



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Estudio de Posible Reacción Anafiláctica y Seroneutralización en Perros Beagle a la Vacunación Intramuscular Repetida, Usando Cepa Vacunal Antirrábica V-319/Acatlán Producida en Cultivos Celulares.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Manuel Fernández Ruvalcaba

**Asesores: Dr. Eliseo Hernández Baumgarten
Dr. José Manuel Berruecos Villalobos**



México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNAM
1983
F475
ej. b
Pt 83-218 b



Estudio de Posibles Factores Ambientales y Genéticos
relacionados con la aparición de la enfermedad de
mucopolisacaridosis tipo VI en el ganado bovino
de la zona de producción de carne en el Estado de Jalisco.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA
BIOLOGICA - UNAM
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Una parte importante de la información
del MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
se encuentra en los libros
Manual de Farmacología Veterinaria

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia
del Instituto de Investigaciones y Enseñanza



Forma D. E. 1001

A MI PADRES:

MANUEL FERNANDEZ VAZQUEZ

MARIA R. DE FERNANDEZ

CON ETERNA GRATITUD.

A MIS HERMANOS:

MARIA DE LOS ANGELES

MARTHA MARGARITA

RUBEN.

A MIS ASESORES:

DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

DR. JOSE MANUEL BERRUECOS VILLALOBOS

A MI HONORABLE JURADO.

DESEO MANIFESTAR MUY ESPECIALMENTE MI AGRADECIMIENTO AL
M.V.Z., M.Sc. GERMINAL J. CANTO ALARCON, POR SU VALIOSA
AYUDA PRESTADA DESINTERESADAMENTE EN MI BENEFICIO PROFE-
SIONAL, Y A LA SRA. MAGDALENA ESCANAME POR LA TRANSCRIP
CION DEL TEXTO.

G R A C I A S.

EL PRESENTE TRABAJO SE ELABORO EN LA SECCION DE
EPIZOOTIOLOGIA DEL PROYECTO DE RABIA PARALITICA
(I.N.I.P.) PALO ALTO, MEXICO.

AGRADEZCO AL DR. ELISEO HERNANDEZ B. LAS FACILI
DADES Y ATENCIONES QUE ME BRINDO.

RESUMEN

En vista de las posibilidades de provocar choque anafiláctico en perros, utilizando para vacunarlos la vacuna V-319/Acatlán originalmente elaborada para bovinos, se seleccionaron 5 perros de la raza Beagle libres de anticuerpos vacunales contra rabia y en buenas condiciones de salud, se les hicieron sangrados periódicos mensualmente y se vacunaron a cada uno de ellos durante 10 meses; cada mes, antes y después de vacunar se determinaron sus constantes fisiológicas tales como temperatura, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria, siguiendo a esto un período de observación de 2 horas. De la sangre recolectada se obtuvo el suero y se analizaron por la prueba de Sueroneutralización en ratón.

Los resultados indicaron que el contenido protéico de la vacuna no producía choque anafiláctico durante 10 vacunaciones, una cada mes, y que el título de anticuerpos fue siempre en aumento.

C O N T E N I D O

| | |
|--------------------------|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| MATERIAL Y METODOS | 14 |
| RESULTADOS | 18 |
| DISCUSION | 19 |
| CONCLUSIONES..... | 21 |
| BIBLIOGRAFIA | 22 |

INTRODUCCION

La rabia es una enfermedad viral contagiosa del sistema nervioso central (SNC), y glándulas salivales causada por un virus neurótropo sensible al eter y termolabil (52, 13, 28, 2), perteneciente a la familia de los Rhabdovirus (20). La enfermedad afecta a todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre. En todos los huéspedes conocidos, el virus produce una encefalitis mortal (52).

Los signos típicos de la enfermedad son en orden descendente: agresividad, anorexia, ptialismo, paraplejia, maxiloparesia, disfagia, parálisis completa, inquietud y estreñimiento (19, 3). La forma más común de transmisión es por mordedura de animales infectados en perros y gatos; en bovinos y equinos la enfermedad es transmitida por la mordedura de quirópteros principalmente por Desmodus rotundus (13, 41). En el perro, los carnívoros salvajes y los murciélagos vampiros que son animales que muerden; el brote de rabia, una vez iniciado, no se extingue; más bien por su largo período de incubación tiende a reaparecer a intervalos más o menos regulares (41).

El virus requiere de alguna solución de continuidad para penetrar, debido a que no pasa piel integra y aunque sí atravieza las mucosas respiratoria y digestiva, la transmisión aerea y oral no son el mecanismo común (31, 18).

Zinke demostró la infecciosidad de la saliva, transmitiendo la rabia al inocular saliva de un perro rabioso a uno sano (51).

Pasteur, Roux, Chamberland y Thuiller (1881-1889) demostraron que el virus puro se concentraba en los centros nerviosos, a partir de estas investigaciones, aislaron el virus y lo sometieron a pases seriados por via intracerebral en huéspedes naturales, modificando su patogenicidad para lograr uno de virulencia uniforme (4, 27).

La vacuna de Pasteur fue preparada en médula espinal, utilizando el virus que había sido fijado por una serie de pases en cerebros de conejos y atenuado por desecación a temperatura ambiente sobre hidróxido de potasio (51).

Este procedimiento resultó ser muy caro y demandaba mucho tiempo en su elaboración, además de que el perro tenía que ser vacunado diariamente durante 10 días; sin embargo a partir de estos primeros ensayos evolucionó la vacuna (51).

No se pensó más en la posibilidad de vacuna a los perros hasta que apareció la vacuna fenolada de Fermi y modificada por Semple (4). El primer ensayo de campo fue realizado en Japón, de 1918 a 1920 por Umeno en una epizootia de rabia que se presentó en Tokyo (51).

Esta vacuna fue la primera usada comercialmente y usada en forma masiva, pero en 1930 se sospechó que a la vacuna le faltaba antigenicidad, lo cual fue demostrado por Webster y posteriormente con los estudios de Habel se hizo evidente que muchas de las cepas usadas en la producción de vacuna no eran lo suficientemente potentes (51, 26).

Kesler en la década de los 20s desarrolló una vacuna eficaz inactivada con cloroformo, probándose con buenos resultados pero comercialmente no funcionó (33).

Más tarde se pudo descubrir que el conglomerado de tejido nervioso no dejaba penetrar el cloroformo lo suficiente, impidiendo así alcanzar el virus que quedaba sin atenuarse. Las vacunas de éter fallaron por la misma razón, además se observó que las vacunas de tejido nervioso a veces producían parálisis posvacuna (4, 15).

La evolución de una vacuna antirrábica prosiguió con la adaptación de la cepa Flury a pollitos del día (29), y más tarde a huevos embrio

nados (36). Johnson aisló la cepa Flury de una muchacha que murió de rabia por una exposición, en la que no hubo mordedura, pero sí datos anamnésticos de lamedura de mucosas (8, 31). El virus fue pasado 136 veces intracerebralmente en pollitos de un día. Más tarde Koprowski y Cox (36), propagaron esta cepa en embriones de pollo. El virus con 50 a 60 pasajes fue designado LEP (bajo pasaje), encontrándose que no era virulento para los perros cuando se les inyectaba parenteralmente (35).

Algún tiempo después se observó que al inmunizar con vacuna antirrábica viva LEP de uso canino, los cachorros menores de 11 semanas no respondían tan bien como los animales adultos y podía causar encefalitis en cachorros de menos de 3 semanas de edad (32).

Con el desarrollo del cultivo de tejidos empieza una nueva etapa en la elaboración de vacuna antirrábicas.

El primer trabajo significativo acerca de la propagación del virus rábico en cultivos celulares fue el de Kissling (1958), que cultivando la cepa CVS (challenge virus strain), en células primarias de riñón de criceto obtuvo títulos de $10^{3.5}$ DL 50 en ratones (34). Desde entonces han sido muchos los investigadores que han modificado el crecimiento del virus rábico fijo y de calle en cultivos celulares, tanto primarios como de línea continua, sobre una gran variedad de tejidos (1) (Cuadro 1).

