3, 7, 14, 28 y 90[®]. Más tarde la dosis de éste último día fue abandonada eventualmente, imponiéndose un protocolo de 5 dosis, conocido como 'Protocolo de Essen' porque fue en esa ciudad alemana, en 1984, donde el Comité de Expertos en Rabia de la OMS le consideró el '*gold standard*' frente al que a partir de entonces se evaluaban las nuevas propuestas.

A finales de los años 80 se propuso un nuevo protocolo de vacunación por parte de Vodopjia *et al*[®] en Zagreb (Croacia), que fue aprobado por la OMS como un segundo protocolo, también de tipo intramuscular[®], se reconoce como protocolo '2-1-1' (o protocolo de Zagreb) pues requiere la administración de 2 dosis de vacuna el día 0, seguido de una dosis administrada cada uno de los días 7 y 21.

Con el propósito de rebajar el costo y sustituir la vacuna tipo Simple por las vacunas de cultivo celular, en los años 80 se iniciaron en Tailandia una serie de ensayos de campo para reducir los volúmenes que se administraban de vacuna, que dieron lugar al protocolo conocido como 'Thai Red Cross' (2-2-2-0-1-1) que requiere dos dosis de vacuna administradas en la parte superior del deltoides los días 0, 3, 7, 14 y una dosis que se administra cada uno de los días 28 y 90. El protocolo fue aprobado por la OMS en 1985, modificándose después (el día 90 los pacientes no acudían a vacunarse) reduciéndolo a dos dosis los días 0, 3, 7 y 28, que se sigue actualmente.

En relación con los individuos que han sido **vacunados antes** con vacunas de cultivo celular, existen 3 protocolos, uno de ellos mediante administración intramuscular y los dos restantes intradérmicos. El primero consiste en la administración de dos series de dosis, una de ellas cada uno de los días 0 y 3. El protocolo intradérmico incluye dos series de dosis, también, una cada uno de los días 0 y 3 y la segunda mediante la administración de 4 dosis intradérmicas el mismo día 0.

En relación con las **vacunaciones pre-exposición**, la recomendación de la OMS incluye la administración por vía intramuscular o subcutánea de una serie de tres dosis los días 0, y bien el 21 o el 28. Todavía, la ACIP ha propuesto un régimen nuevo en 2010, justificado en razones de tipo económico que incluye 4 dosis intramusculares distribuidas en



2 semanas (la propuesta es del CDC y elimina la dosis del día 28, quedando en 0, 3, 7 y 14) especialmente indicada para pacientes inmunocompetentes[®].

Tabla 5. *Protocolos de vacunación pre y post-exposición frente a la rabia, recomendados por la OMS y la ACIP*

Vacunación	Nº dosis	Vía	días
Vacunación pre-exposición			
1. Im	3	Im	0,7,21 ó 28
2. id	3	id	0,7,21 ó 28
Vacunación post-exposición			
1. Essen	5	Im	0,3,7,14,28
3. Zagreb	4	Im	0 (2 dosis),7,21(1 dosis)
4. Reducida 4 dosis (CDC)	4	Im	0,3,7,14
5. Modificada Thai Red Cross	8	Id	(2 dosis cada día) 0,3,7,28
Post-exposición, para personas que previamente haya sido vacunadas con una vacuna de cultivo celular			
6. Dos dosis im	2	Im	0,3
7. Dos dosis id	2	Id	0,3
8. Cuatro dosis id	4	id	0

Im: intramuscular; id: intradérmica

6.2.2.3. Las propuestas en el Plan de Contingencia para la Rabia en España.

La tabla de intervenciones en el caso de exposición a un animal sospechoso o confirmado de rabia, descritas en el Plan de Contingencia, se corresponde con la recomendación de la OMS. Las series vacunales se pueden interrumpir en el caso de confirmación de laboratorio que el animal está sano o, si se trata de perros o gatos, si después de 14 días de observación, el animal permanece sano (la OMS fija 10 días y el Plan de contingencia recomienda hasta 20 días). Las vacunas utilizadas en



España deben poseer una potencia mínima de 2,5 UI/ml y se consideran seguras e inmunógenas.

Tabla 6. Protocolo de vacunación en el Plan de Contingencia para la rabia

Vía y región de inoculación de la vacuna	Volumen de la dosis	Núm. de dosis	Esquema de inoculación (días de inoculación)
Intramuscular y deltoides	1ml	5	0,3,7,14, y 28 (sistema Essen)
Intramuscular abreviada (recomendada por ACIP), en deltoides	1ml	4	0,3,7 y 14
Intramuscular abreviada, en brazos y deltoides	1ml	4	0 (2 dosis),7 y 21 (sistema Zagreb)

En el caso que se trate de niños se recomienda, en lugar de inocular en deltoides, hacerlo en la región antero-lateral del muslo, pero nunca en los glúteos (debido a que el título de anticuerpos neutralizantes obtenidos, en este caso, son muy bajos). En el caso del sistema Zagreb, se recomienda la inoculación en el brazo derecho y otra en el izquierdo, en el día 0, mientras que el resto de dosis se administra en el deltoides

En pacientes inmunodeprimidos se recomienda hacer un control 15 días después de la administración de la última dosis, valorando la posibilidad de una dosis adicional.

Si se trata de una exposición a **murciélagos**, cualquiera que sea la especie, el protocolo de vacunación recomendado por el Ministerio de Sanidad incluye 3 dosis de vacuna los días 0, 7 y 28 (intramuscular en el deltoides o en la región antero-lateral del muslo, si se trata de niños).

Posibles dosis posteriores de mantenimiento dependen de la respuesta serológica. En grupos de riesgo se recomienda vigilancia serológica cada 6 meses (investigadores y empleados de laboratorios de diagnóstico, por ejemplo) o anual (manipuladores de murciélagos), según el caso; si el nivel de anticuerpos antirrábicos es <0,5 UI se debe administrar una dosis y nuevo control a los 15 días y si el nivel es >0,5 UI se recomienda realizar un control al año.



Debe tenerse presente, sin embargo, en el caso de exposiciones a murciélagos infectados, que la vacunas con destino al hombre elaboradas con el virus de la rabia clásico (genotipo 1) no ofrecen una protección adecuada en el caso del virus EBL-1 (genotipo 5); además de ello, las vacunas elaboradas con la cepa de virus PM (Pitman Moore) inducen una menor protección que las elaboradas con la cepa Pasteur Paris (PV)²³⁰.

Por otra parte también resulta de interés que solamente una pequeña proporción de los individuos vacunados con vacunas clásicas desarrollan una respuesta Th2 (ver antes) frente a EBL-1^{231, 232}.

6.2.2.4. Tratamientos antirrábicos mixtos (suero-vacunación) para casos especiales (tratamientos de inmunidad pasiva).

Los primeros tratamientos post-exposición en el caso de heridas por mordedura de animales rabiosos ya se produjeron en el siglo XIX, por Babes y Lepp²³³ y por Fermi, en los primeros años del siglo XX proporcionando evidencias de que el suero crudo antirrábico incrementaba el periodo de incubación de la rabia y contribuía a la supervivencia. Con el propósito de comprobar si una combinación de vacuna y suero antirrábico podría generar resultados similares en condiciones de campo, entre la población, el Comité de Expertos en Rabia de la OMS llevó a cabo una serie de estudios incluyendo varios casos espectaculares de pacientes mordidos por un lobo en Irán, en 1954, en los que la supervivencia de pacientes con mordeduras en la cabeza llegó al 92% cuando se administró conjuntamente suero y vacuna y de solo el 42% cuando se administró únicamente vacuna²³⁴.

En definitiva, puede resumirse que en casos de exposiciones graves al virus rábico, las vacunaciones post-exposición se combinan con el tratamiento con inmunoglobulina antirrábica (RIG) de origen humano (HRIG), pero como su disponibilidad es limitada y los planes para su sustitución con anticuerpos monoclonales están todavía en fase de desarrollo²³⁵, ocasionalmente se utiliza inmunoglobulina de origen equino (ERIG) en su forma natural (antisueros o inmunoglobulinas purificadas) o preparaciones de F(ab)2 obtenidas por digestión enzimática, que mantienen su capacidad de unión al antígeno, habiéndose desprendido de las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. Debe tenerse en cuenta, no obstante, que la administración de inmunoglobulinas de origen animal al ser humano, promueven el riesgo de producción de enfermedad del suero y reac-



ciones anafilácticas. Aunque las preparaciones de F(ab)2 se toleran mejor, se han relacionado con fallos vacunales, que pueden explicarse por la corta vida media de estos fragmentos.

La inmunoglobulina antirrábica (RIG) debe administrarse como parte del tratamiento primario post-exposición, particularmente en el caso de heridas en la cabeza, manos o mordeduras múltiples, con el propósito de neutralizar el virus en la herida. Este sistema proporciona protección durante un tiempo de una semana, en el que el paciente está desprotegido, mientras se está desarrollando la protección frente a la vacuna. Si se retrasa el tratamiento más de una semana, realmente ya no resulta adecuado e incluso puede ser contraproducente, neutralizando los antígenos vacunales. La dosis recomendada es de 20 UI/kg de peso corporal, si se trata de RIG de origen humano, doblándose (40 UI/kg de peso corporal) si se trata de RIG de origen equino. Para facilitar la administración (por infiltración profunda en la herida y alrededor de la misma) se recomienda el uso de analgesia y cuando las características de las heridas no lo permiten (por ejemplo en el caso de mordeduras en un dedo o en membranas mucosas) es pertinente administrar la inmunoglobulina en un sitio alejado del lugar donde se administra la vacuna, pero no en la región glútea y además, no debe sobrepasarse la dosis, pues podría verse afectada la respuesta inmune a la vacuna; en estos casos, es preferible (por ejemplo si se trata de un caso de mordeduras múltiples) diluir al doble o triple en solución salina para asegurar la infiltración de todas las heridas con la inmunoglobulina disponible²³⁶.

Como ya hemos señalado, cuando se administra suero equino o inmunoglobulinas de este origen, se corre el riesgo de reacciones anafilácticas o de enfermedad del suero. En una revisión de casos de esta naturaleza realizada por Suwansrinon *et al* (2007)²³⁷ se han ofrecido datos de un 0,73% de los pacientes tratados con inmunoglobulinas equinas y del 0,007% en los tratados con inmunoglobulinas.

En cualquier caso, la producción mundial de RIG es corta y por tanto lo es también el abastecimiento que por esta razón resulta caro, además de que se requiere un estricto control de la cadena de frío para el transporte y el almacenamiento, siendo por ello un problema de difícil solución, sino imposible, en la mayoría de las áreas rurales de África y Asia. Por esta razón se puede afirmar que RIG está disponible para un pequeño porcentaje de pacientes, en general, menos del 1% en los que está indicado, en los países en desarrollo y, con carácter global,



para el 2-5%²³⁸. La búsqueda de sustitutos es una necesidad, incluyendo el uso de anticuerpos monoclonales y otros.

Por otra parte debe tenerse presente también, que cuando se trata de aplicar tratamientos post-exposición en el hombre como consecuencia del posible contagio a partir de murciélagos portadores del genotipo 5 mediante la administración de suero hiperinmune, está más indicado el uso de globulina antirrábica ERIG (de caballo), que la correspondiente de origen humano (HRIC), porque la primera se prepara a partir de la cepa PV, mientras que la humana se prepara mediante la utilización de la cepa PM (McColl *et al.*, 2000). Además, es importante anotar también que el suero de los animales vacunados con recombinantes de *vaccinia*-RGMG o de *vaccinia*-MG manifiestan actividad neutralizada cruzada frente a LBV.

En nuestro país, los Ministerios de Sanidad y Agricultura, en el Plan de Contingencia frente a la Rabia, definen los supuestos, de acuerdo con las recomendaciones de la OMS, en los que procede tanto la administración de inmunoglobulina antirrábica, como un tratamiento de suero-vacunación (vacunación y administración de inmunoglobulinas). En la Tabla 7 se recogen estos extremos:

Tabla 7. *Recomendaciones particulares en el tratamiento post-exposición frente a la rabia*

Tipo de exposición o contacto	Estado de salud del animal	Tipo de tratamiento recomendado
Un animal, confirmado enfermo de rabia	No procede su consideración	Completo: vacuna e inmunoglobulinas
Un animal sospechoso, cualquiera que sea el motivo, sin confirmación de diagnóstico de rabia	Cualquiera que sea su estado	Tratamiento completo. Se diferencia según que el paciente esté o no vacunado previamente y, en cualquier caso, se puede interrumpir cuando se disponga de diagnóstico de laboratorio. Se exceptúan, también en el caso de los animales vacunados e identificados de acuerdo con el Reglamento CE 998/2003
Murciélagos	Cualquiera que sea su estado	Tratamiento completo, pudiendo interrumpirse si se confirma negativo en laboratorio
Perro y gato sin factores de riesgo (viajes, importación ilegal, etc)	Sano y vacunado	Ninguno, salvo que se produzcan cambios en el comportamiento del animal (debe someterse a observación)



Ídem anterior	No vacunado	Ninguno, salvo observación, con resultado positivo. Se exceptúan Ceuta y Melilla (proximidad a Marruecos, zonas de riesgo)
No se dispone del animal y no concurren circunstancias de riesgo o sospechosas de serlo	No procede	Ninguno, salvo que se produzcan cambios que aconsejen lo contrario
Cualquier tipo de animal	Sano	Ninguno, salvo cambios que aconsejen lo contrario o informe positivo del laboratorio

Cuando está indicada la administración de la inmunoglobulina (RIG), si es posible se inoculará en las primeras 24 horas, con un máximo de tiempo de 7 días con el fin de evitar posibles interferencias inmunitarias; junto con la primera dosis de vacuna antirrábica. Nunca se inoculará en la misma jeringuilla ni en la misma localización anatómica que la vacuna.

