

BOLIVIA

## SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS POST-CAMPAÑA DE VACUNACIÓN CONTRA LA RABIA EN PERROS DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA, BOLIVIA

Loza A<sup>1</sup>, Marín G<sup>1</sup>, Ascarrunz G<sup>1</sup> (+), Suzuki K<sup>2</sup>, González T<sup>3</sup>, Pecoraro M<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Área de Serología - Laboratorio Provetsur - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Avenida 26 de febrero, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia;

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

<sup>3</sup>Laboratorio de Virología - Cátedra de Virología Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

**RESUMEN:** Durante la campaña de vacunación antirrábica masiva realizada en Santa Cruz, Bolivia, en agosto de 2007, 369.000 perros (82% de la población canina estimada) fueron vacunados durante 2 días con vacunas hechas en Cerebro de Ratón Lactante (CLR) Fuenzalida-Palacios. Desde entonces se han registrado 7 casos de rabia humana, además, el número de casos de rabia canina se ha reducido de 866 casos reportados el año 2006 a 516. Por esta razón, se realizó una encuesta serológica 3 meses después de la vacunación, colectando 320 muestras de sangre de perros con dueños seleccionados al azar, para determinar la respuesta inmune humoral. Tres meses después de la vacunación, el 20,94% de los perros tenían anticuerpos neutralizantes contra la rabia de  $\geq 0,5$  UI/ml. Al respecto se determinó que los animales mayores a un año estaban más protegidos que los menores ( $p < 0,01$ ), sin embargo el sexo de los perros evaluados no mostró asociación estadística con la protección ( $p > 0,05$ ). De acuerdo con las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud las campañas de vacunación deben contemplar coberturas no menores a 80 % para que tengan el efecto deseado. De nuestro estudio se desprende que existe una deficiente protección inmune contra la rabia en la población de canes vacunados de todas las zonas evaluadas, lo cual pone de manifiesto la susceptibilidad a aumentar los casos de rabia canina en la ciudad.

**Palabras clave:** Rabia, vacunación, ELISA, encuesta serológica

## SEROLOGICAL SURVEY OF POST-CAMPAIGN VACCINATION AGAINST THE RABIES IN DOGS OF SANTA CRUZ DE LA SIERRA, BOLIVIA

**Abstract:** During a 2 days massive anti-rabies vaccination campaign held in Santa Cruz, Bolivia in August 2007, 369,000 dogs (82% of the estimated canine population) were vaccinated with vaccines made of suckling mouse brain (CLR) Fuenzalida-Palacios. Since then there have been 7 cases of human rabies, moreover, the number of canine rabies cases have been reduced from 866 cases reported in 2006 to 516. For this reason, a serological survey was performed 3 months after vaccination, collecting 320 samples from dogs with owners selected at random to determine the humoral immune response. Three months after vaccination, 20.94% of the dogs had rabies neutralizing antibodies of  $\geq 0.5$  IU / ml. We found that animals older than a year were more protected than younger ones ( $p < 0.01$ ), but when sex of the dogs was reevaluated it showed no statistical association with protection ( $p > 0.05$ ). According to the recommendation of Panamerican Health Organization for rabies vaccination campaign, an effective coverage against the disease should be  $\geq 80\%$ . Our results demonstrate a deficient immune protection against rabies in the population of dogs vaccinated in all areas evaluated, which shows increased susceptibility to canine rabies in the city.

**Key Words:** Rabies, vaccination, ELISA, serosurvey

**Dirección para correspondencia:** A. Loza. Lab Provetsur. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Avenida 26 de febrero, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia

**E-mail:** [arlove@gmail.com](mailto:arlove@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

El número de casos de rabia animal en el departamento de Santa Cruz permanece alto, 214 en 2007. Este número es constituido principalmente por caninos y bovinos. En 2007, fueron notificados al Ministerio de Salud 161 casos de rabia canina en la ciudad de Santa Cruz. Los canes estuvieron involucrados en 100% de 3 casos de rabia humana ocurridos en 2007. La distribución de los casos de rabia canina en el departamento de Santa Cruz es heterogénea, con las redes de salud Sur y Norte presentando los mayores índices.