CUADRO 1. VACUNAS ANTIRRÁBICAS ELABORADAS EN CULTIVOS CELULARES

| SISTEMA CELULAR | CEPA DE VIRUS | T I P O | RECOMENDADA PARA |
|--------------------------------|-------------------------------|------------|--|
| Fibroblastos de pollo | Flury LEP | Vivo | Perros |
| Riñón de perro (línea celular) | Flury HEP | Vivo | Perros, gatos, bovinos |
| Riñón de Cerdo | ERA | Vivo | Perros, gatos, bovinos ovinos y caprinos. |
| Riñón de Hamster | Flury LEP | Vivo | Perros. |
| Riñón de Hamster | SAD (Alabama Dufferin Strain) | Vivo | Perros, bovinos. |
| Riñón de Hamster | CVS | Inactivado | Perros, gatos, ovinos, caprinos, bovinos, equinos. |

Ref. La Rabia, técnicas de laboratorio, 3a. ed. Martin M. Kaplan, Hilary Koprowski, M. K. Abelseth, Ed. OMS, 1976.

Según el principio involucrado en la producción de inmunidad - las vacunas antirrábicas pueden dividirse en dos tipos: vacunas de virus vivo atenuado y vacunas inactivadas (25) (Cuadro 2).

CUADRO 2. VACUNAS ANTIRRABICAS VIVAS E INACTIVADAS

| VACUNA | CEPA | TEJIDO EMPLEADO | INDICADO PARA |
|-----------------|-----------------------------|------------------|----------------------------------|
| De virus vivo: | | | |
| LEP | Flury 40-60 pases en huevos | Embrión de pollo | Perros. |
| KELEV | Kelev 40-60 pases en huevos | Embrión de pollo | Perros y bovinos. |
| HEP | Flury 180 pases en huevos | Embrión de pollo | Perros, gatos bovinos, hombre. |
| Tejido Nervioso | Virus fijo | SNC | Perros, bovinos, hombre y otros. |
| Inactivadas: | | | |
| Pato | Virus fijo | Embrión de pollo | Hombre. |
| Tejido Nervioso | Virus fijo | SNC | Perros, bovinos, hombre y otros. |

Ref. OMS Comité de expertos en la Rabia. 5to. Informe, 1966.

Las vacunas de virus vivo modificado o atenuado, son capaces de multiplicarse en el animal y producir una infección inaparente inmunizante, tienen la gran ventaja de que una sola dosis es suficiente para producir inmunización de larga duración o aún permanente.

En las vacunas inactivadas el virus se somete a algún proceso de inactivación (luz ultravioleta) para eliminar por completo su posibilidad de infectar o multiplicarse en cualquier tejido. Debido a que el vi-

rus no se multiplica para producir más Ag, la cantidad de virus en cada dosis de vacuna es muy importante (25), tienen la desventaja de que por estar preparadas en tejido nervioso, pueden llegar a causar parálisis pos vacunal (15).

Es de suma importancia para que una vacuna sea aceptable el ser: inocua, lo suficientemente antigénica para proteger al animal, facilidad de producción, estabilidad aún después de largo almacenaje y económica (14, 25). Actualmente las vacunas antirrábicas pueden dividirse en tres grandes grupos tomando como criterio para subdividir las su origen, y son:

1. Vacunas preparadas en tejidos nerviosos.
2. Vacunas producidas en embrión de pollo o pato.
3. Vacunas elaboradas en cultivo de tejidos.

1. Vacunas preparadas en tejidos nerviosos.-

- a) Tipo ~~Simple~~: Preparada en cerebro de cabras, ovejas o conejos.
Semilla: Cepa PV (Pasteur Virus)
Tipo: Fenolizada.
Caducidad: Seis meses (39, 48).
- b) Tipo Fermi: Preparada en cerebros de ovejas.
Semilla: Cepa de virus fijo del Instituto Pasteur (Francia).
Tipo: Fenolizada.
Caducidad: Cinco meses (40, 39).
- c) Tipo Fuenzalida: Preparada en cerebro de ratón lactante, irradiada con luz ultravioleta y fenolizada. Se utilizan 3 cepas: La cepa 51 en perros, la 91 y CVS en humanos. La 51 y 91 se han mantenido en ratones adultos por pases intracerebrales.
Caducidad: Seis meses (21).

2. Vacunas de origen aviario.-

- a) Cepa Flury. De acuerdo al número de veces que la cepa es pasada a través del embrión de pollo o de pato, se tienen tres variantes: HEP, MEP y LEP, (High, Medium y Low passage, respectivamente), indicándose con ésto si es alto, mediano o pequeño el número de pases (14, 37).

3. Vacunas preparadas en cultivo de tejidos.-

Estas vacunas tienen la ventaja de poder concentrarse más fácilmente y de poseer una escasa cantidad de proteínas extrañas, por lo que los factores causantes de complicaciones posvacunales en el SNC no existen, o al menos no han sido reportados; estas vacunas se han utilizado en un número considerable de animales y humanos (53). La técnica general consiste en infectar monoestratos celulares y después de un período de incubación variable, se cosecha el fluido y las células se someten a diversos tratamientos para liberar el virus (14).

La Vacuna V-319/Acatlán, es una vacuna de origen murciélagu vampiro adaptada a cultivos celulares, línea celular BHK 21 (Riñón de Hamster) desarrollada en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (11, - 12, 27).

Con esta vacuna V-319/Acatlán se procedió a realizar pruebas de inocuidad, antigenicidad y respuesta serológica en bovinos, indicando que mostraba buenos prospectos para llenar los requisitos de una buena vacuna (45). También se realizaron pruebas de duración de inmunidad en la misma especie con buenos resultados (46).

En perros se han hecho pruebas de inocuidad y evaluación serológica en cachorros beagle procedentes de madres vacunadas y no vacunadas - (23, 24, 43, 49).

El presente trabajo se hizo debido a que la vacuna V-319/Acatlán contiene proteínas extrañas al perro, debido a que en su elaboración se emplea suero fetal bovino, el cual contiene albumina y por esto es probable que causara choques anafilácticos o reacciones alérgicas en perros.

Por consiguiente los resultados obtenidos en este trabajo tienen a resolver los siguientes problemas:

- 1.- Observar la presencia o ausencia de choque anafiláctico en perros con la inoculación repetitiva de la vacuna antirrábica V-319/Acatlán.
- 2.- Determinar el título de Ac séricos por medio de la prueba de sueroneutralización en ratón albino suizo de 21 días, a lo largo del experimento.

La palabra anafilaxis deriva del griego: a.- sin y filaxis.- Protección, (profilaxis), y es una reacción de hipersensibilidad inmediata, que puede ser inducida experimentalmente en animales y accidentalmente en el hombre.

La forma de inducción es por medio de la exposición de un animal sensibilizado a una segunda inyección del mismo Ag (antígeno); produciendo una unión específica Ag-Ac (anticuerpo) en tejidos como resultado de la fijación de uno de los elementos al tejido (5, 10, 17, 22). La reacción se manifiesta por una serie de signos referidos en conjunto como "choque anafiláctico", que son característicos para cada especie y pueden tener consecuencias fatales (5, 6, 10). Se ha observado en las diferentes especies animales que el sitio donde se lleva a cabo la reacción anafiláctica varía; así tenemos que en el perro, el hígado es el órgano más afectado; en el caballo el pulmón y en el conejo el corazón. Así mismo algunas especies son más resistentes que otras a la anafilaxis mortal, como es el caso de la rata, el ratón y el hamster (5, 6, 7, 9, 30).

El choque anafiláctico en el perro es acompañado por activación de sistemas fibrinolíticos y proteolíticos del plasma así como la liberación de histamina y serotonina (5, 9, 30). En la anafilaxis general no mortal en el perro los signos que observamos son: aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria, prurito, diarrea y emisión de orina. En la anafilaxis mortal en el perro hay vómito que empeora hasta adquirir características biliosas o fecales, diarrea muy intensa y se torna sanguinolenta, respiración frecuente y superficial, la presión arterial baja, hay taquicardia, ataxia convulsiones y muerte por falla respiratoria, pues los músculos involucrados en la respiración se contraen de tal manera que impiden que el animal inspire permaneciendo en una espiración mortal. La sangre obtenida de un animal con choque anafiláctico es incoagulable, existe una marcada congestión del hígado con éstasis de las tributarias, lo que da como resultado la dificultad respiratoria y disminución de la presión sanguínea (5, 9, 22, 30).

A la necropsia se encuentran grandes zonas edematosas en la mucosa intestinal y pulmones, hay hemorragia y congestión del hígado, tubo digestivo y corazón. El hígado puede llegar a encerrar hasta el 60% del volumen sanguíneo total del animal por constricción de los vasos suprahepáticos. No obstante que los órganos afectados cambian en las diferentes especies animales, dos cambios básicos perduran: incremento de la permeabilidad capilar y contracción del músculo liso (5, 9, 22, 30).

