



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

VALORACIÓN DE LA COBERTURA VACUNAL
ANTIRRÁBICA

ASSESSMENT OF THE RABIES VACCINE COVERAGE

Autor/es

Laura Beltrán Palacios

Director/es

Marta Monzón Garcés
Juan José Badiola Díez

Facultad de Veterinaria

2016

Valoración de la cobertura vacunal antirrábica



Laura Beltrán Palacios

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL
Julio 2016

Índice

1. Resumen.....	3
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
3.1 Patogenia y presentación clínica.....	5
3.2 Etiología.....	6
3.3 Transmisión.....	7
3.4 Epidemiología.....	7
3.5 Inmunidad.....	8
4. Justificación y objetivos.....	10
5. Metodología.....	12
6. Resultados y discusión.....	14
7. Conclusiones.....	21
8. Conclusions.....	22
9. Valoración personal.....	23
10. Bibliografía.....	23
11. Otras fuentes de información.....	26
12. Anexos.....	28

1. Resumen

La rabia es una enfermedad vírica, causada por virus pertenecientes al género *Lyssavirus*. Es una zoonosis que produce una encefalomielitis, casi siempre mortal una vez que han aparecido los síntomas clínicos. Su distribución es mundial y aunque la incidencia real de rabia humana se desconoce, la OMS estima que cada año se producen en el mundo unas 55.000 muertes por esta enfermedad, principalmente en países en desarrollo.

España está libre de esta zoonosis en mamíferos terrestres desde 1978. Desde esta fecha, se han diagnosticado varios casos de "rabia importada", en perros procedentes de Marruecos. A este dato hay que añadir que se han declarado una veintena de murciélagos positivos al virus en España. Teniendo en cuenta estos datos epidemiológicos, así como la situación geográfica de nuestro país como zona de paso entre Europa y países endémicos, resulta necesario extremar las medidas de prevención y control de la enfermedad.

Con el fin de lograr una percepción real de la situación actual de protección y vacunación contra la rabia se realiza un estudio preliminar para valorar el estado inmunológico frente al virus causal de esta enfermedad en una muestra representativa de cánidos mediante la determinación de anticuerpos contra dicho virus. Se aplica una prueba serológica basada en un ELISA indirecto como técnica inmunológica admitida por la OIE para la detección cualitativa de anticuerpos contra la rabia en muestras de sueros individuales con el objeto de determinar si los animales presentan seroconversión tras su vacunación.

El estudio se ha llevado a cabo sobre 17 muestras, procedentes de perros del Albergue Sanitario de Movera (Zaragoza). El estudio evidencia que en el 23.5 % y 5.9 % de los perros muestreados se ha logrado la seroconversión al presentar títulos iguales o superiores a 0.5 UI/ml, respectivamente, mientras que el 70.6 % restante no alcanza este umbral de protección establecido por la OIE.

Title: ASSESSMENT OF THE RABIES VACCINE COVERAGE

2. Abstract

Rabies is a viral infectious disease caused by Lyssaviruses. It is a zoonotic disease characterized by encephalomyelitis that leads affected animals to death in most cases presenting clinical

signs. Its distribution is global, and despite the actual incidence in human species is yet unknown, WHO estimates that 55,000 deaths occur each year, mainly in developing countries.

Spain is free of terrestrial rabies since 1978. However, several imported dog rabies (from Morocco) and nearly 20 bat rabies cases have been diagnosed since that date. Taking into account these epidemiological data and the geographical location between Europe and endemic countries, it results necessary to maximize control and prevention measures.

The aim of this study was to provide actual data concerning vaccination coverage in 17 dogs from a shelter in Movera (Zaragoza) by preliminary study about antibody titers against rabies. An indirect-ELISA established by OIE was applied on all sera in order to determine the rate of seroconversion in animals analyzed.

Out of the 17 samples tested, 23.5 % and 5.9 % presented antibody titers equal or higher than 0.5 IU/ml, respectively. These results indicate an acceptable level of protection according to the OIE. The remaining samples, 70.6 % did not show titles with protection levels (they were lower than 0.5 IU/ml).

3. Introducción

El primer registro histórico que se tiene de la rabia se sitúa en las Leyes de Eshunna, primer código de la antigua Mesopotamia, con fecha de 1930 a.C. En él se dice textualmente que, "si un perro está loco", y el perro muerde a una persona y le causa la muerte, el dueño debe pagar "dos tercios de una mina de plata"(Rodríguez, 2014).

Desde entonces se han encontrado escritos referentes a la rabia en documentos del antiguo Egipto (papiro de Kahun) o el imperio Romano (Cordero del Campillo, 1996).

La rabia es una enfermedad causada por virus pertenecientes al género *Lyssavirus*. Es una zoonosis que resulta casi siempre mortal una vez que han aparecido los síntomas clínicos. Aunque la rabia afecta a animales domésticos y salvajes, en la mayoría de los casos humanos el virus se propaga por la saliva de perros domésticos infectados a través de mordeduras o arañazos (Ribadeau-Dumas et al., 2013).

La rabia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártida, pero más del 95 % de las muertes humanas actualmente se registran en Asia y África. Es una enfermedad desatendida de poblaciones pobres y vulnerables cuyas muertes raramente se notifican y que

no disponen o no tienen fácil acceso a las vacunas y a los tratamientos existentes. La rabia aparece sobre todo en comunidades rurales remotas, y los niños de 5 a 14 años son las víctimas más frecuentes (OMS, 2016).

3.1 Patogenia y presentación clínica

La enfermedad de rabia consiste en una encefalitis letal en la que se diferencian varias fases asociadas a su patogenia:

- **El periodo de incubación** varía en cada caso, correspondiendo al periodo desde que se produce la infección hasta que el virus alcanza las raíces dorsales de los nervios espinales. El virus realiza una migración vía ascendente es decir, desde el lugar de inoculación, generalmente periférico, hasta el sistema nervioso central (SNC). Por lo general, este periodo varía entre los 14 y 90 días, dependiendo principalmente de la distancia desde el lugar de inoculación del virus y al SNC (Archer et al., 2014).

- **El periodo prodrómico** abarca desde el momento en el que el virus se localiza en los nervios espinales hasta que el virus se fija en las neuronas cerebrales. Durante esta migración el virus se va replicando, activando el sistema inmune así como la producción de anticuerpos. No obstante, a pesar de dicha activación, no se logra responder a tiempo para frenar el progreso de la infección.

Aparecen síntomas inespecíficos como fiebre, dolor muscular, ansiedad y vómitos, entre otros (Susilawathi et al., 2012; Udow et al., 2013).

- **El periodo neurológico agudo**, corresponde a la multiplicación del virus a nivel del tálamo, ganglios basales y médula espinal. En esta fase ocurre una diseminación centrífuga del virus hacia los nervios periféricos, invadiendo zonas altamente inervadas, en las que también se multiplica (epitelio de las glándulas salivares, retina, córnea y folículos pilosos, principalmente). No en todos los animales ocurre esta diseminación, ya que la muerte puede ocurrir antes.

Esta etapa se puede manifestar de dos formas: rabia paralítica o forma furiosa. La forma paralítica, también llamada rabia muda, es más común en ganado bovino y roedores. La forma furiosa generalmente se presenta en los mamíferos carnívoros, que son los principales reservorios de la enfermedad. En esta forma clínica es característico que las lesiones a nivel del encéfalo sean más extensas y diseminadas que las que se presentan en la médula espinal, a diferencia de lo que ocurre en la forma paralítica.

Los síntomas comunes en ambas presentaciones son: fiebre, rigidez de la nuca, parestesias, fasciculación muscular, convulsiones generalizadas y focalizadas, hiperventilación e hipersalivación. La presencia de hidrofobia es uno de los signos patognomónicos de la rabia, aunque es variable dependiendo de los distintos lugares geográficos (Biblioteca Médica Digital de la Universidad Nacional Autónoma de México, 2011).

En la fase furiosa, se produce una inflamación a nivel cerebral y cambios en el comportamiento, episodios violentos y agresivos, alucinaciones, convulsiones y ataques.

En las últimas fases tienen lugar episodios de parálisis de los músculos respiratorios, arritmias y colapsos de los órganos, debido a la encefalitis. Esto conduce al estado de coma, que puede durar horas o días.

La tasa de mortalidad en el hombre se sitúa en el 99 % de los casos (Zubair et al., 2012; Rodríguez, 2014).

