



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

INOCUIDAD Y RESPUESTA ANTIGENICA DE
LA VACUNA ANTIRRABICA V-319 EN PERROS.

T E S I S

Que para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista

p r e s e n t a :

HUMBERTO JORGE GOMEZ HERNANDEZ

México, D. F.

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A MIS PADRES:

**MEDICO VETERINARIO HUMBERTO GOMEZ ESCAMILLA
Y SRA. EVANGELINA HERNANDEZ DE GOMEZ**

CON MI CARÍO.

A MI ESPOSA:

**SRA. YOLANDA FABELA DE GOMEZ
Y A MI HIJO HUMBERTO**

CON TODO MI AMOR.

A MIS ASESORES:

**DR. ELISEO HERNANDEZ B.
Y DR. J. MANUEL BERRUECOS V.**

**GRACIAS POR LA DIRECCION DE
ESTA TESIS.**

A MIS MAESTROS:

**GRACIAS POR LAS ENSEÑANZAS
RECIBIDAS EN LAS AULAS DE -
NUESTRA QUERIDA ESCUELA.**

IV

DOY LAS MAS SINCERAS GRACIAS AL PERSONAL TECNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACION - SOBRE RABIA PARALITICA DEL I. N. I. F. POR SU AYUDA Y ORIENTACION PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO .

TAMBIEN LAS GRACIAS AL PERSONAL TECNICO- DEL CENTRO ANTIRRABICO DE LA CD. DE TOLUCA POR SU COLABORACION A ESTE TRABAJO .

GRACIAS

CONTENIDO .

INTRODUCCION	Págs. 1
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	22
DISCUSION	27
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31

CONTENIDO .

INTRODUCCION	Págs. 1
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	22
DISCUSION	27
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31

INTRODUCCION

Definición.- La rabia es una enfermedad, aguda y contagiosa, de etiología viral que afecta al Sistema Nervioso Central (9). Se presenta en diversas especies de mamíferos domésticos y silvestres y en otros animales de sangre caliente (11). En perros y gatos, la forma más común de transmisión es por la mordedura de un animal enfermo a uno sano, y en ganado bovino - por la mordedura del quiróptero hematófago (Desmodus rotundus). En caninos, clínicamente se manifiesta por trastornos locomotores y de conducta tales como irritabilidad, agresividad, aullidos roncós, parálisis y tendencia a perseguir objetos en movimiento (6).

La evolución de la enfermedad y los signos que se presentan pueden depender en cierta medida, del origen del virus, pues se ha visto, que el procedente de la mordedura de los vampiros, determina casi siempre la forma paralítica de la enfermedad en los bovinos; por otra parte, el virus fijo, o sea el modificado - por una serie de pases intracerebrales por ejemplo, CVS determina la parálisis ascendente (6) mientras que el tipo de virus - de "calle", sus efectos en perros son casi siempre la forma furiosa de la enfermedad (6).

La primera referencia histórica de la rabia, se encuentra en el Pre-mosaico de Eshunna, mejor conocido como el Código de Hammurabi en Babilonia y escrito en el Siglo XXIII A. C. Aristoteles también describió la enfermedad 322 años A.C. (10).

No fue sino hasta finales de 1822, cuando Pasteur trató de reproducir la enfermedad y realizó el siguiente experimento: Utilizó un perro rabioso, el cual introdujo en una jaula con 4 perros sanos con el fin de que éstos fueran mordidos y dió como resultado que 6 semanas después, 2 perros murieron afectados por la rabia y los otros 2 no sufrieron el menor signo de la enfermedad; éstos resultados, fueron bastante irregulares.

Pasteur tuvo la idea de que "el virus de la rabia que penetra en las personas con la mordedura, se fija en el cerebro y en la médula espinal, puesto que los síntomas de la hidrofobia hacen suponer que este microbio que no podemos encontrar, ataca al sistema nervioso; ahí es donde tenemos que buscarlo". Había un inconveniente: que para poder cultivar el microbio, había que utilizar el cerebro de un animal vivo; y fue Roux, ayudante de Pasteur, quien hizo una trepanación en el cráneo de un perro sano y lo inoculó con una pequeña cantidad del cerebro macerado

de un perro recién muerto de rabia; 2 semanas más tarde, el -
perro mostraba los signos de la enfermedad y murió días después.
Pasteur contaba ahora con un procedimiento 100% seguro para ino
cular animales de laboratorio y así repetir la enfermedad en anio
males sanos.