No se debe administrar a personas previamente vacunadas. La dosis recomendada es de 20 U.I./ Kg. infiltrando la mayor cantidad posible localmente alrededor de la herida, y el resto vía intramuscular en la región glútea, en dosis única. En el caso de utilizar la IgR optaremos por la pauta Essen o la pauta de ACIP.

6.2.2.5. Anticuerpos monoclonales y otros sistemas nuevos de inmunización pasiva

Wiktor y Koprowski en 1978²³⁹ fueron dos de los primeros investigadores en demostrar la utilidad *in vivo* de los anticuerpos monoclonales. La implantación subcutánea de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales protegía al ratón del desafío intracraneal. En 1989, Schumacher *et al.* administraron a ratones y hamsters un coctel de anticuerpos monoclonales específicos y demostraron que les protegían tanto en escenarios de tratamientos pre-exposición como de post-exposición²⁴⁰.

En la actualidad están surgiendo en Europa, América del Norte, India, China y Japón, grupos de investigación que desarrollan experimentos destinados a la búsqueda de alternativas que puedan sustituir el RIG. Incluso, en la actualidad, algunos productos están en fase de desarrollo y en India y EE.UU., se encuentra en Fase I de ensayos clínicos, un cóctel de dos anticuerpos monoclonales denominado CL184, que parece muy prometedor²⁴¹, aunque no se ha probado el efecto inmunosupresor, por lo que todavía ningún grupo de pacientes ha recibido el



tratamiento. Estos cocteles de anticuerpos monoclonales neutralizan el genotipo 1, el virus de la rabia clásica, pero poseen un efecto escaso o nulo frente a los virus de murciélagos, incluyendo los EBL-1 y 2, y el genotipo 4 (virus Duvenhague).

Las plantas transgénicas son, igual que sucede en el caso de las vacunas, una alternativa a considerar en un futuro próximo, como fuente de anticuerpos monoclonales. En la práctica ya se han realizado ensayos con anticuerpos antirrábicos elaborados por plantas, que han protegido al hámster frente al desafío²⁴².

En la actualidad se trabaja también con fragmentos de anticuerpos que mantienen sus puntos de unión al antígeno en las porciones variables de las cadenas ligeras y pesadas, incluso proteínas de fusión que unen más de un fragmento, incrementando la capacidad neutralizante hasta 1.500 veces, mostrando un gran potencial terapéutico como RIG. Entre sus ventajas se incluye su termoestabilidad y su pequeño tamaño, que facilita la penetración en los tejidos de la herida, en particular cuando se desarrollan utilizando nanotecnología.

Como en el caso de otras infecciones, se han desarrollado *in vitro* **aptámeros**, que son moléculas sencillas de ARN o ADN (ligandos de oligonucleótidos) que reconocen específicamente dianas por medio de estructuras tridimensionales que se generan por un proceso repetitivo denominado 'evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial' (SELEX)²⁴³. Además de las ventajas de los anticuerpos, como su alta afinidad, excelente especificidad y baja toxicidad e inmunogenicidad, también son estables y fáciles de sintetizar, modificar y manipular²⁴⁴. Su potencial terapéutico ya se ha demostrado en varios casos y algunos se han introducido en el uso clínico, por ejemplo frente al HIV-1. Recientemente se han propuesto varios productos de este tipo en el caso de la rabia. Liang *et al.* (2012)²⁴⁵ generaron 5 tipos de aptámeros de DNA que se unían con alta afinidad a células vivas infectadas con el virus de la rabia inhibiendo la replicación del virus en cultivos de células BHK-21 demostrando la efectividad del procedimiento como una alternativa menos costosa y más efectiva que las inmunoglobulinas o los fragmentos, proponiendo su utilidad clínica como moléculas terapéuticas. En otro estudio de los mismos autores²⁴⁶ desarrollaron 16 aptámeros de DNA monocatenario de alta afinidad que inhibían la replicación del virus de la rabia en células infectadas, pero no otros virus; dos de ellos, identificados como F021 y F024 se comportaron especialmente, como agentes muy prometedores por su



actividad antivírica frente al virus de la rabia.

Entre la tecnología de reciente desarrollo relativa a la administración de RIG por vía intradérmica debe hacerse mención, también, al uso de microagujas y a los sistemas de administración sin agujas, entre cuyos estudios se ha incluido también las vacunas antirrábicas también.

6.2.2.6. Eficacia de las vacunas actuales contra la rabia canina y humana, frente a los nuevos *Lyssavirus*.

Una cuestión que preocupa a muchos investigadores y técnicos, además de responsables sanitarios de todo el mundo, con el auge actual de nuevos tipos de virus relacionados con el de la rabia (nuevos *Lyssavirus*), y a la que ya hemos hecho alguna referencia en este estudio, es la eventual capacidad inmunizante de los tipos de virus utilizados en las vacunas al uso tanto en los animales como en el hombre frente a estos nuevos *Lyssavirus*. Hasta la fecha, no obstante, se han publicado datos escasos sobre el particular y por lo general procedentes de estudios experimentales.

No hace falta decir que desde un punto de vista de Salud Pública, la eficacia de las vacunas antirrábicas frente a la infección con *Lyssavirus* diferentes del virus de la rabia clásico, posee un enorme interés²⁴⁷. Como hemos visto, todas las vacunas antirrábicas comercializadas hasta la fecha consisten en preparaciones a base de cepas del virus de la rabia clásica, por lo que la protección frente a los *Lyssavirus*, en especial los de origen asiático o africano, constituye un problema todavía no resuelto, que ha hecho que los fallecimientos por esta causa hayan ido acompañados de un interés especial (desde 1970 hasta la fecha, un total de 12 casos, principalmente a partir de murciélagos, 5 en África, 3 en Asia, 2 en Australia y 2 en Europa).

Sobre la base de la información proporcionada en aquí, respecto de las interrelaciones genéticas y antigénicas dentro del género *Lyssavirus* (ver antes), se ha llegado a establecer la existencia de **un grado bajo de neutralización cruzada** entre los filogrupos I y II y **también entre ambos y el virus WBCV**.

Los experimentos llevados a cabo *in vivo*, sobre animales vacunados y desafiados con diferentes especies de *Lyssavirus*, han puesto de manifiesto una eficacia reducida o inexistente de las vacunas comercializadas frente a la rabia, respecto de los virus del filogrupo II (MOKV, LBV, SHIBV) y del filogrupo III (WCBV). Respecto del filogrupo I, la eficacia



de las vacunas frente a alguno de los virus incluidos en él, es **variable**, lo que sugiere una pérdida gradual de protección vacunal que se relaciona con la distancia de las cepas vacunales²⁴⁸.

Una mejora de la predicción de la protección vacunal utilizando solo la secuencia de la glicoproteína podría representar un avance significativo para el desarrollo de vacunas futuras y también para evaluar el posible riesgo representado por los nuevos *lyssavirus*. Tal mejora, sin embargo, requeriría un conocimiento más detallado de los efectos antigénicos individuales de las sustituciones de aminoácidos. A ello se puede llegar actualmente mediante técnicas de mutagénesis dirigida y cartografía antigénica. Los avances recientes en la caracterización antigénica de los diferentes tipos de *Lyssavirus* pueden ayudar a diseñar vacunas futuras, capaces de inducir protección cruzada²⁴⁹.

La proteína G, presente en la superficie del virus, es el componente vírico principal, responsable de la inducción de una respuesta protectora y es la diana de los anticuerpos neutralizantes. Las regiones responsables de las diferencias en antigenicidad y conservadas, por el momento están mal conocidas. Hasta la fecha se han definido cuatro sitios antigénicos principales y un sitio antigénico menor.

Los estudios llevados a cabo en modelos animales sugieren que las vacunas antirrábicas actuales proporcionan alguna protección frente al virus DUVV, los EBLV y alguno de los recientemente identificados tipos asiáticos. La infección por el LBV en animales de compañía vacunados señala claramente la falta de protección. Además, la vacunación post-exposición ha fallado también en la prevención de la enfermedad y muerte en un modelo animal de infección por el virus WCBV. Está justificado, por tanto, la necesidad de formulaciones vacunales más reactivas frente a estos *Lyssavirus*, principalmente en áreas donde existe riesgo.

El nivel de protección cruzada frente al virus IKOV es desconocido, aunque el análisis de comparación de secuencias hace temer que con las vacunas actuales se puede inducir poca o ninguna inmunidad protectora.

6.2.3. Nuevas estrategias en el diseño y desarrollo de vacunas frente a la rabia

Los planteamientos anteriores de conseguir protección frente a los diferentes tipos de *Lyssavirus* han suscitado numerosos estudios tanto



en lo que se refiere a nuevos virus recombinantes potenciales vectores vacunales como a glicoproteínas, como potenciales estrategias nuevas. Hasta la fecha, todas las estrategias han ido dirigidas a lograr protección frente a los tipos de virus de los filogrupos I y II, para lo que el mapeado de epitopos desarrollado en el caso de los virus influenza, ha sido una referencia muy útil²⁵⁰.

6.2.3.1. Vacunas de DNA. Las vacunas de DNA se postulan como interesantes, tanto en lo que se refiere a la profilaxis como a la terapia post-exposición (en el caso del hombre). Inicialmente se basan en el uso de plásmidos portadores del gen o genes de interés (en general el gen de la proteína G y la proteína N, aunque también un coctel de genes) por ejemplo pertenecientes a diferentes genotipos, incluyendo virus semejantes al de la rabia, que son insertados directamente en el hospedador²⁵¹. Lo interesante de estas vacunas, además, es que pueden inducir una respuesta de células CD8+ y CD4+, aspecto éste que suele ser fallido en las vacunas recombinantes (en lo que se refiere a la inducción de respuesta CD8+) y de subunidades. La primera vacuna de DNA frente a la rabia se desarrolló en el Instituto Wistar, de los EE.UU.^{252,253} logrando inmunidad de larga duración aunque la inducción de anticuerpos neutralizantes es más baja que la que se obtiene a partir de vacunas inactivadas de células diploides (en el hombre). Como quiera que sea, son ya numerosos los estudios que han demostrado el interés de este tipo de productos para tratamientos post-exposición en animales de experimentación²⁵⁴ aunque en primates no han tenido tanto éxito²⁵⁵.

6.2.3.2. La genética inversa y otras estrategias para el diseño de vacunas contra la rabia.

La genética inversa persigue averiguar la función de un gen o de un fragmento de un genoma secuenciado o clonado, mediante su modificación por mutagénesis o dicho de otro modo, al contrario de la genética clásica que a partir de una función averigua el gen responsable, en este caso partiendo del gen se averigua la función. Hace uso, por ejemplo, de técnicas de mutagénesis aleatoria o dirigida bien puntuales (referidas a un nucleótido en particular) o masivas (por ejemplo silenciamiento de genes completos), observando después los efectos, para lo que se ayuda de la PCR. En definitiva, a partir de una copia clonada de cADN obtenida de un virus ARN por transcripción inversa in vitro y sometida aquella a manipulación genética, se generan virus modificados mediante transfección de células permisivas con los ADNs



clonados. La técnica fue utilizada por primera vez por Taniguchi en 1978²⁵⁶, inicialmente a partir de virus ARN mc (+). La técnica permite introducir mutaciones, inserciones y deleciones diseñadas, en genoma de virus vivos.

La genética reversa posee gran utilidad en el diseño de vacunas, ofreciendo estrategias nuevas para el desarrollo de nuevos virus vivos atenuados (uno de los objetivos más utilizados), permite modificar la especificidad de hospedador o la generación de virus deficientes en la replicación, por lo general buenos candidatos a cepas vacunales. Pueden diseñarse mutaciones más estables que las clásicas, o deleciones, incorporando después estas mutaciones en el virus recombinante producido por genética inversa. La genética reversa proporciona una herramienta muy útil para eliminar determinantes de virulencia en virus altamente patógenos, como sucede en la influenza o la rabia, y generar nuevas cepas atenuadas²⁵⁷. Una de las primeras aplicaciones de la genética inversa con el propósito de desarrollar virus vacunales en virus ARNmc (-) se produjo en el caso de los virus influenza obteniendo un virus de la gripe aviar en el que mediante ingeniería genética se logró que el gen de la hemaglutinina (HA) procediese de un virus H5N1, mientras que el de la neuraminidasa (NA) lo fuera de un virus H2N3, utilizando como base un virus H1N1²⁵⁸, obteniendo un virus vacunal H5N3 que proporcionaba protección completa frente al H5N1 de alta patogenicidad para las aves.

En el caso del virus de la rabia, los avances en genética inversa han permitido generar virus atenuados. En base a la cepa Flury HEP un grupo de investigación²⁵⁹ desarrolló un mutante en el que se había delecionado el gen que codifica para la fosfoproteína (proteína P, cofactor de la polimerasa vírica) impidiendo de este modo la replicación del virus en las células y resultando así totalmente apatógeno, que en el ratón inducía una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes que protegía frente al desafío. De forma semejante, la deleción del gen que codifica para la proteína de la matriz (proteína M) a partir de la cepa RC-HL, logró un virus apatógeno que retenía su inmunogenicidad total en relación con la proteína G.

Mediante genética inversa se pueden también generar homólogos, por ejemplo un virus de la rabia basado en vectores de virus recombinantes que pueden expresar una amplia variedad de genes extraños capaces de inducir efectores inmunes principales frente al virus de la rabia²⁶⁰. En su momento, el principal objetivo en el desarrollo de



tales vectores fue modificar el gen recombinante para lograr atenuar completamente el virus sin disminuir la capacidad del vector para inducir una respuesta inmune completa frente al virus de la rabia²⁶¹; la modificación más importante ha consistido en reemplazar el codón de arginina en la posición 333 en la secuencia del gen recombinante por otro aminoácido distinto, por ejemplo glutamina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, cisteína, serina o ácido aspártico, todos los cuales originan un fenotipo atenuado. Así sucedió en el caso de la cepa SAD²⁶², aunque también se ha descrito que se puede conseguir el mismo efecto mediante mutaciones en los residuos 164-303. En cualquier caso, las mutaciones en un solo aminoácido no garantizan un fenotipo atenuado estable, pudiendo revertir a la forma virulenta mediante el pase intracraneal por ratón, en el que se producen mutaciones en otras posiciones²⁶³.