3.2 Etiología

Respecto a la etiología, los virus de la rabia, son un conjunto de virus ARN de cadena simple pertenecientes al género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae*. Posee dos componentes estructurales mayores, una ribonucleoproteína helicoidal (formada por ARN, fosfoproteína, polimerasa y nucleoproteína) y una envoltura, formada por glicoproteínas (proteína G) (Betancurth et al., 2015).

En la actualidad se admite la existencia de doce especies de virus reconocidas por el Comité Internacional de Taxonomía de virus dentro de este género: virus de la rabia clásico (RABV), virus *Lagos bat* (LBV), virus *Mokola* (MOKV), virus *Duvenhage* (DUVV), lisavirus europeo de murciélago tipo1 (EBLV1) o tipo 2 (EBLV2), virus australiano de murciélago (ABLV), virus *Aravan* (ARAV), virus *Khujand* (KHUV), virus *Irkut* (IRKV), virus de murciélago caucásico del oeste (WCBV) y virus *Shimoni* (SHIV). Recientemente, se han descrito otros tres virus, el virus *Bokeloh* (BBLV), el virus *Ikoma* (IKOV) y el lisavirus de murciélago de *Lleida* (LLEBV), este último en España (en 2011).

Aunque la enfermedad puede estar asociada a cualquiera de estos virus, la mayor parte de los casos informados (alrededor de 55.000 casos anuales en humanos) se deben a la infección por el virus de la rabia clásico (RABV), cuya distribución es mundial (Red nacional de vigilancia epidemiológica, 2013).

3.3 Trasmisión

Respecto a la trasmisión del virus, según el contexto social y ambiental, pueden actuar como vector y/o reservorio del virus una especie animal u otra. Según algunos estudios experimentales, algunos animales infectados por el virus se han recuperado de la enfermedad, habiéndose detectado anticuerpos neutralizantes en suero y líquido cefalorraquídeo, confirmándose el verdadero estado de portador con aislamientos víricos en animales sanos (Gnanadurai et al., 2013).

En cuanto a la trasmisión al hombre, no hay duda del papel principal del perro (Rodríguez et al., 2013).

En relación con otras especies, ningún serotipo del virus se asocia exclusivamente con el gato y tampoco se ha definido a los felinos como reservorios. Sin embargo, se considera que esta especie pueden actuar como vectores importantes en la trasmisión zoonótica (Hanlon et al., 2005).

Los quirópteros, conocidos comúnmente como murciélagos, son reservorios del virus de la rabia, es decir lo mantienen y además pueden transmitirlo a otras especies, incluida el hombre. El caso más evidente de la participación de los murciélagos en la epidemiología de la rabia se observa en el continente americano, con el genotipo 1 (RABV), asociado a los murciélagos hematófagos (*Desmodontinae*).

Respecto a los animales salvajes, el zorro es la especie de mayor interés sobre todo en Europa (Gyllys et al., 1998). En un futuro se prevé que el perro mapache adquiera mayor importancia (Rodríguez, 2014).

3.4 Epidemiología

En relación con la epidemiología de la enfermedad, algunos países han logrado erradicarla aplicando medidas profilácticas estrictas. En otros continentes, como África, Asia, Este y Centro de Europa y América, la rabia sigue siendo endémica y afecta principalmente a especies silvestres. En estos países en los que la enfermedad constituye una endemia, se han puesto en marcha medidas para gestionar y reducir el riesgo de infección en las poblaciones susceptibles, tanto en fauna silvestre como animales domésticos, creando una barrera entre la fuente animal de la enfermedad y el hombre. Para ello, se llevan a cabo campañas de vacunación masivas de perros, y también de animales salvajes en determinadas situaciones, campañas de información para la población y un mejor acceso a los servicios de atención médica proporcionando vacunas y sueros antirrábicos (WHO, 2004).

Distribution of risk levels for humans contacting rabies, worldwide, 2013

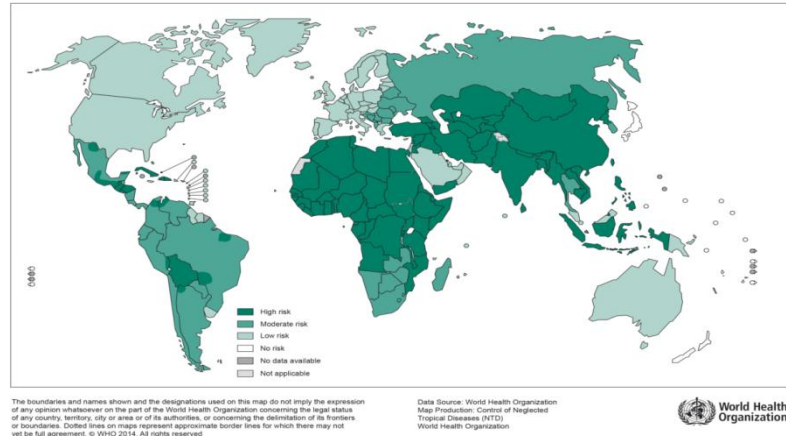


Figura 1. Distribución mundial de los niveles de riesgo de exposición a rabia en humanos.

En cuanto a la situación epidemiológica en España, los territorios peninsulares e insulares españoles no han registrado casos de rabia en animales terrestres desde el año 1978, a excepción del caso de Toledo en Junio de 2013 (Pérez de Diego et al., 2015), importado de África.

No obstante Ceuta y Melilla presentan casos esporádicos de rabia en perros, gatos y caballos, debido a su proximidad con el continente Africano, donde la enfermedad es endémica (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2013).

3.5 Inmunidad

Respecto a la inmunidad frente a la rabia, hay que hacer referencia a una respuesta inmune innata y una específica o adaptativa.

En la innata están implicadas barreras físicas, químicas y celulares, destacando entre estas últimas las células dendríticas y otras células fagocíticas. La respuesta inmune específica, se atribuye a la activación de los linfocitos T (Rodríguez, 2014). Estos linfocitos desempeñan un papel fundamental en la defensa frente al virus, participando tanto los CD4+ (linfocitos cooperadores), como los CD8+ (linfocitos citotóxicos), siendo también partícipes los linfocitos B. Los anticuerpos neutralizantes, IgG, bajo el control de las células Th2, poseen una función protectora esencial, siendo la proteína G del virus la única responsable de su inducción, aunque esta respuesta humoral se desarrolla muy tarde en el curso de la enfermedad. A diferencia de otras enfermedades producidas por virus, en este caso los linfocitos T citotóxicos son insuficientes para proporcionar protección frente al virus rábico (Lafon, 2007).

La respuesta inmune marca el tipo de cuadro clínico, es decir si es rabia furiosa o rabia muda.

La inmunización frente al virus rabia fue descrita por primera vez en 1881 por Víctor Galtier en corderos mediante la inoculación intravenosa de saliva de animales infectados. Pasteur en 1884, tras prestar interés a los estudios de Galtier comenzó sus primeros trabajos en la creación de la vacuna antirrábica, consiguiendo crear la primera vacuna atenuada frente a la rabia (Pasteur, 1885). Con el paso de los años, diferentes autores fueron creando nuevas cepas vacunales con diferentes características (Anexo I).

El principal modo de actuación de todas las vacunas frente a la rabia consiste en la inducción de la respuesta de anticuerpos con intervención de los linfocitos TCD4+. Cabe diferenciar las vacunas inactivadas, que inducen principalmente la activación de los linfocitos B con la colaboración de las células Th2 (CD4+), mientras que en las vacunas a base de microorganismos vivos atenuados, inducen respuesta de las células Tc CD8+ (Rodríguez, 2014). Actualmente, todas las vacunas comercializadas frente a rabia, para la inmunización de humanos o animales domésticos, son vacunas inactivadas que contienen proteínas víricas intactas y que inducen una respuesta humoral. La utilización de virus vivos y recombinantes, que inducen una respuesta tanto humoral como celular, principalmente se limita a las especies silvestres, se debe a que la oferta de estas vacunas de momento es escasa y a la falta de estudios relacionados en los animales domésticos (Rodríguez, 2014), sin embargo hay que destacar la gran eficacia de dichas vacunas en las poblaciones de animales silvestres (Vos et al., 1999). Cabe señalar que la alta tasa de mutación del virus causal constituye un problema para la elaboración de vacunas, pudiendo producir una baja respuesta frente a genotipos provenientes de otros países.