La siguiente idea fue la de atenuar aquel microbio que -
no podía aislar. Uno de los perros inoculados con la "substan -
cia" procedente del cerebro virulento de un conejo, dejó de ma-
nifestar algunos signos de la enfermedad y milagrosamente se res-
tablecía; poco después, volvieron a inocular al perro que había -
sanado con una dosis más "virulenta", y Pasteur esperaba con -
ansiedad que el perro mostrara los primeros signos de la enfer-
medad; sin embargo, no se presentaron y durante meses, el pe-
rro siguió viviendo, siendo esta la primera inmunidad efectuada.

Pasteur seguía buscando la manera de atenuar el "virus"
y por fin encontró el procedimiento, que consistía en desecar o
bre hidróxido de potasio fragmentos de médula espinal de cone -
jos muertos de rabia, e inyectarlos en animales de laboratorio.
Aún existía la duda si realmente quedaban inmunizados y así, se
hizo una prueba definitiva, que consistió en inocular por vía in-
tracerebral a 2 perros vacunados y a 2 perros no vacunados, -

resultando que un mes después los perros vacunados seguían vivos y los no vacunados murieron por la enfermedad.

De los trabajos anteriores, se formó una "comisión" para comprobar los resultados obtenidos y después de rigurosos experimentos, la comisión dictaminó: "cuando un perro ha sido inmunizado con médulas espinales de virulencia gradualmente creciente de conejos muertos de rabia, no hay nada en el mundo capaz de producirle Hidrofobia".

Originalmente la idea de prevenir la rabia, fue para evitar la enfermedad en los humanos, dándolo como tratamiento a personas atacadas por perros o lobos rabiosos (13).

A pesar de que desde la época de Pasteur, se reconoce la necesidad de determinar el poder inmunizante de las vacunas antirrábicas y de que se han hecho desde entonces numerosos trabajos de experimentación con ese fin, la mayoría de los laboratorios que producen tales vacunas no han comenzado, sino hasta época reciente, a probar sus productos en forma sistemática. En consecuencia, cuando se contó con pruebas prácticas de potencia, muchos laboratorios se sorprendieron al comprobar que habían estado trabajando bajo un falso concepto de seguridad, ya

que las vacunas que por años habían estado distribuyendo, preparadas de acuerdo con métodos de producción bien establecidos, tenían en realidad poca o ninguna capacidad inmunizante (7).

En la actualidad, la rabia es un padecimiento enzoótico, que se encuentra presente en todas las entidades del país. El problema es de carácter silvestre y urbano, ello debido a que las concentraciones caninas, guardan estrecha relación con las grandes poblaciones humanas y es en este medio donde se favorecen el mecanismo de transmisión de perro a perro y la probabilidad de que se presente la infección en humanos.

No obstante que se cuenta con recursos técnicos adecuados para la prevención (vacuna) y control (centros antirrábicos) del padecimiento, estos recursos no son empleados oportunamente en la mayoría de los casos por razones de carácter socio-económico-cultural.

En nuestro país, de 1968 a 1972 se aplicaron 159,094 tratamientos completos a humanos, con un promedio anual de 31,818 personas (14). En el año de 1973, se recibieron 3,111 reportes de casos de rabia en animales y confirmados en laboratorio. De éstos corresponden el 81.4% a perros, 4.5% a gatos, y 14.4% a

otras especies (14).

Dado lo anterior se deduce que es conveniente realizar programas de vacunación para el control de la rabia, utilizando para ello vacunas apropiadas.

