
GUIA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL VIRUS DE LA RABIA

DIRECCION REDES EN SALUD PÚBLICA

**SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE
REFERENCIA**

GRUPO DE VIROLOGIA

2019



Dirección

Martha Lucia Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Astrid Carolina Florez Sánchez
Directora Técnica (E)
Redes en Salud Pública

Clara del Pilar Zambrano Hernández
Subdirectora
Laboratorio Nacional de Referencia

Dioselina Peláez Carvajal
Coordinadora
Grupo de Virología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Omayda Cárdenas Bustamante
Equipo Técnico
Dirección de Redes en Salud Pública

Elaborado por:

Martha Gracia Romero
Katherine Dayanna Laiton Donato
Luis Felipe Acero
Grupo de Virología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Angélica María Rojas Bárcenas
Alejandra Pinilla Farías
Equipo de Zoonosis
Dirección de Vigilancia y Riesgo en Salud Pública

TABLA DE CONTENIDO

OBJETIVOS DE LA GUÍA	4
ALCANCE	4
DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	5
1. GENERALIDADES	6
1.1 Agente etiológico	6
1.2 Modo de transmisión	6
1.3 Prevención	7
1.3.1 Inmunización preventiva.....	7
1.3.2 Profilaxis post- exposición	7
2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO	7
2.1 Bioseguridad	7
2.2 Toma de muestra	8
2.2.1 Muestras de animales	8
2.2.2 Muestras humanas	8
2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte	9
2.3.1 Muestras animales.....	9
2.3.2 Muestras humanas	9
2.4 Conservación, almacenamiento y transporte	9
2.4.1 Muestras de animales	9
2.4.2 Muestras de humanos	10
2.5 Documentación requerida	11
2.6 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico	11
2.6.1 Inmunofluorescencia Directa - IFD	13
2.6.2 Prueba Biológica.....	13
2.6.3 Pruebas moleculares	14
2.6.4 Secuenciación del genoma del virus	14
2.6.5 Inmunohistoquímica	15
3. CONTROL DE CALIDAD	15
3.1 Evaluación externa directa del desempeño (EEDD):	15
4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL VIRUS DE LA RABIA	15
5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA LA VIGILANCIA DEL VIRUS DE LA RABIA	16
5.1 Laboratorio de rabia del grupo de virología INS de la red nacional de laboratorios	16
5.2 Laboratorios de Salud Pública (LDSP)	16
5.3 Las instituciones públicas y privadas (Centros de Salud, Hospitales Clínicas)	17
6. FLUJOGRAMA DE MUESTRAS Y RETROALIMENTACIÓN (Figura 6)	17
REFERENCIAS	18

OBJETIVOS DE LA GUÍA

Describir los lineamientos y el proceso de vigilancia por laboratorio del virus de la rabia.

Establecer los procesos de obtención, conservación y transporte de las muestras para la detección del virus de la rabia

Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayos empleados para el diagnóstico por laboratorio del virus de la rabia

Describir los criterios técnico-operativos para la participación en el programa interlaboratorio de control de calidad para la evaluación del desempeño directo.

Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio del virus de la rabia, así como describir las funciones y responsabilidades en cada uno de los niveles.

ALCANCE

La presente guía aplica para la vigilancia por laboratorio del virus de la rabia teniendo en cuenta las matrices y métodos para su detección usados en el Laboratorio Nacional de Referencia del INS.



DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

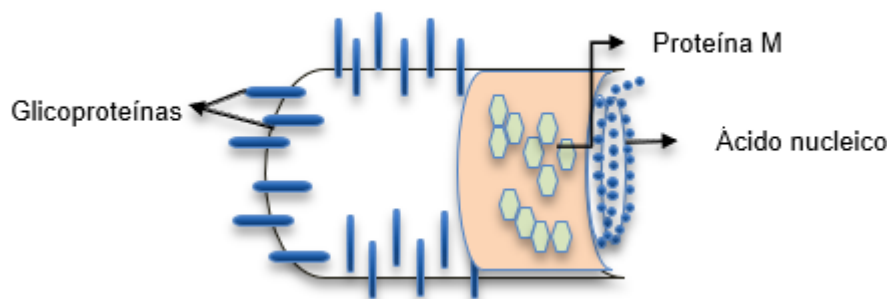
- **Anticuerpos monoclonales:** Anticuerpo homogéneo de una sola célula híbrida, que se produce para que se una a una sola sustancia específica.
- **Bioterio ABSL-2:** Lugar de evaluación biológica que está destinado a la crianza, mantenimiento, cuidado y uso de animales de experimentación. ABSL-2, sigla en inglés, que significa Animales bioseguridad nivel-2
- **Genotipo viral:** son colecciones diferentes del mismo virus, generadas por adaptaciones y mutaciones de su genoma sin alterar la esencia del virus.
- **ICA:** Instituto Colombiano Agropecuario
- **IPS:** Instituto Prestador de Servicio de Salud
- **Inmunofluorescencia directa (IFD):** Técnica utilizada para la detección de un antígeno en la cual se utiliza un anticuerpo marcado con fluoresceína que, al unirse al antígeno presente en la muestra a analizar, produce fluorescencia que es detectada por microscopio de luz UV (470 nm).
- **LDSP:** Laboratorio de Salud Pública.
- **Linaje genético:** Línea o rama filogenética a la que pertenece un organismo
- **LNR:** Laboratorio Nacional de Referencia
- **MEN:** Método de ensayo
- **MSPS:** Ministerio de Salud y Protección Social
- **OMS (WHO):** Organización Mundial de la Salud
- **OPS (PAHO):** Organización Panamericana de la Salud
- **Rabia pareasiente:** Infección por rabia que produce parálisis
- **Rabia Humana:** Enfermedad causada por virus rábico en humanos.
- **Rabia animal:** Enfermedad causada por infección por virus rábico en animales.
- **Ratón /ICR:** Cepa de ratones creados por el "Institute of Cancer Research"
- **SDS:** Secretaria Departamental de Salud
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **UPGD:** Unidad Primaria Generadora de Datos.
- **Variante antigénica:** Adaptación del virus Rábico a diferentes reservorios o a nuevos hospederos.

1. GENERALIDADES

1.1 Agente etiológico

El virus de la rabia, género *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae*, agente etiológico de la rabia, enfermedad zoonótica prevenible. Las dimensiones del virion son: 180 nm de longitud por 75 nm de diámetro, con forma típica de bala. El virus está envuelto por una bicapa lipídica (membrana o envoltura). En la membrana está insertada la glicoproteína denominada G; en el interior está la proteína de matriz (M), la nucleocápside y el ácido nucleico, que es un RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa [1], Figura 1.

Figura 1. Estructura del virus de la rabia



Fuente: Imagen esquematizada por el autor – Grupo de Virología

1.2 Modo de transmisión

La rabia es una zoonosis mortal que afecta el sistema nervioso central de animales homeotermos, mantienen una temperatura corporal constante, independientemente de la temperatura ambiental, especialmente mamíferos, incluido el ser humano. Se trasmite por la saliva de un animal o humano infectado a través de mordedura, arañazo o contacto directo con mucosas o piel erosionada o también por contacto de mucosas o piel erosionada con tejido nervioso de un animal o humano infectado.

El tiempo de incubación varía con el lugar de inoculación y la cantidad de inóculo; es así que, si el punto de contacto ha sido la cabeza, el cuello o los miembros superiores, el período de incubación será más corto; a partir de ahí el virus migra hacia los tejidos, pero sobre todo hacia las glándulas salivales, en donde es excretado en la saliva [2].

1.3 Prevención

La vacunación de animales de compañía (perros y gatos) es la estrategia más eficaz para prevenir la rabia en humanos, también es necesario implementar acciones de control de población animal susceptible a la rabia [3].

1.3.1 Inmunización preventiva

La vacuna pre-exposición se utiliza como inmunización principalmente en personas con alto riesgo de contacto con el virus, entre los que se pueden encontrar personal de laboratorio, personal de zoonosis y guardabosques en parques naturales, quienes pueden tener contacto con murciélagos y animales silvestres, entre otros. Así mismo, se recomienda vacunar a personas que realizan actividades al aire libre (montañismo) o personas que hacen actividades de búsqueda y clasificación de animales y plantas silvestres en zonas boscosas. Es conveniente vacunar a los niños que residen o visitan zonas de alto riesgo [3].