El incremento de la inmunogenicidad de estas vacunas atenuadas se ha explicado porque cuando se disponen dos genes recombinantes idénticos en tándem en el virus recombinante el resultado es mucho más inmunogénico que si solo se dispone de uno²⁶⁴.

En 1995, Mebasion *et al*²⁶⁵ generaron virus recombinantes que contenían proteína G de *Lyssavirus*, tanto heteróloga como quimérica y utilizando la expresión de un gen 'reporter' demostraron que estos podían ensamblarse y funcionar como un virus infeccioso; en ese estudio utilizaron una glicoproteína de un virus MOKV como sustituto para la proteína G de un virus salvaje de un clon de virus rábico clásico (RABV). El gen del MOKV codifica para una proteína de 523 aminoácidos, 2 aminoácidos más corta que la está presente en el virus RABV, con una identidad de solamente el 56,7%. No se identificó ninguna homología de secuencias entre la secuencia señal y los dominios citoplasmáticos del MOKV y del RABV, aunque los dominios externos (los ectodominios) de los dos virus (entre los aminoácidos 19 y 430) sí que presentaban una identidad del 62%. En la práctica, el dominio citoplasmático del MOKV era capaz de interactuar heterotípicamente con las proteínas del RABV salvaje, demostrando así que los dominios de la proteína G de los *Lyssavirus* puede cambiarse sin comprometer su función. La sustitución del sitio antigénico III en la glicoproteína del virus RABV en la correspondiente secuencia del virus MOKV, no afectó a su capacidad para generar partículas infecciosas ni para mediar la infección, pero no prevenía la neutralización del virus con un anticuerpo monoclonal dirigido frente al sitio III del RABV, mientras que el suero específico de



MOKV si neutralizó esta quimera.

En otro estudio se analizó la inserción de epitopos inmunológicamente potentes para los linfocitos B y Tc, en lugar del sitio antigénico III de la cepa Pasteur del virus de la rabia RABV²⁶⁶ y en un tercero²⁶⁷, generaron virus de la rabia defectivos incapaces de replicarse, al carecer del gen de la proteína de la matriz (M) que en el virus salvaje virulento es necesaria para llevar a cabo el proceso de ensamblaje de las proteínas víricas.

En otros estudios, finalmente, produjeron quimeras de proteína G que contenían dominios intercambiados entre el virus RABV y el virus EBLV-1 o MOKV, evaluando su potencial como vacunas de DNA frente a diferentes especies de *Lyssavirus*²⁶⁸. Los estudios in vivo demostraron que las quimeras eran más eficientes en la protección del ratón después del desafío intracraneal con RABV, EBLV-1 y 2, que un homogeinizado de plásmidos. Además, después de 10 pases intracerebrales en ratón no existían modificaciones de ningún tipo (el virus vacunal permanecía estable). Las conclusiones de este estudio pusieron de manifiesto el posible uso de virus de la rabia recombinantes como candidatos vacunales pan-*Lyssavirus*²⁶⁹.

Otra observación, muy importante, derivada de estudios de genética inversa, es que la inmunogenicidad de los mutantes obtenidos por deleción de genes, que se traduce en la atenuación del virus de la rabia, puede incrementarse mediante inserción de genes adicionales de la proteína G. Faber *et al* (2002)^{270, 271} desarrollaron una estrategia de genética inversa construyendo una forma recombinante de un virus vacunal atenuado que contenía múltiples copias de un gen de la glicoproteína (G). Este virus recombinante demostró que una proteína G, expresada en uplicado, era capaz de proteger frente al desafío intracraneal con el virus RABV con un mayor nivel de supervivencia que un virus que expresara simplemente proteína G. La sobreexpresión podía proporcionar una protección extra frente al desafío asentada en un incremento en la inducción de apoptosis (por una mayor inmunogenicidad de las dos glicoproteínas) y en un incremento en los niveles de interferón como resultado de un genoma de mayor tamaño. Este trabajo ha continuado y los autores han demostrado que un virus recombinante que expresa una proteína G atenuada triplicada, en una sola dosis, es suficiente para proporcionar una proporción completa frente al RABV²⁷² en el ratón, lo que lleva, de forma natural a pensar que una vacuna de virus recombinante que exprese múltiples proteínas G, cada



una de ellas derivada de representantes de cada uno de los filogrupos, podría ser una forma adecuada de desarrollar **una vacuna de pan-*Lyssavirus*** que, además, no necesitaría inactivarse, lo que supondría menores costes. En situaciones de pre-exposición una vacuna de esta naturaleza podría inducir títulos suficientes de anticuerpos neutralizantes en una sola dosis, otra gran ventaja, y por último, una reducción del tiempo necesario para la respuesta inmune, redundaría en reducir la necesidad de utilizar inmunoglobulinas en los tratamientos mixtos (suero-vacunación).

Recombinantes: Debe hacerse notar, aunque parezca innecesario, que los estudios llevados a cabo para el desarrollo de vacunas nuevas para los animales de compañía, también repercuten en el desarrollo de nuevas vacunas humanas. Después de la demostración de que los animales domésticos vacunados con vacunas estándar no se protegen frente al desafío con *Lyssavirus* del filogrupo II²⁷³, se han desarrollado nuevas vacunas de subunidades utilizando virus *vaccinia* como vehículo para expresar diferentes proteínas G de *Lyssavirus*²⁷⁴. En los últimos años se han producido varios virus *vaccinia* recombinantes como vehículo para la expresión de diferentes proteínas G de los *Lyssavirus*, incluyendo los que expresan WCBV G (*vaccinia*-WG) o MOKV G (*vaccinia*-MG) solamente, dos copias de la proteína G del RABV (*vaccinia*-RGRG), una copia de proteína G de RABV y otra de MOKV (*vaccinia*-RGMG) o una copia de proteína G del RABV y otra de WCBV (*vaccinia*-RGWG). Es muy importante que tanto los virus que expresan proteína G simple como doble, son capaces de proteger frente al desafío intracraneal con el virus homólogo, aunque la protección solamente se ha logrado frente a cada virus de desafío cuando la vacuna incluye la proteína G homóloga.

Pese al claro potencial de estas nuevas formulaciones vacunales existen riesgos en lo que a seguridad se refiere, respecto del uso de *Lyssavirus* competentes en replicación y de recombinantes basados en el virus *vaccinia* para la pre-inmunización. Últimamente, los temores de seguridad hacen poco probable el uso de tales vacunas. Sin embargo, como las actuales vacunas comercializadas contra la rabia incluyen virus inactivados y adyuvantados, existe potencial suficiente para el desarrollo de nuevas vacunas pan-*Lyssavirus*, que (por otra parte) se están generando a partir de preparaciones inactivadas de virus de cada filogrupo. Esta estrategia puede proporcionar protección frente a todos los *Lyssavirus*, generando una respuesta cruzada de anticuerpos



protectores (Evans *et al.*, 2012).

6.2.3.3. Vacunas derivadas de plantas (vacunas de plantas transgénicas)

Representan un sistema novedoso, seguro y barato, de administración de una nueva generación de vacunas antirrábicas²⁷⁵. Se utilizan virus de plantas, como el del mosaico del tabaco, o el del enanismo del tomate, como vectores de expresión de antígenos extraños en plantas, proporcionando vacunas obtenidas por ingeniería genética a partir de las hojas de una u otra planta. Entre las ventajas de las plantas y cultivos para la expresión de proteínas, en particular en el caso del tabaco, representan una biomasa de proporciones importantes para la producción de proteínas recombinantes.

Uno de los desarrollos más avanzados en la expresión productiva de antígenos extraños en plantas ha sido la denominada 'diseño de genes estratégicos' para lograr expresiones de alto nivel en plantas transgénicas.

En el caso de la rabia se ha diseñado un gen quimérico que codifica para una proteína G recombinante en la que el péptido señal se ha sustituido por el de la planta del tabaco, que es muy eficiente en el transporte de proteínas en el retículo endoplásmico de las células de la planta. De este modo la proteína G recombinante se expresa en un nivel mucho más alto en las hojas del tabaco comparado con la expresión de la proteína recombinante nativa. Las hojas son inmunogénicas y protegen frente a la inoculación intracerebral del virus en el ratón, lo que abre un camino muy prometedor.

6.3. Adjuvantes para vacunas inactivadas frente a la rabia y perspectivas nuevas

La mayoría de las vacunas actualmente disponibles y comercializadas frente a la rabia, en la actualidad, sacrifican su riqueza antigénica y en buena medida su inmunogenicidad, a la seguridad. Ello exige, en cualquier caso, la utilización de adyuvantes para mejorar la inmunogenicidad. Los adyuvantes se plantean también, como una necesidad, en el caso de las vacunas de subunidades, por lo general poco inmunógenas, aunque buenos o muy buenos antígenos.

La mayoría de las vacunas inactivadas comerciales, si están adyuvantadas, incorporan hidróxido de aluminio, que promueve respuesta de tipo Th2, favoreciendo la producción de IgG1. No podemos sustraer-



nos, en este punto, a los grandes avances que se han producido en los últimos años en relación con la íntima relación que guarda la inmunidad innata respecto de la inmunidad adquirida, para la que la primera es absolutamente crítica. Las señales que producen la activación de las células del sistema de defensa inespecífico (macrófagos, células dendríticas) reconocen a través de sus receptores de membrana tipo *Toll-like* (TLR) y citoplasmáticos (receptores NOD) moléculas presentes en los patógenos y en las células dañadas por ellos. Este conocimiento ha derivado en el desarrollo de nuevos tipos de adyuvantes para sustituir el de las sales de aluminio, como sucede con los oligonucleótidos de citosina y guanina (CpG)-ODN que activan el sistema de inmunidad innata al unirse a los TLR-9 y que comparados, por ejemplo, con los adyuvantes clásicos producen títulos anticuerpos neutralizantes 2 veces más altos que los obtenidos en experimentos llevados a cabo en ratón²⁷⁶. Por otra parte, en los últimos años se están llevando a cabo interesantes estudios en este campo que a buen seguro cambiarán el espectro de la potenciación antigénica en las formulaciones vacunales en un próximo futuro²⁷⁷.





7. Consideraciones finales.

No existe duda que el **perro** continúa siendo en todo el mundo el vector principal de la rabia y la principal fuente de infección humana. No obstante, otras especies de animales salvajes u originalmente salvajes pero algunas veces adaptadas como animales de compañía o mascotas exóticas, han adquirido importancia en particular en determinadas regiones. En cualquier caso y abstracción hecha del perro, los murciélagos se han venido revelando como la fuente más importante y probablemente de mayor futuro en los años venideros de casos de rabia o de encefalitis semejantes a la misma. Debe recordarse que en la actualidad el número de *Lyssavirus* es ya particularmente numeroso y que la inmensa mayoría de ellos se asocian a los murciélagos, además de que muchos de ellos ya cuentan en su haber con casos humanos relacionados.

Los esfuerzos realizados en los últimos años en materia de estrategias vacunales para el control de la rabia en los animales, principalmente mediante el desarrollo de nuevos productos inactivados a partir de cepas vacunales bien conocidas, derivadas de las cepas clásicas y obtenidas por pases por animales, embrión de pollo o cultivos celulares, que a la vez que buenos inmunógenos, son seguros, han dado sus frutos en el control de la rabia en poblaciones animales.

De igual modo, las estrategias a base de vacunas orales bien a partir de cepas atenuadas, virus recombinantes de distinto tipo, que expresan principalmente glicoproteína del virus de la rabia, han resultado decisivas para el control de la rabia salvaje (particularmente del zorro, chacal o mapache) en Europa y América. No obstante la complicada orografía de los países limítrofes a aquellos que aún mantienen brotes de la enfermedad mantienen el riesgo.

El **riesgo** es, por otra parte, inevitable entre países y continentes. Si se refiere a los **animales terrestres**, el hombre y su capacidad de desplazamiento cualquiera que sea el motivo (ocio, trabajo, emigración, etc.) juega el papel principal. Desde África a Europa o desde los países del Este de Europa a Europa Central o el Occidente Europeo, el riesgo permanece, como lo demuestra el permanente relato de casos rela-



cionados la mas de las veces con la entrada ilegal de mascotas, por lo general de corta edad y ordinariamente de condición sanitaria desconocida, que de forma clandestina atraviesan las fronteras sin que las autoridades sanitarias puedan hacer nada para evitarlo. Este riesgo debe ser objeto de una previsión y vigilancia permanente por todos los medios al alcance de las autoridades sanitarias, se trate de medidas de profilaxis sanitaria o médica, o ambas, en una alerta continua. La demostrada posibilidad de que desde un reservorio doméstico salte un brote de enfermedad en animales salvajes o al contrario, no admite discusión en la adopción de medidas cautelares.

A ello se une, además, la novedad de casos de rabia en **murciélagos**, algunos de los cuales han sido causa de fallecimientos humanos. Con esta deriva se introduce un elemento de gran importancia epidemiológica, relacionado con el proteccionismo de las leyes (en particular las normas europeas) respecto de su papel bienhechor en el control de insectos. En este caso en particular, debe considerarse además, que varias de las especies de murciélagos insectívoros que se han implicado ocasionalmente en casos de aislamiento o detección de *Lyssavirus*, se corresponden con especies migratorias, según ha sido publicado recientemente²⁷⁸, incluyendo por ejemplo *Miniopterus schreibersi*, *Nyctalus noctula* o *Pipistrellus pipistrellus*, entre los que son capaces de recorrer en su migración distancias de más de 1.000 km, y otras, como *Myotis myotis* o *M. daubentoni*, que migran a distancias mucho más cortas. Aunque, como se señala en el artículo, el fenómeno migratorio (que solo afecta a un 3% de las más de 1.000 especies de murciélagos) es un fenómeno en constante evolución, entre otras razones condicionado a los cambios climáticos, una situación de plena actualidad que está cambiando el mapa de muchos sectores biológicos.