La primera vacuna comercial para perros fue desarrollada a principios de la tercera década de este siglo, por Umeno y Doi (1921) (16). Esta vacuna, fenolizada de cerebro de conejo, fue usada para el control de rabia en perros en el Japón y los Estados Unidos. Sin embargo, no fue sino hasta 1940 cuando Habel desarrolló una prueba de potencia para las vacunas tipo Simple (Habel 1949) (10). Johnson (1945) dió la primera contribución experimental para el conocimiento de la inmunidad en perros, durante un año después de una dosis de esta vacuna (16).

Koprowski y Cox en 1948 desarrollaron una vacuna a virus vivo modificado de origen de embrión de pollo (chick embryo origin-modified live virus) denominada CEO-MLV. Esta vacuna CEO tipo LEP (low egg passage) fue probada por Tierkel et al en 1953 (16). Estos autores, reportaron una duración de inmunidad hasta por 39 meses en perros adultos.

Este biológico fue el tipo de vacuna usada en los Estados Unidos, entre 1953 y 1965, durante este período los casos de rabia se redujeron de 5,688 casos confirmados, a sólo 412 (16) . Resultados similares con la vacuna CEO-LEP fueron obtenidos en otros países (16).

Kissling (1958) adaptó exitosamente un virus fijo de rabia en cultivos celulares en células primarias de riñón de hamster (16). Tras su éxito, varios laboratorios comerciales en Estados Unidos y Canadá desarrollaron diferentes tipos de vacunas en Cultivos celulares para su uso en animales domésticos (1). Fuezalida et al, y Sikes y Larghi, (1967) desarrollaron para su posible uso en animales y humanos dos vacunas de origen de cerebro de ratón lactante (16).

Las vacunas antirrábicas y los principios inmunológicos involucrados en su uso, son similares a las otras vacunas para inmunización contra agentes infecciosos.

Las vacunas son de 2 tipos diferentes:

- a) Vacunas de virus inactivado (muerto).
- b) Vacunas de virus vivo modificado (atenuado).

En las vacunas a virus inactivado (muerto) el antígeno se trata de varias formas para eliminar completamente la posibilidad de infectar o multiplicarse en cualquier tejido.

Como el virus no se multiplicará para producción de más antígeno, la cantidad de virus o masa antigénica en cada dosis de vacuna es de suma importancia. Por esta razón, se buscan materiales virulentos con títulos muy altos.

Una variedad de agentes químicos y físicos han sido empleados exitosamente en el proceso de inactivación y son:

Fenol

Beta proliolactona

Irradiación ultravioleta

Los puntos más importantes son:

- 1.- Uniformidad en la inactivación.
- 2.- Ausencia de residuos tóxicos.
- 3.- Preservación de la integridad antigénica de las proteínas virales.

Estas vacunas se utilizan principalmente en el hombre, -

para inmunización antes y después de la exposición y requiere de la aplicación de dosis múltiples (8).

Un ejemplo de las vacunas inactivadas es la vacuna que se utiliza actualmente en las campañas antirrábicas, la tipo fuenzalida, preparada en cerebro de ratón lactante en suspensión al 2.5% en agua bidestilada, estabilizada y preservada con fenol y etilmercurio tiosalizado e inactivada mediante irradiación ultravioleta. La dosis es de 2 ml., la cual se aplica por vía intramuscular en la región crural, de acuerdo a las técnicas ya conocidas. Esta vacuna se administra a animales mayores de 3 meses de edad en aparente buen estado de salud. Se recomienda conservarse entre 4 grados y 8 grados centígrados. Existe una importante limitación, en cuanto a la cantidad de vacuna producida, ya que sólo se pueden preparar lotes pequeños (14).

Hoy día, las investigaciones están dirigidas principalmente hacia el desarrollo de fuentes de virus más purificado para la producción de vacunas, con el objeto de reducir al mínimo las reacciones post-vacunales y preservar o aumentar al mismo tiempo su poder inmunizante. Para todas las vacunas, tanto atenuadas como inactivadas, se utiliza una cepa de virus que ha sido modificada desde su estado de virus de calle. La mayoría de hs

cepas que se usan en la producción de vacunas provienen de un virus que ha sufrido una serie de pasajes por inoculación intracerebral en animales de laboratorio.