1.3.2 Profilaxis post- exposición

La profilaxis post-exposición consiste en lavado de la herida y administración de vacuna o vacuna e inmunoglobulinas, según el caso (inmunización preventiva o profilaxis post-exposición), luego de una agresión o contacto con un animal potencialmente transmisor de la rabia, conforme a las normas OMS-OPS y MSPS. El objetivo del tratamiento es neutralizar el virus e impedir que llegue al SNC [3-5].

Nota: Este procedimiento debe ser realizado en un centro médico por personal idóneo del área de la salud.

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

2.1 Bioseguridad

Durante el procesamiento de las muestras para el diagnóstico de rabia se deben tener en cuenta todas las normas de bioseguridad señaladas por la OMS y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) [6,7].

2.2 Toma de muestra

2.2.1 Muestras de animales

Rabia animal (Código 650)

- Perros o gatos, con signología compatible con la definición de caso establecida en el protocolo de vigilancia del evento o que hayan presentado muerte súbita luego de síntomas compatibles con infección por virus rábico.
- Perros o gatos identificados en las acciones de intervención de foco o caso de rabia que hayan sido agredidos o hayan tenido contacto con secreciones, saliva o tejidos encefálicos con el o los casos confirmados para rabia animal.

Vigilancia de la rabia por laboratorio (Código 652)

- Perros o gatos que se encuentren muertos en patios, calles, parques etc., sin causa aparente.
- Perros o gatos encontrados atropellados en carreteras o vía pública.
- Perros o gatos que hayan muerto en centros o clínicas veterinarias, en centros de zoonosis o de bienestar animal con diagnóstico indeterminado.

Para las muestras de animales de producción con sintomatología neurológica compatible con rabia, se debe consultar el procedimiento al Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, y en animales silvestres (murciélagos, zorros, lobos, etc.) a las Corporaciones Autónomas Regionales.

Tipo de muestras que no son competencia del INS

- Muestras de animales diferentes a perros o gatos
- El cuerpo completo de perro o gato
- Muestras en estado de descomposición
- Muestras mal empacadas, con fuga de líquidos
- Muestras sin identificación, sin ficha de notificación, con información incompleta
- Muestras de perros o gatos sacrificados masiva e indiscriminadamente, sin sintomatología neurológica o sin tener en cuenta los propósitos de la vigilancia de rabia descritos en el protocolo de vigilancia del evento

2.2.2 Muestras humanas

- **Pacientes vivos**
Las muestras de pacientes vivos que se encuentran hospitalizados con signos y síntomas compatibles con la definición de caso de rabia humana incluida en el protocolo de vigilancia del evento son suero y LCR.
- **Paciente fallecido**
Las muestras de pacientes fallecidos con cuadro clínico compatible con la definición de caso de rabia humana incluida en el protocolo de vigilancia del evento deben ser tomadas

mediante necropsia. Se debe tomar muestras¹ de 1x2 cm de diámetro de las siguientes regiones del encéfalo: Bulbo raquídeo, hipotálamo, cerebelo, glándula salival, puente, corteza cerebelosa, mesencéfalo, medula espinal cervical C1).

2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte

2.3.1 Muestras animales

Una vez fallecido el animal, el procedimiento para la toma de la muestra consiste en sujetar el animal y proceder a separar la cabeza del cuerpo, teniendo en cuenta las medidas de bioseguridad y el uso adecuado de equipos de protección personal, de conformidad a los lineamientos del programa de zoonosis del MSPS, garantizando el bienestar animal

2.3.2 Muestras humanas

Deberán ser tomadas en la Institución Prestadora de Servicios de Salud en donde al paciente se le prestó atención.