Existen dos tipos fundamentales de anafilaxis: La sistémica directa o activa y la sistémica pasiva.

La directa es el estado anafiláctico inducido por inmunización activa (sensibilización) de animales con un Ag.

La pasiva es la que se obtiene por la administración de Ac; por lo general endovenosa o intraperitonealmente seguida de otra inyección endovenosa de Ag 24-48 horas después.

En la anafilaxis activa la primera inyección de Ag es conocida como inyección o dosis sensibilizante y la segunda como inyección o dosis de choque o desencadenante (9, 10, 17, 22, 30).

Hay evidencias de que se puede producir sensibilización por -- inhalación de Ag disperso, ya sea en forma de polvo o en finas gotas como aerosoles (9, 30). En algunos sistemas Ag-Ac el choque anafiláctico puede ser inducido por la inyección de Ag seguida de una inyección endovenosa de Ac, uno o dos días después; a esta forma de anafilaxis es llamada anafilaxis pasiva reversible (9, 30).

En la anafilaxis local (reacción de Arthus) el primer indicio de una reacción alérgica es la aparición de una gran zona de eritema y edema alrededor de la vesícula producida por la inyección intradérmica de Ag. En pocas horas se produce necrosis celular que sigue creciendo hasta 48 horas después; luego el tejido muerto se seca y en aproximadamente una semana la lesión cicatriza.

Esta reacción anafiláctica local se debe a la formación intravascular de precipitado Ag-Ac y trombosis. La difusión del Ag en los vasos vecinos del sitio de inyección crea una alta concentración de Ag y el Ac circulante se concentra formando complejos Ag-Ac que precipitan y tapan los pequeños vasos, produciendo destrucción local del tejido por inadecuada irrigación. Por lo tanto este tipo de anafilaxia no se debe a la fijación celular de Ac y desgranulación de células cebadas, sino a los precipitados que forman con el Ag los Ac circulantes (10, 17, 22, 30).

Se puede producir anafilaxis cutánea, si una inyección desencadenante se inocula en la piel de cuyo ya sea que éstos hayan sido activa o pasivamente sensibilizados y un colorante como el azul de Evans se inyecta endovenosamente inmediatamente después de la inyección intracutánea de Ag. El colorante aparece en el sitio de inyección de la piel, el escape del colorante demuestra el incremento de permeabilidad capilar, resultado de la interacción Ag-Ac (30).

También se observa anafilaxis cutánea local cuando el sitio de la piel es sensibilizado por una inyección intracutánea de Ac y posteriormente en un lapso de 6 horas se inyecta una mezcla de Ag y colorante endovenosamente (22, 30).

Las células cebadas son las mayormente involucradas en la reacción anafiláctica, en menor grado los basófilos circulantes y los Ac más importantes que se unen a estas células para provocar la reacción anafiláctica son los del tipo IgE (inmunoglobulina E), debido a que esta inmunoglobulina tiene en su fracción cristalizante porciones para las cuales las células cebadas tienen receptores; por lo que las IGE son denominadas Ac citotóxicos (10, 17, 22).

Es imperativo que el Ag sea polivalente; ya que tiene que hacer de puente entre dos IgE, para producir la desgranulación de la célula cebada provocando la salida de histamina, serotonina, heparina y SRS-A (slow reacting substances - anafilaxis) (9, 30).

Las inmunoglobulinas IgM e IgG también pueden causar la desgranulación de basófilos y células cebadas, debido a que pueden unirse al complemento mediante C1q, y originar la cascada en la cual C3 y C5 actúan como anafilotoxinas, lo que produce la desgranulación de células cebadas y basófilos (17, 22).

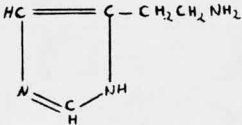
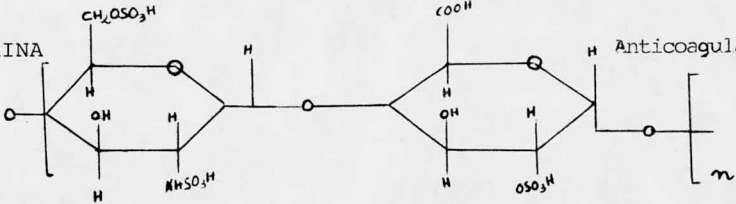
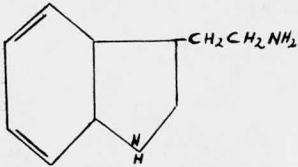
Las células cebadas y los basófilos son abundantes en tejido conjuntivo, pulmón, útero, alrededor de vasos sanguíneos, hígado, riñón, bazo, corazón y otros órganos, variando su concentración de acuerdo a la especie animal de que se trate (10, 17, 22, 30). Las células cebadas y los basófilos poseen gránulos citoplásmicos formados por un complejo heparina, histamina e iones Zinc, y en algunas especies 5 hidroxitriptamina y/o serotonina, las plaquetas y leucocitos de conejo también poseen histamina (5, 6, 7, 9, 30). En el perro el principal mediador químico comprobado de reacciones anafilácticas es la histamina que proviene de la descarboxilación de la histidina por la enzima descarboxilasa de histidina en las células cebadas. Es una amina de gran actividad farmacológica que

dilata los capilares sanguíneos aumentando su permeabilidad y produce con tracción del músculo liso (cuadro 3) (10, 30).

La reacción anafiláctica mediada por Ac circulantes, también - puede producirse transfiriendo Ac de un animal sensibilizado a uno no sen sibilizado. Es necesario un cierto período entre la transferencia de sue ro y el inicio de la reacción en el organismo. Esto es debido a que los Ac tienen que unirse a las células cebadas y basófilos, proceso que requie re de aproximadamente 30 minutos (10, 17, 30).

LAS SUBSTANCIAS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVAS LIBERADAS DURANTE LA REACCION

ANAFILACTICA SON:

| NOMBRE | FORMULA | ACTIVIDAD |
|---|---|--|
| HISTAMINA |  | Incrementa la permeabilidad vascular. |
| HEPARINA |  | Anticoagulante. |
| KININAS | Pequeños péptidos | Incrementan la permeabilidad vascular y causan dolor. |
| SEROTONINA |  | Principal mediador anafiláctico en roedores. |
| SRS-A (Slow reactin subtances anaphylaxis). | ? | Producen una muy lenta contracción y muy lenta relajación del músculo los antihistamínicos no son útiles contra estas sustancias y causan dolor. |

Ref - 44

CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ANAFILAXIA AGUDA EN EL PERRO

| | |
|--------------------------------------|--|
| Tiempo aproximado del comienzo: | 10 Segundos |
| Muerte: | 1 Hora |
| Mediador principal: | Histamina |
| Organo o Tejido principal de choque: | Venas Hepáticas |
| Signos: | Vómito, diarrea, hipotermia, disnea, colapso, convulsiones, muerte. |

MATERIAL Y METODOS

a) Animales experimentales.-

Los animales usados en el experimento se seleccionaron con base en la ausencia de Ac circulantes a rabia, como se señala en la monografía No. 23 de la OMS por el Comité de Expertos en la Rabia. Siguiendo este criterio se seleccionaron 5 perros raza Beagle, machos adultos, con una edad promedio de 4 años y un peso promedio de 13 Kg, en buen estado de salud, los cuales fueron identificados por medio de tatuaje en el pabellón de la oreja derecha con los números: 09, 13, 71, 73 y 75.

Para las pruebas de Sueroneutralización (SNT) se emplearon ratones de la raza Albino Suizo de 21 días de edad y procedentes del Bioterio del I.N.I.P.

b) Biológico empleado.-

Se utilizó la vacuna V-319/Acatlán. La cepa fue aislada de un vampiro Desmodus rotundus que fue capturado en el rancho San Ricardo, localizado a tres kilómetros al suroeste de la Estación San Vicente, Municipio de Acatlán de Pérez Figueroa, Oaxaca. El vampiro fue capturado en una red colocada alrededor de un corral donde se encontraban bovinos mordidos por dichos quirópteros, el vampiro murió cuando era trasladado al I.N.I.P. y se congeló a -30 C; tres días después se efectuó el examen de su cerebro y glándulas salivales por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa (42), encontrándose estos órganos positivos a rabia.

