



**Facultad de Ciencias Agropecuarias
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**

TESIS

**"ESTUDIO DE SEROCONVERSIÓN DE LAS VACUNAS ANTIRRÁBICAS
UTILIZADAS EN PERROS PRIMOVACUNADOS DE 13 A 16 SEMANAS DE EDAD,
PIURA 2014"**

**Para optar por el título profesional de
MÉDICO VETERINARIO**

**Bachiller en medicina veterinaria
VÍCTOR EDUARDO GRADOS MORANTE**

Piura – 2015

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre; que con tesón y sacrificio nos brindó su esfuerzo y amor por el estudio y la investigación con el convencimiento que se debía dar siempre lo mejor de cada uno.

A mis hermanos Luis Felipe y Ana María por su apoyo y exigencia en la redacción y revisión del presente trabajo de investigación.

A mis hijos Renato y Mariana, de quienes me siento feliz de poder compartir la naturaleza del conocimiento.

A Eduardo Sebastián y Erika, una nueva razón de superación.

A todas aquellas personas que se interesan en la salud y el bienestar público y que hacen investigación a fin de permitir una mejor forma de existencia con la naturaleza.

AGRADECIMIENTO

Mi especial agradecimiento al M.V. Dr. Ricardo López Ingunza, (coordinador del laboratorio); Bióloga Albina Díaz Olivera; M.V. Carina Mantari Torpoco; M.V. Katherine Valladares Hinostrosa y técnica de laboratorio Margarita Fernandez Acevedo; todos ellos personal altamente eficiente y dedicado a la investigación del Laboratorio de Zoonosis Viral del Instituto Nacional de Salud del Perú.

Al M.V. Mario Regalado Deza, asesor y amigo que me orientó al buen desarrollo de éste trabajo de investigación.

Al Instituto Nacional de Salud, entidad pública ejecutora del Ministerio de Salud dedicado a la investigación de los problemas prioritarios de salud y de desarrollo tecnológico.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación es el estudio de la seroconversión de las vacunas antirrábicas utilizadas en perros (*Canis lupus familiaris*) primovacunados de 13 a 16 semanas de edad en Piura. Entre mayo 2014 a julio 2015 en el departamento y provincia de Piura, se evaluaron 27 perros primovacunados; todos de 13 a 16 semanas de edad clínicamente sanos; de forma aleatoria y por vía subcutánea en la zona interescapular, se les aplicó una dosis correspondiente de un mililitro de vacuna antirrábica nacional o vacuna antirrábica importada. Se les hizo un muestreo serológico pre y post vacunal colectando sangre de la vena cefálica y centrifugada para obtener el suero, para determinar los niveles de anticuerpos resultantes. En el Laboratorio de Zoonosis Virales, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud del Perú, se midió la respuesta serológica por el método RFFIT en cultivo celular BHK₂₁. Previo a la vacuna ninguno mostró anticuerpos al desafío de rabia; posterior a la vacuna 59,26% tuvieron respuesta positiva pero insuficiente; cubiertos 40,74% de los individuos con niveles $\geq 0,5$ UI/mL conforme a los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud (50% de los que recibieron vacuna nacional y 31% de los que recibieron vacuna importada). El diseño estadístico aplicado es el de comparación de medias por $T_{student}$ para un estudio experimental, no existiendo diferencias significativas entre éstas. Las vacunas nacional e importada generan respuestas positivas a la titulación. Muchos factores influyen para que no presenten un nivel adecuado de protección después de la vacunación. Es necesario revacunar a los cachorros con dosis de refuerzo. La revacunación posterior a la primovacuna es importante para mantener y/o hacer persistente por más tiempo la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica.

PALABRAS CLAVE: virus, zoonosis, seroneutralización, virus modificado, RFFIT, OIE, BHK₂₁.

ABSTRACT

The objective of the present work of investigation is the study of serum conversion of rabies vaccines used in canines (*Canis lupus familiaris*) primo vaccinated between 13 to 16 weeks old. Between May, 2014 to February, 2015 in Piura, Peru, 27 dogs were evaluated, all between 13 to 16 weeks old clinical healthy and randomly chosen on inter-scapula form and subcutaneous via, who received either a national or imported dose of anti-rabies vaccine. A serological sampling was done pre and post vaccine blood collected by cephalic vein and centrifuged for obtain serum to determine the levels of resultant antibodies. At the Laboratory of Viral Zoonoses, National Center of Public Health, National Institute of Health of Peru the serological response was measured by the RFFIT method in BHK₂₁ cellular culturing. Previous to the vaccine none showed antibodies to the rabies challenge, posterior to vaccine 59,26% had positive but insufficient response, covered 40,74% of the individuals with levels $\geq 0,5$ UI/mL in conformity with WHO requirements (50% from national vaccine and 31% from imported vaccine). The statistical applied design is a comparison of averages for an experimental study, not existing significant differences between these. Both national and imported vaccines generate positive answers to the titres. Many factors influence an unsuitable level of protection after the vaccination. Pets need to revaccinate whit reinforcement dose. Posterior revaccination to primo vaccine is important to keep and/or increase immunogenicity of the anti-rabies vaccine.

KEY WORDS: virus, zoonosis, seroneutralization, modified virus, RFFIT, OIE, BHK₂₁.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTO | ii |
| RESUMEN | iii |
| ABSTRACT | iv |
| I.- INTRODUCCIÓN | 01 |
| II.- MARCO TEÓRICO | 03 |
| 1. Rabia | 03 |
| 1.1 Generalidades | 03 |
| 1.2 Etiología | 04 |
| 1.3 Patogenie | 04 |
| 1.4 Prevención y control | 06 |
| 1.5 Producción de vacunas | 06 |
| 1.5.1 Cepas de virus de siembra | 07 |
| 1.6 Respuesta inmune | 08 |
| 1.7 Requisitos | 08 |
| 1.8 Tipo de vacuna antirrábica | 09 |
| 1.8.1 Vacuna antirrábica nacional | 09 |
| 1.8.2 Vacuna antirrábica importada | 10 |
| 1.9 Técnica de aplicación de la vacuna | 10 |
| 1.10 Nivel de anticuerpos vacunales | 11 |

| | |
|--|----|
| 1.11 Investigación epidemiológica | 11 |
| 1.12 Prueba de seroneutralización | 12 |
| 1.12.1 Seroneutralización en ratones | 12 |
| 1.12.2 Seroneutralización en células BHK ₂₁ | 13 |
| 1.13 Eficacia | 14 |
| 1.14 Otras investigaciones similares | 15 |
| 2. Variables de estudio | 18 |
| III.- MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 1. ESPACIO Y TIEMPO | 19 |
| 2 POBLACIÓN Y MUESTRA | 20 |
| 3. DISEÑO EXPERIMENTAL | 20 |
| 4. EQUIPOS Y PROCEDIMIENTOS | 22 |
| 5. DISEÑO ESTADÍSTICO | 28 |
| IV. RESULTADOS | 30 |
| V. DISCUSIÓN | 35 |
| VI. CONCLUSIONES | 37 |
| VII.RECOMENDACIONES | 38 |
| VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| ANEXOS | |

I. INTRODUCCIÓN

La rabia canina es una enfermedad presente en todos los continentes y es causada por un virus de la familia Rhabdoviridae. Aunque es una de las enfermedades caninas más comunes, las vacunas han conseguido controlar su aparición y sus efectos.

Puede afectar a todos los animales de sangre caliente. La seropositividad es una indicación de contacto previo con el virus. La ausencia de respuesta inmune puede ser interpretada como un indicador de susceptibilidad, y por lo tanto como un indicador de riesgo. Las técnicas serológicas son asimismo útiles para controlar la respuesta inmune a la vacunación en animales domésticos; los perros son los transmisores principales de la enfermedad en el mundo. Los únicos lugares en que no existe el virus son Australia, Nueva Zelanda, Nueva Guinea, Suecia, Noruega, las islas británicas, donde se ha erradicado y la Antártica con las islas del Caribe en América por barreras naturales. Aparte de estos lugares, la rabia existe en cualquier otro lugar.

No es muy resistente, a 80 °C muere en dos minutos y a 100 °C muere inmediatamente. La saliva líquida es infectante durante 24 horas. En la superficie del suelo, las cepas se mantienen infectantes durante 2 a 3 meses, siempre que el lugar no esté expuesto a los rayos solares. El formol al 1% lo inactiva en 15 minutos, los jugos gástricos en 4 a 5 horas y sensible al éter y cloroformo.

Asimismo, el virus de la rabia es inactivado por evaporación y calentamiento a 56 °C por una hora, luz solar, la luz ultravioleta y muchos agentes químicos, incluyendo

formalina, etanol 50% a 70% ácidos fuertes, amonio cuaternario, 0,1 - 1% y jabón al 20%, lo inactivan.

Es importante determinar que tanto las vacunas producidas en el país, como las comerciales importadas, mantienen protegidos a los cachorros primovacunados, desde las 13 a 16 semanas de edad, teniendo en cuenta las normas sugeridas por la OMS (Organización Mundial de la Salud), igualando o superando niveles de 0,5 UI/mL en el suero sanguíneo (nivel de protección contra la enfermedad).

La Organización Mundial de la Salud (OMS-WHO) considera equiparable y recomendada la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT: Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) por ser tan sensible como la prueba MNT (Mouse Neutralization Test) (Prueba de Seroneutralización en Ratones).

Esta enfermedad es mortal y puede afectar al ser humano. Por eso, todos los países toman medidas para prevenirla, contenerla y tratar de eliminarla. La investigación de la dinámica, de las vacunas y mecanismos eficaces de administración para poblaciones específicas que aseguren calidad de las vacunas es, por tanto, muy importante.

Se considera que el enfermo con rabia evoluciona a la muerte, porque no genera inmunidad útil que impida la infección al Sistema Nervioso Central.

El RFFIT es una técnica serológica que no requiere de reactivos específicos para cada especie, y puede ser utilizada por lo tanto, para detectar anticuerpos antirrábicos en cualquier especie utilizando el mismo diseño experimental.