En concreto, para la inmunización en el hombre únicamente son aceptables las que provienen de cultivos celulares y están libres de agentes contaminantes (WHO, 1984). Según la Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios, las vacunas *Merieux* (Sanofi Pasteur MSD, S.A.) y *Rabipur* (GSK Vaccines GMBM) son las dos únicas autorizadas en España.

Respecto a las vacunas para animales salvajes, la vacunación oral ha resultado ser la más efectiva. Durante las campañas europeas, frente a la rabia vulpina, se utilizaron tres tipos de vacunas: SAD, SAD B19 y SAG2. Recientemente se han empezado a usar vacunas recombinantes (Cliquet et al., 2015).

En cuanto a la vacunación de los animales domésticos (perros, gatos y hurones), las cepas vacunales presentes en las vacunas autorizadas en España son: *Flury LEP*, vCP65, cepa Pasteur/RIV y cepa Pasteur VP-13 (Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios, 2016). En concreto, según la Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios, están

autorizadas y comercializadas las siguientes vacunas: *Etadex*, *Purevax rabies*, *Nobivac Rabia*, *Rabdomun* y *Rabisyva VP-13* (Anexo II).

Acerca de la protección conferida por las vacunas, la OIE señala la necesidad de un umbral de protección en el título de anticuerpos frente al virus no inferior a 0.5 UI/ml de suero (determinado por una prueba de neutralización *in vitro* con anticuerpos fluorescentes). De hecho, este valor es la referencia en la que se basa la normativa internacional en relación con los desplazamientos no comerciales (Reglamento CE 998/2003).

Según WSAVA (*World Small Animal Veterinary Association*), en el caso de los cánidos se aconseja vacunar a los 3 ó 4 meses de edad. Tras dos o más semanas, se debería comprobar la seroconversión. En el caso de que los animales sean seronegativos, tendrían que ser revacunados y posteriormente debería volver a valorarse su seroconversión. Si continuaran ofreciendo resultados negativos, debería considerarse su incapacidad para lograr protección (WSAVA, 2010). En perros menores de 16 semanas, se debería administrar una sola dosis a los 3 meses, con revacunaciones cada año; en los animales mayores de 16 semanas, se recomienda una dosis con revacunación anual o cada 3 años (Anexo III).

4. Justificación y objetivos

Según el Doctor Hervé Bourhy, Jefe de la Unidad de Rabia del Instituto Pasteur de París, la rabia es considerada una de las enfermedades más olvidadas en los países desarrollados (Galán, 2012). Probablemente por ello, no se está prestando suficiente consideración a los factores de riesgo que resultan esenciales para el control de la enfermedad, facilitando así su re-emergencia (Birhan et al., 2015).

En relación con la situación real de la enfermedad en España, existen varios aspectos que justifican la necesidad de un estudio exhaustivo sobre ella.

- En España se han declarado 20 casos de rabia en perros importados y otros 20 en murciélagos (Colegio oficial de Veterinarios de Madrid, 2013).
- En 2014 se describió un caso de muerte en un paciente humano infectado con rabia residente en España que fue contagiado por la mordedura de un perro en Marruecos.
- La entrada de perros callejeros a Ceuta y Melilla a través de las fronteras naturales procedentes del Norte de África, donde la rabia es endémica, es frecuente.

- Se ha detectado la existencia de un flujo constante y no bien controlado de entrada y salida ilegal de mascotas a Europa provenientes de otros países donde la rabia es endémica, así como de un tráfico ilegal de cachorros provenientes de Europa del Este.
- La cobertura vacunal antirrábica en los cánidos es alta, aunque geográficamente heterogénea, ya que existen diferentes normativas entre las distintas Comunidades Autónomas en relación con su obligatoriedad.

En Comunidades como Cataluña, Galicia y País Vasco no hay obligación de vacunar a los perros frente a la rabia; en Asturias la vacunación sólo es voluntaria en el caso de que no sea una raza potencialmente peligrosa; mientras, en el resto de CCAA existe dicha obligatoriedad, variando entre ellas si la vacunación es sólo obligatoria para perros o también lo es para hurones y gatos. Por ejemplo, en Extremadura la vacunación antirrábica es obligatoria para los perros a partir de 3 meses, siendo voluntaria y recomendada en gatos y hurones a partir de 3 meses (Decreto 207/2014), al igual que por ejemplo en Aragón, donde se establece la obligatoriedad de la vacunación anual de todos los cánidos, siendo voluntaria en las demás especies, salvo gatos y hurones que vayan a desplazarse a otros estados miembros de la Unión Europea (Proyecto de orden, 2015). Mientras que en Andalucía se establece como obligatoria en perros, gatos y hurones, debiendo efectuarse la primera vacunación a partir de los 3 meses (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía 2010).

- Existe una falta de supervisión por parte de las autoridades competentes para evaluar la población vacunada de mascotas. Además, estudios sobre la titulación de anticuerpos proporcionados por la vacuna antirrábica son inexistentes, por lo que el grado de protección real en la población es desconocido.

Todos estos factores constituyen un peligro latente que podría desencadenar la re-emergencia de casos de rabia, tanto en perros como en otras especies animales; o lo que sería fatal, casos de muerte por rabia en humanos.

Además, la información y concienciación de las medidas para prevenir la rabia en todos los sectores, así como de las pautas a seguir en caso de la agresión por un mamífero terrestre y especialmente un murciélago, es todavía muy escasa.

Por otra parte resulta imprescindible tener en cuenta los múltiples factores que pueden influir en la eficacia de la vacunación, pudiendo depender de: tipo de vacuna, número de vacunaciones (proporcionando dos aplicaciones una mejor inmunidad), raza (si se trata de puras o cruces), tamaño del animal, edad (se presenta un menor título de anticuerpos en perros menores de 6 meses y mayores de 5 años, según lo demostrado en varios estudios;

Mansfield et al., 2003) o número de días transcurridos desde la vacunación a la toma de muestras.

El objetivo del trabajo planteado consiste en valorar el estado inmunológico frente al virus de la rabia en una muestra de cánidos mediante la determinación de anticuerpos específicos.

Se trata de un estudio preliminar sobre una muestra de la población de cánidos en la provincia de Zaragoza en el que se pretende determinar el porcentaje de la población que, según la OIE, presenta protección real frente al virus al superar el título de 0.5 UI/ ml de anticuerpos mediante la técnica inmunológica que se va a aplicar.

5. Metodología

Para la realización de este trabajo se ha aplicado una técnica inmunológica basada en la utilización de un ELISA indirecto. Para ello, se utilizó un kit comercial validado y certificado por la OIE para lograr el objetivo planteado, PLATELIA™ RABIES II KIT. Mediante esta técnica, es posible la detección y valoración *in vitro* de las IgG frente a la glicoproteína del virus de la rabia en suero (de perros, gatos y zorros), que según los estudios realizados, presenta una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 78.2 % (Wasniewski et al., 2014).

La prueba se basa en el uso de una técnica de inmunoanálisis enzimático, con fase sólida denominado ELISA indirecto. El antígeno utilizado consiste en la glicoproteína del virus de la rabia extraída a partir de la membrana del virus inactivado y purificado. El conjugado enzimático usado para su visualización consiste en una proteína A de *Staphylococcus aureus* asociado con peroxidasa. En el desarrollo de la técnica, siempre deben incluirse los controles positivos y negativos, que han sido calibrados con los patrones de la OIE, y que permiten la determinación cualitativa o cuantitativa del título de anticuerpos contra el virus de la rabia en el suero problema.

Tras la extracción de muestras de sangre sin anticoagulante se obtuvo el correspondiente suero de cada muestra mediante centrifugación a 3000 rpm.

Posteriormente, se siguió el protocolo establecido por la casa comercial (Anexo IV), que consiste básicamente en:

1. A partir de cada muestra serológica se recogen 10 µl y se añaden 990 µl de diluyente en tubos *ependorf* para lograr una dilución 1:100. Lo mismo para cada uno de los controles: R3 (control negativo), R4a (control positivo) y R4b (control positivo). Siempre por duplicado.