Esta cepa fue adaptada a cultivos celulares mediante 5 pases en células de embrión de vampiro; posteriormente se le dieron 5 pases en células BHK21 tomándose de este último pase una placa; la número 476, para purificar el virus; después se dieron 3 pases más en estas mismas células donde se alcanzó un título de 10^9 UFP ml (unidades formadoras de placa) (11,12).

Esta cepa se utiliza actualmente para producir la vacuna antirrábica V-319 elaborada en PRONABIVE.

La vacuna empleada en este trabajo pertenece al lote 75-6, su presentación es un frasco ampula de 5 dosis, por lo cual se reconstituyó con 10 ml.

c) Metodología de Trabajo.-

A los 5 perros se les hicieron vacunaciones y sangrados cada 30 días durante un lapso de 10 meses. Para el sangrado se utilizó la vena radio cubital, obteniendo 10 ml de sangre cada mes por animal.

Inmediatamente después se determinaron: frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura, posteriormente se inoculó a cada animal 2 ml de la vacuna V-319/Acatlán lote 75-6, usándose los músculos crurales para su aplicación (50). En seguida se volvieron a determinar las constantes fisiológicas mencionadas anteriormente, siguiendo a esto un período de observación posvacunal de 2 horas para detectar posibles reacciones indeseables (15).

Las muestras de sangre de cada animal se dejaron a temperatura ambiente y una vez ocurrida la retracción del coágulo, se obtuvo el suero centrifugándolo a 1,500 G durante 10 min. Los sueros se envasaron en tubos de plástico, se inactivaron a 56°C por 30 min. y se almacenaron a -20°C para su posterior estudio por la técnica de sueroneutralización en ratón albinos suizo de 21 días (42).

Para la prueba de SNT* se hacen diluciones de los sueros problema, enfrentándose a una cantidad constante de virus (42).

La SNT consta básicamente de tres pasos a seguir:

* Sueroneutralización

1.- Preparación y titulación del virus de desaffo CVS (challenge virus strain). Este virus originalmente es distribuido mundialmente por el Instituto Wistar de Filadelfia. Se debe conservar después de su titulación en una suspensión al 20% en ampollitas de 1 ml a -70°C , cuando se realiza la prueba se descongela rápidamente una ampollita y se hacen diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} utilizando como diluyente BAPS (Solución de albumina fosfatada con antibióticos) el título se calcula por el método de Reed and Muench - (47).

2.- Obtención y dilución inicial del suero, confrontación del suero con el virus, e inoculación de ratones.

Los sueros problema una vez inactivados e identificados se diluyen en forma decreciente de la siguiente manera:

| | | | | |
|------------------|-----|------|------|-------------|
| Diluyente | 0.6 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| Suero | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Dilución inicial | 2.5 | 12.5 | 62.5 | 312.5 |
| C V S | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| Dilución final | 5 | 25 | 125 | 625 X 5 = N |

Cuando se prepara la dilución del suero con el diluyente, la mezcla se hace cambiando la pipeta en cada dilución.

En la infección con el virus se debe poner la dilución donde se encuentren de 50 - 300 DL 50% (26, 41).

Se incluye un suero de referencia (Instituto Butantan Brasil) - que nos indica que el virus de desaffo es virus rábico y es la causa de la muerte de los ratones (41).

Se deberán incluir en la prueba diluciones del virus de desafío de 10^{-5} a 10^{-8} incubadas unas a 4°C y otras a 37°C , las primeras para saber el título del CVS el día de la prueba y las segundas para saber el título después de haber sido incubados conjuntamente con los sueros problema (25, 26, 41).

Inmediatamente después de infectar todas las diluciones de los sueros se incuban a 37°C con agitación durante 90 minutos.

Posteriormente se sacan de incubar, se colocan en un recipiente con hielo y se procede a inocular lotes de 6-10 ratones por dilución con .03 ml intracerebralmente (25, 26, 41).

3.- Interpretación de resultados.-

Una vez inoculados los ratones se anotan los resultados en formas especiales, anotando el número de animales vivos y muertos durante 21 días posteriores a la inoculación, debiendo descartarse a los ratones que mueren durante los primeros tres días por considerarlo traumatismo a la inoculación, una vez hecho esto, los resultados se calculan por el método de Reed and Muench (26, 47).

RESULTADOS

Se estableció que a cero días del experimento mediante SNT en ratón de 21 días (26) los cinco perros estaban libres de antecedentes vacunales a rabia por dar un título menor a 1:5.

La sangre dejada al medio ambiente presentó retracción del coágulo, lo que indicó la presencia de una coagulación normal, obteniéndose 5 ml de suero por cada perro en cada sangrado.

La cantidad de la proteína presente en la vacuna y susceptible de provocar choque anafiláctico en el perro, fue de 0.1083% (10 mg por cada 100 ml), determinada por el método de micro Kjeldal.

Los resultados de las observaciones clínicas indicaron que los animales se mantuvieron dentro de los límites normales como se observa en el cuadro 1 y en las gráficas I, II, III, IV, V y VI.

El título de la vacuna usada V319/Acatlán fue de $10^{7.3}$ UFP, con tenido envasado en un frasco de 5 dosis por lo que cada animal fue inmunizado con 4×10^6 UFP contenidas en 2 ml, confirmándose el título por inoculación en ratones lactantes (26).

El título de los Ac en todos los sueros, determinado por medio de la prueba de SNT fue siempre en aumento como se aprecia en el cuadro 2.

CUADRO 1. PROMEDIOS DE LAS CONSTANTES FISIOLÓGICAS DE PERROS ANTES Y DESPUES DE VACUNAR (10 DOSIS DURANTE 10 MESES UNA CADA MES).

| TATUA JE | TEMPERATURA | | FRECUENCIA CARDIACA | | FRECUENCIA RESPIRATORIA | |
|-------------|-------------|---------|---------------------|---------|-------------------------|---------|
| | ANTES | DESPUES | ANTES | DESPUES | ANTES | DESPUES |
| 09 | 38.3 | 38.3 | 89 | 93 | 23 | 21 |
| 13 | 38.5 | 38.2 | 101 | 100 | 24 | 25 |
| 71 | 38.5 | 38.6 | 108 | 109 | 31 | 34 |
| 73 | 38.6 | 38.6 | 112 | 112 | 21 | 24 |
| 75 | 38.6 | 38.7 | 97 | 100 | 23 | 24 |

Temperatura normal: 37.5 - 39.0 (ref. 16, 38)

Frecuencia Cardíaca normal: 80 - 120 (ref. 16, 38).

Frecuencia respiratoria normal: 15 - 30 (ref. 16, 38).

CUADRO 2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SUERONEUTRALIZACION EN RATON DE 21 DIAS DE SUEROS DE PERROS INOCULADOS CON VACUNA V-319/ACATLAN DURANTE 10 MESES APLICANDO UNA DOSIS POR MES.