El virus de rabia es atenuado por diversos métodos:

Desecado (vacuna Pasteur).

Por Pasaje en otro tipo de animal (vacuna Avianizada).

En cultivos celulares (vacuna Cepa V-319).

Las vacunas deben contener un tipo de virus capaz de multiplicarse en el huésped vacunado sin provocar enfermedad clínica o complicaciones.

Ventajas sobre las vacunas inactivadas (5):

- 1.- La dosis es generalmente más pequeña.
- 2.- Una sola dosis es suficiente.
- 3.- Confiere una inmunidad de larga duración.

La vacuna de virus vivo no produce reacciones adversas causadas por la vacunación (anafilaxia) bajo condiciones de campo, ni ocurren muertes por rabia; además, la respuesta serológica

gica del ganado vacunado, ha probado una buena protección inmunitante (5). Sólo una advertencia final sobre las vacunas de virus vivo: El virus debe tener una alta viabilidad en el momento de su aplicación en el campo (8).

La vacunación en animales tiene lugar, antes de la exposición y con vacunas vivas; por consiguiente, una dosis única es suficiente para generar inmunidad. El método para determinar el título de anticuerpos séricos es mediante la técnica de seroneutralización en placa y/o ratón, con muestras de sueros tomadas a determinados intervalos después de la última dosis de vacuna (8).

De las vacunas a virus vivo avianizadas se usó en un principio la vacuna antirrábica cepa Flury alto pasaje que resultó muy efectiva para la inmunización contra la rabia; sin embargo, en una evaluación crítica efectuada en 1968 por Arellano et al (2), se demostró que esta vacuna producida por laboratorios comerciales y oficiales, resultó ineficaz para proteger al ganado contra la rabia paralítica, ya que no protegió al 80% de los bovinos vacunados como se exige, variando la protección de un 28% a 70%, mientras que la vacuna de referencia protegió al 100% de los animales; al quedar demostrada la ineficacia del bio

lógico en cuestión, se hicieron recomendaciones para que fuera retirada del mercado (2).

Una de las vacunas usadas en México es la cepa ERA; ésta ha sido probada en Canadá por Abelseth en perros y bovinos y en México por Arellano y Sureau únicamente en bovinos, resultando ser muy efectiva para proteger al ganado a una exposición virulenta (desafío) 6 años después de la vacunación, con un 100% de protección (1), en pruebas realizadas en el Proyecto de Investigación sobre Rabia Parálitica (P.I.R.P.) del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. En el P.I.R.P., se aisló la cepa de virus de rabia denominada V-319 que se adaptó a cultivos celulares, la cual probó ser inocua para bovinos y caninos aplicada por vía intramuscular, pero patógena por vía intracerebral. En ratones lactantes y ratones de 21 días de edad, la cepa es patógena por vía intracerebral, menos patógena por vía intramuscular e inocua por vía intraperitoneal; además, en una limitada serie de pruebas en bovinos y caninos, la cepa no fue excretada por saliva en animales inoculados (Bijlenga y Zavala, 1972). Se concluyó que la cepa V-319 clona 476 debería ser investigada como cepa vacunal (4).

Después de la adaptación y purificación en placa de la ce

pa de origen de murciélago vampiro (V-319), se hicieron los siguientes estudios: 2 vacunas, una viva y otra inactivada, y fueron desarrolladas en cultivos celulares (5). La vacuna a virus vivo cepa V-319, así como la vacuna inactivada con beta-propionolactona preparada con la misma cepa, dieron 100% de protección, después de un año, al desafío con una cepa de exposición de origen de murciélago vampiro, mientras que el 71% de los animales testigos no vacunados, murieron de rabia.

La vacuna ERA tiene una patente internacional y por esta razón no se produce en México; sin embargo, se aplica con un precio por dosis demasiado alto, lo que la imposibilita para ser utilizada en campañas antirrábicas oficiales para el control de la enfermedad.

Por esta razón, y de acuerdo al plan de operaciones del P.I.R.P. del I.N.I.P., los investigadores encontraron una vacuna (cepa V-319), tan efectiva como la cepa ERA, la cual se produce en grandes cantidades con alta calidad y a bajo precio (4).