El descubrimiento continuo de nuevos *Lyssavirus*, en particular los que son altamente divergentes del Filogrupo I, representa un riesgo indudable para la Salud Pública al que en los últimos años se pretende dar respuesta, muy en particular en el caso de los grupos de riesgo (aunque no solo) (Fooks, 2004; Nel, 2005). Las vacunas actuales autorizadas, tanto para el hombre como para los animales, son incapaces de proteger suficientemente frente a los *Lyssavirus* incluidos en los filogrupos II y III, razón que hace necesario el diseño y desarrollo de nuevas vacunas. Aunque el riesgo actual y futuro de infección con los *Lyssavirus* divergentes es difícil de cuantificar, el desarrollo de nuevos tipos de diagnóstico diferencial para uso en el campo puede mejorar



nuestro conocimiento del impacto de tales virus y su repercusión sobre la Sanidad Animal y la Salud Pública, en áreas geográficas donde se han responsabilizado de casos.

Es importante señalar, como hemos indicado más atrás, que dado que las vacunas frente a la rabia que incluyen el serotipo 1 (clásicas) solo proporcionan una escasa protección (si es que la producen) frente a los genotipos 2, 3 y 5, debería considerarse una prioridad en referencia a la protección humana frente a la rabia, el desarrollo de vacunas anti-*Lyssavirus* de amplio espectro (McColl *et al.*, 2000). A este respecto parece de interés que las vacunas elaboradas a partir de DNA recientemente desarrolladas en ratón, a las que ya nos hemos referido²⁷⁹, igual que otras ensayadas en perros²⁸⁰, o las por el momento experimentales derivadas de los modernos procedimientos de genética inversa, podría representar una estrategia de gran interés práctico futuro.

De igual forma se han llevado a cabo diversos estudios mediante combinaciones de genes de la glicoproteína G en el desarrollo de vacunas de quimeras que podrían ser de interés en regiones concretas, como podrían ser quimeras de EBL-1 para proteger frente a estos virus en el caso de Europa²⁸¹ pues no puede descartarse que los zorros pudieran convertirse en vectores para variantes de EBL-1, a la vista de los saltos de la barrera de especie descritos en ovejas y martas en Dinamarca y Alemania o el aislamiento de variantes del virus de la rabia clásico en murciélagos insectívoros descritos en Canadá a partir del ganado bovino o de zorros y, muy importante, la presión a la que están sometidos en la actualidad los zorros en Europa, como consecuencia de las intensas campañas de vacunación oral frente al genotipo 1, clásico, del virus de la rabia (McColl *et al.*, 2000).

Independientemente del riesgo que supone para la vida salvaje, el desarrollo de nuevas vacunas que induzcan una respuesta inmune neutralizante sobre los pan-*Lyssavirus* es de gran importancia en general y particularmente para los grupos sociales en riesgo, especialmente para los científicos y técnicos que trabajan en laboratorios, en los que tales avances son una necesidad crítica.





8-Posicionamiento de la Comisión de Rabia del CGCVE

En lo que se refiere a la localización geográfica, España está situada en una encrucijada entre dos continentes, África y Eurasia, sometida por ello a las corrientes de agentes de infección procedentes de uno y otro lugar a través de innumerables vectores permanentes u ocasionales, con importancia especial en lo que se refiere al continente africano.

En lo que se refiere a la localización geográfica, la situación de España, en una encrucijada entre África y Eurasia, está sometida al riesgo de llegada de agentes de infección procedentes de ambos continentes, en particular de África, a través de vectores animales, sin descartar ninguno, originarios muchas veces de zonas endémicas de rabia. Se debe considerar también la influencia del comercio, sobre todo el clandestino, de animales salvajes o domésticos, vehículos potenciales del virus, cuando proceden de zonas donde la enfermedad es frecuente, como sucede nuevamente en el caso del continente africano.

Se suman a ello la entrada ilegal de seres humanos procedentes del norte de África o del África subsahariana, huyendo de la penuria y la miseria de muchos de aquellos países; para ellos Italia y España representan la puerta de entrada natural en Europa y con ello la solución de todos los problemas; no se puede excluir que con esos emigrantes entren también pequeños animales que actúan como vectores de agentes de infección, igual que ellos mismos. Incluso, la entrada de turistas, que en ocasiones se acompañan ilegalmente de mascotas, tiene la misma consideración; en este punto, la entrada de turistas procedentes del este europeo (antigua Unión Soviética, principalmente, pero también de otros países del mismo entorno y países asiáticos, principalmente China y también la India) posee un interés especial pues en estos casos, la entrada se refiere a turistas de gran solvencia económica, para los que siempre existe alguna solución, cualquiera que sea el problema, en relación con la entrada de 'sus' animales. Una consideración especial en ese punto, se refiere al creciente comercio con los países asiáticos, principalmente China y la India, que en esta materia representan punto de riesgo, más remoto, pero no imposible y en cualquier caso, de difícil valoración.



Respecto de la denominada ‘rabia urbana’, el perro es el centro de atención principal en todos los lugares del mundo. Por su proximidad al hombre, su especial vulnerabilidad al virus rábico, su condición de reservorio y su capacidad mil veces demostrada para actuar de mecanismo habitual de transmisión a la especie humana, ha acreditado a través de los siglos, muy particularmente en el área mediterránea, su condición de principal vector de transmisión de la rabia al ser humano. En la mayor parte de los países que han logrado controlar o erradicar la rabia canina, se ha logrado de forma paralela el control de la rabia humana, razón por la que esta especie animal es el centro de atención de todos los esfuerzos relativos a la vigilancia de la enfermedad. En lo primero, las medidas puestas en práctica han sido invariablemente censado, registro, control de animales vagabundos o indocumentados y vacunación en masa, obligatoria o voluntaria, anual o bianual, justificada por el tipo de producto utilizado.

El perro es, además, susceptible de forma natural a genotipo 1, virus de la rabia clásico, de forma directa o a partir de otros mamíferos domésticos y salvajes (zorro, lobo, coyote) pero también se ha comprobado su sensibilidad (en ocasiones de forma experimental) a otras especies de *Lyssavirus*, procedentes de quirópteros. Junto al perro, igualmente por su proximidad al entorno humano, otros animales domésticos como el gato y, en menor medida (a consecuencia de su introducción por diferentes motivos) el hurón e incluso los mapaches y ‘perros mapache’ y ocasionalmente otras especies, deben ser objeto de vigilancia permanente.

Como se ha señalado²⁸², en tanto la rabia siga estando presente y endémica en el norte de África, particularmente **en Marruecos**, no solo es imposible evitar el paso de animales enfermos por la frontera natural existente entre ese país y las ciudades de Ceuta y Melilla, sino también a la península y aún a los países con los que por una u otra razón existe tráfico de mercancías, animales y humanos **de Europa Central**, particularmente Francia, Italia, Grecia y el resto de países, tráfico, por otra parte, que ha crecido sustancialmente en los últimos años sobre todo coincidiendo con las vacaciones de veranos de emigrantes residentes en Francia, Holanda, Bélgica o Alemania, cuando es de dominio público la formación de colas kilométricas en los pasos fronterizos del Estrecho de Gibraltar, momentos en los que la presión puede hacer que no resulta demasiado difícil introducir ilegalmente perros o gatos procedentes de nuestro vecino del Sur. Una vez en España, la libre



circulación a través de las fronteras de los países de la UE, hace relativamente fácil llegar en estas condiciones a cualquiera de los países de nuestro entorno.

Otro tanto puede suceder en el caso de la rabia vulpina si, en este caso, son los turistas que viajan por carretera, procedentes de países de Europa Central o del Este, en los que aún se describen casos de rabia salvaje y en los que eventualmente un contagio de una mascota con algún animal portador, pueden hacer llegar a nuestro país animales infectados.





9-Conclusiones y propuestas finales

PRIMERA:

El Riesgo de importación de casos de rabia canina procedentes del norte de África es una evidencia de importancia creciente. Ante tal situación, se debe incrementar el celo de las autoridades sanitarias, en puntos de entrada en la península conectados de forma directa con los puertos africanos, muy especialmente en lo que se refiere a la entrada de vehículos automóviles, que puedan transportar ilegalmente animales enfermos o en periodo de incubación de aquellos lugares.

De modo particular, las ciudades de Ceuta y Melilla, sin barreras naturales con el territorio endémico de Marruecos, deben mantener por parte de sus autoridades sanitarias extremo rigor en la entrada de animales procedentes de las localidades del entorno, principalmente animales vagabundos.

SEGUNDA:

Aunque el riesgo de importación de casos de rabia procedentes de otros territorios del interior de Europa, se considera menor que en el caso del norte de África, se debe tener presente que:

- 1) la libre circulación de personas y mercancías en los países de la UE permite con facilidad la entrada de animales vehiculados ilegalmente procedentes de países que describen casos de rabia en animales domésticos (principalmente perro y gato) e incluso de especies salvajes (sobre todo zorro rojo);
- 2) la falta de medidas específicas y la cierta relajación de los controles referidos a las poblaciones vulpinas, puede facilitar rebrotes en países declarados libres de este tipo de rabia. Se desconoce si esta situación está siendo contemplada de algún modo por las autoridades autonómicas o dependientes del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente, en aspectos como el conocimiento de las poblaciones de zorro, densidad, abundancia, etc. habida cuenta de la importancia crítica que se concede a determinados valores de esta especie animal en relación con la difusión de la rabia;

3) No se debe olvidar que está perfectamente acreditado el contagio de perros a partir de zorros enfermos y al contrario, como parece que sucedió en nuestro país en el año 1977, cuando se describieron dos casos de rabia en zorros en la provincia de Málaga con ocasión del brote de rabia de 1975, en el que afortunadamente fueron casos aislados, sin relación entre ellos, probablemente debido al contagio singular con perros enfermos o por consumo de carroña procedente de cadáveres.

TERCERA:

Se considera absolutamente necesario, mantener un criterio único en toda España en lo que se refiere a la **Vacunación Obligatoria**, que debe ser anual (en función del producto autorizado utilizado para la inmunización, que debe ser aplicada por Veterinarios autorizados) para garantizar una inmunidad protectora suficiente contra la rabia, en todo caso sistemática, y que debe alcanzar sin excepción a la totalidad de perros y gatos, igual que en el caso de mascotas exóticas como los hurones o los perros-mapache, también especialmente susceptibles al virus de la rabia.

De estas últimas especies, debería abrirse un registro por parte de los profesionales o las clínicas veterinarias autorizadas, que como en el caso de las demás especies, se traslade y ponga a disposición de las autoridades sanitarias competentes.

En el control de la rabia en los animales de compañía (perro, gato, hurón y otros), solo la vacunación en masa de los animales, completada con el censado, registro, identificación (mediante microchip) y otras medidas de vigilancia, tiene acreditado el éxito.

CUARTA:

En relación con la rabia de murciélagos, habida cuenta de los últimos casos descritos en nuestro país, y de las consideraciones expuestas a propósito de la posibilidad de transmisión a especies terrestres, como de la llegada de animales procedentes de otras latitudes sea cual fuere la causa de la misma, exige por parte de las autoridades competentes una alerta continua.

En la misma línea, se considera necesario por parte de las autoridades competentes el estímulo y financiación suficiente a los grupos de investigación especializados, en la mejora permanente de los recursos disponibles en materia de diagnóstico y vacunación, así como en la búsqueda de nuevos productos vacunales capaces de proteger al ser



humano y a las poblaciones animales de eventuales exposiciones a estos virus, cuya relación con el virus de la rabia clásico en ocasiones es insuficiente para garantizar una protección adecuada.





10-BIBLIOGRAFÍA

(Endnotes)

- 1 San Isidoro de Sevilla. Etimologías. Edic. bilingüe latín-español. Madrid, 2004
- 2 Abellán García, C., Sánchez-Serrano, L.P., Amador, R. and A.J. Rosinha. Rabies in the Iberian Peninsula. In 'Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin' A testament to rabies by Dr. Arthur A. King. Chapter 11. OIE-WHO. Paris, 2004.
- 3 Poza Tejedor, P., 2013. Apunte histórico sobre la rabia en España. XIX Congreso Nacional y X Iberoamericano, de la Historia de la Veterinaria. Madrid. Libro de Actas.
- 4 Sevillano, O. y P. Benitez (Coord.). Rabia: actualización de conocimientos y gestión de las actividades sanitarias. Comunidad Autónoma de Madrid. 2010
- 5 Saiz Moreno, L. Aportaciones a la historiografía de la Veterinaria de Salud Pública. En 'Temas de Historia de la Veterinaria'.Vol. 2. José M. Cid Diaz Edit. Editum 2000. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia
- 6 Álamo Sanz, R. Presentación y Antecedentes Históricos. En 'Jornadas Internacionales sobre Rabia'. Colegio Oficial de Veterinarios de Zamora-ICE Universidad de León. 22-24 de marzo de 1996
- 7 Torres, J.M. y P. Moratinos. 1984. El médico militar José Albert i Raspall y su valiosa colaboración en la creación y organización del laboratorio histoquímico, 'Alma-Mater' del Instituto Militar de Medicina Preventiva 'Capitán Ramón y Cajal'. Med. Militar, 40: 431-33
- 8 García Izcara, D. Lesiones del retículo de las células nerviosas en la rabia. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas. Madrid. Tomo III. Fascículo IV
- 9 De Juana Sardón, A. Las instituciones y servicios ganaderos y la labor veterinaria en el siglo XX. www.racve.es