II. MARCO TEÓRICO

1. Rabia.-

1.1. Generalidades.-

Como los virus son organismos intracelulares obligados, su existencia se ve amenazada si son destruidos por el sistema inmune o por la muerte de su hospedador. Debido a éstos factores opuestos, los virus y sus hospedadores han sido sometidos a una rigurosa selección y adaptación. Los virus son seleccionados por su capacidad para evadir las respuestas inmunes del hospedador, mientras que los animales se seleccionan por su resistencia a las enfermedades inducidas por virus. Los virus que son eliminados antes de que se repliquen no se pueden diseminar y los hospedadores eliminados por los virus no pueden actuar más como hospederos. (1)

La rabia es un excelente ejemplo; el virus es letal en perros, gatos, caballos y ganado bovino, porque no son sus hospederos naturales. Por otro lado, en sus hospederos naturales, especialmente murciélagos y mofetas, el virus rábico persiste y puede ser diseminado por la saliva durante largo tiempo sin causar enfermedad. (1).

El primer esfuerzo que hizo Pasteur para controlar la rabia fue dirigido a la inmunización del perro; La vacuna de Pasteur consistió en la colecta del virus de la columna vertebral en conejos, la que había sido modificada o estabilizada por pases seriados intracerebralmente en conejos y adecuadamente atenuado por desecación a

temperatura ambiente sobre hidróxido de potasio. Los perros fueron hechos resistentes a la rabia por una serie de 10 inyecciones subcutáneas diarias del virus preparado que había sido graduado desde la forma no infectiva hasta la máxima infectividad de acuerdo a las pruebas en conejos inoculados intracerebralmente (2).

Desde los trabajos pioneros de Pasteur hasta la década de 1940 las vacunas empleadas en todo el mundo fueron esencialmente modificaciones de la vacuna original de Pasteur. Pruebas experimentales de la eficacia de uso de la vacuna de tejido cerebral tipo *Semple* fue obtenida en 1945 por Johnson que mostró que una simple inyección de alto grado de resistencia al desafío con virus de rabia de la calle en perros, producía el 88,5% de inmunización 12 meses después de la aplicación de la vacuna; de allí en adelante se han desarrollado nuevas técnicas más seguras. (2)

1.2. Etiología.-

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) El agente de la encefalitis de la rabia deriva del orden *Mononegavirales*, familia *Rhabdoviridae* y género *Lyssavirus*. Los lyssavirus tienen 12 Kb (en genética, el equivalente a mil pares de bases de ADN), no segmentados, genoma RNA de polaridad negativa codificando 5 proteínas virales de las cuales se identifican nucleoproteína N, fosfoproteína P, Matriz de proteína M, glicoproteína G y polimerasa L. la partícula viral tiene forma de bala con 100 – 300 nm de largo y 75 nm de diámetro. (3)

1.3. Patogenie.-

La rabia es una zoonosis y la infección usualmente ocurre siguiendo una mordida transdermal o rasguño por un animal infectado. La transmisión puede también ocurrir

con material infectado usualmente saliva. Entra por contacto directo con la mucosa de la víctima o con lesiones recientes de la piel. Muy raramente la rabia puede ocurrir a través de la inhalación del aerosol conteniendo virus o vía órganos transplantados. (4)

La infección por la mordedura usa como vehículo a la saliva que se deposita en el músculo estriado donde se replica hasta alcanzar una concentración suficiente para llegar a un nervio sensorial o motor, donde se une a receptores de acetilcolina y entra al sistema nervioso central (SNC), infecta a las neuronas y causa un comportamiento aberrante, que se le llama “rabia furiosa”, pero cuando la infección penetra en la neurocorteza el cuadro clínico cambia a “rabia silenciosa”, que puede presentar depresión, coma y muerte por paro respiratorio. (5)

En los casos humanos el periodo de incubación es de algunas semanas a unos meses pudiendo llegar a un año, sin manifestaciones clínicas aparentes; el largo de la incubación depende de factores como de la cantidad de virus inoculado, del sitio de entrada viral y de la proximidad de la mordida del sistema nervioso central. El virus inoculado es transportado al sistema nervioso central (SNC) vía los nervios periféricos; luego de arribar al cerebro es replicado y diseminado rápidamente por el SNC a muchos tejidos diferentes incluyendo las glándulas salivales. (4)

La proximidad del sitio de entrada del virus al SNC incrementa la probabilidad de un corto período de incubación. La velocidad estimada de migración es de 15 – 100 mm por día. El virus entonces se mueve desde el SNC vía flujo anterógrado axoplásmico a través de los nervios periféricos conduciendo a la infección de alguno de los tejidos adyacentes no nerviosos como por ejemplo los tejidos secretores de las glándulas salivales. (3)

El virus rábico puede penetrar las defensas naturales del organismo y establecerse en el área por numerosas rutas y llega al sistema nervioso central por vía de los troncos nerviosos. Goodpasture observó que el seccionar los nervios que inervan la zona, poco tiempo después de la inoculación, tenía el efecto de salvar la vida del animal. (5)

No existe un test actualmente para diagnosticar la infección de rabia en humanos antes del debut de la fase clínica. El diagnóstico es basado en la historia clínica, síntomas y signos basados en la información epizootológica. (4)

1.4. Prevención y control.-

Dada la tasa de letalidad del 100% de la enfermedad, la acción más racional para prevenir la rabia humana consiste en el control y la erradicación de la enfermedad en los animales domésticos, principalmente perros. (6)

1.5. Producción de vacunas.-

Las vacunas para salud pública de gran escala deben seguir los requerimientos de calidad de la Organización Mundial de la Salud OMS (WHO por sus siglas en inglés); ser seguras y tener un significativo impacto para la actual enfermedad y toda la población; ser fácilmente adaptable a los programas de inmunización y no interferir significativamente con la respuesta inmune de otras vacunas que son aplicadas simultáneamente y ser producidas conociendo las limitaciones técnicas comunes como son refrigeración, capacidad de almacenaje y ser apropiadamente costosas para los diferentes mercados. (4)

Dada la importancia que tiene la lucha contra la rabia canina para la prevención de la enfermedad humana, se ha sistematizado instrumentos de gestión administrativa y

evaluado técnicas sencillas aplicables para que los países afectados puedan formular y poner en prácticas programas basados en la cooperación intersectorial e internacional. La OMS describe los aspectos técnicos, legislativos y de gestión administrativa para la lucha contra la rabia canina. (6)

1.5.1. Cepas de virus de siembra.-

Existen diferentes tipos de virus de siembra para la producción de vacunas antirrábicas las cuales deben ser evaluadas en su actividad, inocuidad e identidad. Las siguientes cepas satisfacen los requisitos especificados:

- Cepa Pasteur de París de virus fijo de conejo;
- Cepa PV-11 de virus rábico fijo de conejo de Pasteur;
- Cepa Pitman-Moore (PM) de virus rábico fijo;
- Cepa de encéfalo de ratón CVS de virus rábico fijo;
- Virus rábico adaptado al embrión de pollo LEP (40-50 pases) Flury;
- Virus rábico adaptado al embrión de pollo HEP (227-230 pases) Flury;
- Virus rábico adaptado al embrión de pollo (100 pases) Kelev;
- Cepa ERA de virus SAD (35-45 pases), en cultivo de células porcinas;
- Primario de células de riñón de hámster, para vacuna de virus vivos y de virus muertos;
- Cepa CTN 1 T Zinan-1 de China, 40 pases por el ratón seguido de 100 pases por la cepa KBM de células diploides de pulmón humano;
- Fuenzalida (cepas de virus canina 51 y humana 91). (6)

1.6. Respuesta inmune.-

El modo de actuación de las vacunas frente a la rabia consiste 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. (7)

En la actualidad, todas las vacunas comercializadas frente a la rabia, cualquiera sea su destino (el hombre o los animales) son vacunas inactivadas que contienen proteínas víricas intactas (G, N, NS/P, M y L) de las que se espera induzcan 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 se limitan a la inmunización de los animales salvajes, en los que es esperable una respuesta de base celular y humoral. (7)

1.7. Requisitos.-

Las vacunas contra la rabia para aplicar en animales contienen virus vivos atenuados para la especie animal concreta (como la cepa Flury con pocos pases en huevo, la Flury con muchos pases en huevo, la Street-Alabama-Dufferin o la Kelev) o virus inactivados por medios químicos o físicos, o bien vacunas recombinantes. El virus se cultiva en huevos embrionados o en cultivos celulares. (8)

Normalmente, las vacunas contra la rabia están liofilizadas, pero las vacunas con virus inactivados, preferiblemente con un adyuvante, se pueden mantener en forma líquida. (8)

Antes de autorizar nuevas vacunas se debe determinar la duración de la inmunidad derivada de su empleo en animales vacunados de la especie de destino. Las vacunas deben proporcionar una protección inmunitaria durante al menos un año como mínimo recomendable. (8)

1.8. Tipo de vacuna antirrábica.-

1.8.1. Vacuna antirrábica nacional.-

El Ministerio de Salud a través del Instituto Nacional del Salud produce la vacuna antirrábica nacional y proporciona vacunas inactivadas, elaboradas en Cerebro de Ratón Lactante (CRL) y en cultivo celular en células BHK (Riñón de Hámster Lactante) cepa 21 C13. (9)

La presentación de ambos tipos de vacuna es líquida, la CRL es de color blanco turbio por ser una suspensión y la de Cultivo Celular es de color rosado, envasados en frascos de 10 dosis y en la etiqueta se especifica:

- Temperatura de conservación.
- Fecha de expiración.
- Especies a vacunar.
- Dosis. (9)

Debe conservarse a temperaturas de 4°C a 8°C, desde que sale de producción hasta el momento de su utilización, para asegurar la potencia de la vacuna. La vacuna no debe congelarse. (9)