2. Se homogenizan suavemente todas las muestras y los controles.
3. Se distribuyen 100 μ l de los controles y de las muestras en cada uno de los pocillos de la microplaca.
4. Se cubre la microplaca con una película autoadhesiva para proceder a la primera incubación a 37°C durante 60 minutos. Durante esta incubación, los anticuerpos frente al virus de la rabia presentes en la muestra se unen a la glicoproteína que recubre los pocillos de la microplaca.
5. Tras la incubación, se realizan 3 lavados con la solución de lavado (1:10) para eliminar los anticuerpos no unidos y otras proteínas séricas.
6. Se añaden 100 μ l del conjugado (R7, 1:100) en cada pocillo de la microplaca con la pipeta multicanal.
7. Cubierta la microplaca con la película adhesiva, se realiza la segunda incubación de 60 minutos a 37°C. La proteína A marcada, es decir el conjugado, se une a los complejos antígeno-anticuerpo adheridos.
8. Se realizan 5 ciclos de lavado.
9. Se añaden 100 μ l de solución de desarrollo enzimático (R8+R9, 1:11) en cada pocillo. La presencia de complejo inmune se demuestra por el agregado de una solución que contiene un sustrato de peroxidasa y un cromógeno (R8+R9), lo que inicia una reacción que genera color.
10. Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad.
11. Se añaden 100 μ l de solución de parada (R10) en cada pocillo para frenar la reacción colorimétrica.
12. Se lleva a cabo la lectura mediante el espectrofotómetro (densidad óptica: 450-620 nm). Los valores obtenidos serán proporcionales a la cantidad de anticuerpos frente al virus de la rabia presente en las muestras.

Para el desarrollo del trabajo experimental, se han tomado muestras de sangre venosa de 17 perros, procedentes del Albergue Sanitario Provincial, ubicado en el barrio de Movera (Zaragoza), respetando siempre las normas y protocolos establecidos por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

El protocolo que se sigue cuando un animal adulto llega al refugio es: el mismo día de la llegada se le realiza un examen clínico, una desparasitación interna y externa y la vacunación antirrábica, justo después es alojado en una zona de cuarentena durante 2 días. Si se trata de un cachorro, se aplica el mismo protocolo además de las vacunas específicas para su edad

(vacunación frente a Moquillo, Hepatitis canina, Parvovirus y Parainfluenza), ampliándose la cuarentena a 7 días.

La muestra de cánidos sometidos a este estudio estaban vacunados frente a rabia por el veterinario del Albergue Sanitario en su totalidad, salvo los animales 14 - 17, que fueron vacunados justo después de la extracción de sangre.

6. Resultados y discusión

Para la interpretación de los resultados, el primer paso consistió en validar los controles positivos y negativos siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

La absorbancia de cada control negativo individual debe ser menor a 0.05, los valores del control positivo R4a deben estar comprendidos entre 0.300 y 1.200 y todos los valores del control positivo R4b deben encontrarse entre 1.500 y 3.500. La prueba debe repetirse si al menos uno de los controles está fuera del rango establecido (Anexo V).

En el presente estudio los valores de R3 (control negativo) fueron 0.015 y 0.007; los valores de R4a (control positivo) resultaron 0.427 y 0.413; y los valores de R4b (control positivo), fueron 2.548 y 2.602, por lo que al encontrarse todos ellos dentro del rango de validación, no fue necesaria su repetición.

En cuanto al análisis de los valores obtenidos a partir de las muestras problema (Tabla 1), las indicaciones de la casa comercial establecen que (Anexo VI):

- Un valor de seroconversión mayor de 0.5 UI/ml equivale a que la densidad óptica de la muestra sea mayor o igual que la media de los controles positivos R4b (es decir, >2.575).
- Una seroconversión de 0.5 UI/ml corresponde a una densidad óptica comprendida entre la media de los controles positivos R4a y R4b (en este caso, entre 2.575 y 0.420).
- Una falta de seroconversión equivale a que la densidad óptica de las muestras se encuentre por debajo de valor de R4a (es decir, < 0.42).

Tabla 1. Título de anticuerpos y consecuente estado de los animales en función de los valores de densidad óptica obtenidos mediante la técnica utilizada.

Cánidos	Densidad óptica	Título de anticuerpos	Estado
1	0,558	0,5 UI	Seroconvertido
2	0,165	< 0,5 UI	No seroconvertido
3	0,064	< 0,5 UI	No seroconvertido
4	3,162	> 0,5 UI	Seroconvertido +++
5	0,079	< 0,5 UI	No seroconvertido
6	0,196	< 0,5 UI	No seroconvertido
7	0,878	0,5 UI	Seroconvertido
8	0,961	0,5 UI	Seroconvertido
9	0,299	< 0,5 UI	No seroconvertido
10	0,341	< 0,5 UI	No seroconvertido
11	0,179	< 0,5 UI	No seroconvertido
12	1,749	0,5 UI	Seroconvertido
13	0,297	< 0,5 UI	No seroconvertido
14	0,084	< 0,5 UI	No seroconvertido
15	0,064	< 0,5 UI	No seroconvertido
16	0,235	< 0,5 UI	No seroconvertido
17	0,154	< 0,5 UI	No seroconvertido

Analizando específicamente los datos correspondientes a los animales de los que se tomó la sangre previamente a su vacunación (14 – 17), se observa que aunque no presentan una titulación mayor o igual a 0.5 UI/ml, presentan cierto título de anticuerpos que podría deberse a la inmunidad materna conferida en el periodo de lactación (Kasempimolporn et al., 1996) o a que, aunque no se disponga de esta información, hubieran sido vacunados con anterioridad.

En su conjunto, de todas las muestras analizadas, 4 se encuentran con valores de seroconversión de 0.5 UI/ml (23.5 %), 1 presenta valores por encima de 0.5 UI/ml (representando un 5.9 %) y 12 no presentan seroconversión (70.6 %, Figura 2).

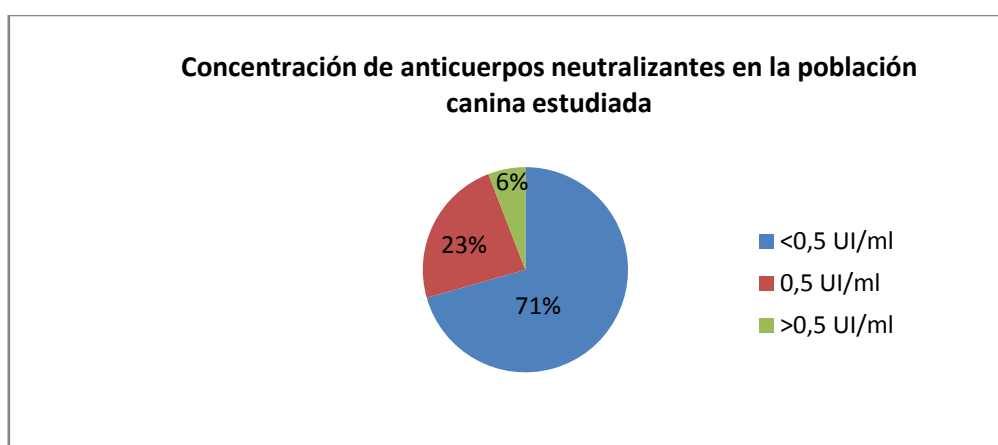


Figura 2. Distribución de porcentajes en función de las concentraciones de anticuerpos antirrábicos neutralizantes determinados en los cánidos estudiados.

En un estudio realizado por la Universidad de Montevideo en 2011, aplicando la misma técnica inmunológica a muestras de perros procedentes de un Hospital Veterinario entre los animales con historia de vacunación, el 36 % presentaron títulos superiores a 0.5 UI/ml y el 64 % de los animales no tenían títulos con niveles de protección (Moreno et al., 2012). Por lo que las muestras procedentes del estudio descrito aquí presentan un porcentaje de seroconversión menor que las analizadas en la ciudad uruguaya. Esta discrepancia podría deberse a la diferencia entre ambas poblaciones, puesto que en el Albergue Sanitario se recogen normalmente perros vagabundos que presentan alto nivel de estrés y desnutrición y al Hospital acuden con propietario y tienen mayores cuidados. Además, como se ha indicado en el apartado de Metodología, en el Albergue el primer día los animales se manipulan, se desparasitan y vacunan, por lo que la capacidad de su sistema inmune para lograr anticuerpos suficientes para una seroconversión, disminuye con total certeza. Por otra parte, el tamaño de la muestra en el presente estudio era menor, por lo que también puede alterar los porcentajes obtenidos. Consecuentemente, la ampliación de la muestra a partir de este estudio preliminar a un mayor número de animales y diferentes procedencias constituye un objetivo futuro de gran interés e imprescindible para confirmar las conclusiones extraídas.