- 10 Instituto Nacional de Estadística. Movimiento Natural de la Población. Defunciones según la causa de la muerte. 1900-1990. Madrid, 1991
- 11 Rodríguez Ferri, E.F. Estado actual de la rabia animal con especial referencia a España. Colección de Veterinaria de Salud Pública, IV. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, 1987
- 12 Sánchez Serrano, L.P., Abellán García, C. y O. Díaz García. 2003. Rabia en España. ¿qué ocurre con la rabia en quirópteros?. *Semergen*. 29(5), 268-70
- 13 Sánchez Serrano, L.P., 1999. Rabia transmitida por murciélagos insectívoros en España. *BES*, 7: 14, 149-152
- 14 Vázquez Morón, S., Juste, J., Ibañez, C., Ruiz-Villamor, E., Avellón, A., Vera, M. and J. E. Echevarria. 2008. Endemic circulation of European Bat Lyssavirus Type 1 in Serotine Bats, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 14:8, 1263-1266
- 15 Vigo Martín, M., y J. Monsalve Tresaco. 2013. Gestión eficaz de un foco de rabia canina. Junio 2013. *Veterinarios*. Sept. 12-19
- 16 Resolución de 9/6/2013 de la Dirección Gen. Agric. Y Gan. De Castilla-La Mancha, por la que se establecen las medidas de contingencia y emergencia en ciertos municipios de la provincial de Toledo, ante la declaración oficial de un caso de rabia importado.
- 17 Plan de Contingencia para el control de la Rabia en Animales Domésticos en España. Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino), Dirección General de Salud Pública y Sanidad Exterior (Ministerio de Sanidad y Política Social) e Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación). Revisión 1 de enero de 2011
- 18 Resolución de 23 de diciembre de 2013 de los Directores Generales de Salud Pública, Calidad e Innovación, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y del de Sanidad de la Producción Agraria, del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, por la que se reinstaura el Nivel 0 de Alerta, sin casos de rabia animal.
- 19 Baer, G.M. The natural history of rabies. 2nd ed. CRC Press. Boca Ratón. Florida, 1991

- 20 Lafuente González, J. y Y. Vela Palacio. La Veterinaria a través de los tiempos. Edit. Servet. Grupo Asis Biomedica, S.L. Zaragoza, 2011
- 21 Cordero del Campillo, M. Desarrollo histórico de la Medicina Preventiva. Crin Edit. S.L., Barcelona, 1996
- 22 Meydenbach, J. (Edit.). *Hortus Sanitatis, sive Tractatus herbarum, lapidum, animalium et caeterarum creaturarum, etiam describentes ipsarum virtutem*. 1491. Biblioteca de la Basílica de San Isidoro. León. Edición Facsimil (El jardín de la Salud. Las hierbas.1). Universidad de León-Cátedra de San Isidoro de la Real Colegiata de León. 1999
- 23 Martínez Pérez, J.M. La Rabia: Conocida desde la antigüedad, temida hasta la actualidad. Premio de la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León-Colegio Oficial de Veterinarios de León. 2014
- 24 Steele, J.H., History of rabies. In 'Baer, G.M. (Coordinator). The natural history of rabies'. Academic Press. New York, 1975
- 25 Fracastoro, G., De contagione et contagiosis morbis eteorum curatione. Libri III. En 'History of Medicine Series'. G.P. Putnam's Sons. New York/London, 1930
- 26 Galtier V. 1879. Études sur la rage. *Ann. Med. Vet.*;28:627–39.
- 27 Sundarshan, M.K., Madhusudana, S.N., Mahendra, B.J., et al. 2007. Assessing the burden of human rabies in India: results of a national multi-center epidemiological survey. *Int. J. Infect. Dis.*, 11:29-35
- 28 Menezes, R. 2008. Rabies in India. *Cmaj*, 178: 564-66
- 29 WHO. WHO Expert Consultation on rabies. World Health Organization. Technical Report Series. 2005. 931
- 30 Hu, R, Tang, Q., Tang, J., Fooks, A.R. 2009. Rabies in China. An update. *Vector Borne Zoonosis Dis.* **9**(1):1-12.
- 31 Dodet, B., Adjogoua, E.V., Aguemon, A.R., Amadou, O.H., et al. 2008. Fighting rabies in África: the África rabies Expert Bureau (AfroREB). *Vaccine*, 26: 6295-98
- 32 Fekadu M., Baer G.M. (1980) Recovery from clinical rabies of 2 dogs inoculated with a rabies virus strain from Ethiopia. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1632–1634.
- 33 Miller A., Morse H.C., Winkelstein J., Nathanson N. (1978) The



role of antibody in recovery from experimental rabies. I. Effect of depletion of B and T cells. *J. Immunol.* 121: 321–326.

34 Starr L.E., Sellers T.F., Sunkes E.J. (1952) Apparent recovery of a dog from rabies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 121: 296.

35 Jackson A.C., Reimer D.L., Ludwin S.K. (1989) Spontaneous-Recovery from the Encephalomyelitis in Mice Caused by Street Rabies Virus. *Neuropath. Appl. Neurobiol-* 15: 459–475.

36 Kuang Y., Lackay S.N., Zhao L., Fu Z.F. (2009) Role of chemokines in the enhancement of BBB permeability and inflammatory infiltration after rabies virus infection. *Virus Res.* 144: 18–26.

37 Gnanadurai, C.W., Zhou, M., He, W., Leytson, C.M., Huan Ch., Salyards, G., Harvey, S.B., Chen, Z., He, B., Yang, Y., Hooper, D.C., Dietzchold, B. and Z.F. Fu. 2013. Presence of virus neutralizing antibodies in cerebral spinal fluid correlates with non-lethal rabies in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7:9, 1-8, www.plosntds.org

38 Bronnert, J., Wilde, H., Tepsumethanon, V., Lumlerdacha, B., and T. Hemachudha. 2007. Organ transplantation and rabies transmission. *J. Travel Med.*, 14:, 177-180

39 Fooks, A.R., McElhinney, L.M., Pounder, D.J., Finnega, C.J., Mansfield, *et al.*, 2003. Case report isolation of a European bat lyssavirus type 2 a from a fatal human case of rabies encephalitis, *J. Med. Virol.*, 71 (2) 281-289

40 Picard-Meyer, E., Brookes, S.M., Barrat, J., Litaize, E. *et al.* 2008. Experimental infection of foxes with European Bat Lyssaviruses type 1 and 2. *Dev. Biol* (Basel). 131: 339-45

41 Wertheim, H.F.L., Nguyen, T.Q., Nguyen, K.A.T., *et al.* 2009. Furious rabies after an atypical exposure. *PLoS Med* 6(3) e 1000044:doi:10.1371/journal.pmed.1000044

42 Healy, D.M., Brookes, S.M., Banyard, A.C., Núñez, A., Cosby, S.L., and A.R. Fooks. 2013. Pathobiology of rabies virus and the European bat lyssaviruses in experimentally infected mice. *Virus Res.* 172, 46-53

43 Dietzgen, R.G. and I.V. Kuzmin (Edit.). Rhabdoviruses. Molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interaction,

cytopathology and control. Casiter-Academic Press. Norfolk, U.K., 2012

44 Vázquez-Morón, S., García Benzaquen, N., Berciano Rodríguez, J.M., Martínez Alares, I., Navarro Gómez, A., Echevarría Mayo, J.E., y L. Domínguez Rodríguez. 2013. Virus de la rabia. *Salud Pública*, 6-12

45 International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. Official Taxonomy: Updates since the 8th Report, 2009. http://stalcitvonlineorg/files/proposals/taxonomy_proposal_vertibrate1/m/vert04/4068.aspx, accessed November 2013

46 Badfrane, H., Bahloul, C., Perrin, P., and N. Tordo. 2001. Evidence of two *Lyssavirus* Phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J. Virol.*, 75; 3268-76

47 Freuling, C.M., Muller, T., Marston, D., Fooks, A.R., Rupprecht, C.E., and I. Kuzmin. 2011. Updates on the diversity of the *Lyssavirus* genus. *Rabies Bull. Eur.* 35: 4, quarter 4, 8-10

48 Boulger, L.R., Porterfield, J.S. 1958. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. *Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 52:421-24

49 Kemp, G.E., Causey, O.R., Moore, D.L., Odeola, A., Fabiyi, A. 1972. Mokola virus: further studies on IbAn 273777, a new rabies-related etiologic agent of zoonosis in Nigeria. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 356-59

50 Meredith, C.D., Prossouw, A.P., and H.P., Koch. 1971. An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. *South African Med. J.*, 45: 767-69

51 Pawesska, J.T., Blumberg, L.H., Liebenberg, C., Hewlett, R.H., *et al.*, 2006. Fatal human infection with rabies-related Duvenhage virus, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 12:1965-67

52 Van Thiel, P., van den Hoek, J., Eftimov, F., Tepaske, R., *et al.*, 2008. Fatal case of human rabies (Duvenhage virus) from a bat in Kenya: the Netherlands, Dec. 2007. *Eurosurveillance*, 13:118

53 Mohr, W. 1957, Die tollwut. *Medizinische Klinik*, 52: 1057-60

54 Fekadu, M., Shaddock, J.H., Chandler, F.W. and D.W. Sanderlin. 1988. Pathogenesis of rabies virus from a Danish bat (*Eptesicus serotinus*): neuronal changes suggestive of spongiosis. *Arhiv. Virol.*, 99: 187-203



- 55 Amengual, B., Whitby, J., King, A., Cobo, J.S., and H. Bourhy. 1997. Evolution of European Bat Lyssaviruses. *J. Gen. Virol.*, 78: 2319-28
- 56 Lumio, J., Hilborn, M., Roine, R., *et al.*, 1986. Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet*, 1: 378
- 57 Freulin, C., Grossmann, e., Conraths, F.J., *et al.* 2008. First isolation of EBLV-2 in Germany. *Vet. Microbiol.*, 131:26-34
- 58 Fraser, G.C., Hooper, P.T., Lunt, R.A. *et al.*, 1996. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 2:327-31
- 59 Hanna, J.N., Carney, I.K., Smith, G.A., *et al.*, 2000. Australian bat Lyssavirus infection: a second human case, with a long Incubation period. *Med. J. Austr.* 172: 597-99
- 60 Kuzmin, I.V., Botvinkin, A.D., Rybin, S.N. and A.B. Baialiev. 1992. A Lyssavirus with an unusual antigenic structure isolated from a bat in southern Kyrgyzstan. *Voprosy Virusologii*, 37: 256-59
- 61 Arai, Y.T., Kuzmin, I., Kamoka, Y. and A.D. Botvinkin. 2003. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 333-337
- 62 Kuzmin, I.V., Orciari, L.A., Arai, Y.T., *et al.*, 2003. Bat Lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res.*, 97: 65-79
- 63 Belikov, S., Leonova, G., Kondratov, I., Romanov, E. and E. Pavlenko. 2009. Isolation and genetic characterization of a new Lyssavirus strain in the Primorskiy kray, East Siberian. *East Sib. J. Infect. Pathol.*, 16:68-69
- 64 Kuzmin, I.V., Hughes, G.J., Botvinkin, A.d., Orciari, L.A., and C.e. Rupprecht. 2005. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for Lyssavirus genotype definition. *Virus Res.* 111: 1519-22
- 65 Kuzmin, I.V., Mayer, A.E., Niezgodna, M., *et al.*, 2010. Shimoni bat virus, a new representative of the *Lyssavirus* genus. *Virus Res.*, 149: 197-210

- 66 Picard-Meyer, E., Servat, A., Robardet, E., Moinet, M., Borel, C.M and F. Cliquet. 2013. Isolation of Bokeloh bat lyssavirus in *Myotis nattereri* in France. *Archives Virol.*, Jun. 12
- 67 Freunling, C.M., Beer, M., Conraths, F.J., Finke, S., Hoffmann, B., Keller, B., Kliemt, J., Mettenleiter, T.C., Muhlbach, E., Teifke, J.P., Wohlsein, P., and T. Muller. 2011. Novel *Lyssavirus* in Natteres's bat, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 17, 1519-22
- 68 Marston, D.A., Horton, D.L., Ngeleja, C., Hampson, K., McElhinney, L.M., Banyard, A.C. *et al.*, 2012. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(4), 664-67
- 69 Arechiga Ceballos, N., Vazquez Moron, S., Berciano, J.M., Nicolas, O., Aznar López, C., Juste, J. *et al.*, 2013. Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 19(5), 793-95
- 70 Vazquez, S., Juste, J., Ibañez, C., Berciano, J.M. and J.E. Echevarría. 2011. Phylogeny of European Bat Lyssavirus 1 in *Eptesicus isabellinus* bats. Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17(3):520-23
- 71 Muller, T., Cox, J., Peter, W., Schafer, R., Johnson, N., McElhinney, L.M. *et al.*, 2004. Spill-over of European bat lyssavirus type I into a stone marten (*Martes fimba*) in Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 51(2): 190-201
- 72 Dacheux, L., Larrous, F., Mailles, A., Boisseleau, D., Delmas, O., Biron, C. *et al.*, 2009. European bat lyssavirus transmission among cats, Europa. *Emerg. Infect. Dis.* 15(2):280-04
- 73 Tjornehoj, K., Fooks, A.R., Agerholm, J.S., Ronsholt, L., 2006. Natural and experimental infection of sheep with European bat lyssavirus type-1 of Danish bat origin. *J. Comp. Pathol.* 134(2-3): 190-201
- 74 McCail, B.J., Epstein, J.H., Neill, A.S. *et al.* 2000. Potential exposure to Australian bat lyssavirus. Queensland, 1996-1999. *Emerg. Infect. Dis.*, 6(3):259-64
- 75 CDC. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report. Feb. 26, 2010. Presumptive Abortive Human Rabies-Texas, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Weekly/Vol59/nº7*, 185-190