2.4 Conservación, almacenamiento y transporte

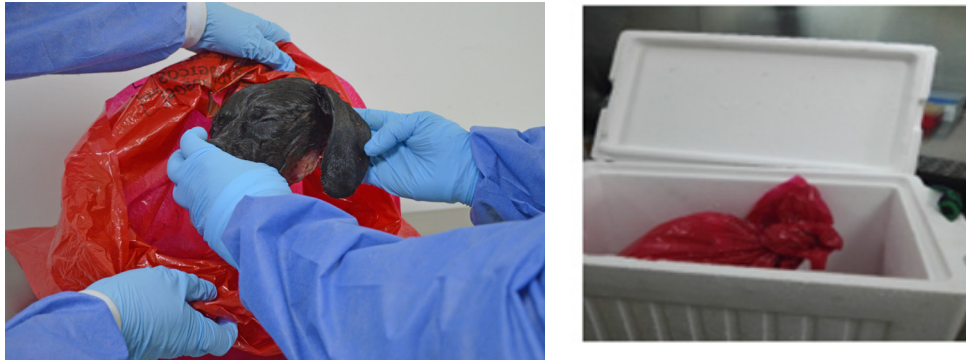
2.4.1 Muestras de animales

La cabeza del animal se envuelve en doble bolsa plástica bien sellada, evitando derrames de sangre por fuera de esta y se introduce en nevera de icopor con suficientes pilas congeladas de manera que conserve la cadena de frío hasta su destino [8] (Figura 2).

¹ Consultar el Manual de Procedimientos, para la toma, conservación y envío de muestras al Laboratorio Nacional de Referencia. INS-2019, en los siguientes links: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/Paginas/documentos-de-interes.aspx>
https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DocumentosdeInteresSRNL/Manual_toma_envio_muestras_INS-2019.pdf



Figura 2. Embalaje de muestras animales para detección del virus de la rabia



Fuente: Foto INS comunicaciones

La muestra debe ser remitida inmediatamente conservando la cadena de frío, de no ser posible, esta puede ser congelada máximo por 3 días.

2.4.2 Muestras de humanos

Sin excepción, se deben enviar dos paquetes de muestras así:

- Para el laboratorio de virología muestras frescas, en envase de cierre hermético debidamente marcado (Figura 3).
- Para el **estudio patológico** el diagnóstico de rabia en muestras de origen humano (fallecido), se realiza en muestras de cerebro (asta de Ammon y corteza temporal), corteza cerebelosa, tallo-mesencéfalo, médula espinal cervical C1 y de los demás tejidos obtenidos en la necropsia de al menos un (1) cm de diámetro enviadas en formol al 10% con pH neutro.

Las muestras de tejido deben ser remitida inmediatamente, conservando la cadena de frío, de no ser posible, la muestra debe mantenerse congelada (-20°C) y enviarse lo más pronto posible.

Figura 3. Embalaje de muestras de tejidos humanos para detección del virus de la rabia