1.8.2. Vacuna antirrábica importada.-

Generalmente las vacunas de laboratorios internacionales son producidas en sustrato celular de cepas tipo Pasteur RIV inactivadas con betapropiolactona en cultivos celulares -Células NIL2; BHK21- libres de tejido nervioso que proceden de embriones de hámster o de una cepa fija PVII Pitman Moore (origen Pasteur) transmitido por la cadena de virus Wistar (GS-57). Este producto pasa por una filtración a través de poros cercanos al tamaño del virus antes del proceso de inactivación y luego se le somete a pruebas de virulencia en ratones vacunados según la técnica del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH). (6)

Los cultivos celulares se producen usando células primarias o líneas de células continuas. Los sistemas de siembra varían entre los diferentes fabricantes. Durante la década pasada el empleo de vacunas inactivadas para la inmunización animal ha aumentado considerablemente; también el empleo de adyuvantes como el fosfato de aluminio. (3)

1.9. Técnica de aplicación de la vacuna.-

La vía de administración de la vacuna con el fin de normalizar los procedimientos de vacunación es subcutánea y en la región interescapular y la primovacuna se hará a la edad de 3 – 4 meses y una dosis de refuerzo un año después aproximadamente. La finalidad de vacunar entre los 13 a 16 semanas es evitar que la presencia de

anticuerpos antirrábicos transmitidos al cachorro por el calostro de la madre pueda interferir con el desarrollo de la inmunidad. (9)

1.10. Nivel de anticuerpos vacunales.-

Requerimiento de potencia para vacunas animales.- Se sugiere que las vacunas inactivadas con una potencia menor a 1,0 UI por dosis como medida por la prueba NIH u otro prueba reconocida no deberá ser permitida salvo que se haya determinado la duración de la protección de al menos un año en las especies que se van a usar. (9)

Las vacunas inactivadas antirrábicas actualmente producidas para uso veterinario tienen diversas actividades antigénicas y llegan a brindar protección hasta por 36 meses después de la aplicación; las vacunas que tienen un valor mínimo de 2,0 UI por dosis. La estabilidad de la línea de cultivo celular de Hamster NIL2 confiere una duración de dos años después de la producción. (10)

1.11. Investigación epidemiológica.-

La investigación epidemiológica, debe hacerse tanto en la población humana como en la población animal susceptible de enfermar, fundamentalmente las especies que constituyen el reservorio principal: en el caso de la rabia urbana, el perro y en rabia silvestre, el murciélago. Asimismo se debe realizar investigación y vigilancia de factores de riesgo. (9)

1.12. Prueba de seroneutralización.-

Se extrae sangre de la vena cefálica del cachorro en cantidades de 3 – 5 ml (que permita un remanente de suero por lo menos 1 a 1,5 ml) dejándole coagular a temperatura ambiente por una hora y luego se centrifuga a 1 500 rpm durante 10 minutos para la obtención del suero y su conservación a -20° Celsius para su análisis y contraste con CVS (Challenge Virus Standard) y el cálculo de las UI/mL del título de anticuerpos vacunales. Se considera a un perro protegido si el título de anticuerpos es mayor o igual a 0,5 UI/mL. (11)

1.12.1. Seroneutralización en ratones.-

Esta prueba está basada en la neutralización de una serie de diluciones del suero problema con una dosis constante de virus rábico de desafío (Challenge Virus Estándar) previamente titulado. El procedimiento es el siguiente: primero, se inactivan los sueros problema a 56 °C por 30 minutos, luego se preparan diluciones seriadas del suero: "1/2:5, 1/12:5, 1/62:5, 1/312:5". De cada una de estas diluciones se pasan 0,2 mL a cada uno de una serie de tubos de ensayo. A continuación se agregan 0,2 mL de la dilución de virus correspondiente a 64 DL₅₀ de esta forma se produce una dilución doble tanto de los virus como del suero, con lo que la dilución final de virus es de 32 DL₅₀ y las diluciones finales del suero de 1/5; 1/25; 1/125; 1/625; etc. A esto se incluye en la prueba un suero de referencia internacional (NIBSC) (National Institute for Biological Standards and Control). (12)

Una vez incubados los sueros a 37 °C durante 1,5 horas, los tubos se colocan en un recipiente con agua y hielo. Luego, se inoculan intracerebralmente 0,03 ml de estas mezclas suero-virus en seis ratones, en el caso de los sueros problema y se emplean ocho ratones para la titulación de virus. Se emplean ratones albinos suizos. Los

distintos grupos de ratones se mantienen en observación por 14 días y se consideran positivos los que muestren sintomatología compatible a rabia durante este período. Se realiza el análisis de la mortalidad por el método de Reed and Muench para la determinación de valores logarítmicos alcanzados en la seroneutralización. (12)

1.12.2. Seroneutralización en células BHK₂₁-

La principal aplicación de la serología para el diagnóstico de la rabia clásica es determinar respuestas a la vacunación, en animales domésticos antes de viajes internacionales, o en la población de fauna después de inmunización oral. De acuerdo con la OMS (comité expertos de la OMS en estandarización biológica, 1985), se considera que 0,5UI/mL de anticuerpos contra la rabia es el título measurable mínimo de anticuerpos que representa un nivel de inmunidad en el ser humano, que se corresponde con la capacidad de protección frente a la infección por el virus de la rabia. Para confirmar una respuesta satisfactoria a la vacunación, en perros y gatos se utiliza la misma medición. (11)

El Método Rápido de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT) Consiste en incubar diluciones sucesivas de los sueros a titular y un suero de referencia cuyo título en UI/mL es conocido, con una dosis constante de virus. A continuación se agrega una suspensión de células sensibles (BHK o BSR). Después de 24h de incubación se podrá apreciar la diferencia en el número de focos de infección entre las celdillas que recibieron el suero de referencia y aquellas que han recibido los sueros desconocidos. La disminución del título infeccioso permite calcular el título de los sueros desconocidos por comparación con el suero de referencia. Es el método más usado en los países desarrollados y permite obtener resultados en 26 h teniendo una sensibilidad equivalente al test de la seroneutralización. (12)

Como la precisión de los test en animales es limitada, las evaluaciones en líneas celulares estables han sido cada vez más utilizadas.(13)

Un estudio dirigido por “International Laboratory for Biological Standards, State Serum Institute, Copenhagen, Denmark” (Laboratorio para Estándares Biológicos, Instituto de Suero, Copenhagen, Dinamarca) y otros laboratorios demostraron que el test de RFFIT es más confiable del que realizado en animales, llevando a WHO (OMS) a recomendar ésta técnica como la más adecuada para la evaluación de potencia de inmunoglobulinas antirrábicas. (13)

1.13. Eficacia.-

Es la proporción de enfermedad impedida en los individuos vacunados; es decir, es la proporción de enfermedad de los individuos sin vacunar que es atribuible cuando el factor es la no vacunación. (2)

“La eficacia de las vacunas veterinarias deberá demostrarse mediante estudios estadísticos válidos de la vacunación en prueba en el animal hospedador utilizando los animales más sensibles, normalmente los más jóvenes, para los que ha de recomendarse el producto. En cada especie animal, los datos deben apoyar la eficacia de la vacuna en cada régimen de vacunación que se describe en la etiqueta de recomendaciones del producto, incluyendo los estudios sobre el inicio de la protección cuando en la etiqueta del producto se haga referencia a dicho inicio y a la duración de la inmunidad. Las pruebas se realizarán bajo condiciones controladas, comenzando, siempre sea posible, con animales seronegativos”. (8)

1.14. Otras investigaciones similares.-

1.14.1. Susceptibilidad canina a rabia después de una campaña de vacunación en zonas endémicas del Perú.-

Tres meses después de una campaña nacional de vacunación en Perú (2004), en distritos de Juliaca y Tambogrande se midió el nivel de respuesta inmune con 32% de protección adecuada. El método usado fue seroneutralización en ratón. (11)

1.14.2. Evaluación de la seroconversión como respuesta a la vacunación antirrábica en perros en el departamento del Valle del Cauca,

En el 2009, en el valle del Cauca, Colombia, por el método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para la detección y cuantificación de anticuerpos neutralizadores antiglicoproteína del virus rábico en el suero de los perros, 16% tuvieron respuestas menores a 0,5 UI/mL y 9,1 % con 0,0 UI/mL de anticuerpos antirrábicos neutralizantes. En el estudio se determinó que se aplicaron 17 marcas de vacunas y el porcentaje de seronegativos disminuyó de 23,1 %, en perros menores de seis meses, a 2,1 %, en aquellos entre tres y cuatro años de edad. (14)

1.14.3. Respuesta inmune de caninos vacunados contra el virus de la rabia.-

Determinación del título de anticuerpos contra la rabia en 140 caninos con historia de vacunación y comparar con los títulos protectores establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). De las 140 muestras analizadas, 50 (36%, IC 95%: 28 - 44%) presentaron títulos de anticuerpos superiores a 0.5 UI/mL, indicando un nivel

de protección aceptable según la OIE. El restante (64%) de los animales con historia de vacunación, no tienen títulos con niveles de protección (mayores o igual a 0.5 UI/mL). Los resultados del presente trabajo, dejan de manifiesto el posible riesgo de infección que tiene la población canina estudiada. Medidas sanitarias más rigurosas deberían ser consideradas para lograr un estado inmunitario aceptable en esta población. (15)

1.14.4. Comparación de la respuesta de anticuerpos después de la vacunación con dos vacunas veterinarias inactivadas.-

Un estudio comparativo de dos vacunas comerciales inactivadas fueron medidos por un período de cuatro meses por el método FANV test (Fluorescent Antibody Virus Neutralization) donde los resultados para vacuna A fue de 93% y B 100% de protección 14 días post vacuna; en la evaluación al día 28 fue de 93% para A y 67% para B. evaluaciones posteriores dieron resultados de detrimento de la capacidad inmunogénica de las vacunas. (16)

En la práctica profesional diaria los animales son primovacunados entre las 13 a 16 semanas de edad y se evalúa serológicamente las respuestas inmunes esperándose coberturas adecuadas desde los 14 días post vacunales en adelante. (16)

1.14.5. Factores asociados al éxito de vacunación de rabia de perros en Suecia.-

Un estudio de los factores asociados al éxito de la vacunación contra rabia en perros usando vacunas comerciales, determinó que en mascotas que recibieron una sola dosis de vacuna menores de 6 meses declinan los títulos de anticuerpos en las evaluaciones a los 120 días post vacunal. (17)