Entre los factores que pueden influir en el nivel de protección frente a rabia alcanzado por el animal tras su vacunación, se incluye, como ha sido mencionado, el estado nutricional y sanitario del animal; pero también la composición de la vacuna, su capacidad inmunogénica, su correcta administración e incluso su forma de conservación (es necesario un mantenimiento de la vacuna a temperaturas comprendidas entre los 2°C y los 8°C; a temperaturas mayores conservan su estabilidad pero disminuye su poder antigénico; Organización Panamericana de la Salud, 2005). Desde el punto de vista sanitario, todos estos aspectos deben ser considerados de forma integral como factores influyentes en una respuesta inmune adecuada (Moreno et al., 2012)

Según estudios publicados se ha concluido que las razas pequeñas generan más anticuerpos vacunales que las razas más grandes, y en particular los *Dobermann* y *Rottweiler* presentan menores tasas de respuesta humoral, incluso se recomienda una vacunación de refuerzo para razas de mayor tamaño (Kennedy et al., 2007). Sin embargo, en el nuestro se observa que las razas grandes presentan una seroconversión de un 40 %, mientras que las razas medianas presentan una seroconversión del 25 % (Figura 3).

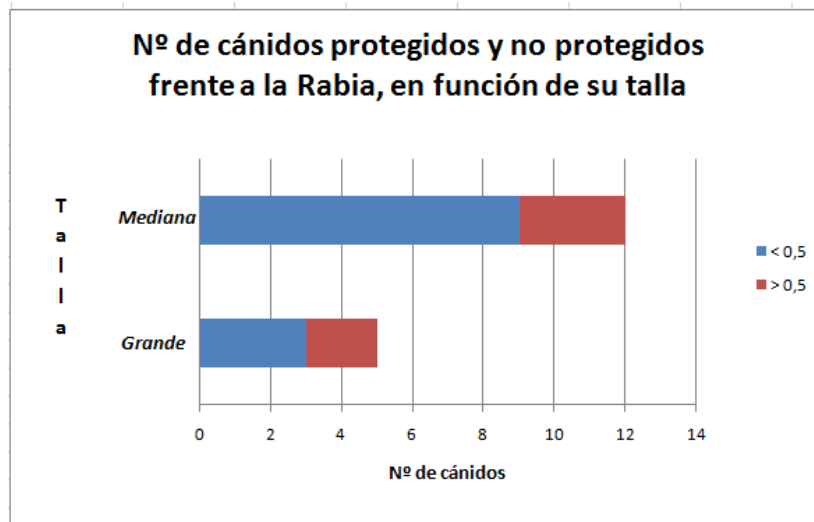


Figura 3. Distribución de perros protegidos y no protegidos en función de su tamaño.

En cuanto al nivel de protección vacunal en función de la raza, la tasa de seroconversión en el estudio realizado se observó mayor en animales mestizos en relación con la de animales resultantes de un cruce con perros de razas potencialmente peligrosas y razas puras (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución del nivel de anticuerpos neutralizantes en función de la raza.

Raza	Nº de cáninos no protegidos	%	Nº de cáninos protegidos	%
Mestizos	3	50%	3	50%
Mestizo-Mastín	2	66,66%	1	33,33%
Mestizo- Perros potencialmente peligrosos	4	100%	0	0%
Razas puras (Pastor Alemán, Podenco , Galgo y American Stanford)	3	75%	1	25%

Para valorar el posible efecto de la edad de los animales en su estado inmunológico frente al virus rabia, la distribución de grupos se llevaría a cabo idealmente en base a la edad de comienzo de pauta de vacunación recomendada (menores de 3 meses, entre 3 y 12 meses, mayores de 1 año). Sin embargo, en este estudio no se ha podido llevar a cabo así, por lo que se ha estudiado por cohortes de edad. El resultado obtenido indica que un 14.3 %, 20 %, 75 y 0 % de los animales de 1, 2, 3 y 4 años respectivamente, presentan seroconversión (Figura 4).

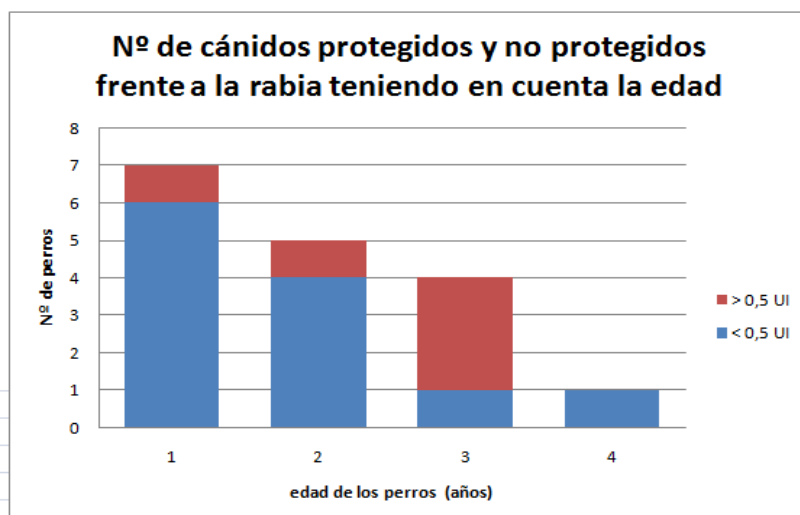


Figura 4. Número de cánidos protegidos y no protegidos teniendo en cuenta su edad.

Según las observaciones de estudios anteriores, los máximos valores en la titulación de anticuerpos frente al virus estudiado se alcanzan a los 28 días post-vacunación y descienden al avanzar el tiempo post-vacunación, siendo muy rápida la respuesta inmune en la revacunación (Moreno et al., 2012). En este estudio, los animales en los que había transcurrido más de un año de diferencia entre su vacunación y la extracción de sangre presentaban el mayor porcentaje de seroconversión, un 50 %, mientras que los animales en los que no había transcurrido un año entre ambos procedimientos presentaban un porcentaje de seroconversión menor, de un 26.7 % (Figura 5). Se ha propuesto como limitación de las técnicas inmunológicas el hecho de que animales recién vacunados presentaran un estado de seroconversión insuficiente o indetectable debido a una respuesta inmunológica tardía (Reglamento CE 998/2003). Esta ampliación en el tiempo de conformación de la respuesta en el animal frente al virus, podría justificar también los resultados de seroconversión que se acaban de referir en relación con el tiempo post-vacunación.

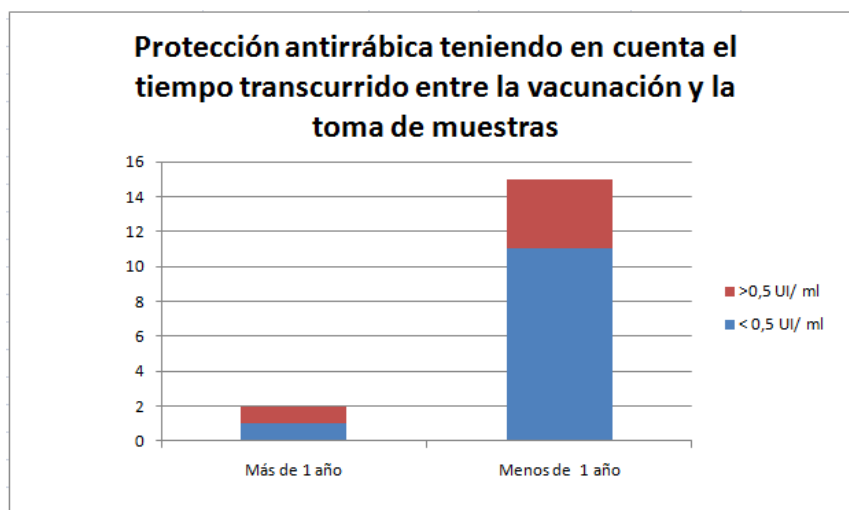


Figura 5. Estado de protección frente a la enfermedad teniendo en cuenta los días transcurridos entre la vacunación y la extracción de la muestra de sangre para el análisis serológico.