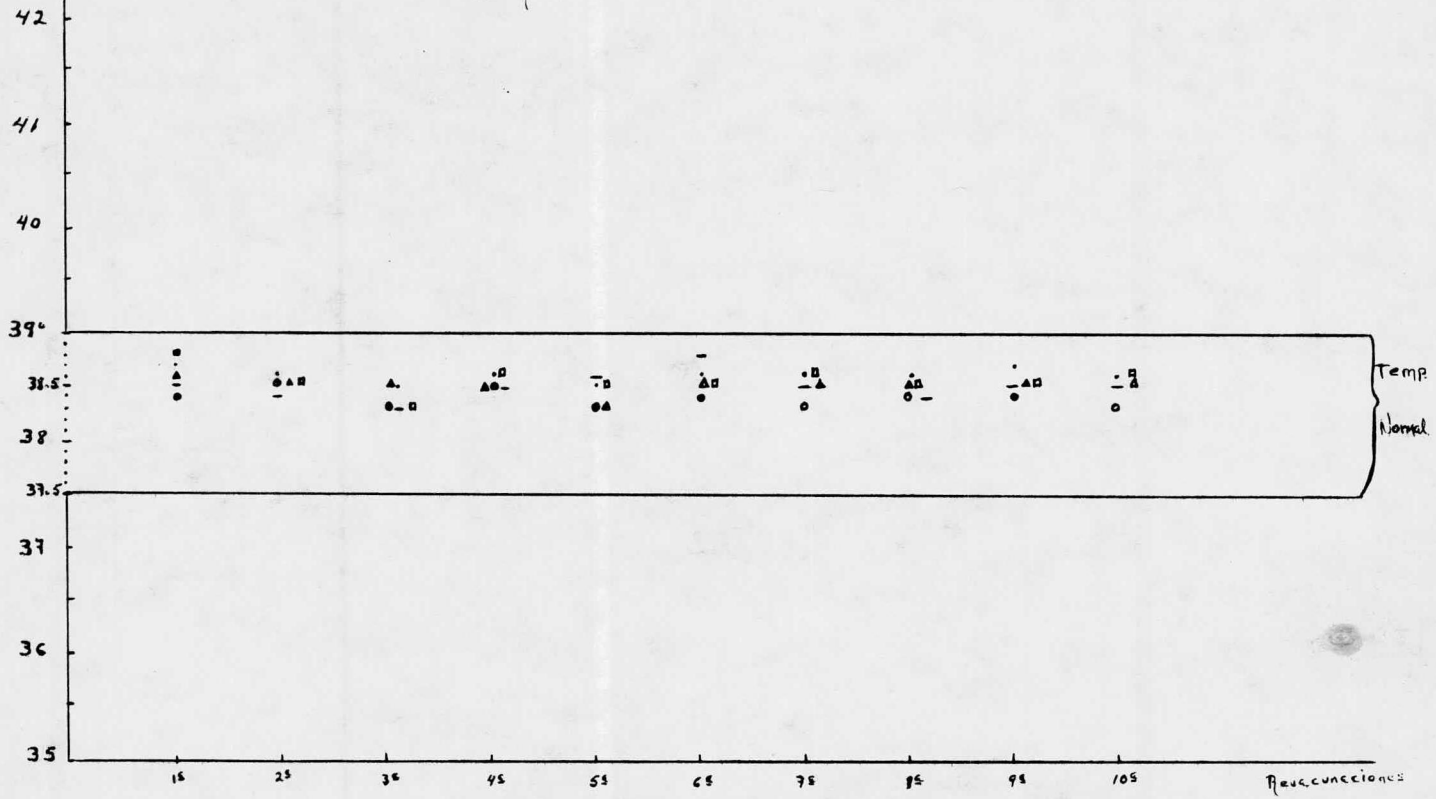
| TATUAJE | 0 DIAS | MES 1 | MES 2 | MES 3 | MES 4 | MES 5 | MES 6 | MES 7 | MES 8 | MES 9 | MES 10 | 4 MESES DESPUES |
|---------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| 09 | < 5 | > 2.09 | > 4.19 | > 4.48 | 5.18 | > 5.50 | 6.29 | > 7.69 | > 8.39 | > 8.6 | 9.05 | 9.05 |
| 13 | < 5 | > 2.09 | > 4.19 | > 3.99 | 4.68 | > 5.02 | 5.72 | > 6.43 | > 7.11 | > 7.81 | 7.82 | 7.82 |
| 71 | < 5 | > 2.09 | > 4.19 | > 4.41 | 5.11 | > 5.16 | 5.86 | > 6.55 | > 7.25 | > 7.86 | 7.9 | 7.9 |
| 73 | < 5 | > 2.09 | > 4.19 | > 4.69 | 5.39 | > 5.39 | 5.62 | > 6.32 | > 7.02 | > 7.72 | 9.05 | 9.05 |
| 75 | < 5 | > 2.09 | > 4.19 | > 4.78 | 5.48 | > 5.48 | 5.69 | > 6.39 | > 7.09 | > 7.39 | 7.6 | 7.6 |