El centro de control de rabia del municipio de Santa Cruz de la Sierra, viene realizando en el mes de agosto de cada año, como parte del Programa de Nacional de control de la rabia, campañas de vacunación masiva contra la rabia. En los últimos 5 años las campañas de vacunación contaron con más de 1000 brigadas de vacunación, que son distribuidas por toda la ciudad, manteniendo una cobertura vacunal de 82,42% para el año 2007; (Alcaldía de Santa Cruz de la Sierra ZONOSIS-CEDES, 2008).

La vacuna utilizada durante todo este período fue Fuenzalida-Palacios de virus rábico inactivado, producida en cerebro de ratones lactantes, fabricada por el laboratorio INLASA-Instituto Nacional de Laboratorios. El mismo recomienda la revacunación cada 12 meses. Sikes et al, (1971) y Fields et al, (1976) demostraron que esta vacuna confería inmunidad superior a 12 meses cuando es administrada en dosis única en canes. Desde mucho tiempo, diferentes investigaciones han demostrado la importancia de los anticuerpos anti-rábicos neutralizantes en la profilaxis de la infección rábica. Estos anticuerpos son esenciales en la inmunidad por que intervienen en los primeros estadios de la infección del virus; (Baltazar et al, 1955). Por lo tanto, la determinación de estos anticuerpos es un método para determinar a resistencia del individuo a la infección.

Investigaciones realizadas por Dean et al, (1964) demostraron que los canes vacunados que presentan niveles detectables de anticuerpos anti-rábicos en suero, raramente enfermaran de rabia a un desafío viral.

Entre las proteínas del virus rábico, únicamente la glicoproteína puede inducir la síntesis de anticuerpos neutralizantes para rabia; (Cox et al, 1977). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la evaluación de la inmunidad anti-rábica a través de titulación de anticuerpos y considera un título igual o superior a 0,5 UI/ml como efecto de un estado inmunitario suficiente para proteger individuos expuestos al riesgo de contaminación.

La respuesta inmune humoral no es el único mecanismo involucrado en la protección de los individuos, ya que concomitantemente actúan mecanismos de la respuesta inmune celular; (Mifune et al, 1981).

Con el objetivo de evaluar canes vacunados durante la campaña que presentaban título protector (0,5 UI/ml) después de la vacunación, y un título de anticuerpos 90 días después de la vacunación, se realizó un muestreo serológico en 320 canes del Municipio de Santa Cruz de la Sierra.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

Santa Cruz de la Sierra es la ciudad capital del Departamento de Santa Cruz, ubicado en la parte oriental de Bolivia (17 ° 45 'S, 63 ° 14' O) a 416 metros sobre el nivel del mar. La ciudad tiene un clima semi-tropical, con una temperatura promedio de 21 ° C en invierno y 32 ° C en verano. La superficie total es de aproximadamente 370 kilómetros cuadrados. La población estimada es de 1,4 millones de personas (Ministerio de Salud y Previsión Social, 2007). El Gobierno de Bolivia emitió una regulación especial de medidas sanitarias para el control de la rabia en noviembre de 2005, debido al aumento de la incidencia de

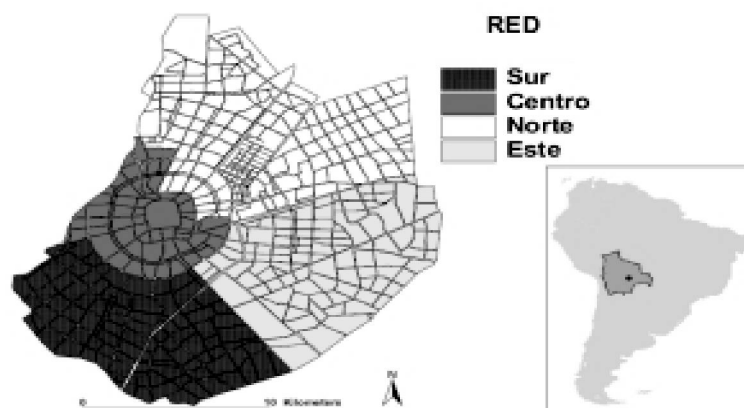


Figura 1. Mapa de distribución de redes de salud en el área de estudio. Inserto: el punto indica la posición de Santa Cruz en Bolivia en Sudamérica (Suzuki et al, 2008).

casos de rabia canina y humana en los últimos años (Ministerio de Salud y Deportes, 2005).