Por último, se sabe que ciertas patologías como, traumatismos, quemaduras, infecciones (Parvovirus, FIV, FeLV o Moquillo), parasitosis (Leishmania, Demodex o Toxoplasma), alergias, fallo renal o pérdida de proteínas, leucemia, linfoma, mieloma, ciertas endocrinopatías como la diabetes mellitus, hiperadrenocorticismos, tiroidopatías, problemas metabólicos, obesidad, intervenciones quirúrgicas, quimioterapia / radioterapia oncológica, inmunosupresión iatrogénica o estrés asociado a situaciones concretas como destete precoz, frío intenso, anestesia, transportes o hacinamientos, ejercicio intenso, gestación, inmadurez neonatal o senescencia, pueden afectar al estado inmunológico del individuo produciendo una hiporespuesta vacunal (ARGOS, 2015). Los animales de este estudio no presentaban patologías sistémicas graves. Sólo dos de ellos presentaban garrapatas y otros dos estaban afectados de sarna sarcóptica; los animales fueron tratados frente a ambas patologías en cuanto llegaron al Albergue Sanitario. Por ello probablemente, los porcentajes de seroconversión no parecen haber sido alterados por dichas patologías (Tabla 3).

Tabla 3. Estado de protección frente a rabia en función de otras enfermedades.

Enfermedad/ sanos	Nº de cánidos no protegidos	%	Nº de cánidos protegidos	%
Garrapatas	1	50%	1	50%
Sarna	1	33,33%	2	66,67%
Sanos	10	83,33%	2	16,67%

Tras la vacunación, se podrían producir algunas reacciones adversas como vasculitis cutánea, anemia hemolítica inmunomediada, trombocitopenia inmunomediada o poliartritis inmunomediada tipo I (ARGOS, 2009). Sin embargo, según los datos que proporcionó el veterinario responsable del Albergue, no figura ninguna de estas reacciones en ninguno de los animales analizados.

También existen diferencias entre las distintas vacunas comercializadas debido a las distintas cepas vacunales que las componen y sus adyuvantes (ARGOS, 2015), a las pautas de inmunización (según el número de dosis recomendada sea 1 ó 2) o a la vía de administración, ya que la vía intramuscular genera mayor inmunidad humoral que las de vía subcutánea (Zhang et al., 2011). En este estudio, todos los animales (al valorar el posible efecto de las vacunas, se han excluido aquellos animales que en el momento de la extracción de muestra serológica no habían sido vacunados) habían sido vacunados con *Etadex*, excepto en un caso, en el que se había utilizado *Novibac*. *Etadex* es una vacuna elaborada con la cepa *Flury* LEP inactivada (valor antigénico > 1 UI /ml) cuya duración es anual. *Novibac* es también inactivada, pero utiliza la cepa Pasteur/RIV (valor antigénico >2UI/ml) y su efectividad alcanza los 3 años. A pesar de que, según los datos obtenidos, el porcentaje de animales vacunados seroconvertidos con *Novibac* es de un 100 %, y con *Etadex* es de un 25 % (Tabla 4), resulta imprescindible aumentar el tamaño de la muestra para confirmar el mayor porcentaje de éxito que parece ir asociado con *Novibac*, probablemente debido a que el valor antigénico demostrado es mayor.

Tabla 4. Estado de protección en función de la marca comercial de la vacuna utilizada

Marca de la vacuna	Nº de cánidos no protegidos	%	Nº de cánidos protegidos	%
Etadex	8	67%	4	33%
Novibac	0	0%	1	100%

Tras realizar el análisis conjunto de todos los datos anteriormente expuestos, se puede concluir que la muestra de cánidos sometidos a estudio presentan unos porcentajes de seroconversión menores a lo esperado. Una vez analizados los posibles factores a los que podría deberse este bajo estado de protección se ha considerado como posible causa principal

el protocolo seguido en el Albergue Sanitario a la llegada de los animales, puesto que el estado de estrés supuesto en ese momento no resulta conveniente para la inmunización. De todos modos, resulta necesario ampliar el estudio, tanto en el número de cánidos, como en lugares de procedencia, para confirmar dicha hipótesis y valorar otras posibles causas. El principal problema que se encuentra en relación con esta posibilidad es que los animales vagabundos deben de ser sometidos a la desparasitación interna y externa, así como a vacunación frente a diferentes microorganismos para evitar la entrada de cualquier patógeno al Albergue. Pero todo ello unido al estrés que sufre el animal conlleva una inmunosupresión del perro y consecuentemente, una disminución de la respuesta vacunal, y no sólo frente al virus rabia. Presumiblemente, estos resultados podrían mejorar si se modificara el protocolo a la entrada del animal en el refugio. Por ejemplo, si se llevara a cabo la desparasitación externa recién llegado, en la semana 1 la vacunación para cachorros, en la semana 2 una desparasitación interna y en la semana 3 la vacunación antirrábica, con revacunación a los 3 meses. Pero este tipo de cambios, obviamente, dependen del órgano gestor del Albergue.

7. Conclusiones

A partir del estudio realizado y en relación con las muestras analizadas, las principales conclusiones que se pueden extraer son las siguientes:

1. El porcentaje de animales analizados que mostraron valores de seroconversión frente al virus rabia fue mucho menor que el que no lo alcanzó (29.4 % frente a 70.6 %), llegando sólo un animal a superar el valor de 0.5 UI/ml, establecido por la OIE como umbral mínimo que representa protección real frente al virus.
2. El porcentaje de animales que presentaron valores de seroconversión frente al virus rabia fue más alto en perros de mayor tamaño(40 %) que en perros de razas medianas (25 %).
3. Los perros mestizos presentaron el mayor porcentaje de seroconversión frente al virus rabia (50 %), mientras que los cruces con perros potencialmente peligrosos no la lograron en ningún caso.
4. Los animales de 3 años presentaron la mayor tasa de seroconversión (75 %). Además, el tiempo transcurrido entre la vacunación y la valoración de títulos frente al virus parece influir en los resultados de seroconversión puesto que al aumentar se logran mejores tasas de protección (50 % cuando este periodo es mayor a un año, frente a 26.7 %, cuando es menor).

5. A pesar de que resulta necesario ampliar el estudio a un mayor número de muestras para poder confirmarlo, los resultados sugieren que la marca *Novibac* aumenta el éxito de protección en el animal.

8. Conclusions

As regards the analyzed samples in the present study, the main conclusions that can be drawn are the following ones:

1. The percentage of analyzed animals who showed values of seroconversion against rabies virus was much less than that who did not reach it (29.4 % opposite to 70.6 %), going so far as only one animal to overcome the value of 0.5 UI/ml, established by the OIE as minimal title that represents real protection against the virus.
2. The percentage of animals who presented values of seroconversion against rabies virus was higher in dogs of major size (40 %) than in dogs of medium-sized races (25 %).
3. Mongrels presented the biggest percentage of seroconversion against rabies virus (50 %), while crossings with potentially dangerous dogs achieved it in no cases.
4. The 3-year-old animals presented the biggest valuation of seroconversion (75 %). Also, the time longed between vaccination and anti-rabies title evaluation seems to influence the results of seroconversion since, on having increased, there are achieved better valuations of protection (50 % when this period is bigger than one year, opposite to 26.7 %, when it is less).
5. Although it turns out to be necessary to extend the study to a higher number of samples to be able to confirm it, the results suggest that *Novibac* increases the protective success in the animal.

9. Valoración personal

La realización de este trabajo ha supuesto tanto una búsqueda de bibliografía científica como un trabajo laboratorial y de análisis de datos, que sin duda resultará muy útil para mi futuro profesional. Me ha permitido profundizar en un tema, para mí muy interesante e inexplorado como es la Rabia, y más concretamente la eficacia vacunal en una población de perros de Zaragoza. Sobre todo después de conocer los resultados analíticos.

10. Bibliografía

- Archer, E., Houldcroft, C. J. (2014) **Genomewatch: Rabid about whole lyssagenomes. *Nature Reviews Microbiology*; 12(5): 316.**
- Betancurth, C., Lengua, J. C., Calderón, A. (2015). **Determinación del virus rábico en murciélagos hematófagos del Alto Sinú (Córdoba, Colombia).** *Veterinaria y Zootecnia*; 9 (1): 87-98. DOI: 10.17151/vetzo.2015.9.1.3
- Birhan, G., Alebie, A., Admassu, B., Shite, A., Mohamed, S., Dagnaw, B. **A Review on emerging and re-emerging viral zoonotic.** *International Journal of Basic and Applied Sciences*; 4(2): 53-59. DOI: 10.5829/idosi.ijbav.2015.4.2.95186
- Cliquet, F., Picard-Meyer, E., Mojzis, M., Dirbakova, Z., Muizniece, Z., Jaceviciene, I., et al. (2015). **In-depth characterization of live vaccines used in Europe for oral rabies vaccination of wildlife.** *PLoS One*; 10(10) . DOI:10.1371
- Cordero del Campillo, M. (1996). **Desarrollo histórico de la medicina preventiva.** Crin ediciones. S.L.
- Galán, A. (2012). **La rabia: perspectiva actual.** *Sanidad Militar*; 68(4):201-202.
- Gnanadurai, C.W., Zhou, M., He, W., Leytson, C.M., Huan C., Salyards, G., et al. (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. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002375

- Gylys, L., Chomel, B.B., Gardner, I.A. (1998). **Epidemiological surveillance of rabies in Lithuania from 1986 to 1996.** *Scientific and Technical Review*; 17(3): 691-698.