- 76 Madhusudana S.N., Nagaraj D., Uday M., Ratnavalli E., Kumar M.V. 2002 Partial recovery from rabies in a six-year-old girl. *Int. J. Infect. Dis.* 6: 85–86.
- 77 Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Recovery of a patient from clinical rabies—California, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 61: 61–65.
- 78 Willoughby RE, Jr., Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond, CM, *et al.* 2005 Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* 352: 2508–2514.
- 79 Hamir, A.N., Niezgodna, M. and Ch.E. Rupprech. 2011. Recovery from a clearance of rabies virus in a domestic ferret. *J. Am. Assoc. Lab. Animal Sci.*, 50:2, 248-51
- 80 Doege, T.C. and R.L. Northrop. 1974. Evidence for inapparent rabies infection. *Lancet* II, 826-829
- 81 Fekadu, M., and G.M. Baer. 1980. Recovery from clinical rabies of 2 dogs inoculated with a rabies virus strains from Ethiopia. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1632-34
- 82 Fekadu, M. 1972. Atypical rabies in dogs in Ethiopia. *Ethiop. Med. J.*, 10: 79-86
- 83 Fekadu, M., Shaddock, J.H., and G.M. Baer. 1981. Intermittent excretion of rabies virus in the saliva of a dog two and six months after it had recovered from experimental rabies. *Am.J. Trop. Med. Hyg.*, 30:L 1113-15
- 84 Gordon, E.R., Curns, A.T., Krebs, J.W., Rupprecht, C.E. Real, L.A. and J.E. Childs. 2004. Temporal dynamics of rabies in a wildlife host and the risk of cross-species transmission. *Epidemiol. Infect.* 132: 515-24
- 85 Calisher, Ch.H., and J.A. Ellison. 2012. The other rabies viruses: the emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. *Travel Med. And Infect. Dis.*, 10, 69-79
- 86 Bourhy, H. Rabies in Europe. Colloquium rabies and emerging viral diseases in North Africa and Western Europe. 6th and 7th june 2009. Hammamet, Tunisia, pg: 14-15
- 87 El Harrak, M., 2011. OIE conference on rabies Control. Incheon (Republic of Korea), 7-9 september

- 88 Ichraf, Z., Kamel, E., and Ch. Bahloul. Situation of rabies in Tunisia. Colloquium rabies and emerging viral diseases in North Africa and Western Europe. 6th and 7th June 2009. Hammamet, Tunisia, pg: 16
- 89 Touihri, L., Zaquia, I., Elhili, K., Dellagi, K. and Ch.Bahloul. Evaluation of mass vaccination campaign coverage against rabies in dogs in Tunisia. Colloquium rabies and emerging viral diseases in North Africa and Western Europe. 6th and 7th June 2009. Hammamet, Tunisia, pg: 25
- 90 Chirag, T., Holmes, E.C. et al., Evolutionary history and dynamics of dog virus in western, northern and central Africa. Colloquium rabies and emerging viral diseases in North Africa and Western Europe. 6th and 7th June 2009. Hammamet, Tunisia, pg: 31-32
- 91 Gautret, P. Ribadeau-Dumas, F., Parola, P., Brouqui, P., and H. Bourhy. 2011. Risk for rabies importation from North Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 17(12): 2187-2193
- 92 El Harrak, M., Epidemiological situation of rabies in Morocco and control strategy. Sadat City, 19 April 2008
- 93 Mailles, A., Boisseleau, D., Dacheux, L., Michalewicz, C., Gloaguen, C., Ponçon, N., Bourhy, H., Callon, H., Vaillant, V., Dabosville, I., and P. Morineau-Le Houssine. 2011. Rabid dog illegally imported to France from Morocco, August 2011. *Eurosurveillance*, 16(33)1-3
- 94 Van Rijckewaresel, G.G., Swaan, C.M., Van den Bergh, J.P.,Goorhuis, A., Baayen, D., Isken, L., Timen, A. and A. van den Hoek. 2012. Rabid puppy-dog imported into the Netherland from Morocco via Spain, February 2012. *Eurosurveillance*, 17(10). 1-3
- 95 Weiss B, Hoffmann, U. Freuling, C. Müller, T.,Fessler, M. Renner, C. 2009. Rabies exposure due to an illegally imported dog in Germany. *Rabies Bulletin Europe.*;33:5–7.
- 96 Toma, B. 2005. Fox rabies in France. *Eurosurveillance*, 10:10-12
- 97 De Benedictis, P, Gallo, T, Lob, A, Coassin, R, Squecco, G, Ferri, G. 2008. Emergence of fox rabies in north-eastern Italy. *Eurosurveillance*.13(45):pii:19033
- 98 Tsiodras, S., Dougas, G. et al., 2013. Re-emergence of animal rabies in northern Greece and subsequent human exposure, october



2012-march 2013. *Eurosurveillance*, 18: 18, 1-3

99 De Benedictis, P., Marciano, S., Veggiato, C., Capua, I., and F. Mutinelli. Emergence of fox rabies in North-Eastern Italy: the new scenario. Colloquium rabies and emerging viral diseases in North Africa and Western Europe. 6th and 7th June 2009. Hammamet, Tunisia, pg: 17

100 Mutinelli, F., Stankov, S., Hirstovski, M., Seimenis, A., Theoharakou, H., and I. Vodopija. Rabies in Italy, Yugoslavia, Croatia, Nosbina, Slovenia, Macedonia, Albania and Greece. In: King, A.A., Fooks, A.R., Wandeler, A., Aubert, M. (Eds). Anonymous Historical Perspectives of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin. OIE publications. Paris. 2004

101 Fusaro, Al, Monne, I., *et al.*, 2013. The introduction of fox rabies into Italy (2008-2011) was due to two virtual genetic groups with distinct phylogeographic patterns. *Infect. Genet. Evolut.*, 17: 202-209

102 Liu, Y., Zhang, S., Wu, X., Zhao, J., Hou, Y., Zhang, F., Velasco-Villa, A., Rupprecht, C.E. and R.Hu. 2010. Ferret badger rabies origin and its revisited importance as potential source of rabies transmission in Southeast China. *BMC Infect. Dis.*, 10: 234-41

103 Zhang, S., Tang, Q., Wu, X., Liu, Y., Zhang, F., Rupprecht, Ch.E., and R.Hu. 2009. Rabies in ferret badgers, Southeastern China. *Emerg. Infect. Dis.*, 15: 6, 946-49

104 Regulation EC No 998/2003 of the European Parliament and of the Council, of 26 Mayo 2003, on the animal health requirements applicable to the non-commercial movement of pet animals and amending Council Directive 92/65/EEC

105 Niezgoda, M., Briggs, D.J., Shaddock, J., Dreesen, D.W. and C.E. Rupprecht. 1997. Pathogenesis of experimentally induced rabies in domestic ferrets. *Am. J. Vet. Res.*, 58(11): 1327-31

106 Hamir, A.N., Niezgoda, M. and Ch. Rupprecht. 2011. Recovery from and clearance of rabies virus in a domestic ferrets. *J. Am. Assoc. Lab. Animal Sci.*, 50:2, 248-251

107 García, J.T., García, F.J., Alda, F., González, J.L., Aramburu, M.J. *et al.*, 2012. Recent invasión and status of the racoon (*Procyon lotor*) in Spain. Biological Invasions, DOI 10.1007/s10530-011-0157-x

- 108 Fernández-Aguilar, X., Molina-Vacas, G., Ramiro, V. *et al.* 2012. Presence of racoon (*Procyon lotor*) in Doñana National Park and its surroundings. *Galemys*, 24: 76-79
- 109 Beltran-Beck, B., García, F.J. and C. Gortázar. 2012. Raccoons in Europe: disease hazards due to establishment of an invasive species. *Eur. J. Wild. Res.* 58: 5-15
- 110 Vos, A., Nolden, T., Habla, Ch., Finke, S., Freuling, C.M., Teifke, J. and T. Müller. 2013. Raccoons (*Procyon lotor*) in Germany as potential reservoir species for Lyssaviruses. *Eur. J. Wild. Res.* 59: 637-43
- 111 Real Decreto 1628/2011, de 14 de noviembre, por el que se aprueba el catálogo español de especies exóticas invasoras
- 112 Sutor, A., Schwarz, S., and F.J. Conraths. 2014. The biological potential of the raccoon dog (*Nyctereutes procytonoides*), Gray 1834) as an invasive species in Europe –new risks for disease spread?. *Acta Theriol.* 59: 49-59
- 113 Singer, A., Kauhala, K., Holmala, K. and G.C. Smith. 2008. Rabies risk in raccoon dogs and foxes. *Dev. Biol. (Basel)*, 131: 213-22
- 114 Sánchez Serrano, L.P.; Abellán García, C., 2003. The new face of rabies in Spain: infection through insectivorous bats, 1987-2002. *Eurosurveillance* 7(27)
- 115 Fooks, A.R., Brookes, S.M., Johnson, N., McElhoinney, L.M., and A.M. Hutson. 2003. European Bat Lyssaviruses: an emerging zoonosis. *Epidemiol. Infect.* 131: 1029-1039
- 116 Office International des Epizooties 1998. Rabies in Denmark: in sheep. *Dis. Info.*, 11(34), 116. También en *Rabies Bull. Europe*, 1998, 22:3, pag. 3 y 5
- 117 Müller, T., Cox, J., Schafer, R. *et al.* 2004. Spill-over of European Bat Lyssavirus type1 into a stone marten (*Martes foina*) in Germany. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 51: 49-54
- 118 Anonimous 1998. Summary of rabies in Europe. Denmark, and Rabies in individual countries, *Rabies Bull. Europe*, 22, 4, pag. 3 and 6
- 119 McColl, K.A., Tordo, N., and A.A. Setien. 2000. Bat lyssavirus infections. *Rev. Sci. Techn. OIE*, 19(1), 177-196



- 120 Ronsholt, L. 2002. A new case of European Bat Lyssavirus (EBL) infection on Danish sheep. *Rabies. Bull. Europe*, 26:2, 15
- 121 Tjornehoj, K., Fooks, A.R. *et al.*, 2006. Natural and experimental infection of sheep with European bat Lyssavirus type-1 of Danish bat origin. *J. Comp. Path.* 134:190-201
- 122 Brookes, S.M., Klopfleish, R., *et al.* 2007. Susceptibility of sheep to European bat lyssavirus type-1 and -2 infection: a clinical pathogenesis study. *Vet. Microbiol.*, 125: 210-23
- 123 WHO. WHO Technical Report Series nº 931. WHO expert consultation on rabies. First Report. Geneve, 2004
- 124 WHO. WHO Expert Consultation on Rabies. WHO Technical Report Series 982. Second Report, Geneva, 2013
- 125 Cleaveland, S., Kaare, M., Tiringa, P., Mlenmgeya, T. and J. Barrat. 2003. A dog rabies vaccination campaign in rural Africa: impact on the incidence of dog rabies and human dog-bite injuries. *Vaccine*, 21, 1965-73
- 126 Hampson, K., Dukshoff, J., Cleaveland, S., Haydon, D.T., Kaare, M., Packer, C., and A. Dobson. 2009. Transmission dynamics and prospects for the elimination of canine rabies. *PLoS Biology*, 7, 462-71
- 127 OIE. Rabies. OIE Terrestrial Manual 2008. Chapter 2.1.13, 304-323
- 128 Morters, M.K., Restif, OI, Hampson, K., Cleaveland, S., Wood, J.L.N., and An J.K. Conlan. 2013. Evidence based control of canine rabies: a critical review of population density reduction. *J. Animal Ecol.*, 82, 6-14
- 129 Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T. *et al.*, 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*, 5, 730-37
- 130 Irwin, D.J., Wunner, W.H., Ertl, H.C., and A.C. Jackson. 1999. Basis of rabies virus neurovirulence in mice: expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs. *J. Neurovirol.*, 5, 485-94
- 131 Camelo, S., Lafage, M., and M. Lafon. 2000. Absence of the p55Kd TNF- α receptor promotes survival in rabies virus acute encephalitis. *J.*



Neurovirol., 6, 507-18

132 Wang, Z.W., Sarmento, L., Wang, Y. *et al.* 2005. Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune response in the central nervous system. *J. Virol.* 79: 12554-65

133 Jackson, A.C., Rossiter, E., and M. Lafon. 2006. Expression of Toll like receptor in the human cerebellar cortex in rabies, herpes simplex encephalitis and other neurological diseases. *J. Neurovirol.*, 12, 229-34

134 Lafon, M. Immunology. In 'Rabies' 2th Edit. Edit. By Alan C. Jackson and William H. Wunner. Elsevier, 2007

135 Wunderli, P.S., Shaddock, J.H., Schmid, D.S., Miller, T.J., Baer, G.M. 1991. The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccines. *Vaccine*, 9: 638-642

136 Blancou, J., Aubert, M.F., Cain, E., Selve, M. *et al.* 1989. Effect of strain differences on the potency testing of rabies vaccine in mice. *J. Biol. Stand.* 17:259-266

137 Larson, J.K., Wunner, W.H., Otvos, L. Ertl, H.C. 1991. Identification of an immunodominant epitope within the phosphoprotein of rabies virus that is recognized by both class I and class II- restricted T cells. *J. Virol.*, 65, 5673-79

138 Galtier V. 1881. Les injections de virus rabique dans le torrent circulatoire ne provoquent pas lécllosion de la rage et semblant conférer l'immunité. La rage peut être transmise par l'ingestion de la matière rabique. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*; 93:284-5.

139 Pasteur L.1885. Méthode pour prévenir la rage après morsure. *C R Acad Sci (Paris)*;1886, 101:765-74 y **102**:459-69, 835-38; 1887, **103**:777-85.

140 Polanco, A. 2012. La batalla del doctor Jaume Ferrán i Clua. En 'Historia de Iberia vieja', 96: 30-33

141 Wiktor, J.J., and H.F. Clark, en G.M. Baer (edit.) 'The natural history of rabies'. Chapt. 9, pág. 155-177. Academic Press Inc, N.Y., 1975

142 Vienchanage, J., Vialat, C., Gruet, J., et R. Bequignon. 1956.



Essais de culture in vitro du virus rabique des rues. *Ann. Inst. Pasteur*, 90, 361-363

143 Kissling, R.E. 1958. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 98: 223-

144 MacPherson, I. and M. Stoker, 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones –an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*. 16: 147-151

145 Hayflick, L. and P.S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Res.* 25, 585-621

146 Koprowski, H. 1954. Biological modification of rabies virus as a result of its adaptation to chicks and developing chick embryos. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 10: 709-724.