Depende del tipo de vacuna usada, la raza y el tamaño, la edad (menores de 6 meses y mayores de 5 años) y es deseable la revacunación. (17)

1.14.6. Validación de bioensayos para el estudio de inmunogenicidad de vacuna contra la rabia.-

Un estudio comparativo de dos vacunas comerciales inactivadas fueron medidos por un período de cuatro meses por el método FANV test (Fluorescent Antibody Virus Neutralization) donde los resultados para vacuna A fue de 93% y B 100% de protección 14 días post vacuna; en la evaluación al día 28 fue de 93% para A y 67% para B. evaluaciones posteriores dieron resultados de detrimento de la capacidad inmunogénica de las vacunas. (18)

1.14.7. Nivel logrado de inmunidad de rabia en perros que vagan en África y Asia.-

Del estudio serológico practicado a perros callejeros vacunados de zonas de Sud-África en Johannesburgo y en dos lugares de Indonesia se pudo inferir que es importante el mantener la frecuencia de vacunaciones y los estudios serológicos apropiados para determinar los periodos de vacunación para la efectiva protección de los perros expuestos al medio callejero. (19)

El interés del presente trabajo de investigación es evaluar en nuestro país que la aplicación de vacuna comercial y vacuna nacional en condiciones controladas provean inmunidad suficiente para proteger los animales primovacunados ante una posible exposición ó desafío, garantizando de ésta manera la salud de la población.

2. Variables de estudio.-

Variable independiente:

X1: Vacuna antirrábica nacional

X2: Vacuna antirrábica importada.

Variable Dependiente

Y: Nivel anticuerpos vacunales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESPACIO Y TIEMPO

El departamento de Piura se encuentra localizado al noroeste del país entre los 4°5' y 6°22' latitud sur y 79°00' y 81°07' longitud oeste. La provincia de Piura capital del departamento se encuentra a 25 m.s.n.m. la temperatura media en verano es de 35°C la máxima y 23°C la mínima. Limita con las provincias de Paita y Sullana al noroeste, con las de Ayabaca, Morropón y departamento de Lambayeque por el este, y con la provincia de Sechura por el suroeste. Tiene una población proyectada al 2014 de 754 849 habitantes, 654 978 en la zona urbana y 99 871 en zona rural de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), con una densidad poblacional de 788,21 hab/Km².

El estudio se realizó en dos etapas que se desarrollaron en dos lugares diferentes. La primera etapa consistió en la inmunización de los animales que se realizó en la ciudad de Piura y la segunda etapa en la que se realizó el análisis de las muestras de suero, se ejecutó en el Laboratorio de Zoonosis Virales del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (Lima).

Esta investigación, se efectuó entre los meses de mayo 2014 a julio del 2015.

2. POBLACIÓN Y MUESTRA:

2.1. Población:

La población estimada en la provincia de Piura para el año 2012 según información de la dirección regional de salud Piura, es de noventa y dos mil novecientos treinta (92 930) canes

2.2. Muestra:

Para determinar el tamaño de muestra, cuando se comparan medias, se evaluaron 27 animales para el cálculo estadístico, que en promedio tenían entre 13 a 16 semanas de edad, sin vacuna para rabia, que se presentaron en consulta particular sin distinción de sexo, evaluados como sanos y desparasitados en la ciudad de Piura.

La aplicación de la vacuna fue como se define en el protocolo correspondiendo a una dosis de vacuna, interescapular y de aplicación subcutánea.

3. DISEÑO `EXPERIMENTAL.-

Para el presente estudio se desarrolló un diseño experimental para contraste de hipótesis.

Siendo un trabajo de investigación experimental verdadera con diseño al azar $\geq 0,5$ UI/ml se aceptaría H1; por tanto las vacunas serían óptimas.

Se realizó un muestreo aleatorio probabilístico simple para comparación de medias y el tamaño muestral se definió por:

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S^2}{d^2}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra para cada grupo.

Z_{α} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado = 1,645 \approx 1,7

Z_{β} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado = 1,645 \approx 1,7

S = Varianza de la variable cuantitativa del grupo control o de referencia 0,5

d = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (cuantitativos) 0,5

Del cálculo establecido se obtienen 12 individuos muestrales para cada grupo de estudio, en total 24 perros; pero por conveniencia se analizaron los sueros de 27 perros.

A cada perro se le hizo una prueba serológica inicial o basal y otra final a los 18 días posteriores a la vacunación antirrábica.

4. EQUIPOS Y PROCEDIMIENTOS.-

1. Equipos

Material biológico:

- 27 perros de 13 a 16 semanas de edad^(*)
- Catorce dosis de vacuna antirrábica nacional.
- Trece dosis de vacuna antirrábica importada.

^(*)Por aleatoriedad y teniendo 27 individuos se distribuyó de esa manera.

Insumos:

- 81 tubos de vacío (vacutainers™) de 6 ml con coagulante.
- 27 tubos de vacío de 6 ml.
- 54 Viales 0,150 ml (150 µL).
- Ocho baterías de gel refrigerante (Gel pack).
- 40 Placas portas Lab-Teck™ de 08 cámaras.
- 250 mL Acetona 80%
- 250 mL MEM (Minimum Essential Medium).
- Virus CVS (Challenge Virus Standard)
- Tres frascos de cultivos de Células BHK₂₁.
- Conjugado de Isocionato de fluoresceína.
- Dos litros de Buffer.
- Dos litros de agua destilada.
- 02 cajas de micropipetas desechables de 200 µL.
- 02 cajas de micropipetas desechables de 100 µL.

- 02 cajas de micropipetas de 50 μ L.
- 15 pipetas desechables de 10 mL.
- 15 pipetas desechables de 5 mL.
- 12 pares de guantes quirúrgicos.
- 81 jeringas desechables.
- 54 agujas 21 G x 1”.
- 27 agujas 23 G x 1½”.
- Un Kg. Algodón hidrófilo.
- Un litro alcohol 96°.
- Un rollo papel toalla.
- Un rollo esparadrapo.
- 01 millar papel bond.

Instrumentos:

- 01 Refrigerador.
- 01 Centrífuga.
- 02 Conservadores de poliestireno (tecnopor).
- 01 Mesa de sujeción.
- 02 Rejillas porta tubo.
- 01 Computador.
- 01 Impresora.
- Equipo baño maría.
- Cámara de bioseguridad II.
- 02 micropipeteadoras de 200 μ L.
- 02 micropipeteadoras 100 μ L.
- 02 micropipeteadoras 50 μ L.
- 02 Pipeteadoras automáticas.
- 01 Incubadora de temperatura y CO₂.

- 01 Secadora.
- 01 Estereoscopio.
- 01 Microscopio de fluorescencia invertido.
- 02 lapiceros.
- 01 archivador.
- 01 USB 2Gb.
- Servicio de laboratorio del Instituto Nacional de Salud por 45 días.
- Servicio de internet 50 horas.

2. Procedimiento.-

Primera etapa.-

Postulado el proyecto y hecha la revisión bibliográfica correspondiente, en coordinación con el asesor se plantearon propagandas en banners para informar a los dueños de las mascotas de la importancia y necesidad de aplicar la primovacuna contra la rabia y solicitar de ellos nos permita realizar con el consentimiento informado el desarrollo de la tesis.

Se solicitó el permiso al laboratorio de zoonosis viral del Instituto Nacional de Salud para que nos permitan el uso y disposición de los equipos e insumos apropiados para el presente trabajo de investigación.

Coordinado de manera apropiada y con el consentimiento firmado se procedió a tomar las muestras correspondientes a la fase de campo, de forma aleatoria.

Segunda etapa.-

A cada cachorro se le registró los datos y desparasitó con una combinación comercial de Mebendazol y Prazicuantel (220 mg + 50 mg respectivamente) cinco días previos a la inoculación de la vacuna, tomando en cuenta la dosis recomendada de ésta asociación anti-parasitaria que es de 22 mg/Kg PVde Mebendazol y 5 mg/Kg PV de Prazicuantel.

Al quinto día se tomó la muestra sanguínea basal, rotuló y procesó de acuerdo a lo siguiente:

Obtención de suero de sangre completa para la recuperación de anticuerpos:

- Se procedió a la extracción de sangre a través de la vena cefálica (4 ml aprox.); en tubos para estudios de bioquímica sanguínea con coagulante.
- Incubó a 37 °C durante 1 hora hasta que la sangre estuvo coagulada.
- Se refrigeró la muestra a 4°C durante 12 horas para permitir que el coágulo sanguíneo se retrajera.
- Se extrajo el suero con jeringa de aguja fina 23G x 1½" (aprox. 2 ml) en tubos nuevos (importante no lisar los eritrocitos del coágulo).

- Centrifugó el suero a 4000 rpm durante 20 min a 4 °C y se colectó 1,5 mL del suero en tubos de bioquímica vacutainer™.
- Se etiquetó y conservó el sobrenadante a -20 °C.

El suero se transportó vía aérea en caja de poliestireno expandido de alta densidad protegiendo la temperatura con baterías congeladas de gel refrigerante en cantidad suficiente para tal efecto.

Llegado a destino se descongelaron en agua fría y se procedió a colocarlos en microviales de 150 μ L, rotularlos, inactivarlos en baño maría por 30 minutos a 56 °C y almacenarlos a temperatura de refrigeración (2 – 6 °C).

El método RFFIT implementado por el laboratorio del Instituto Nacional de Salud contempla la utilización de portas Lab-Teck™ de 8 cámaras; para el estudio se usaron 4 cámaras por muestra de suero canino (diluciones de 1/5; 1/25; 1/125; 1/625).

Todo el proceso se realiza en cámara de Bioseguridad II esterilizada previamente con luz Ultravioleta por 15 minutos y los materiales a usar deben haber estado previamente colocados dentro de la cámara para esterilizarlos también. El procedimiento es como se detalla a continuación:

- Al primer pocillo 75 μ L MEM (Minimun Essential Medium) y 100 μ L a los pocillos 2-4.
- Añadir 50 μ L suero inactivado del animal en estudio sólo al primer pocillo.