- Hanlon, A., Kuzmin, V., Blanton, J.D., Weldon, W., Manangan, J., Rupprecht C. (2005). **Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia.** *Virus Research*; 111(1): 44-54.

- Kasempimolporn, S., Mitmoonpitak, C., Chaiyabutr, N., Supakorn, K., Brahmasa, R., Sitprijia, V. (1996). **Maternal antibodies against rabies in Thai puppies. A preliminary study.** *Journal of Medical Association Thailand* ;79(1): 36-39. DOI: 10.1136/vr.102975

- Kennedy, L. J., Lunt, M., Barnes, A., McElhinney, L., Fooks, A. R., Baxter, D. N., et al. (2007). **Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies.** *Vaccine*; 25(51):8500-8507.

- Lafon, M. (2007). **Inmunology.** In "Rabies" 2th edición (editado por: Jackson, A and Wunner, W) *Elsevier Academic Press*: 489-504.

- Mansfield, L., Sayers, R., Fooks, R., Burr, D., Snodgrass, D. (2004) **Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination.** *Veterinary Record*;154: 423-426.

- Moreno, J., Burghi, N., Piaggio, J., Puentes, R. (2012). **Respuesta inmune de caninos vacunados contra el virus de la rabia.** *SMVU-Veterinaria Montevideo*; 48(186): 19-22.

- Pasteur, L. (1885). **Methodes pour prévenir la rage après morsure.** *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences*; 101: 765-74.

- Pérez de Diego, A. C., Vigo, M., Monsalve, J., Escudero, A. (2015). **The one health approach for the management of an imported case of rabies in mainland Spain in 2013.** *EuroSurveillance*; 20(6).

- Ribadeau-Dumas, F., Dacheux, L., Bourhy, H. (2013) **Rabies.** *Medical Sciences (Paris)*; 29(1): 47-55. DOI: 10.1051/medsci/2013291013

- Rodríguez , E., Sánchez , L., O. Díaz, Berciano, J. M., Echevarria, J.M. (2013). **Rabia animal en España, situación en 2012.** *Boletín Epidemiológico Semanal: Vigilancia Epidemiológica;* 21(3): 25-29.
- Rodríguez, E. F. (2014) **Rabia, riesgos y control. Análisis de la situación en España.** *Consejo General de Colegios Veterinarios de España* (Ed.).
- Susilawathi, M., Darwinata, E., Dwija, I., Budayanti, S., Wirasandhi, A., Subrata, N., et al. (2012). **Epidemiological and clinical features of human rabies cases in Bali 2008-2010.***BMC Infectious Diseases;* 12(1): 81. DOI:10.1186/1471-2334-12-81.
- Udow, J., Marrie, A., Jackson, C., (2013) **Clinical Features of Dog-and Bat-Acquired Rabies in Humans.** *Clinical Infectious Diseases;* 57(5):689–696. DOI: 10.1186/1743-422X-9-50
- Vos, A., Neubert, A., Aylan, O., et al. (1999). **An update on safety studies of SAD19 rabies virus vaccine in target and non-target species.** *Epidemiology and infection;* 123: 165-175.
- Wasniewski, M., Labbe, A., Tribout, L., Rieder, J., Labadie, A., Schereffer, J., et al. (2014). **Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores.** *Journal of Virological Methods;* 195: 211- 220. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.021.
- Zhang, X., Zhu, Z., Wang, C. (2011). **Persistence of rabies antibody 5 years after postexposure prophylaxis with vero cell antirabies vaccine and antibody response to a single booster dose.** *Clinical Vaccine Immunology;* 18(9): 1477–1479. DOI: 10.1128/CVI.05090-11
- Zubair, M., Qasim, M., Zia, S., Rehman, M., Ashfaq, U., Khan, S. (2012) **Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment.** *Virology Journal;* 9(50). DOI: 10.1186/1743-422X-9-50.

11. Otras fuentes de información

- **Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios** (2016) *Centro de Información online de Medicamentos Veterinarios de la AEMPS - CIMA Vet.* Recuperado de: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/BuscarMedicamentos.do>
- **Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios** (2016) *Vacunas de uso humano autorizadas en España.* Recuperado de: http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/vacunas/autorizadasEspana/noComb_Viricas.htm
- **ARGOS** (2015) *Fariñas, F. Fallos vacunales dependientes del animal: mitos y realidades.* Recuperado de: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/11484/articulos-archivo/fallos-vacunales-dependientes-del-anim:-mitos-y-realidades.html>
- **ARGOS** (2009) *Pérez, A. Reacciones adversas de la vacunación.* Recuperado de: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/682/articulos-archivo/reacciones-adversas-a-la-vacunacion.html>
- **Biblioteca Médica Digital de la Universidad Nacional Autónoma de México** (2015) *Velasco, A. Infecciones del sistema nervioso: rabia.* Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/rabia.html>
- **Boletín Oficial de la Junta de Andalucía**, *Orden 19/04/2010, por la que se establecen los tratamientos obligatorios de los animales de compañía, los datos para su identificación en la venta y los métodos de sacrificio de los mismos en la Comunidad Autónoma de Andalucía.* Recuperado de: <http://www.juntadeandalucia.es/boja/2010/81/18>
- **Colegio oficial de veterinarios de Madrid** (2013) *Profesión.* Recuperado de: <http://www.colvema.org/revista/Colvema80/index.html>
- **Decreto 207/2014, sobre vigilancia y control de la rabia en la Comunidad Autónoma de Extremadura.** *CONSEJERIA DE AGRICULTURA, DESARROLLO RURAL, MEDIO AMBIENTE Y ENERGIA.* Recuperado de: <http://doe.gobex.es/pdfs/doe/2014/1740o/14040235.pdf>
- **OMS** (2016) *Rabia. Nota descriptiva N° 99.* Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>

- **Organización Panamericana de la Salud** (2005) *Manual de normas y procedimientos para la vigilancia, prevención y control de la rabia; Medidas preventivas*. Recuperado de: <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/piezas%20comunicacionales/cdmanualRabia/medidasprev.html>

- **PROYECTO DE ORDEN** (2015) *del Consejero de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, por la que se regula la vacunación antirrábica obligatoria de la especie canina en la Comunidad Autónoma de Aragón y se establece la documentación sanitaria para animales de compañía*. Recuperado de: http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/AgriculturaGanaderiaMedioAmbiente/LISTAS_MANUALES/DESTACADOS/DESTACADOS_INICIO/DOCUMENTOS_INFORMACION_PUBLICA/VACUNA_ANTIRRABICA.pdf

- **Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica** (2013) *Protocolo de vigilancia y alerta por sospecha de rabia*. Recuperado de: http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/p_4_p_1_vigilancia_de_la_salud/rabia_2013_2.pdf

- **REGLAMENTO (CE) No 998/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO** de 26 de mayo de 2003 por el que se aprueban las normas zoonosanitarias aplicables a los desplazamientos de animales de compañía sin ánimo comercial. Recuperado de: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2003R0998:20080624:ES:PDF>

- **WHO** (1984) *Expert Committee on rabies. World Health Technical Report Series*. Recuperado de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38724/1/WHO_TRS_709.pdf

- **WHO**(2004) *WHO Technical Report series nº 931, expert consultation of rabies*. Recuperado de: http://www.who.int/rabies/trs931_%2006_05.pdf

- **WSAVA** (2010) *Journal of Small Animal Practice, Vol 51*. Recuperado de: <http://www.wsava.org/sites/default/files/VaccinationGuidelines2010.pdf>

12. Anexos

Anexo I- Cepas vacunales de la rabia.

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 ¹⁵³
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		Cuando 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)	

Anexo II- Oferta europea y de España en vacunas frente a la rabia, para animales.