Lease como Logaritmo base 10

Temp.
°C

Gráfica I

CURVA de TEMPERATURAS ANTES de VACUNAR



- - 09
- - 13
- ▲ - 71
- - 73
- - 75

Normal 37.5 - 39.0 °C

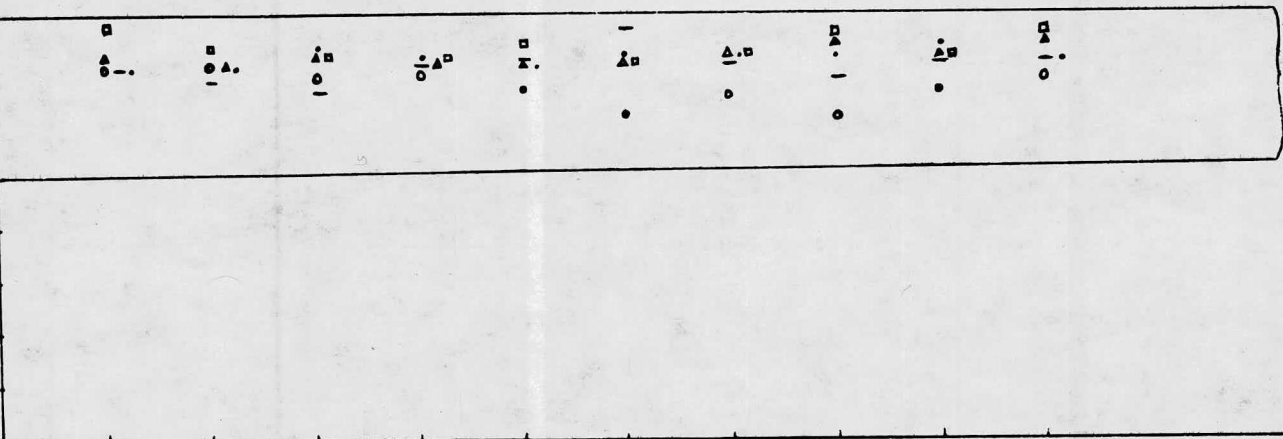
Ref. 16, 38

Temp
°C

Gráfica II

CURVA de TEMPERATURAS DESPUES de VACUNAR

42
41
40
39
38.5
38
37.5
37
36
35



- - 09
- - 13
- △ - 71
- - 73
- - 75

Normal: 37.5 - 39.0 °C

Ref. 16, 38

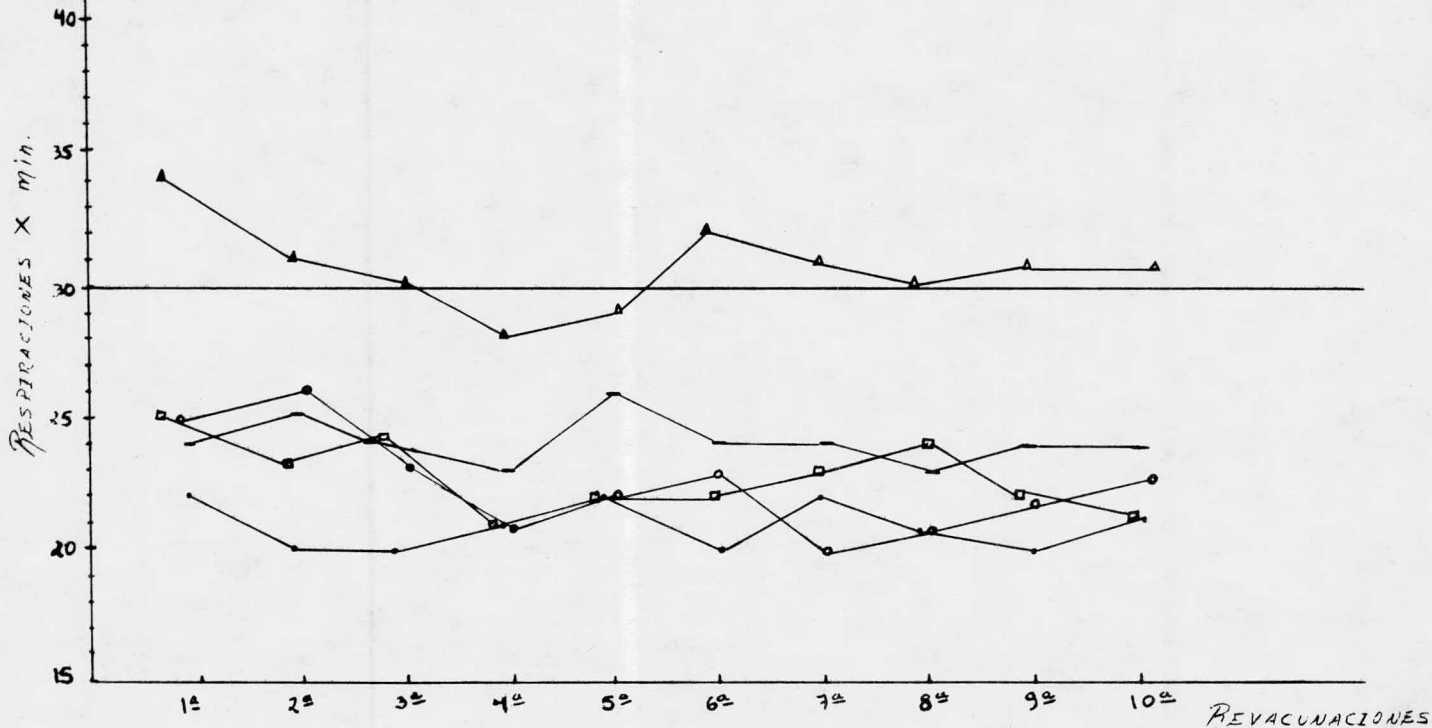
Revacunaciones

Frecuencia Respiratoria

Grafica III

CURVA de FRECUENCIAS RESPIRATORIAS
ANTES de VACUNAR

- o - 09
- - 13
- Δ - 71
- - 73
- - 75



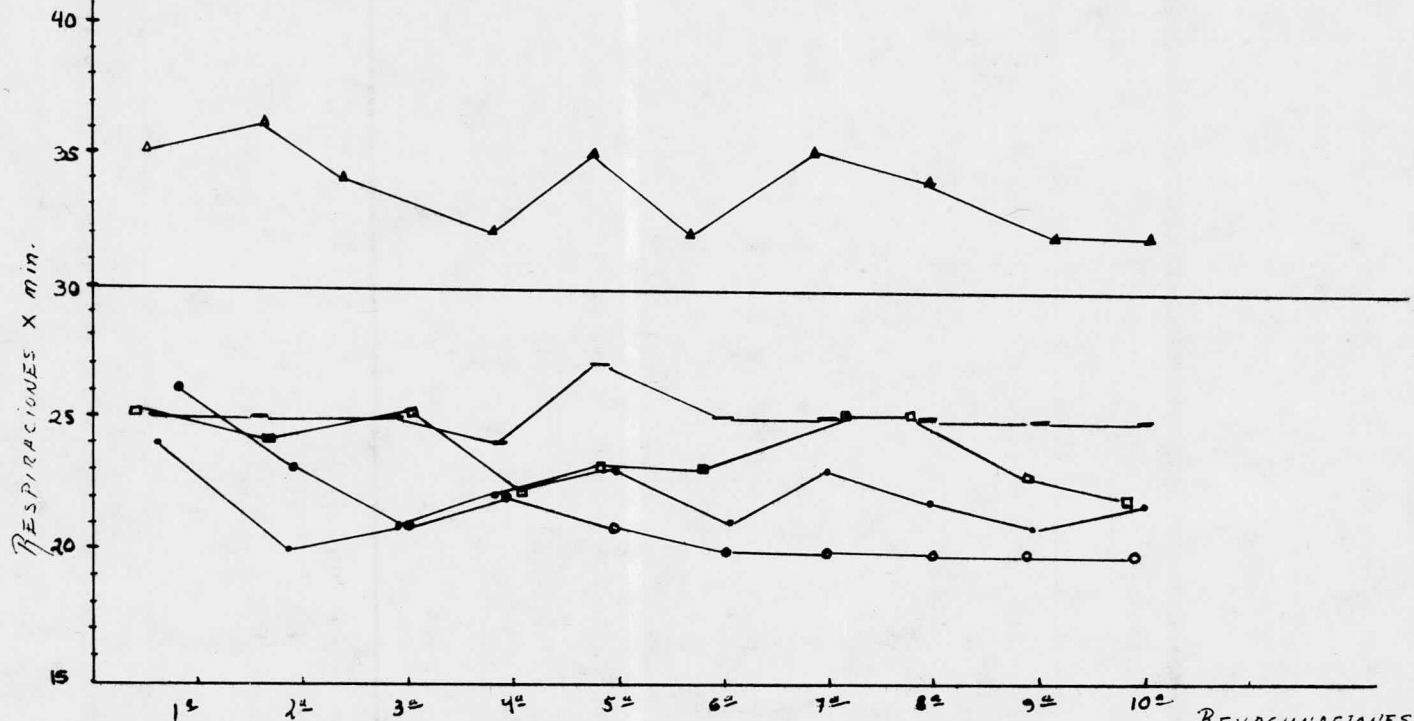
NORMAL: 15-30 Ref. 16, 38

Frecuencia Respiratoria

Grafica IV

CURVA de FRECUENCIAS RESPIRATORIAS DESPUES de VACUNAR

- o - 09
- - 13
- △ - 71
- - 73
- - 75



NORMAL: 15 - 30

Ref. 16, 38

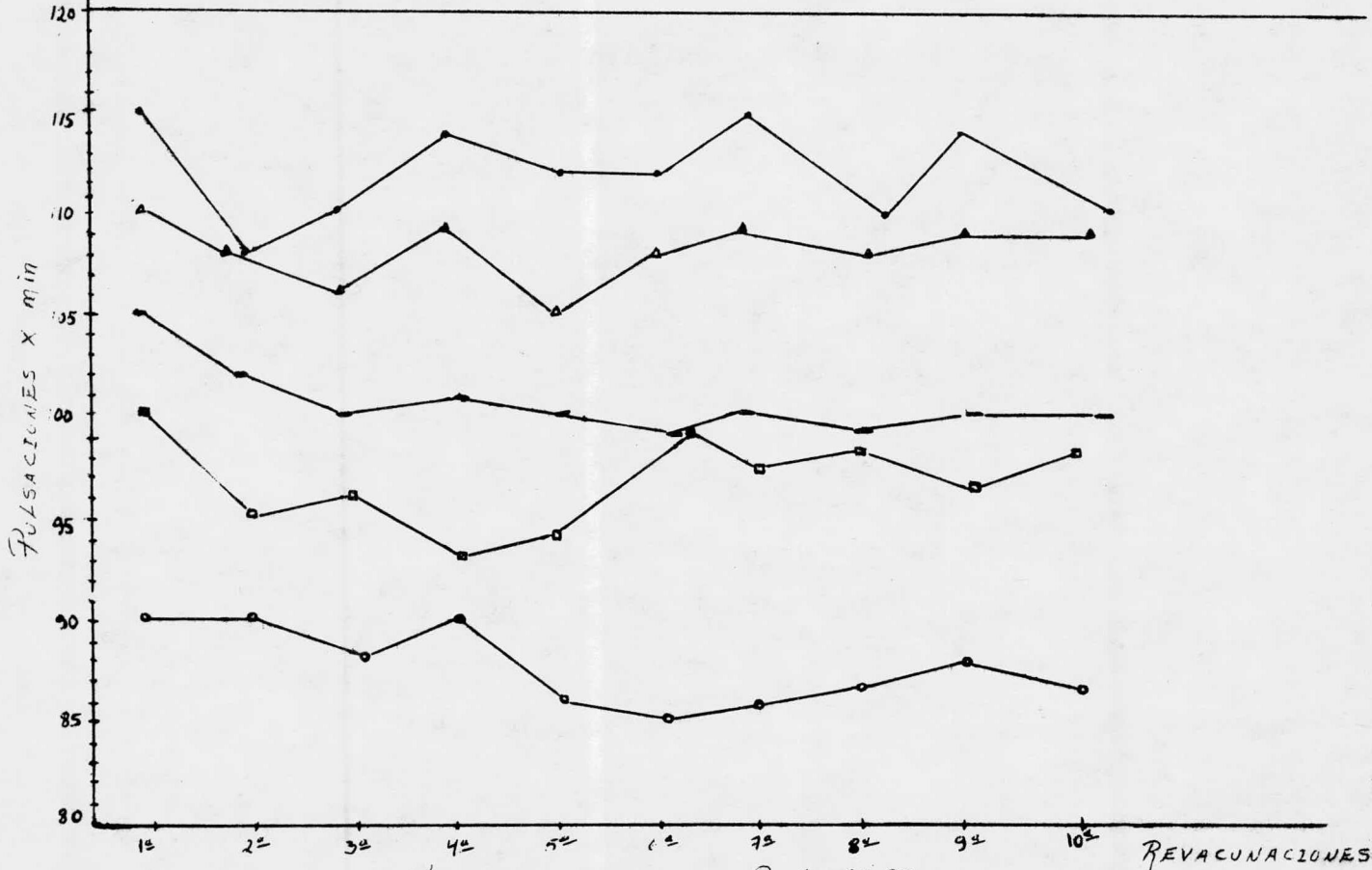
REVACUNACIONES

Frecuencia Cardíaca

Grafica V

CURVA de FRECUENCIAS CARDÍACAS
ANTES de VACUNAR

○ - 05
- - 13
△ - 71
● - 73
□ - 75



NORMAL: 80-120

Ref 16,38

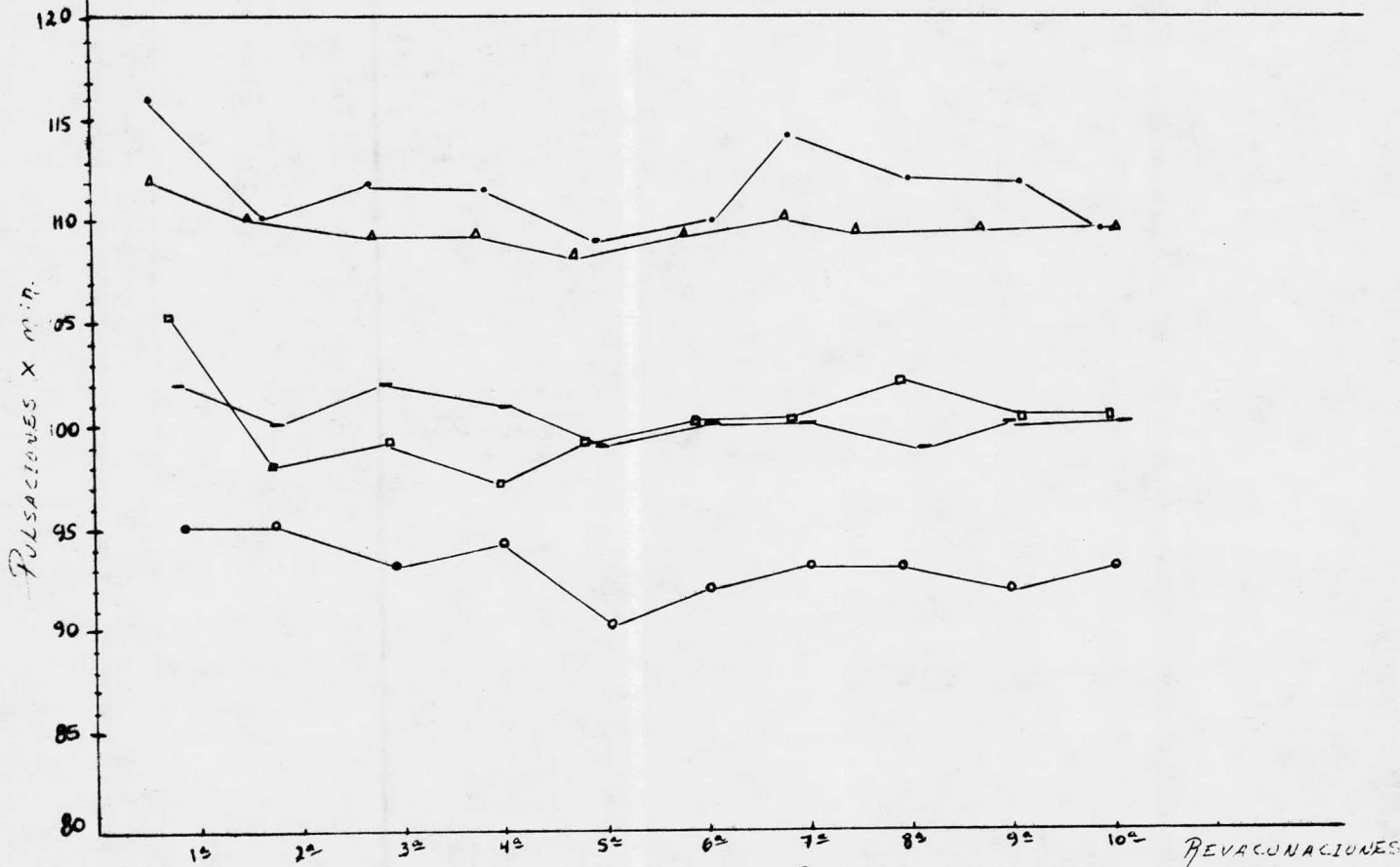
REVACUNACIONES

Frecuencia
cardíaca

Grafica VI

CURVA DE FRECUENCIAS CARDIACAS DESPUES DE VACUNAR

o - 09
- - 13
Δ - 71
· - 73
□ - 75



NORMAL: 80-120

Ref. 16, 38

REVACUNACIONES

DISCUSION

Los animales utilizados a lo largo del experimento sobrevivieron hasta su conclusión y aún mucho tiempo después, sin presentar ningún cambio de conducta que pudiera considerarse patológica o alteración aparente.

Por otra parte era de esperarse que los animales tuvieran alguna alteración aparente a lo largo de la prueba debido al contenido de proteínas extrañas al perro en la vacuna V 319/Acatlán, esto aunado al hecho de que la vacuna fue elaborada originalmente para bovinos. Se demostró que la cantidad de proteína presente en la vacuna al aplicarse intramuscularmente en dosis repetitivas cada treinta días no indujo reacciones anafilácticas ni tampoco otras indeseables en perros, llegando los animales utilizados en el experimento al final de la prueba en buenas condiciones de salud y manteniendo dicha condición hasta su desecho.

Los resultados obtenidos confirman las observaciones de otros investigadores en el sentido de que las vacunas preparadas en cultivo de tejidos ofrecen menos riesgos de encontrar efectos indeseables para la salud de los animales; esto es bien sabido por lo clínicos que hayan hecho la comparación entre vacunas en cultivo celular y vacunas en embrión de pollo (1, 8, 4, 39).