- Homogenizar con micropipeta de 25 μ L unas 30 veces y posteriormente trasegar 25 μ L al siguiente pocillo. Repetir hasta el cuarto pocillo y desechar los 25 μ L restantes del último, en cubeta estéril que contiene virucida.
- Adicionar 100 μ L virus CVS (Challenge Virus Standar) a cada pocillo.
- Incubar en estufa a 37 °C – 5% CO₂ por 90 minutos.
- Añadir 200 μ L de células BHK₂₁.
- Incubar en estufa 37 °C – 5% CO₂ por 20 a 24 horas.

Retirar las placas de la estufa incubadora:

- Descartar el líquido de cada pocillo.
- Colocar encima de baterías congeladas las placas y adicionar 200 μ L de acetona al 80% por 15 minutos.
- Eliminar la acetona sacudiendo ligeramente la placa en papel secante.
- Secar con secadora de aire caliente cuidando de no incidir de forma directa.
- Añadir 120 μ L de conjugado de Anticuerpos de rabia + Isotiocionato de Fluoresceina en cada pocillo.
- Llevar a estufa incubadora 37 °C – 5% CO₂ por una hora.
- Retirar el conjugado escurriendo y retirar el cubo de cada placa dejando sólo la lámina.
- Sumergir en buffer por tres veces primero y agua destilada tres veces después.

- Finalmente secar con secadora la placa.

Se lee con microscopio invertido de fluorescencia a 200x.

Tercera etapa.-

Con los resultados obtenidos se realizó el análisis de inferencia obtenido y se procedió a elaborar el informe final de tesis.

5. DISEÑO ESTADÍSTICO

Para la contrastación de la hipótesis; se realizó la comparación de medias, para muestras independientes (*T_{student}*):

$$T = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

Donde:

T= prueba de student

X₁= Promedio Vacuna nacional.

X₂= Promedio Vacuna importada.

σ₁= Desviación standard vacuna nacional.

σ_2 = Desviación standard vacuna importada.

n= número de datos.

IV. RESULTADOS

➤ **Previo a la vacuna antirrábica.-**

Todos los animales antes de la aplicación de la vacuna son desparasitados y evaluados clínicamente como sanos. Como resultado de la primera evaluación tienen 0,0 UI/mL de protección de anticuerpos para un desafío de rabia (sin protección). En promedio 106,41 días de edad a la investigación (15 semanas, 1 día).

➤ **Posterior a la vacuna.- (Gráfico 01)**

Todas las respuestas post vacunales son positivas aún cuando no todas alcanzaron los niveles de 0,5 UI/mL. El promedio de respuesta al desafío de rabia es de 0,89 UI/mL.

Están inmunizados 11 de 27 animales con títulos $\geq 0,5$ UI/mL (40,74%).

3. individuos de 27 (11,11%) tienen títulos $> 0,4$ UI/mL por lo que probablemente éstos animales están en proceso de alcanzar los títulos mínimos requeridos para considerarse protegidos, tomando en cuenta que se evaluaron los sueros extraídos el día 18 postvacunal.

Los más altos títulos alcanzados por las mascotas a la vacunación son para las respuestas a las vacunas importadas (2,40 UI/mL; 3,08 UI/mL); pero el mayor número de individuos que logran los títulos de anticuerpos $\geq 0,5$ UI/mL es para los animales vacunados con vacuna nacional.

De la vacuna nacional (Figura01): N° animales 14.

Promedio de edad 106 días (15 semanas, 1 día).

Promedio de respuesta 0,85 UI/mL.

Porcentaje de animales protegidos según requerimientos OMS $\geq 0,5$ UI/mL = 07 (50%).

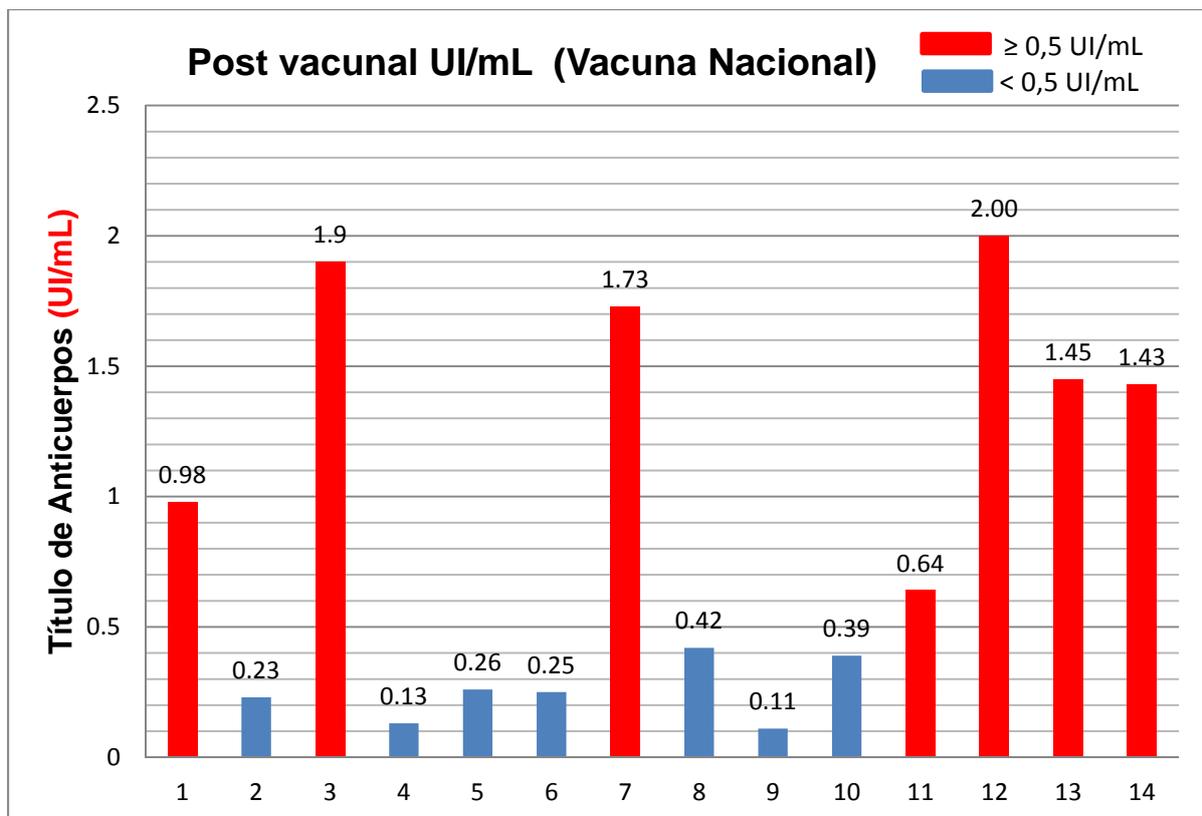


Figura 01. Respuesta serológica a la vacuna nacional. Método RFFIT en cultivo celular BHK₂₁.

De la vacuna importada (Figura 02): N° animales 13.

Promedio de edad 107 días (15 semanas, 2 días).

Promedio de respuesta 0,94 UI/mL.

Porcentaje de animales protegidos según requerimientos OMS $\geq 0,5$ UI/mL = 4 (31%).

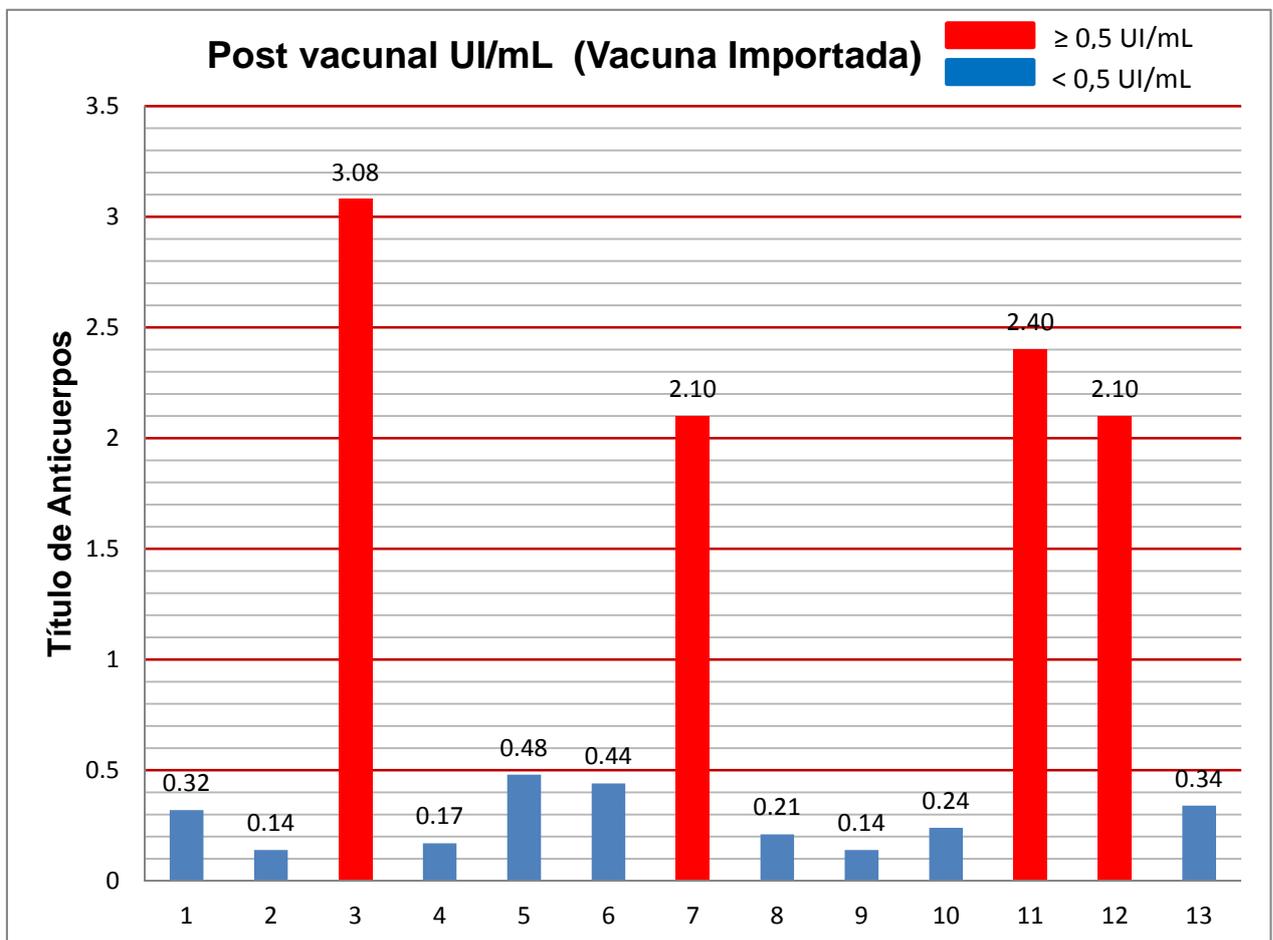


Figura 02. Respuesta serológica a vacuna importada. Método RFFIT en cultivo celular BHK₂₁.