147 Koprowski, H., and H.R. Cox. 1948. Studies on chick embryo adapted rabies virus; culture characteristics and pathogenicity. *J. Immunol.* 60: 533-

148 Kiprowski, H. and J. Black. 1950. Studies on chick embryo adapted rabies virus. III. Duration of immunity in vaccinated dogs. *J. Immunol.* 64: 410-415

149 Bankovsky, D., Safaonov, g., Kurilchuk, Y. 2008. Immunogenicity of the ERA G 333 rabies virus strain in foxes and raccoon dogs. *Dev. Biol.* (Basel), 131: 461-66

150 Esh, J.B., Cunningham, J.G. and T. Wiktor. 1982. Vaccine-induced rabies In four cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180: 1336-39

151 Oboegbulem, S.I., Okolo, M.I.O., and E.E. Erojikwe. 1987. Rabies in vaccinated dogs: observations. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 6(1): 69-76

152 Constantine, D.G., Bayer, E.V. and G.L. Humphrey. 1978. Vaccine-induced canine rabies, California. *MMWR*. Atlanta. Georgia, 27: 224-25

153 Schumacher, C.L., Coulon, P., Lafay, F. et al. 1993. *Onderstepoort, J.Vet.Res.*, 60(4): 459-62

154 Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad y Consumo

- 155 National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). Compendium of Animal Rabies Prevention and Control, 2011. *MMWR/Nov. 4*, 60:6, 1-17
- 156 Rupprecht, C.E., Hanlon, C.A., Blanton, J., Manangan, J. *et al.* 2005. Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus vaccines. *Virus Res.* 111:1, 101-105
- 157 Kieny, M., Lathe, R., Drillien, R. *et al.*, 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, 312, 163-166
- 158 Wiktor, T.J., macfarlán, R.I., Reagan, K.J. *et al.*, 1984. Protection from rabies by a vaccinia recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 81: 7194-98
- 159 Vos, A., Neubert, A., Aylan, O. *et al.*, 1999. An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species. *Epidemiol. Infect.* 123, 165-175
- 160 Rupprecht, C.E., Wiktor, T.J., Johnston, D.H. *et al.* 1986. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proced. Nat. Acad. Sci. USA.* 83, 7947-50
- 161 Taylor J., Trimarchi, C., Weinberg, R. *et al.* 1991. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine* 9, 190-93
- 162 Taylor, J., Meignier, B., TGartaglia, J. *et al.* 1995. Biological and immunogenic properties of a canary poxrabies recombinant. ALVAC-RG (Vcp65) in non-avian species. *Vaccine* 13, 539-549
- 163 Esposito, J.J., Knight, J.c., Shaddock, J.H., Novembre, F.J., and G.M. Baer. 1988. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Virology* 165, 313-16
- 164 Taylor, J., Weinberg, R., Languet, B., Desmettre, P. and E. Paoletti. 1988. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* 6, 497-503
- 165 Tuboly, T. and E. Nagy. 2001. Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the



transmissible gastroenteritis virus spike gene. *J. Gen. Virol.* 82(1) 183-190

166 Hu, R., Zhang, S., Fooks, A.R., Yuan, H., Liu, Y., Li, H., Tu, Ch., Xia, X. and Y. Xiao. 2006. Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies virus glycoprotein. *Microb. Infect.* 8, 1090-97

167 Yang, Y., Ertl, H.c.IJ. and J.M. Wilson. 1994. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to virtual antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity*, 1, 433-442

168 Qian, P., Li, X.M., Jin, M.L., Peng, G.Q. and H.C. Chen. 2004. An approach to a FMD vaccine based on genetic engineered attenuated pseudorabies virus: one experiment using VP1 gene alone generates an antibody responds on FMD and pseudorabies in swine. *Vaccine*, 22 (17-18):2129-36

169 Klupp, B.G., Hengaratner, C.J., Mettenleiter, T.C., Enquist, L.W. 2004. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *J. Virol.*, 78:424-40

170 Olsen, L.M., Ch'ng, T.H., Card, J.P., Enquist, L.W. 2006. Role of pseudorabies virus US3 protein kinase during neuronal infection. *J. Virol.*, 80: 6387-98

171 Kimman, sT.G., de Wind, N., Oei-Lie, N., Pol, J.M., Berns, A.J., Gielkens, A.L., 1992. Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. *J. Gen. Virol.*, 73(Pt2), 243-51

172 Yuan, Z., Zhang, S., Liu, Y., Zhang, F., Fooks, A.R. Li, Q. and R. Hu. 2008. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine*, 26, 1314-21

173 Manninger, R. 1968. Rabies in Hungary during the past forty years. *Magy. Allatorv. Lap.*, 23, 5-15 (cit. En OMS)

174 Cleaveland, S. 1998. Epidemiology and control of rabies. The growing problem of rabies in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 131-134



- 175 Cleaveland, S., Kaare, M., Knobel, D., and M. K. Laurenson. 2006. Canine vaccination—Providing broader benefits for disease control. *Vet. Microbiol.*, 117, 43-50
- 176 Baer, G.M. Abelseh, M.K. and J.G. Debbie. 1971. Oral vaccination of foxes against rabies. *Amer. J. Epidemiol.*, 93, 487-90
- 177 Rosatte, R. Howard, D., Campbell, J. and C. MacInnes. 1990. Intramuscular vaccination of skunks and raccoons against rabies. *J. Wildlife Dis.*, 26, 225-30
- 178 Rupprecht, C.E., Hanolon, C.A. and Slate, D. 2004. Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control. *Develop. Biology* (Basel), 119, 173-84
- 179 Isara, A., Bressan, G. and F. Multinelli. 1990. Sylvatic rabies in Italy: Epidemiology. *J. Vet. Med.*, B37, 53-63
- 180 Aubert, M.F.A., Masson, E., Artois, M. and J. Barrat 1994. Oral wildlife rabies vaccination field trials in Europe, with recent emphasis on France. *Current Topics Microb. Immunol.*, 187, 219-43
- 181 Wandeler, A., W., Prochaska, S. and F. Steck. 1982. Small mammal studies in a SAD baiting area. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 173-76
- 182 Schneider, L. and J. Cox. 1988. Eradication of rabies through oral vaccination. The German field trial. In 'Vaccination to control rabies in foxes' (P. Pastoret *et al.*, Eds). Commission of the European Communities.
- 183 Pastoret, P.P., Kappeler, A. and Aubert, M. European rabies control and its history. In: King, A.A., Fooks, A.R., Aubert, M., Wandeler, A.I., (eds.). *Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean basin.* 2004; 337-347
- 184 Brochier, B., Deschamps, P., Costy, F. *et al.*, 2001. Elimination of sylvatic rabies in Belgium by oral vaccination of the red fox (*Vulpes vulpes*). *Ann. Med. Vet.*, 145, 293-305
- 185 Artois, M., Guittre, C., Thomas, I., Leblois, H., Brochier, B. and J. Barrat 1992. Partial pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: a comparison. *Vaccine*, 10, 524-28



- 186 Lambot, M., Blasco, E., Barrat, J. *et al.*, 2001. Humoral and cell-mediated immune response of foxes (*Vulpes vulpes*) after experimental primary and secondary oral vaccination using SAG2 and VRG vaccines. *Vaccine*, 19, 1827-35
- 187 Knobel, D., Lieneberg, A. and J.T. Du Toit 2003. Seroconversion in captive wild dogs (*Lycaon pictus*) following administration of a chicken head bait/SAG-2 oral rabies combination. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 70, 73-77
- 188 Pastoret, P. and B. Brochier, 1999. Epidemiology and control of fox rabies in Europe. *Vaccine*, 17, 1750-54
- 189 Kieny, M.P., Iatke, R., Dirillien, R. *et al.*, 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from recombinant vaccinia virus. *Nature*, 312, 163-166
- 190 Wiktor, T.J., Macfarlane, R.I., Reagan, J.J. *et al.*, 1984. Protection from rabies by a vaccinia recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Nat. Acad. Sc., USA*, 81, 7194-98
- 191 Artois, M. 2003. Wildlife infectious disease control in Europe. *J. Mountain Ecol.* 7, 89-97
- 192 Berndtsson, L.T. Nyman, A-K.J., Rivera, E. and B. Klingeborn. 2011. Factors associated with the success of rabies vaccination of dogs in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 53:22,1-7
- 193 Cliquet, F., Verdier, Y., Sagné, L., Auibert, M., Schereffer, J.L., Selve, M., Wasniewski, M. and A. Servat. 2003. Neutralising antibody titration in 25,000 sera of dogs and cats vaccinated against rabies in France, in the framework of the new regulations that offer an alternative to quarantine. *Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz.* 22(3): 857-866
- 194 Jakel, J., König, M., Cussler, K., Hanschmann, K., and H.J. Thiel. 2008. Factors influencing the antibody response to vaccination against rabies. *Dev. Biol. (Basel)*, 131: 431-437
- 195 Schultz, R.D. *et al.*, 2010. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *J. Comp. Path.* Vol. 142, S102-S108
- 196 Minke, J.M., Bouvet, J. Cliquet, F., Wasniewski, M., Guiot, A.L., Lemaitre, L., Cariou, C., Cozette, V., Vergne, L. and P.M. Guigal. 2009. Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Vet. Microbiol.*, 133(3), 283-6

- 197 Verteuil, E. and F.W. Urich. 1935. The study and control of paralytic rabies transmitted by bats in Trinidad. *British West Indies. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 4(29): 317-51
- 198 Málaga, A.A. y S.C. Campillo. 1957. Rabia humana transmitida por murciélagos: confirmación del primer caso en México. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 42(6):567-70
- 199 Scheider, M.C., Romijn, P.C., Uieda, W., Tamayo, H., Fernandes de Silva, D., Belotto, A., Barbosa, J., and L.F. Leanes. 2009. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America?. *Rev. Panam. Salud Pública* 25(3), 260-269
- 200 Noah, D.L., Drenzek, C.H.L., Smith, J.S., Krebs, J.W., Orciari, L., Shaddock, J., Sanderlin, D., Whitwefield, S., Fekadu, M., Olson, J.G., Rupprecht, C.E., and J.E. Childs 1998. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. *Ann. Int. Med.*, 128: 922-30
- 201 Kuzmin, I.V. and Ch. E. Rupprecht. Bat Rabies. In 'RABIES', 2th Edit. Alan C. Jackson and William H. Wunner. Elsevier, 2007, pag. 259-307
- 202 Directiva 92/43/CEE, de 21 de mayo de 1992, referente a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres, con declaración de especies de interés comunitario que requieren protección estricta (se incluyen quirópteros). Modificada y adaptada por la Directiva 97/62/CEE, de 27 de octubre
- 203 Real Decreto 1997/1995, de diciembre, por el que se establecen medidas para contribuir a garantizar la biodiversidad mediante la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres.
- 204 Acha, P.N. and A. Málaga Alba. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In 'Natural history of vampire bats'. M.A. Greenhall and U. Schimidt (edts). CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida, pag 208-13
- 205 Linhart, S.B., Flores Crespo, R., Mitchell, G.C. 1972. Control de murciélagos vampiros por medio de un anticoagulante. *Bol. Of. Sanit. Panamer.* 73, 100-09
- 206 Muller, T., Johnson, N., Freuling, C.M., Fooks, A.R., Selhorst, T. and A. Vos. 2007. Epidemiology of bat rabies in Germany. *Arch. Virol.*, 152, 273-288



- 207 Abellán, C., Garrido, M., Martínez, B., Sánchez, L., Echevarría, L.E., Amengual, B., Borrás, M. y J. Serra. La Zoonosis Rábica en Quirópteros: Manual de Buenas Prácticas y Manejo de los Murciélagos. Ministerio de Sanidad y Consumo Serie de Informes, Estudios e Investigación. Madrid, 2008. www.msc.es
- 208 Serra-Cobo, J., Amengual, B., Abellan, C. and Bourhy, H. 2002. European bat lyssavirus infection in Spanish bat populations. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 413-420.
- 209 Linhart, S.B., Flores Crespo, R. and C.G. Mitchell. Control of vampire bats. In 'Natural history of vampire bats' A.M. Greenhall and U. Schmidt, Edits. CRC Press. Boca Ratón. Florida. USA. 1972.
- 210 Thomson, R., Mitchell, G.C. and R. J Burns. 1972. Vampire bat control by systemic treatment of livestock with an anticoagulant. *Science.* 177, 806-08
- 211 Hanlon, C.A., Kuzmin, I.V., Blanton, J.D., Weldon, W.C., Mannagan, J.S., and C.E. Rupprecht. 2005. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.*, 111: 44-54
- 212 Aguilar-Setien, A., Brochier, B., Tordo, N., De Paz, O., Desmettre, P., Péharpré, D. and P.P. Pastoret. 1998. Experimental rabies infection and rabies vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine*, 16: 1122-26
- 213 Aguilar-Setien, A., León Campos, Y., Tesoro Cruz, E., Kretschmer, R., Brochier, B., and P.P. Pastoret. 2002. Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies virus. *J. Wildlife Dis.*, 3S(3), 539-44
- 214 Almeida, M.F., Martorelli, L.F.A., Aires, C.C., Sallum, P.C. and E. Massad. 2005. Indirect oral immunization of captive vampires, *Desmodus rotundus*. *Virus Res.*, 111: 77-82
- 215 Almeida, M.F., Martorelli, L.F.A., Aires, C.C., Barros, R.F. and E. Massad. 2008. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. *Virus Res.* 137:275-77
- 216 Bonito, R.F., de Oliveira, N.M., Nishioka, S de A. 2004. Adverse reactions associated with a fuenzalida-palacios rabies vaccine: a quasi-experimental study. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 37:7-9
- 217 WHO Expert Committee on rabies. World Health Technical