El período de observación directa, seguido a la vacunación repetitiva no demostró ninguna alteración aparente en la conducta de los animales después de 2 horas de observación. La determinación de las constantes fisiológicas a lo largo de 10 meses de la prueba, caen dentro de los márgenes normales, si bien, se observa taquicardia y polipnea en algunos de los animales, esta puede ser atribuida a la resistencia que presentaban los animales al manejo, misma que aumentaba conforme se avanzaba en el calendario de vacunaciones y repercutía en los valores de sus constantes fisiológicas (15, 39).

Es de hacer notar que la sangre obtenida cada mes no presentaba alteraciones en el mecanismo fisiológico de la coagulación, comprobado por la buena retracción de coágulo una vez que los tubos se colocaban a temperatura ambiente, lo que alejo aún más las sospechas de manifestaciones que hicieran pensar en una posible reacción anafiláctica.

Es interesante observar el creciente aumento cuantitativo de los Ac a lo largo de las 10 inoculaciones que recibió cada perro y, que este aumento se conservó aún después de 4 meses de la última vacunación como se puede apreciar en el cuadro 2, notamos que los títulos de los anticuerpos se elevan de tal manera que pueden considerarse hiperimmune, lo que contradice un poco las observaciones de Bijlenga y Hernández (12) en el sentido de que los anticuerpos circulantes de becerros de vacas vacunadas contra la rabia interferían con la vacunación. En el caso de este trabajo, la inmunidad activamente adquirida por vacunaciones previas no interfirió con el virus vacunal, sino que este causó la elevación de la tasa de anticuerpos circulantes hasta los niveles expresados en el cuadro 2. Esta es una observación particularmente útil en virtud de la recomendación que se hace en México de revacunar anualmente a los perros.

Siempre queda la duda de si una vacuna protege durante más de un año pueda interferir con la revacunación. Dadas las observaciones que aquí se presentan resultan claro que este no es el caso; Camargo y Ramírez Valenzuela en los 50's aproximadamente, observaron choque anafiláctico severo en ganado bovino en Nayarit consecuente a la revacunación mensual usando la cepa Flury*.

El porque de un aumento tan elevado de anticuerpos circulantes podría atribuir a una replicación viral más rápida que la multiplicación de inmunoglobulinas, por lo que esta va siempre en aumento debido a creciente estímulo antigénico.

* Comunicación Personal de Ramírez Valenzuela.

CONCLUSIONES

- 1.- La vacuna V-319/Acatlán, no produjo choque anafiláctico durante 10 inoculaciones repetidas una cada mes.
- 2.- El título de los anticuerpos fue creciente a lo largo de la prueba.
- 3.- La vacuna V-319/Acatlán preparada en cultivos celulares es un biológico confiable, que no provoca reacciones alérgicas en perros.