### UNIDAD DE MUESTREO

El Gobierno Municipal de Santa Cruz de la Sierra dividió la ciudad en cuatro Redes de Salud (Centro, Sur, Norte y Este) como áreas de responsabilidad de cada uno de los cuatro centros de servicios municipales de salud, siendo el encargado del control de la rabia. A fin de seleccionar los animales, el estudio adoptó la norma de zonificación con una modificación de la combinación de Sur, Norte y Este, como área periférica de Santa Cruz, en comparación con la red Centro, como área central de Santa Cruz, (Fig. 1). El método de selección utilizado fue de muestreo aleatorio estratificado (Thrusfield, 2005). El Gobierno Municipal de Santa Cruz de la Sierra proporcionó acceso a las estimaciones de la población de perros de cada zona sobre la base de los resultados de la última campaña de vacunación realizada en agosto de 2007. La asignación de los individuos a los diferentes estratos fue equilibrada resultando en un total de 320 animales. El tamaño de muestra necesario se calculó utilizando el software Win Episcope 2.0 El tamaño de la muestra de 320 de una población de 400.000 perros fue suficiente para producir un 95 % intervalo de confianza (IC) con una exactitud deseada de  $\pm 5\%$ , asumiendo la seroprevalencia de anticuerpos estimada en 82 %.

### RECOPIACIÓN DE DATOS

El trabajo de campo fue realizado por equipos conformados por los autores y el personal de la Alcaldía Municipal de Santa Cruz de la Sierra. Los 320 animales del estudio fueron analizados en febrero de 2009. El trabajo de campo consistió en la recopilación de datos a través de entrevistas a cada propietario de perro doméstico. A tiempo de la extracción de sangre se elaboró un cuestio-

nario en el que se identificaba los datos de cada animal (edad, sexo y red de salud).

Se pidió información al padre de familia o una persona adulta de cada hogar de donde se colectaron las muestras. La confirmación del estado de vacunación de los perros fue verificada por los certificados de vacunación individual o de acuerdo a la información suministrada por los encuestados. Se tomaron muestras de sangre de las venas cefálica o safena de cada perro, recogidos en tubos sin anticoagulante y se dejó reposar a temperatura ambiente para la liberación del suero. Las muestras fueron centrifugadas y los sueros separados y almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### MÉTODO DE LABORATORIO

Las muestras de sangre fueron procesadas en el laboratorio Provetsur de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Los sueros fueron analizados usando un Enzimoimmunoensayo Indirecto comercial (ELISA-I) que emplea la glicoproteína extraída de la membrana del virus inactivado y purificado como antígeno (Platelia rabia II Kit, Bio-Rad Laboratories, Francia). Los controles positivos y negativos fueron incluidos para cada serie de muestras analizadas.

La absorbancia fue leída en un lector Multiskan EX marca Thermo a 450-620 nm. Para la interpretación de la lectura, se siguieron las recomendaciones de los expertos de la OMS y OIE, los cuales indican que un nivel de anticuerpos igual o superior a 0,5 UI / ml es considerado como protección adecuada contra los riesgos de enfermedad (OMS, 1987). Por lo tanto, se expresaron los resultados de protegidos o no protegidos en función a la densidad óptica (DO) de cada muestra comparada con el umbral correspondiente a la OD valor de corte del control positivo límite inferior (0,5 UI/ml).

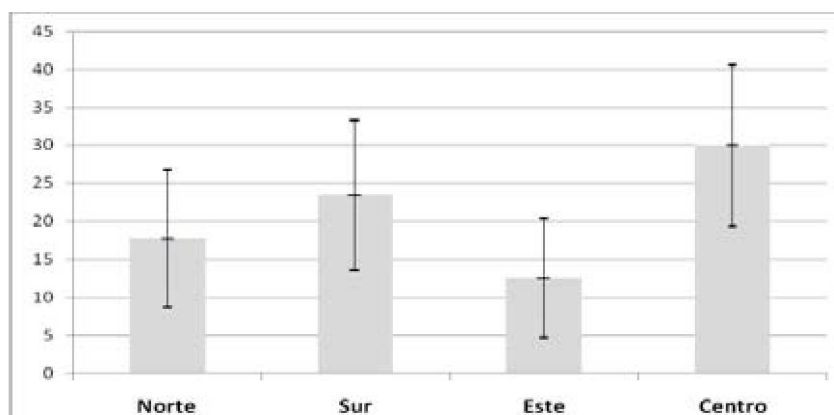


Figura 2. Prevalencia verdadera IC 95% ( $P < 0,05$ ) de perros protegidos contra la rabia por redes de salud en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