Repport Series. 1984. 709: 1-104

218 Wu, X., Smith, T.G., Rupprecht, C.E. 2011. From brain passage to cell adaptation: The road of human rabies vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines*, 10: 1597-1608

219 Wiktor, T.J., Fernandes, M.W., Koprowski, H. 1964. Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain Wi-38. *J. Immunol.*, 93: 353-66

220 Bahmanyar, M., Fayaz, A., Nour-Salehi, S., Mohammadi, M., and H. Koprowski. 1976. Successful protection of humans exposed to rabies infection. Postexposure treatment with the new human diploid cell rabies vaccine and antirabies serum. *JAMA*, 236: 2751-2754

221 Rupprecht, C.E., Briggs, D., Brown, C.M., Franka, R., Katz, S.L., Kerr, H.D., Lett, S.M., Levis, R., Meltzer, M.I., Schaffner, W., Cieslak, P.R. 2010. Use of a reduced (4-dose) vaccine schedule for postexposure prophylaxis to prevent human rabies: recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Recomm. Rep.* 59: 1-9

222 Dreesen, D.W., Fishbein, D.B., Kemp, D.T., Brown, J. 1989. Two-year comparative trial on the immunogenicity and adverse effects of purified chick embryo cell rabies vaccine for pre-exposure immunization. *Vaccine*, 7:397-400

223 Suntharasamai, P., Warrell, M.J., Warrell, D.A., Vraván, C., Looareesuwan, S., Supanaranond, W. et al. 1986. New purified vero-cell vaccine prevents rabies in patients bitten by rabid animals. *Lancet*, 2: 129-131

224 WHO. Prequalified Vaccines. 2011. In: [www://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/rabies/en/index.html](http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/rabies/en/index.html)

225 Briggs, D.J. 2012. The role of vaccination in rabies prevention. *Current Op. Virol.*, 2:309-14

226 Gerichter, C.B., Shtark, JH., and I. Braunstein. 1978. Clinical trial with an antirabies human diploid cell vaccine (hdcv): *Dev. Biol. Stand.* 41: 241-44

227 Vodopija, I. Sureau, P., Smerdel, S., Lafon, M., Baklaic, Z, Ljubivic, M. and M. Svjetlicic. 1988. Comparative study of two human dip-



loid rabies vaccines administered with antirabies globulin. *Vaccine*, 6: 489-90

228 Vodopija, R., Lafon, M., Baklaic, Z., Ljubicic, M., Svjetlicic, M. and I. Vodopija. 1997. Persistence of humoral immunity to rabies 1100 days after immunization and effect of a single booster dose of rabies vaccine. *Vaccine*, 15:571-574

229 Rupprecht, C.E., Briggs, D., Brown, C.M., Franka, R., Kat, S.L. *et al.*, 2010. Use of a reduced (4-dose) vaccine schedule for post-exposure prophylaxis to prevent human rabies: recommendations of the advisory committee on Immunization practices. *MMWR Recomm. Rep.* 59: 1-9

230 McColl, K.A., Tordo, N. and A. Aguilar-Setien. 2000. Bat lyssavirus infections. *Rev.Sci.Tech. Off. Int. Epiz.* 19(1), 177-96

231 Herzog, M., Fritzell, C., Lafage, M., Montano-Hirose, J.A., Scott-Algara, D. and M. Lafon. 1991. T and B cell human responses to European bat lyssavirus after post-exposure rabies vaccination. *Clin. Experim. Immunol.*, 85, 224-230

232 Perrin, P., Joffret, M.L., Zanetti, C., Bourhy, H. Gontier, C., Fritzell, C., Leclerc, C. and P. Sureau. 1991. Rabies-specific production of IL-2 by peripheral blood lymphocytes from human vaccines. *Vaccine*, 9, 549-58

233 Babes, V., et M. Lepp. 1889. Recherches sur la vaccination antirabique. *Ann. Inst. Pasteur*, 3: 384

234 Cabasso, V.J. Passive Immunization. In ' Baer, G.M. –Edit-. The Natural History of Rabies. Vol. II. Academic Press. New York. 1975. Pág. 319-340

235 Bakker, A.B., Python, C., Kissling, C.J., Pandya, P., Marissen, W.E. *et al.* 2008. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus safety, tolerability and neutralizing activity. *Vaccine*, 26: 5922-27

236 Warrell, M.J., 2012. Current rabies vaccines and prophylaxis schedules: preventing rabies before and after exposure. *Travel Med. Infect. Dis.*, 10: 1-15

237 Suwansrinon, K., Jaijareonsup, W., Wilde, H., Benjavongkul-

- chai, M., Sriarron, C. and V. Sitprija. 2007. Sex- and age-related differences in rabies immunoglobulin hypersensitivity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101: 206-08
- 238 Bourhy, H., Goudal, M., Mailles, A., Sadkowska-Todys, M., Dacheux, L., and H. Zeller. 2009. Is there a need for anti-rabies vaccine and immunoglobulins rationing in Europe?. *Eurosurveillance*, 14.
- 239 Wiktor, T.J., and H. Koprowki. 1978. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3938-42
- 240 Schumacher, C.L., Dietzschold, B., Ertl, H.C., Niu, H.S., Rupprecht, C.E., and H. Koprowski. 1989. Use of mouse anti-rabies monoclonal antibodies in postexposure treatment of rabies. *J. Clin. Invest.* 3: 971-75
- 241 Bakker, A.B., Python, C., Kissling, C.J., Pandya, P., Marissen, W.E., Brink, M.F. *et al.* 2008. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus: safety, tolerability and neutralizing activity. *Vaccine*, 26: 5922-27
- 242 Ko, K., Tekoah, Y., Rudd, P.M., Harvey, D.J., *et al.*, 2003. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100: 8013-18
- 243 Zhou, J., Rossi, J.J., 2011. Cell-specific aptamer-mediated targeted drug delivery. *Oligonucleotides*, 21: 1-10
- 244 Huang, Y-F., Shangjuan, D., Liu, H., Philips, H. *et al.*, 2009. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *ChemBiochem.* 10: 862-68
- 245 Liang, H-R., Hu, G-Q., Zhang, T., yang, Y-J., *et al.* 2012. Isolation of ssDNA aptamers that inhibit rabies virus. *Int. Immunopharmacol.*, 14: 341-347
- 246 Liang, H-R., Liu, Q., Zheng, X-X., Gai, W-W., *et al.*, 2013. Aptamers targeting rabies virus-infected cells inhibit viral replication both in vitro and in vivo. *Virus Res.*, 173: 398-403
- 247 Fooks, A. 2004. The challenge of new and emerging lyssaviruses. *Expert. Rev. Vaccines*, 3(4): 333-36
- 248 Evans, J.S., Horton, D.L., Easton, A.J., Fooks, A.R. and A.C. Ban-



yard. 2012. Rabies virus vaccines: is there a need for a pan-lyssavirus vaccine?. *Vaccine*. Dec 14;30(52):7447-54. doi: 10.1016/j.vaccine

249 Horton, D.L., McElhinney, L.M., Marston, D.a. Wood, J.L., Russell, C.A., Lewis, N. *et al.*, 2010. Quantifying antigenic relationships among the Lyssaviruses. *J. Virol.*, 84 (22)11841-8

250 Smith, D.J., Lapedes, A.S., de Jong, J.C., Bestebroer, T.M., *et al.* 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 305 (5682):371-6

251 Nel, L.H. 2005. Vaccines for lyssaviruses other than rabies. *Expert. Rev. Vaccines*. 4(4):533-40

252 Xiang, Z.Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W.H., Cheng, J. and H.C.J. Ertl. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*, 199, 132-40

253 Xinag, Z.Q., Spitalnik, S., Cheng, J., Erikson, J., Wojczyk, B. and H.C.J. Ertl. 1995. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology*, 209, 569-79

254 Lodmell, D.L., and L.C. Ewalt, 2001. Post-exposure DNA vaccination protects mice against rabies virus. *Vaccine*, 19 2468-73

255 Lodmell, D.L., Parnell, M.J., Bailey, J.R., Ewalt, I.C. and C.A. Hanlon. 2002. One-time gene gun or intramuscular rabies DNA vaccination of non-human primates: comparison of neutralizing antibody responses and protection against rabies virus 1 year after vaccination. *Vaccine* 20, 838-844

256 OIE. Aplicación de Biotecnología al desarrollo de vacunas de interés veterinario. Directriz 3.3. Terrestrial Manual 2012. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2010.

257 Yao, K. and Z.Wang. 2008. Reverse genetics for live attenuated virus vaccine development. *Trends in Bio/Pharmaceutical Indust.* 2: 57-62

258 Meeusen, E.N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P. and G. Jungersen. 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 489-510

- 259 Morimoto, K., Shoji, Y., and S. Inoue. 2005. Characterization of P gene deficient rabies virus: propagation, pathogenicity and antigenicity. *Virus. Res.* 111:61-67
- 260 Wang, Z.W., Sarmiento, L., Wang, Y. *et al.* 2005. Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host immune responses in the central nervous system. *J. Virol.* 79, 12554-65
- 261 Morimoto, K., McGettigan, J.P., Foley, H.D., Hooper, D.C., Dietzschold, B. and M.J. Schnell. 2001. Genetic engineering of live rabies vaccines. *Vaccine*, 19, 3543-51
- 262 Dietzschold, B., Wunner, W.H., Wiktor, T.J., Lopes, A.D. *et al.*, 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 80: 70-74
- 263 Faber, M., Faber, M.I., Papaneri, A. *et al.* 2005. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.*, 79: 14141-48
- 264 Faber, M. Pulmanusahakul, R., Hodawadekar, S.S., *et al.*, 2002. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.*, 76, 3374-81
- 265 Mebastian, T., Schnell, M.J., and K.K. Conzelmann. 1995. Mokola virus glycoprotein and chimeric proteins can replace rabies virus glycoprotein in the rescue of infectious defective rabies virus particles. *J. Virol.*, 69(3):1444-51
- 266 Desmezieres, E., Jacob, Y., Saron, M.F., Delpeyroux, F., Tordo, N., and P. Perrin. 1999. Lyssavirus glycoproteins expressing immunologically potent foreign B cell and cytotoxic T lymphocyte epitopes as prototypes for multivalent vaccines. *J. Gen. Virol.*, 80(9)2343-51
- 267 Mebastian, T., Weiland, F. and K.K. Conzelmann. 1999. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol.*, 73, 242-50
- 268 Jallet, C., Jacob, Y., Bahloul, C., Drings, A., Desmezieres, E., Tordo, N. *et al.*, 1999. Chimeric Lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. *J. Virol.*, 73(1): 225-33

- 269 Genz, B., Nolden, T., Negatsch, A., Teifke, J.P. Conzelmann, K.K., Finke, S. 2012. Chimeric rabies viruses for trans-species comparison of lyssavirus glycoprotein ectodomain functions in virus replication and pathogenesis. *Berl. Much. Tierarztl Wochenschr.* 125(5-6): 219-27
- 270 Faber, M., Ulmanusahakul, R., Hodawqdekar, S.S., Spitsin, S., McGettigan, J.P., Schnell, M.J., *et al.* 2002. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* 76(7) 3374-81
- 271 Cenna, J., Tan, G.S., Papaneri, A.B. *et al.* 2008. Immune modulating effect by a phosphoprotein-deleted rabies virus vaccine vector expressing two copies of the rabies virus glycoprotein gene. *Vaccine*, 26: 6405-14
- 272 Faber, M., Li, J., Kean, R.B., Hooper, D.C., Alugupalli, K.R., Dietzschold, B. 2009. Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 106(27):11300-05
- 273 Markotter, W. Van Eeden, C., Kuzmin, I.V. Rupprecht, C.E., Paweska, J.T., Swanepoel, R. *et al.*, 2008. Epidemiology and pathogenicity of African Bat Lyssavirus. *Dev. Biol. (Basel)*. 131: 317-25
- 274 Meyer, J., Kuzmin, I.V., Rupprecht, C.e., Nel, L.H. 2008. Cross-protective and cross-reactive immune responses to recombinant vaccinia viruses expressing full-length lyssavirus glycoprotein genes. *Epidemiol., Infect.* 136: 5, 670-8
- 275 Koprowski, H. and V.Yusibov, 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19, 2735-41
- 276 Wang, X., Bao, M., Wan, M. *et al.* 2008. A CpG oligodeoxynucleotide acgts as a potent adjuvant for inactivated rabies virus vaccine. *Vaccine*, 26: 1893-1901
- 277 Reed, S.G., Bertholet, S., Coler, R.N. and M. Friede. 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 30: 23-32
- 278 Bisson, I.A., Safi, K., Holland, r.a., 20089. Evidence for repeated independent evolution of migration in the large family of bats. *PLoS ONE* 4(10), E7504, 1-6



- 279 Bahloul, C., Jacob, Y., Tordo, N. and P. Perrin. 1998. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine*, 16, 417-25
- 280 Perrin, P., Jacob, Y., Aguilar Setien, A., Loza-Rubio, E., Jallet, C., Desmezieres, A. Aubert, M., cliquet, F. and N. Tordo. 1999. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine*, 18:5-6, 479-86
- 281 Jallet, C., Jacob, Y., Bahloul, C., Drings, A., Desmezieres, E., Tordo, N. and P. Perrin. 1999. Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. *J. Virol.*, 73, 225-33
- 282 Echevarría Mayo, J.E. 2013. Rabia en España: razones para no bajar la guardia. *Prof. Vet., Zoonosis*. 10-14

Con toda probabilidad, España sufrió tradicionalmente y desde el principio de los tiempos, los efectos de la rabia, aunque los testimonios que han llegado hasta nosotros son más bien escasos.

Actualmente el riesgo de importación de casos de rabia canina procedentes del norte de África es una evidencia de importancia creciente. Ante tal situación, se debe incrementar el celo en puntos de entrada en la península conectados de forma directa con los puertos africanos, muy especialmente en lo que se refiere a la entrada de vehículos automóviles, que puedan transportar animales enfermos o en periodo de incubación de esta gravísima zoonosis.