Fuente: Imagen esquematizada por el autor – Grupo de Virología

2.5 Documentación requerida

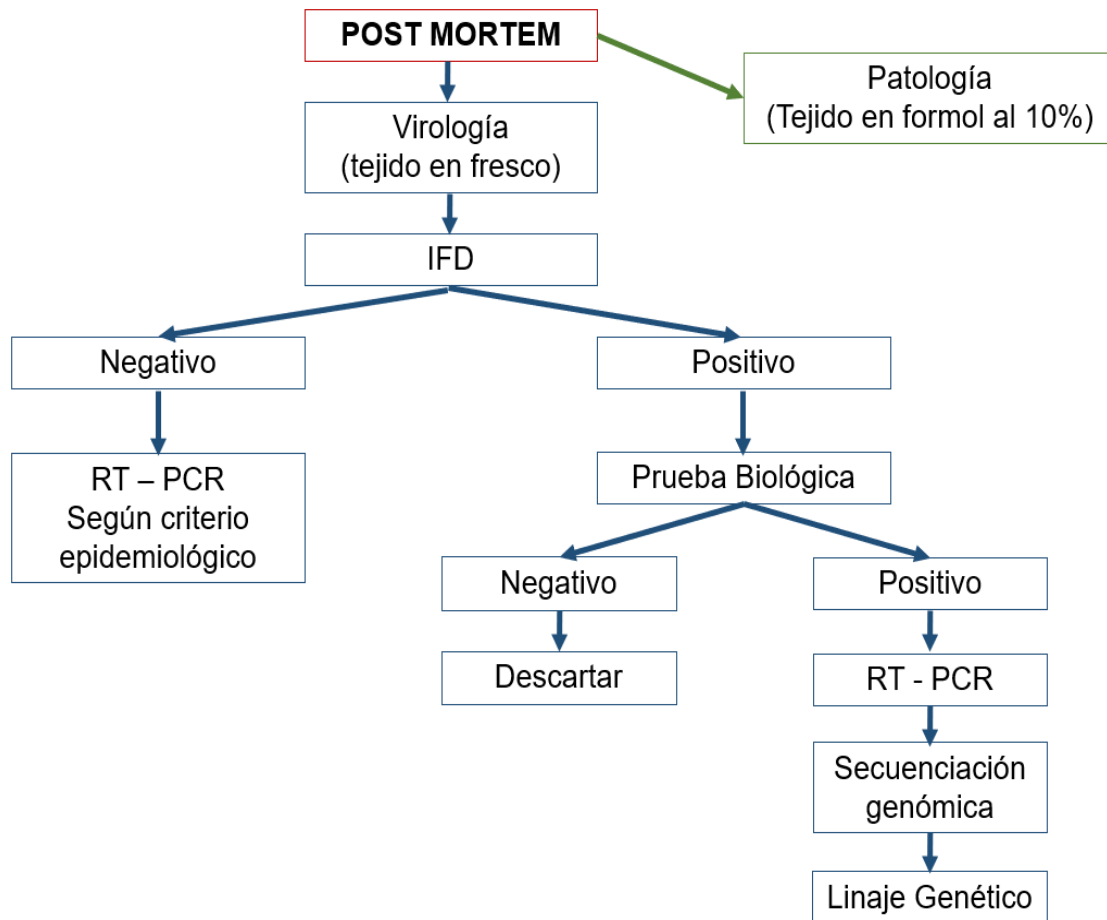
- **Muestras humanas:** deben ser remitidas al INS acompañadas de la ficha de notificación del evento Rabia Humana Cod. INS 670, completamente diligenciada y resumen de la historia clínica.
- **Muestras animales:** deben ir acompañada de la ficha de notificación del evento completamente diligenciada y resumen de la historia clínica o caracterización breve del caso Rabia animal Cod.INS 650 o vigilancia activa de rabia animal Cod. 652, según sea el caso (ver numeral 2.2.1) [8].

2.6 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico

Los algoritmos de diagnóstico para la detección del virus de la rabia en muestras procedentes de tejido encefálico, se muestran en la figura 4.



Figura 4. Algoritmo de diagnóstico para la detección del virus de la rabia en tejido encefálico (necropsias)

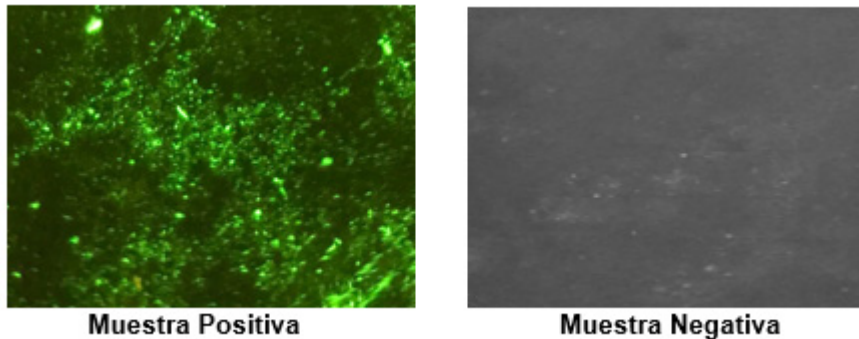


2.6.1 Inmunofluorescencia Directa - IFD

Para detectar el virus en los cortes de tejido encefálico por IFD, se hacen cinco impresiones en lámina de vidrio, se utiliza un conjugado con tres anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína que reaccionan con la proteína de la nucleocápside del virus de la rabia.