De la investigación experimental.-

La derivación operacional de las variables sería:

| Variable | Indicador | Categoría | Criterios de medición | Tipo | Escala de Medición |
|----------------------|-----------|--------------|-----------------------|------------|--------------------|
| Nivel de Anticuerpos | UI/mL | Protegido | $\geq 0,5$ UI/mL | Categórica | Nominal |
| | UI/mL | No protegido | $< 0,5$ UI/mL | Categórica | Nominal |

Del análisis estadístico.-

Se evaluó el análisis de resultados usando el software estadístico SPSS para t student diferencias medias. No hay diferencias significativas en la titulación de las vacunas.

Prueba de muestras relacionadas

| | Diferencias relacionadas | | | | | t | gl | Sig. (bilateral) |
|--|--------------------------|--------------------|---------------------------|---|----------|--------|----|------------------|
| | Media | Desviación típica. | Error típico. de la media | 95% Intervalo de confianza para la diferencia | | | | |
| | | | | Inferior | Superior | | | |
| Valoración Resultado Nacional – Valor Resultado Importada. | -0,12846 | 0,72179 | 0,20019 | -0,56463 | 0,30771 | -0,642 | 12 | 0,533 |

Al realizar la comparación de las medias tanto para la vacuna nacional como importada podemos observar que no existe diferencia significativa entre éstas; a un nivel de

significancia de 0,05 el resultado es 0,533; el cual es mayor que el 0,05 lo que da lugar a determinar que no existe diferencia significativa.

La intención en este estudio fue demostrar la diferencia de las medias como lo dice en su hipótesis alterna “El nivel de anticuerpos producido por vacuna antirrábica nacional y vacuna antirrábica importada en perros (*Canis familiaris*) primovacunales de 13 a 16 semanas de edad es igual ó mayor a 0,5 UI/ml.”, y su conclusión solo se limitaría a demostrar que hay o no hay la diferencia entre dichas medias, para esta población de estudio.

V. DISCUSIÓN

El estudio de la seroconversión de la vacuna nacional e importada en perros primovacunados en Piura confiere a ambos tipos de vacunas respuestas inmunológicas positivas, aún cuando no todas alcanzan los niveles aceptables según el patrón internacional de OMS correspondiente a $\geq 0,5$ UI/ml.

Según **Berndtsson et al** (17), la rabia canina puede ser efectivamente controlada en perros sanos, usando vacunas inactivadas en cultivo celular con valores inmunogénicos mayores a 1 UI/mL que provean un periodo de duración de la inmunidad ante un desafío. La revacunación es deseable.

Mourão en su investigación de la validación de bioensayos para el estudio de la inmunogenicidad de la vacuna de rabia (18), en una de sus conclusiones establece que mascotas primovacunadas contra rabia, tienen niveles de anticuerpos significativamente menores que otros que recibieron dos o más vacunas. Los títulos rápidamente decrecen en el tiempo en los primovacunados.

J.M. Minke et al en su trabajo de investigación acerca de evaluar dos vacunas comerciales monovalentes inactivadas evaluadas los días 14, 28, 56... 120, en sus respuestas post vacuna si bien fueron de 93% y 100% adecuadas al día 14, notaron detrimento de la cobertura en las evaluaciones posteriores llegando al día 120 con valores de 40% y 7% respectivamente en protección contra un probable desafío. (16)

Moreno et al (15), Andrés Paez et al (14) en trabajos de investigación similares en otros países de la región concluyen que es necesario revacunar los cachorros que reciben la primera vacuna como se hace con otro tipo de vacunas como lo son el distemper, parvovirus, leptospirosis, etc.

VI. CONCLUSIONES

Las vacunas tanto nacional como importada generan respuestas positivas en la generación de anticuerpos contra el virus de rabia; tanto la vacuna nacional como la importada deberán ser evaluadas por el profesional veterinario.

La revacunación posterior a la primovacuna es importante para mantener y/o hacer persistente por más tiempo la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica.

Son muchos los factores que pueden influir para que los animales no presenten un nivel adecuado de protección tras la vacunación. Entre ellos podemos considerar incluir la calidad de las vacunas y su capacidad inmunogénica, la forma de conservación de las mismas, la correcta administración, el estado de sanidad del animal, así como su estado nutricional. Por lo tanto, desde el punto de vista sanitario, esta situación debe ser abordada de forma integral, considerando todos estos aspectos como influyentes en una respuesta inmune adecuada.

VII. RECOMENDACIONES

Incluir en la norma técnica peruana para prevención y control de rabia la revacunación de cachorros o canes primovacunados.

Promover la vacuna nacional para uso comercial en clínica e inclusive promover la disponibilidad de monodosis.

Efectuar por parte de los organismos de control la trazabilidad de las vacunas comerciales sobretodo en departamentos con climas tropicales como el nuestro.

Replicar el estudio para evaluar el pico de inmunidad y la persistencia en el tiempo de las vacunas, tanto nacionales como importadas y poder recomendar la revacunación en el momento oportuno, considerando sobretodo regiones de Salud con evidencias de zoonosis de rabia.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tizard I. Inmunología veterinaria. 8va edición. Editorial Elsevier-Saunders Barcelona; 2009. p. 270-1.
2. Wayne M, Meek A, Willeberg P. Epidemiología veterinaria, principios y métodos. Editorial Acribia. Zaragoza 1997. p 150.
3. World Health Organization. Expert consultation on rabies. Technical report series 931. First report 2004. Geneva, Switzerland. p 15.
4. World Health Organization. Weekly epidemiological record. N° 49/50. 2007, 82. Pp 428.
5. Morales-Martínez M. et al. Importancia inmunológica de la proteína N en la infección por virus de la rabia. Revista Veterinaria México Volumen 37 número (3) julio – setiembre 2006.
6. Ocadiz J. Epidemiología en animales domésticos, control de enfermedades. Primera reimpresión. Segunda edición. Impresora Publimer SA. México 1995. p 62
7. Organización Mundial de la Salud. Comité de expertos de la OMS sobre la rabia. Séptimo informe ISBN 924320709 1. Serie de informes técnicos 709. Ginebra 1984. p 7.

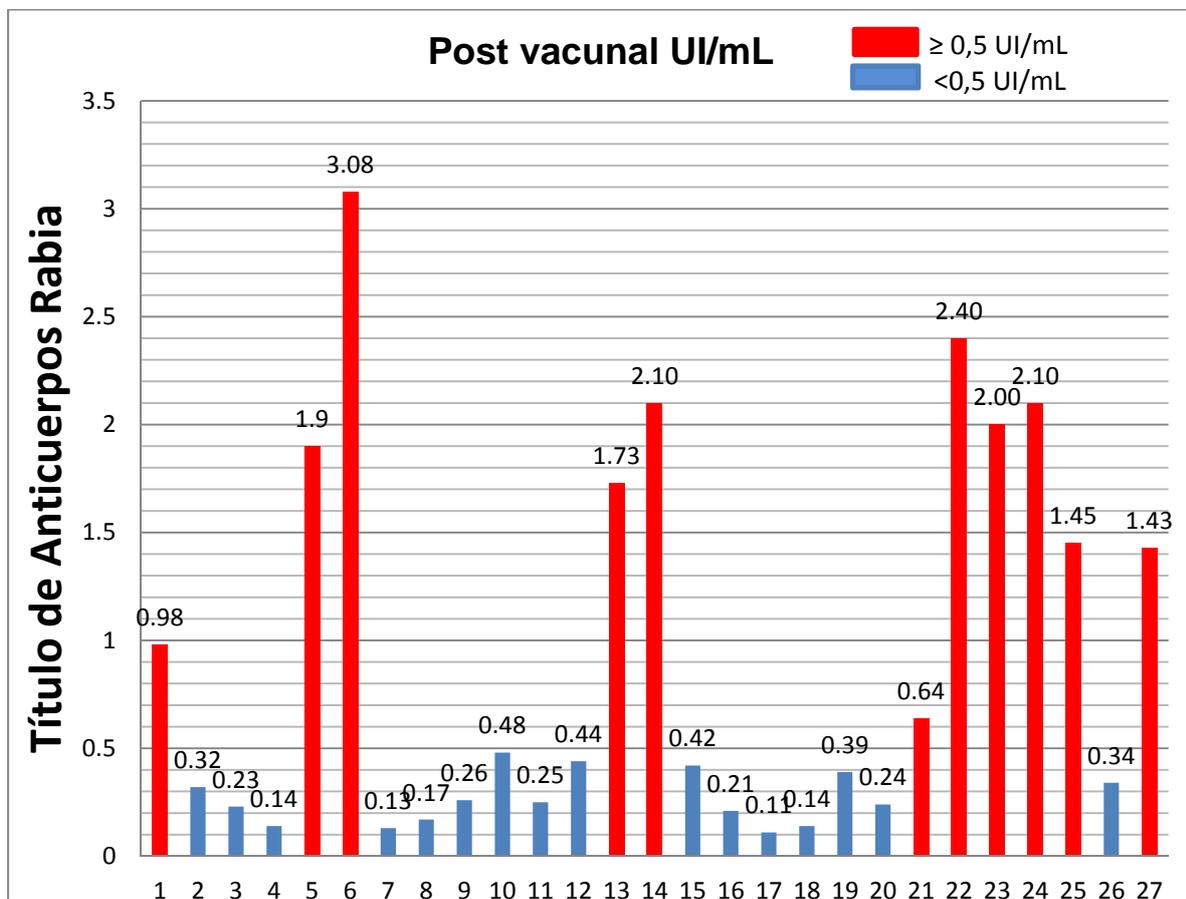
8. Rodriguez E. Rabia, riesgos y control. Análisis de la situación de la rabia en España; Organización Colegial Veterinaria 2014
9. Ministerio de Salud. Norma técnica de salud para la prevención y control de la rabia humana en el Perú. Segunda edición, Lima 2008. p 40-41.
10. Johnson N, Mansfield K. y Fooks A. Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. *Journal of general virology* 2002(83). p 2663 – 69.
11. Lopez R, Díaz A, Condori E. Susceptibilidad canina a rabia después de una campaña de vacunación en zonas endémicas del Perú. *Revista Perú Medica Exp Salud Pública* 2007; 24(1): p 13-19.
12. Kaplan L, Meslin F. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization; 1976.
13. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Volumen 1; 7ma edición. Paris, Francia 2012; p 349
14. Páez A, et al. Evaluación de la seroconversión como respuesta a la vacunación antirrábica en perros en el departamento del Valle del Cauca, Colombia, 2009. *Biomédica*, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 474-84, junio 2011. ISSN 0120-4157.
15. Moreno, Burghi, Piaggio, Puentes; *Respuesta inmune de caninos vacunados contra el virus de la rabia*; Universidad de la república, facultad de medicina veterinaria, Montevideo-Uruguay 2011