- 1.- Abelseth, M. K.: Vacunas antirrábicas producidas en cultivo de tejidos. *Memorias del 1er. Seminario Internacional sobre la rabia para las Américas*. B. Aires, Argentina, 1967.
- 2.- Atanasiu, P.: El virus de la rabia. *Salud Pública en México*, Vol.-XVI-3:345 (1974).
- 3.- Atanasiu, P.: Patogenia de la rabia. *Salud Pública en México*. Vol. XVI-3:357 (1974).
- 4.- Atanasiu, P.: Consideraciones sobre los nuevos tipos de vacunas antirrábicas. *Salud Pública en México*, Vol. XVI-3:437 (1974).
- 5.- Ackasu, A. and Westt, G. B.: Anaphylaxis in the dog. *Int. Arch. - Allerg.* 16: 326, 1960.
- 6.- Auer, J. and Lewis, P. A.: The physiology of the immediate reaction of the anaphylaxis in the guinea pig. *J. Exp. Med.* 12:151, 1912.
- 7.- Auer, J. and Lewis, P. A. : Letal cardiac anaphylaxis in the rabbit. *J. Exp. Med.* 14: 476, 1911.
- 8.- Arellano, S. C.; Sureau, P.; Batalla, D. and Morales, J.: Evaluación de la eficacia de la vacuna cepa Flury, contra la rabia parálitica. *Tec. Pec. en Méx.*, 19:9-14 (1971).
- 9.- Austen, F.K.: Histamine and other mediators of allergic reactions. *Immunological diseases*, Samter, W. Ed. Blackwell Scientific Publ. 2a. ed. 1972.
- 10.- Bellanti, J. A.: *Inmunología clínica*. Ed. W. B. Saunders Co., 2a. Ed. 1971.
- 11.- Bijlenga, G., E. M. Hernández B.: Adaptation, Attenuation and plaque purification of a rabies Isolate (V319) from a vampire bat - (Desmodus rotundus). *Cornell Vet. J.* (1981).
- 12.- Bijlenga G. and E. M. Hernández B.: Testing of the vaccine potential of the plaque purified rabies virus strain V-319 derived from a vampire bat Desmodus rotundus in Mexico. *Cornell Vet. J.* en prensa.

- 13.- Blood, D., Henderson, J. A.: Medicina Veterinaria 3a. ed. Ed. Interamericana. México, D. F., 1968.
- 14.- Boletín Epizootiologico sobre la rabia paralítica. Vol. I:2 INIP-SAG (1975).
- 15.- Burkhart, R. L., Jervis, G. A. and Koprowski, H.: Postvaccinal paralysis and demyelination in dog following antirabies vaccination. *vet. Med.* 45:31 (1950).
- 16.- Cabrera, V. M.: Guía para el estudio de los medios de investigación clínica en los animales. *Apuntes impresos*, 3a. ed., 1972.
- 17.- Carpenter, Philip L.: *Immunology and serology*, 3a. ed. Ed. Philadelphia Saunders, 1972.
- 18.- Correa, G., E.P., Allen, R. and Sulkin, S.E.: The infectivity and pathogenesis of rabies virus administered orally. *Am. J. Epidemiology* 91 (2); 203 (1970).
- 19.- De la Cruz Islas, H.: Analisis comparativo de mil historias clínicas de animales afectados de rabia y animales sospechosos (bovinos y perros) Tesis FMVZ-UNAM, México, D. F., 1973.
- 20.- Fenner, F., McAuslan, B. R., Mims, C.A., Sambrook, J.: *The Biology of animal viruses*. 2a. ed., Ed. Academic Press, 1974.
- 21.- Fuenzalida, E.: Vacuna de cerebro de ratón lactante. *Técnicas de laboratorio en rabia*, OMS Geneva, 3a. ed., 1976.
- 22.- Fundenberg, H. H.: *Inmunología clínica*. Ed. El Manual Moderno, 1a. ed., México, D. F., 1978.
- 23.- Gómez Hernández, J. H.: Inocuidad y respuesta serológica a la vacunación antirrábica con la vacuna V-319. Tesis F.M.V.Z.-U.N.A.M., 1977.
- 24.- González, V. D.: Respuesta serológica a la vacunación antirrábica en cachorros beagle de diferentes edades procedentes de madres vacunadas y no vacunadas. Tesis FMVZ-UNAM, 1976.

- 25.- Habel, K.: Vacunas antirrábicas. Memorias del Ier. Seminario Internacional sobre rabia para las Américas. B. Aires, Argentina, 1967.
- 26.- Evaluation of a mouse test for the standarization of the immunizing power of antirrabies vaccines. Publ. Hlth. Rep. 55: 1473-1487, 1940.
- 27.- Hernández, E. M.: Boletín sobre rabia paralítica. Marzo de 1976, INIP-SAG.
- 28.- Hutyra, F., Mareck, J y Ma-ninger, R.: Patología y Terapéuticas especiales de los animales dom. 11a. ed. Ed. Labor, México, D. F.
- 29.- Horsfall and Tamm: Viral and Rickettsial infections of Man. 4a. ed., Ed. J. B. Lippincott, N. Y.
- 30.- Ishizaka, K.: Anaphylaxis, Immunological diseases. Samter, W., Ed. - Blackwell Scientific Public, 2a. ed. 1972.
- 31.- Johnson, N. H.: The rabies virus. Ed. Lippincott, J. B., 4a. ed. 1965.
- 32.- Kaeberle, M. L.: Newer tools for the prevention of rabies in domestic animals. ANN. N. Y. Acad. Sci. 70 art. 3:467-479, 1958.
- 33.- Kesler, R. A.: Cloroform treats rabies vaccine (preliminary report) vet. Bull. 22:95 (1928).
- 34.- Kissling, R. E.: Growt of rabies virus in non nervous tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 98-233, 1958.
- 35.- Koprowski, H. and J. Black: Studies on chick embryo adapted rabies virus II: Patogenicity for dogs and use of egg adapted strain for vaccination purpose. J. Immunol. 64:185, 1950.
- 36.- Koprowski, H. and Cox, H. R.: Studies on chick embryo adapted rabies virus. J. Immunolog. 60: 533, 1948.
- 37.- Koprowski, H.: Chicken embryo vaccine. Tec. de Lab. en rabia, 3a. ed. 1973. Geneva, OMS.

- 38.- Kolbe, E.: Fisiología veterinara, 2a. ed. 1979. Ed. Acribia, Barcelona, España.
- 39.- Larghi, O. P.: Vacunas antirrábicas. Memorias del Seminario Nal. sobre rabia. Medellín, Colombia. Julio 26 - 29 (1967).
- 40.- Lepine, P.: Fermi Type vaccine. Técnicas de laboratorio en rabia, - 3a. ed. Geneva, Ed. OMS, 1975.
- 41.- Málaga, Alba: Epidemiología de la rabia en las Américas. Curso teórico práctico sobre laboratorio y epidemiología de la rabia. OMS OPS, B. Aires, Argentina, 1965.
- 42.- OMS: La rabia. Técnicas de laboratorio en rabia, 3a. ed. Geneva, 1976
- 43.- Pérez, H., González, D., Fernández, M., Hernández, E.: Inmunidad provocada por la cepa V-319/Acatlán en perros a los 30 meses de la vacunación. Tec. Pec. Méx., No. 41 Julio-Diciembre, 1981.
- 44.- Rakoff, H., Rose, N.: Química Orgánica Fundamental, 1a. ed., 1971. Ed. Limusa, Wiley, 1971.
- 45.- Resúmenes de la X Reunión Anual del I.N.I.P. Tec. Pec. Méx., 21:50 (1972).
- 46.- Resúmenes de la XIII Reunión Anual del I.N.I.P. Tec. Pec. Méx., 30: 104 (1976).
- 47.- Reed and Muench: A simple method of estimating fifty percent point. Am. J. of Hygiene. 27:3 (1936).
- 48.- Saligman, B.: Simple type vaccine. Tec. Lab. en rabia OMS, 3a. ed., 1976.
- 49.- Sagardia, J.: Duración de la Inmunidad conferida por la vacuna V-319 contra la rabia con desafío a un año. Tesis Prof. FMVZ-UNAM.
- 50.- I Seminario Nal. sobre Rabia. Caracas, Venezuela, 5-9 Junio, 1972.
- 51.- Steel, H. J.: Nuevos conceptos sobre epidemiología y control de la rabia. Memorias del 1er. seminario Internacional sobre la rabia para las Américas. B. Aires, Argentina, 1967.

52.- Smith, D., Connant, N. y Willet, H.: Microbiologia de Zinnsser, 4a.
ed. Ed. UTHEA, 1974, México, D. F.

53.- World Health Organization (1974) WHO. Chronicle I-vol 28-16-24 Geneva.