Tabla 1. Valores de Odd Ratio calculado por Red de Salud en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

RED	SUR	ESTE	CENTRO
NORTE	0,702 OR: 0,324 - 1,522	1,51 OR: 0,626 - 3,630	0,50 OR: 0,237 - 1,055
SUR		2,145 OR: 0,927 - 4,961	0,715 OR: 0,354 - 1,442
ESTE			0,33 OR: 0,147 - 0,754

Tabla 2. Relación entre las características de perros protegidos y no protegidos según edad y sexo en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

	Protegidos		No Protegidos		X <sup>2</sup>	Valor-P
	%	n	%	n		
<b>Sexo: macho</b>	18,58	34	81,42	149	1,44	0,23
<b>(versus hembra)</b>	24,08	33	75,91	104		
<b>Edad: &lt;1 año</b>	16,7	7	83,3	35	13,99	<0,01
<b>(versus ≥1 año)</b>	21,58	60	78,42	218		

## ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico se realizó con la versión del software Epidat 3.1. (Xunta de Galicia, OMS-OPS) La relación entre el área geográfica (centro versus sur, este y norte) y las características de los perros se analizó usando chi-cuadrado de Pearson para la comparación estadística de estos factores categóricos. Sobre la base de la sensibilidad de ELISA-I publicado en 88,4 % y especificidad 98,8 % (Anon, 2005; Feyssaguet et al, 2005), se calculó una prevalencia verdadera estimada de anticuerpos entre los perros de estudio y se calculó el intervalo de confianza en 95 %. Se utilizó un valor de p de 0,05 para indicar significancia estadística.

## RESULTADOS

De los 320 perros evaluados la seroprevalencia verdadera de anticuerpos protectores contra la rabia, estimada para las cuatro redes de salud fue de 20,94 % con un IC95 % de 16,32 - 25,55 en noviembre de 2007.

Las redes de salud con la seroprevalencia mas alta fue la red Centro, respecto las tres redes evaluadas (Figura 2).

Se evaluó el riesgo relativo aproximado a infectarse de rabia entre las diferentes redes de salud, donde se observó probabilidad de riesgo significativo para la población de perros de la red Centro respecto la red Este (Tabla 1).

En la evaluación de las variables respuesta por sexo no se observó diferencia estadística significativa para la seroprevalencia calculada en machos respecto de hembras.

Según los estratos etarios evaluados se observó diferencia estadística significativa entre los animales <1 año, respecto a los animales ≥1 año (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

El programa nacional de control y erradicación de rabia urbana contempla la vacunación masiva de perros y tiene como objetivo fundamental mantener los índices inmunogénicos protectivos en perros domésticos, disminuyendo el número de animales susceptibles (Alcaldía de Santa Cruz de la Sierra ZONOSIS-CEDES, 2008).

El método Enzimoimmunoensayo (ELISA-I) Platelia rabia II Kit, Bio-Rad Laboratories, Francia, es recomendado por la OIE (Organización Internacional de Sanidad Animal) como el método válido para identificar animales protegidos y no protegidos a un desafío del virus de la rabia a campo.

El presente estudio permitió determinar que la mayoría de los animales no presentan títulos de protección 20,9 % (67/320), después de tres meses de haber recibido vacunación contra la rabia, esto podría estar influenciado por el tipo de vacuna utilizado durante la campaña.

En un estudio realizado por Haddad et al (1985), únicamente 24,2 % (7/29) de los animales mantuvieron título protector después de 12 meses cuando fueron vacunados con vacuna de cultivo celular y 5,7 % (2/35) con vacuna de tejido nervoso. Estos autores discuten la existencia de factores intrínsecos (étnicos) que interfieren en la

respuesta inmune, asociado al estado nutricional de los animales.