16. Minke, J.M., et al. Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines, *Veterinary Microbiology* (2007), doi:10.1016/j.vetmic.2008.06.024
17. Berndtsson L, et al. Factors associated with the success of rabies vaccination of dogs in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2011, Suecia, 53:22
18. Mourão R; Validação de bioensaios para o estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva; tesis para obtener el título de doctorado en Biotecnología; Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil 2010
19. Morters MK, McKinley TJ, Horton DL, Cleaveland S, Schoeman JP, et al. (2014) Achieving Population-Level Immunity to Rabies in Free-Roaming Dogs in Africa and Asia. *Journal Public Library of Science*

ANEXOS

ANEXO 1

Cuadro 01.- Evaluación de títulos de anticuerpos post vacunales por el método RFFIT en cultivo de células BHK₂₁.



Fuente: elaboración propia

ANEXO 2

Cuadro 02.- Cuadro General de “estudio de la seroconversión de las vacunas antirrábicas utilizadas en perros (*Canis lupus familiaris*) primovacunados de 13 a 16 semanas de edad en Piura.

| Correlativo | identif vial post vacunal | resultado basal (UI/mL) | resultado post vacunal (UI/mL) | resultado post vacunal (TITULO) | Edad (días) vacunación | FECHA DE VACUNACIÓN | FECHA DE TOMA MUESTRA | TIPO VACUNA |
|-------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|-------------|
| 1 | 1011 | 0,00 | 0.98 | 117.00 | 109 | 07/06/2014 | 25/06/14 | Nacional |
| 2 | 1021 | 0,00 | 0.32 | 38.90 | 106 | 07/06/2014 | 25/06/14 | Importada |
| 3 | 1031 | 0,00 | 0.23 | 28.11 | 106 | 07/06/2014 | 25/06/14 | Nacional |
| 4 | 1041 | 0,00 | 0.14 | 16.38 | 109 | 07/06/2014 | 25/06/14 | Importada |
| 5 | 1051 | 0,00 | 1.90 | 228.03 | 109 | 07/06/2014 | 25/06/14 | Nacional |
| 6 | 1061 | 0,00 | 3.08 | 380.20 | 106 | 22/08/2014 | 09/09/14 | Importada |
| 7 | 1071 | 0,00 | 0.13 | 15.50 | 108 | 22/08/2014 | 09/09/14 | Nacional |
| 8 | 1081 | 0,00 | 0.17 | 20.89 | 109 | 22/08/2014 | 09/09/14 | Importada |
| 9 | 1091 | 0,00 | 0.26 | 31.60 | 106 | 22/08/2014 | 09/09/14 | Nacional |
| 10 | 1101 | 0,00 | 0.48 | 58.88 | 106 | 22/08/2014 | 09/09/14 | Importada |
| 11 | 1111 | 0,00 | 0.25 | 30.20 | 106 | 22/08/2014 | 09/09/14 | Nacional |
| 12 | 1121 | 0,00 | 0.44 | 53.70 | 107 | 22/08/2014 | 09/09/14 | Importada |
| 13 | 2011 | 0,00 | 1.73 | 213.80 | 108 | 25/08/2014 | 12/09/14 | Nacional |
| 14 | 2021 | 0,00 | 2.10 | 257.00 | 108 | 25/08/2014 | 12/09/14 | Importada |
| 15 | 3001 | 0,00 | 0.42 | 56.23 | 110 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Nacional |
| 16 | 3011 | 0,00 | 0.21 | 43.00 | 112 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Importada |
| 17 | 3021 | 0,00 | 0.11 | 22.90 | 109 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Nacional |
| 18 | 3031 | 0,00 | 0.14 | 29.11 | 109 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Importada |
| 19 | 3041 | 0,00 | 0.39 | 79.43 | 108 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Nacional |
| 20 | 3051 | 0,00 | 0.24 | 49.55 | 109 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Importada |
| 21 | 3061 | 0,00 | 0.64 | 130.02 | 101 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Nacional |
| 22 | 4001 | 0,00 | 2.40 | 323.60 | 101 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Importada |
| 23 | 4011 | 0,00 | 2.00 | 412.10 | 102 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Nacional |
| 24 | 4021 | 0,00 | 2.10 | 427.56 | 101 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Importada |
| 25 | 4041 | 0,00 | 1.45 | 295.12 | 101 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Nacional |
| 26 | 4051 | 0,00 | 0.34 | 69.02 | 102 | 26/08/2014 | 13/09/14 | Importada |
| 27 | 4061 | 0,00 | 1.43 | 193.00 | 105 | 20/09/2014 | 08/10/14 | Nacional |
| | | promedio | 0.89 | | 106.41 | | | |

Fuente: elaboración propia

ANEXO 3

Remisión de vacunas antirrábicas del Instituto Nacional de Salud del Perú.-



Fuente: Elaboración propia

ANEXO 4

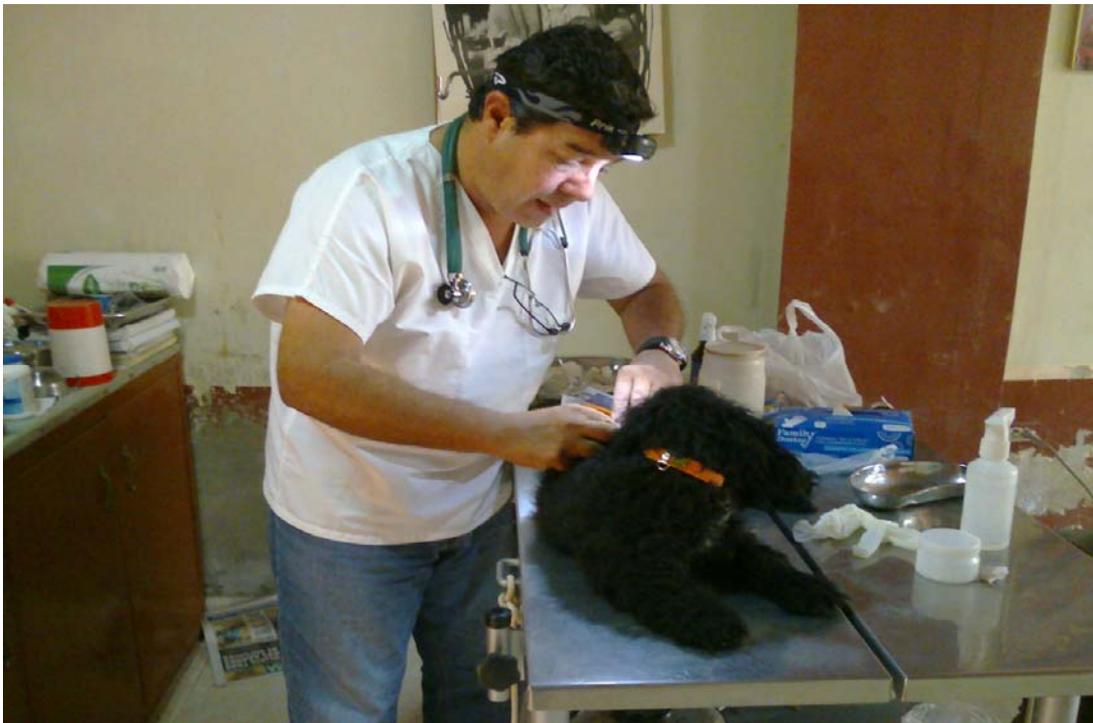
Colección de sangre de la vena safena



Fuente: Elaboración propia

ANEXO 5

Aplicación de vacuna en la región interescapular de forma subcutánea.