El anticuerpo marcado se incuba con el tejido sospechoso de infección con el virus de la rabia y si es positivo, se une a los antígenos que están presentes. El anticuerpo que no se une se elimina por lavado. El complejo antígeno-anticuerpo se visualiza mediante microscopía de fluorescencia. La proteína del virus presente en las células infectadas tendrá una fluorescencia color verde manzana brillante; por el contrario, si el tejido encefálico es negativo para la presencia del virus de la rabia, no habrá fluorescencia (no hay unión antígeno anticuerpo), el campo en el microscopio se verá completamente oscuro [9] (Figura 5).

Figura 5. Inmunofluorescencia Directa IFD, detección del virus de la rabia



Fuente: Imagen esquematizada por el autor – Grupo de Virología

2.6.2 Prueba Biológica

La prueba biológica en ratón/ICR, se realiza para confirmar y amplificar el virus obtenido de una muestra de tejido encefálico positiva por la prueba IFD.

Se emplea una porción de la muestra de tejido encefálico (50 mg), se macera en solución salina estéril hasta disolver el tejido, se centrifuga; el sobrenadante se recoge con jeringa de 0,1 mL y se inoculan 3 µL directamente en el cerebro de ratón/ICR.

El tiempo de la prueba es de 28 días, tiempo durante el cual se observan los síntomas en el ratón, hasta la muerte de todos los ratones inoculados.



Una vez fallece el ratón, se procede a realizar la trepanación, se almacena el cerebro extraído en un vial debidamente rotulado con el número de la muestra y se procede a realizar las pruebas moleculares: extracción de ácidos nucleicos y RT-PCR. La muestra restante luego de realizar las pruebas debe almacenarse en congelación a -70°C .

2.6.3 Pruebas moleculares

- **Extracción de ácidos nucleicos:** Permite obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes, para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La calidad y pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis [10].

- **RT- PCR:** El producto extraído, contiene 1.666 pares de bases, es el gen que codifica para la nucleocápside, el cual se amplifica mediante PCR – convencional. Esta prueba es una reacción enzimática *in vitro*, que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN, durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente [10].
- **Electroforesis:** La electroforesis en gel, se emplea para separar los ácidos nucleicos y las proteínas, en la separación de las macromoléculas hay dos variables: carga y masa. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Durante la electroforesis, las macromoléculas son empujadas a través de los poros del gel, dependiendo de su tasa de migración por el campo eléctrico y de factores como, fuerza del campo magnético, el tamaño y forma de las moléculas y la hidrofobicidad de la muestra en el gel horizontal de agarosa, que varía en concentraciones entre 0,7% a 3,0%, dependiendo del tamaño del fragmento que se va a separar [10].

2.6.4 Secuenciación del genoma del virus

La secuenciación de ácidos nucleicos es un método cuya finalidad es determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un determinado segmento de ADN.

La variabilidad genética a nivel de la secuencia de ácidos nucleicos del gen que codifica para la nucleocápside entre diferentes cepas, permite inferir mediante análisis filogenéticos el linaje genético al que pertenece cada una de las cepas.

A nivel de epidemiología molecular la identificación de linaje genético permite comprender la variabilidad genética viral circulante en las diferentes especies de las regiones del país, así como evaluar rutas de dispersión viral durante brotes.

2.6.5 Inmunohistoquímica

Para el diagnóstico y estudio por patológico en muestras de origen humano en caso fallecido, la técnica de análisis es inmunohistoquímica para la confirmación del cuerpo de Negri, anticuerpo *MILLIPORE* (dilución 1:800). Identificación morfológica de encefalitis de predominio mesencefálica, mielitis del tallo y del segmento medular C1 con amplia lesión de áreas motoras, gliosis reactiva y pérdida de células de Purkinje.

3. CONTROL DE CALIDAD

3.1 Evaluación externa directa del desempeño (EEDD):

El Grupo de Virología del INS, realiza el programa de evaluación externa del desempeño directo (PEEDD) para el diagnóstico de rabia por la técnica de IFD, se realizan dos (2) veces al año (1 prueba semestral).

Los usuarios son los laboratorios de salud pública departamental que tienen la infraestructura y capacidad técnica instalada para izar esta prueba.