Debe considerarse también que los estudios de Sikes et al (1971) y Fields et al (1976), con canes que recibieron dosis única de vacuna hecha en cerebro de ratón lactante y mantuvieron la inmunidad por 3 años, fueron realizados con animales mantenidos en condiciones controladas de laboratorio. Germano et al (1982), analizando la respuesta inmune de canes domiciliados, primo vacunados con la vacuna Fuenzalida-Palacios, en condiciones de campo, observaron una rápida caída de los títulos de anticuerpos contra rabia a los 45 días después de la vacunación cuando fueron analizados por la técnica de Seroneutralización en ratones, y a los 60 días analizados por Inmunofluorescencia Indirecta. En nuestro estudio, los animales menores a 1 año reportaron diferencia estadística significativa, respecto a los animales mayores a 1 año, lo que puede estar atribuido a factores de interferencia maternal en cachorros, estado nutricional deficiente o a la no aplicación de dosis vacunal de refuerzo.

Akakpo et al (1986), analizando la respuesta inmune de 514 canes que recibieron dosis única de vacuna antirrábica de cultivo celular, observaron un decrecimiento en el número de animales protegidos de 74 % 30 días después de la vacunación a 7,0 % después de 360 días, efecto atribuido a la baja condición de salud de los animales, mal nutrición, infecciones y parasitosis.

Los resultados encontrados indican que existe un gran riesgo de que la rabia se mantenga en todos los distritos evaluados (Centro, Sur, Norte y Este), existiendo un mayor riesgo en los distritos periurbanos (Sur, Norte y Este). De acuerdo con las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud las campañas de vacunación deben contemplar coberturas no menores a 80 % para que tengan el efecto deseado.

Es evidente la necesidad de realizar refuerzos de vacunación en animales menores a 1 año para disminuir el riesgo de infección a desafío viral en este grupo etario.

Mayores estudios son necesarios para evaluar, otros factores extrínsecos e intrínsecos a los canes y sobre todo los aspectos logísticos, para determinar si las campañas de vacunación antirrábica canina se realizan de manera adecuada en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Akakpo AJ, Mbou G, Bornarel P, Sarradin P, Bada AR. Serologic response in dogs after a mass primary antirabies vaccination (inactivated vaccine) at pikine dakar (senegal) (translated from french). *Dakar med.* 1993. 38(2):123-128.
2. Baltazar M, Bahamanyar M. Essai pratique du serum antirabique chez les mordus par les loups en-

rages. *Bull. Org. Mond. Sante.* 1955. 13:747-72.

3. Cox JH, Dietzschold B, Schneider LG. Rabies virus glycoprotein: biological and serological characterization. *Infect. Immun.* 1977. 16:754-9.

4. Dean DJ, Evans WM, Thomson WR. Studies on the low egg passage flury strain of modified live rabies virus produced in embryonating chicken eggs and tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* 1964. 25:756-63.

5. Fields M, Ament RD, Lamb D, Blades J. Suckling mouse brain rabies vaccine: duration of immunity in dogs. *Veterinary medicine of small animals clinical* 1976. 71: 37-40.

6. Germano PM, Marilene F, Almeida AC, Aguiar AF, Martorelli P, Marcelo M, Octávio AC. Avaliação da resposta imunitária da vacina anti-rábica preparada em cérebros de camundongos lactentes aplicada em cães primo vacunados em condições naturais. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 1982. 19: 67-73.

7. Haddad N, Soares IC. Activité de deux vaccins antirabiques employés lors de la primovaccination de chiens "tout venant" em Tunisie, *Rec. Med. Vét.*, 1985. 161: 755- 62.

8. Mifune K, De Oliveira AN, Romijn CP, Kimura LS. Essential role t cell in the post exposure prophylaxis of rabies in mice. *Microbiol. Immunol.* 1981. 25:895-904.

9. Sikes R, Cleary WF, Koprowski H, Wiktor TJ, Kaplan MM. Effective protection of monkeys against death from street virus by post-exposure administration of tissue culture rabies vaccine. *Bulletin of the world health organization* 1971.45:1-11.

10. Suzuki K, Gonzales E, Ascarrunz G, Loza A, Pérez M, Ruiz G, Rojas L, Mancilla K, Pereira JA, Guzman J, Pecoraro M. Antibody response to an anti-rabies vaccine in a dog population under field condition in bolivia. *Zoonoses public health*, 2008. 1863 - 2378.

11. Trusfield M. *Veterinary epidemiology*, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, p. 584. 2005.