Nombre	Fabricante	Tipo y características	Destino	Dosis, primovacuna-ción, duración inmunidad y revacunación
Canigen o Rabigen* (LR, MHA2PLR, 8)	Virbac	Inactivada, cepa VP-12; adyuvantada; >1UI;	perros	1ml; im ó 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 ^{6.4} 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-Intervet	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)

Anexo III- Guía de vacunación canina.

Table 1 WSAVA Canine Vaccination Guidelines				
Vaccine	Initial Puppy Vaccination (≤ 16 weeks)	Initial Adult Vaccination (> 16 weeks)	Revaccination Recommendation	Comments and Recommendations See text for definitions of core, non-core and not recommended vaccines
Canine Parvovirus-2 (CPV-2; MLV, parenteral)	Administer at 8–9 weeks of age, then every 3–4 weeks until 14–16 weeks of age.	Two doses, 3–4 weeks apart are generally recommended by manufacturers but one dose is considered protective.	Revaccination (booster) at 1 year, then not more often than every 3 years.	Core
Canine Distemper Virus (CDV; MLV, parenteral)				
Recombinant Canine Distemper Virus (rCDV, parenteral)				
Canine Adenovirus-2 (CAV-2; MLV, parenteral)				
CAV-2 (MLV, intranasal)				
CPV-2 (killed, parenteral)				Parenteral preferred for enhanced immunity to CAV-1. Not recommended where MLV available
Canine Adenovirus-1 (CAV-1; MLV and killed parenteral)				Not Recommended where CAV-2 MLV available
Rabies (killed parenteral)	Administer one dose as early as 3 months of age. *In high risk areas and if permitted by law, give a second dose 2–4 weeks after the first dose	Administer a single dose.	Canine rabies vaccines with either a 1- or 3-year DOI are available. Timing of boosters is determined by this licensed DOI but in some areas may be dictated by statute.	Core where required by statute or in areas where the disease is endemic.

Anexo IV - Protocolo de ensayo

8 - PROTOCOLO DE ENSAYO

Siga estrictamente el protocolo recomendado.

Utilice los controles negativos y positivos para cada prueba realizada y en cada microplaca a fin de validar la calidad de la detección en cada ensayo cualitativo. Si se lleva a cabo la cuantificación, en cada placa habrá que colocar el control negativo y los patrones de cuantificación. En ambos casos, siga la configuración recomendada para la microplaca.

Utilice las buenas prácticas de laboratorio.

1. Retire la cremallera de la microplaca y la cantidad necesaria de filas (R1) del envoltorio protector. Reemplace las filas sin usar con la bolsa desecada en el sobre de la microplaca y ciérrela herméticamente.
2. Establezca con todo cuidado el plan de distribución e identificación de la muestra como se describe a continuación:

Configuración de la microplaca para ensayos cualitativos:												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	E3										
B	R3	E4										
C	R4a	E5										
D	R4a	E6										
E	R4b	E7										
F	R4b	E8										
G	E1	E9										
H	E2	E10...										

3. Para la prueba de detección, diluya los controles R3, R4a y R4b y los sueros desconocidos 1:100 en el reactivo R6 (p.ej: 10 µl de la muestra en 990 µl de la solución diluyente).

4. Para la prueba de cuantificación preparar las muestras patrones (ver el capítulo 5.3) y diluir el reactivo R3, los controles R4a y el suero a detectar de 1/100 con el reactivo R6 (por ejemplo 10 µl de la muestra dentro de 990 µl de la solución de dilución).
5. Distribuya 100 µl de muestras diluidas, controles y patrones de cuantificación en los pocillos de la microplaca correspondiente de acuerdo con el plan de distribución preestablecido.
6. Cubra la microplaca con una película autoadhesiva (corte la hoja si es necesario). Oprima firmemente toda la placa para asegurar un sellado perfecto.
7. Incube las tiras a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos \pm 5 minutos.
8. Prepare la solución de lavado (R2) [vea el capítulo 5].
9. Prepare la solución de conjugado (R7), tal y como se describe en el capítulo 5 antes del final de la primera incubación.
10. Retire la película adhesiva. Realice 3 ciclos de lavado. Las condiciones óptimas de lavado se obtienen con lavadores de microplacas Bio-Rad PW40, PW41 o 1575 con el programa TSE 3. No permita que la microplaca pase más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Seque por inversión sobre un papel absorbente antes del paso siguiente.
11. Coloque 100 µl de solución conjugada (R7) en cada pocillo. Cubra con una nueva película e incube durante 60 minutos \pm 5 minutos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
12. Prepare la solución de desarrollo enzimático (R8+R9) tal y como se describe en el capítulo 5 justo antes de usar.
13. Retire la película adhesiva y realice 5 ciclos de lavado. Las condiciones óptimas de lavado se obtienen con lavadores de microplacas Bio-Rad PW40, PW41 o 1575 con el programa TSE 5. No permita que la microplaca pase más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Seque por inversión sobre un papel absorbente antes del paso siguiente.
14. Lejos de la luz directa, distribuya rápidamente 100 µl de la solución de desarrollo enzimático (R8 + R9) en cada pocillo e incube la placa en la oscuridad a temperatura ambiente ($+18$ a $+30^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos \pm 5 minutos.
Nota: No utilice película adhesiva durante esta incubación.
15. Añada 100 µl de solución de parada (R10) en cada pocillo de acuerdo con la misma secuencia y tasa de distribución en lo que se refiere a la solución de revelación.
16. Seque al completo la base de la placa. Lea la densidad óptica a 450 – 620 nm (modo bicromatismo) por medio de un lector de placa dentro de los 30 minutos de interrumpida la reacción (las tiras siempre deben ser mantenidas en la oscuridad antes de la lectura).
17. Antes de registrar los resultados, compruebe que la lectura cumpla con el plan de distribución e identificación de placas y muestras.

Anexo V- Cálculo e interpretación de los resultados

9 - CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se dan en densidades ópticas (DO) tras leer la microplaca a 450 - 620 nm.

1. Determinación cualitativa

Para la determinación cualitativa incluya en cada prueba los controles (R3, R4a y R4b).

a) Condiciones de la validación

Criterios	Validación
$OD\ R3(i) < 0.05$	La absorbancia de cada control negativo individual debe ser inferior a 0,05. Deberá repetir la prueba si al menos uno de los valores se encuentra fuera de este límite.
$0.300 \leq R4a(i) \leq 1.200$	Todos los valores individuales de DO del control positivo R4a deberán encontrarse entre 0,300 y 1,200. Deberá repetir la prueba si al menos uno de los valores de DO del R4a se encuentra fuera de este límite.
$1.500 \leq R4b(i) \leq 3.500$	Todos los valores individuales de DO del control positivo R4b deberán encontrarse entre 1,500 y 3,500. Sin embargo, un máximo de un valor aberrante individual puede ser eliminado cuando su densidad óptica es inferior a 1,500 o superior a 3,500. La prueba debe ser repetida si la densidad óptica de los dos controles positivos R4b se encuentra fuera de este límite.

Anexo VI- Interpretación de los análisis

b) Interpretación de los análisis

El valor umbral es igual a la media de los dos controles positivos R4a ($\overline{DO\ R4a}$) y corresponde al valor umbral de la seroconversión a 0,5 UE/ml.

El valor de seroconversión elevada es igual a la media de los dos controles positivos R4b ($\overline{DO\ R4b}$) o a un único control positivo R4b si se ha eliminado un valor aberrante.

La densidad óptica de cada muestra se compara con el valor de seroconversión elevada y el valor umbral.

Estado	Resultado	Interpretación
Seroconvertido +++	$DO\ Muestra > \overline{DO\ R4b}$	Las muestras con una densidad óptica superior al valor de seroconversión elevada se originan en individuos con una elevada seroconversión después de la vacunación de acuerdo con la prueba PLATELIA™ RABIES II.
Seroconvertido	$\overline{DO\ R4a} \leq DO\ Muestra \leq \overline{DO\ R4b}$	Las muestras con una densidad óptica igual o superior a la del valor umbral e igual o inferior a la del valor de seroconversión elevada se originan en individuos que han sufrido seroconversión después de la vacunación de acuerdo con la prueba PLATELIA™ RABIES II.
No seroconvertido	$DO\ Muestra < \overline{DO\ R4a}$	Las muestras con una densidad óptica inferior al valor umbral se originan en individuos que presentan un nivel de seroconversión insuficiente para evaluar la eficacia de la vacunación de acuerdo con la prueba PLATELIA™ RABIES II.