- **Evaluación externa directa del desempeño (EEDD).** La evaluación consiste en el envío de 5 láminas portaobjetos impregnados con muestras de encéfalo (positivas y negativas), las láminas son identificadas con un código diferente para cada laboratorio, el puntaje asignado a cada lámina es de 20 puntos. El tiempo de reporte de resultados de la lectura de cada lámina en los formatos establecidos, por parte de los participantes es de 15 días calendario.
- **Evaluación externa indirecta del desempeño (EEID).** Los laboratorios con capacidad para diagnóstico de rabia, deben mandar semestralmente el 10% de las láminas con muestra de encéfalo recibidas dentro del programa de vigilancia de la rabia.

Recibirán una calificación satisfactoria: si tienen el 100% en concordancia en el resultado,
No satisfactoria: si en al menos una lámina el resultado no ha sido concordante o menor del 100%

4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL VIRUS DE LA RABIA

La vigilancia del virus de la rabia consiste en identificar y describir su circulación mediante variables relacionadas con sus características genotípicas y los sitios en donde circula con el fin de suministrar información que permita orientar las acciones de prevención y estrategias de control.

De igual manera se definirán indicadores que permitirán resumir estos aspectos y realizar su publicación en forma periódica, a través de informes técnicos, así como en la construcción de repositorios institucionales donde fácilmente se puedan obtener los microdatos y permitir su uso

por parte de la comunicad científica, médica, académica, administrativa del sistema de salud y el público en general.

5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA LA VIGILANCIA DEL VIRUS DE LA RABIA

5.1 Laboratorio de rabia del grupo de virología INS de la red nacional de laboratorios

- Realizar el diagnóstico y confirmación de las muestras humanas y de animales con sospecha de infección por virus de la rabia en todo el territorio nacional y enviar los resultados.
- Realizar el control de calidad del diagnóstico de la rabia por la técnica IFD, a los LSP que están capacitados para la realización de este diagnóstico.
- Trabajar en conjunto con los grupos de vigilancia y riesgo en salud pública, MPS, OPS, en la atención a brotes de rabia en el territorio nacional
- Realizar capacitación y entrenamiento a los laboratorios que requieran implementar o mejorar las técnicas de diagnóstico de rabia.

5.2 Laboratorios de Salud Pública (LDSP)

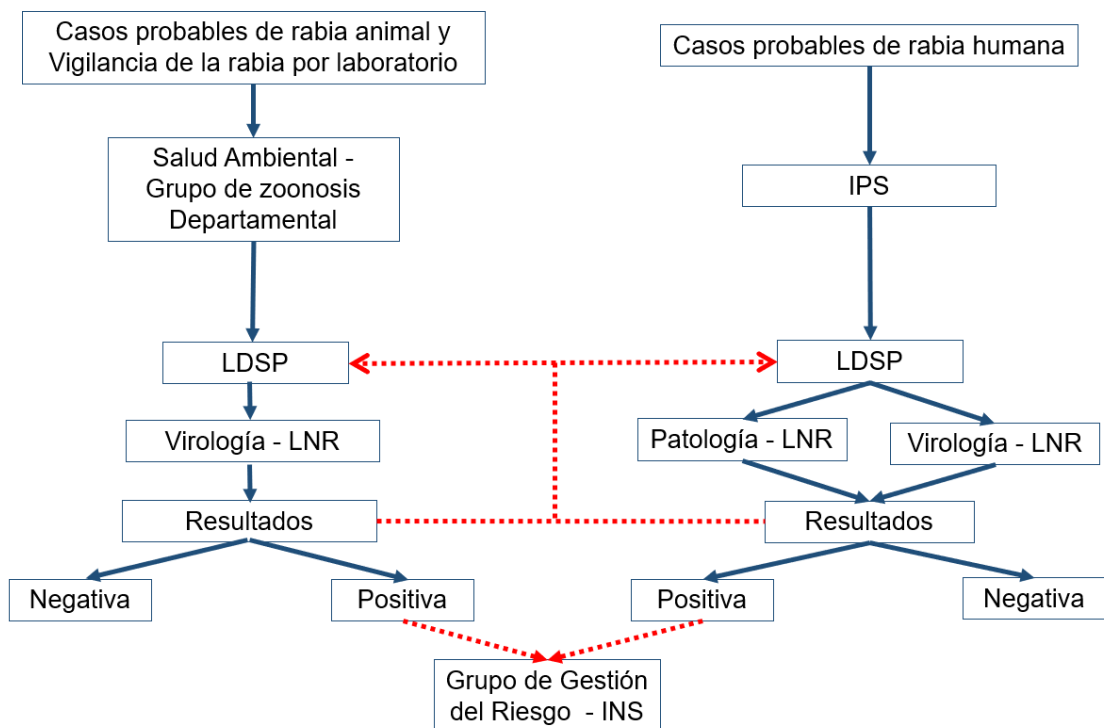
- Coordinar con el área de salud ambiental la entrega al LDSP de muestras de animales, teniendo en cuenta las recomendaciones para su conservación y transporte y que cuente con la documentación requerida.
- Coordinar con las IPS la entrega al LDSP de muestras de humanos, teniendo en cuenta las recomendaciones para su conservación y el transporte y que cuente con la documentación requerida.
- Verificar el estado, embalaje, conservación y documentación de soporte de las muestras de origen humano y animal y realizar el embalaje y envío de muestras al laboratorio nacional de referencia del INS, teniendo en cuenta las recomendaciones para la conservación y el transporte.
- Los LSP que cuentan con capacidad diagnóstica para la rabia, deben enviar mensualmente el consolidado de las muestras procesadas y en caso de obtener algún resultado positivo, remitir de **inmediato** las muestras al laboratorio nacional de referencia del INS para su confirmación.
- Los LSP que cuentan con capacidad diagnóstica para la rabia deben contestar la EEDD semestralmente.
- Realizar jornadas de capacitación y asistencia al personal técnico y profesional para mejorar y fortalecer los procesos de obtención, embalaje y transporte de muestras según las fallas o debilidades detectadas acuerdo con las necesidades para este evento [7].