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 6

Vaciado de los sueros en los microviales de 150 μ L e identificación.-



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 7

Almacenamiento de los microviales con su identificador de tipo y origen.-



Fuente: Elaboración propia

ANEXO 8

Colección de las células BHK₂₁ del frasco para el proceso de incubado en las placas Lab-Teck™.-



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 9

Proceso de añadidura de las células BHK₂₁.-



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 10

Añadido de conjugado de anticuerpos de rabia + Isiticionato de Fluoresceina.-



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 11

Secado de las muestras.-



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 12

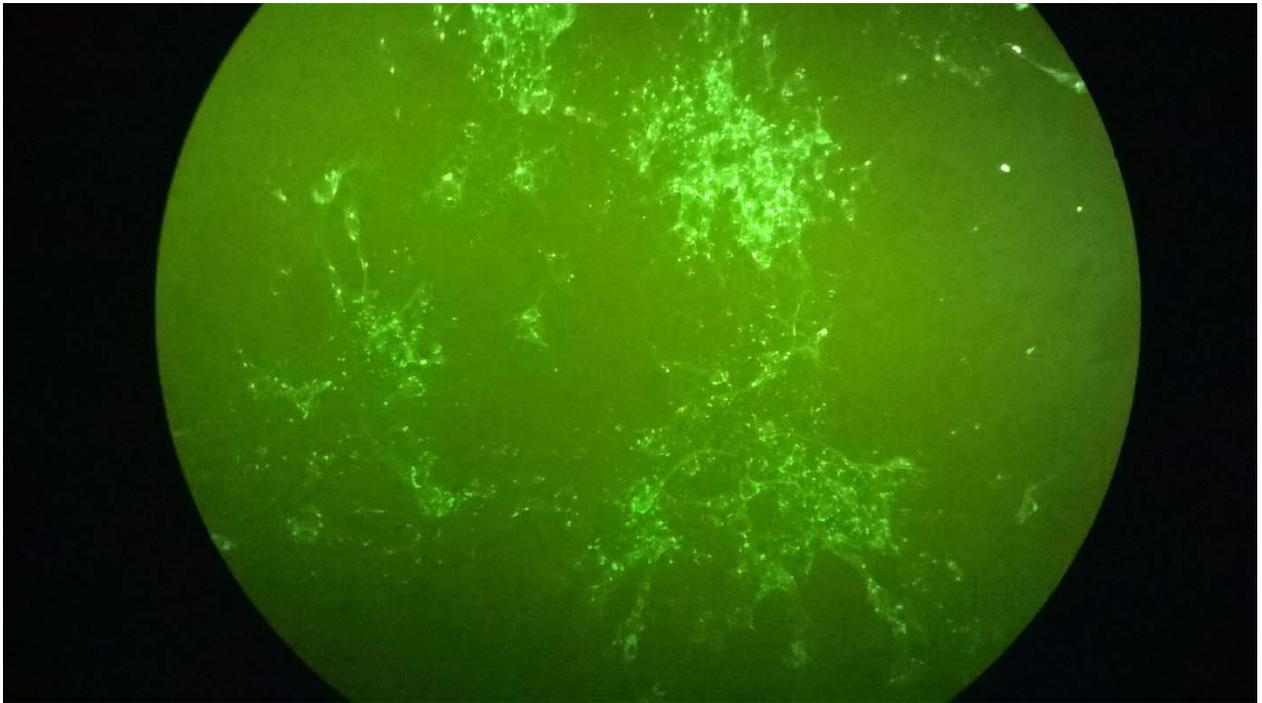
Lectura en microscopio de fluorescencia invertido.-



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 13

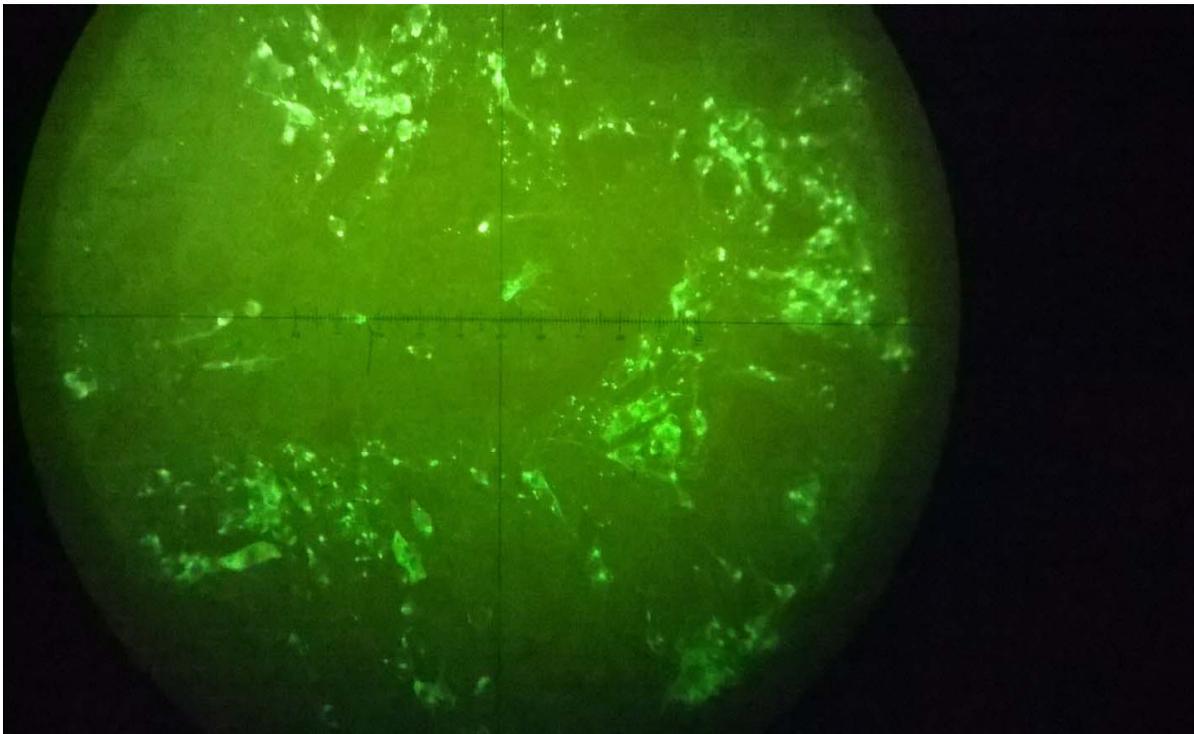
Apreciación de focos de rabia; los puntos blancos tipo isla son artefactos.-



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 14

Vista donde se aprecian focos de rabia.-



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 15

Documento oficial del cálculo de los anticuerpos resultantes de la vacunación.-

PROTICOLO DE TRABAJO
PRUEBA RAPIDA DE INHIBICION DE FOCOS FLUORESCENTES - RIFIT

MUESTRA: PSM105 1071
FECHA DE PRUEBA: 03/11/2014 PROFESIONAL DE LECTURA: EDUARDO GRADOS MORANTE
PROCEDENCIA: PIURA RESPONSABLE PRUEBA: BLCA ALBINA DIAZ OLIVERA

| DILUCION DE L. SUERO | NUMERO DE CAMPOS CONTENIENDO CELULAS INFECTADAS | TOTALES ACUMULATIVOS | | PORCENTAJE DE CAMPO CONTENIENDO CELULAS INFECTADAS |
|----------------------|---|---------------------------------------|-------------------------------|--|
| | | CAMPOS CONTENIENDO CELULAS INFECTADAS | CAMPOS SIN CELULAS INFECTADAS | |
| 1:5 | 0/25 | 0 | 25 | 0/25 |
| 1:25 | 4/25 | 4 | 25 | 4/50 |
| 1:125 | 10/25 | 14 | 15 | 14/39 |
| 1:625 | 15/25 | 29 | 10 | 29/39 |
| 1:3125 | | | | |
| 1:15625 | | | | |
| 1:78125 | | | | |

50% - infectividad inferior al 50% x log del factor de dilución
infectividad sup. al 50% - infectividad inf. 50%

Dif. logaritmos = $\frac{50-36}{74-36} \times 0.7 = \frac{14}{38} \times 0.7 = 0.258$

Dil. final 50% = recíproco dil. partida + dif. Logaritmos

Dilución final 50% = $2.1 + 0.258 = 2.358$

Dilución final 50% = $10^{-2.358} = 228.03$

Potencia relativa del suero en prueba UI/ML

Título final del suero de prueba x NUI (S.R)

Título final del suero de referencia

$\frac{228.03}{240} \times 2 = 1.9$

Título: 1.9 UI/ML

PROTICOLO DE TRABAJO
PRUEBA RAPIDA DE INHIBICION DE FOCOS FLUORESCENTES - RIFIT

MUESTRA: PSM109 1071
FECHA DE PRUEBA: 03/11/2014 PROFESIONAL DE LECTURA: EDUARDO GRADOS MORANTE
PROCEDENCIA: PIURA RESPONSABLE PRUEBA: BLCA ALBINA DIAZ OLIVERA

| DILUCION DE L. SUERO | NUMERO DE CAMPOS CONTENIENDO CELULAS INFECTADAS | TOTALES ACUMULATIVOS | | PORCENTAJE DE CAMPO CONTENIENDO CELULAS INFECTADAS |
|----------------------|---|---------------------------------------|-------------------------------|--|
| | | CAMPOS CONTENIENDO CELULAS INFECTADAS | CAMPOS SIN CELULAS INFECTADAS | |
| 1:5 | 1/25 | 1 | 24 | 1/25 |
| 1:25 | 12/25 | 13 | 17 | 13/30 |
| 1:125 | 21/25 | 34 | 4 | 34/38 |
| 1:625 | 25/25 | 59 | 0 | 59/59 |
| 1:3125 | | | | |
| 1:15625 | | | | |
| 1:78125 | | | | |

50% - infectividad inferior al 50% x log del factor de dilución
infectividad sup. al 50% - infectividad inf. 50%

Dif. logaritmos = $\frac{50-43}{79-43} \times 0.7 = \frac{7}{46} \times 0.7 = 0.1$

Dil. final 50% = recíproco dil. partida + dif. Logaritmos

Dilución final 50% = $1.4 + 0.1 = 1.5$

Dilución final 50% = $10^{-1.5} = 31.6$

Potencia relativa del suero en prueba UI/ML

Título final del suero de prueba x NUI (S.R)

Título final del suero de referencia

$\frac{31.6}{240} \times 2 = 0.26$

Título: 0.26 UI/ML

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 16

Grupo de trabajo del laboratorio de Rabia del INS.-



Fuente: Elaboración propia.