5.3 Las instituciones públicas y privadas (Centros de Salud, Hospitales Clínicas)

- Recolectar, embalar y enviar de manera adecuada y con las muestras de origen humano y animal cuyo cuadro clínico cumpla la definición de caso de rabia según corresponda al Laboratorio Departamental de salud Pública.
- Cumplir con todos los requisitos de bioseguridad en el proceso de recolección, embalaje y envío de muestras.

6. FLUJOGRAMA DE MUESTRAS Y RETROALIMENTACIÓN (Figura 6)

Figura 6 Flujoograma de envío de muestras y realimentación de resultados.



REFERENCIAS

1. Nigg, A.J. and P.L. Walker, Overview, prevention, and treatment of rabies. *Pharmacotherapy*, 2009. **29**(10): p. 1182-95.
2. Dietzschold, B., et al., Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol*, 2008. **3**(5): p. 481-490.
3. World Health, O., WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. World Health Organ Tech Rep Ser, 2013(982): p. 1-139, back cover.
4. OMS. Rabia. Centro de prensa. Nota descriptiva. Septiembre de 2017. . 2017 [cited 2017 26 de enero de 2018]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>.
5. Toro, Gabriel; Martinez, Mancel et al. Guia practica para la atención integral de personas agredidas por un animal potencialmente transmisor de rabia. Bogota 2009. <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Manejo%20integral%20de%20personas%20agredidas%20por%20animales%20transmisores%20de%20rabia.pdf>
6. CDC, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, in Soliciting Stakeholder Input for a Revision of Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL): Proceedings of a Workshop. 2016: Washington (DC).
7. Delany, J.R., et al., Guidelines for biosafety laboratory competency: CDC and the Association of Public Health Laboratories. *MMWR Suppl*, 2011. **60**(2): p. 1-23.
8. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Rabia en humanos, perros y gatos. 2019, Instituto Nacional de Salud: Bogotá.
9. Center for diseases control CDC. Atlanta GA. "*Protocol for Postmortem Diagnosis of Rabies in Animals by direct fluorescent Antibody testing*". Available from: <https://www.cdc.gov/rabies/pdf/rabiesDFASPv2.pdf>
10. Metodos de ensayo estandarizados. INS. MEN-R01.5380-04210. B.