Dentro de una serie de estudios que se tienen programados en el P.I.R.P. con respecto al uso de esta vacuna en perros, este trabajo fue planteado con un doble objetivo: Por un lado pro-

bar la inocuidad de la vacuna en esta especie, y por otro, evaluar mediante pruebas serológicas la capacidad inmunizante de este biológico en una prueba a corto plazo, incluyendo en esta parte el desafío a 3 meses con una cepa de exposición de origen de "calle".

Este trabajo proporciona la información preliminar sobre la efectividad e inocuidad de la vacuna antirrábica cepa V-319 en perros, dada una necesidad mayor en cantidad de vacuna para las campañas oficiales de control de la Rabia Canina.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

La vacuna empleada pertenece al lote No. 73-6; el título de la misma fue de $10^{-7.3}$ /ml. Unidades Formadoras de Placa (U.F.P.). Su presentación es un frasco ampolla con liofilizado de 5 dosis, acompañada de una ampollita con 10 ml. con diluyente, una vez reconstituida; la dosis por animal es de 2 ml. para aplicarse por vía intramuscular. La historia de la cepa vacunal y los métodos usados en la producción de la vacuna, han sido reportados por Bijlenga y Hernández (4) (5).

Los perros Beagles utilizados para este trabajo se obtuvieron de la colonia existente en el I.N.I.P.; se utilizaron 10 perros, 5 machos y 5 hembras identificados con números tatuados en el pabellón de la oreja, cuya edad fluctuaba entre 18 y 24 meses.

Como animales testigos se utilizaron 29 perros criollos; 21 para la titulación de la cepa de desafío y 8 como testigos para la prueba de desafío, identificados con aretes de plástico, los cuales se obtuvieron del Centro Antirrábico de la Ciudad de

Toluca.

Los animales de laboratorio que se utilizaron para pruebas de titulación de la cepa de desafío y seroneutralización, fueron ratones blancos de 3 semanas de edad que se obtuvieron del bioterio del Proyecto de Investigación Sobre Rabia Parálitica del I.N.I.P.

Además, se obtuvieron glándulas salivales de perros afectados de Rabia para elaborar la cepa de desafío; las muestras proceden del Instituto Veterinario Antirrábico de la Ciudad de México.

MÉTODOS:

El criterio que se empleó para la selección de todos los animales experimentales fue en base a la ausencia de anticuerpos rábicos circulantes, lo cual se determinó mediante la prueba de seroneutralización en ratón de acuerdo a los métodos señalados por el Comité de Expertos en Rabia de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) en la monografía No. 23 (7).

La cepa de desafío se obtuvo a partir de glándulas salivales de perros que murieron por la enfermedad de rabia, contraída en forma natural; el diagnóstico se hizo en laboratorio con la técnica de inmunofluorescencia (A.F.) (3). Una vez obtenidas las glándulas de los perros, se conservaron en congelación a menos 70 grados centígrados; posteriormente, se descongelaron para preparar una suspensión al 20% empleando BAPS* al 0.75% como medio de suspensión. Para hacer la suspensión, se colocaron las glándulas salivales en un homogenizador a máxima velocidad durante 10 minutos y se obtuvo un macerado. El material así preparado, se centrifugó para obtener el sobrenadante y se procedió a envasarlo en ampollitas de vidrio de 5 ml. de capaci -

* BAPS = Bovine Albumin Phosphat Serum. Difco Lab. Detroit, Mich. E.U.A.

dad, con cantidades de 3 ml. Se selló la ampolleta a la flama y se guardó en congelación a menos 70 grados centígrados.

Posteriormente, se hizo la titulación de la suspensión de glándulas usando ratones y perros como animales experimentales.

Para la titulación en ratones, se emplearon varios lotes de animales de 3 semanas de edad, inoculándolos con 0.03 ml. por vía intracerebral. Los ratones se observaron durante 21 días anotando diariamente, el número de animales muertos y paráliticos. Después de transcurrido el período de observación, se calculó el título buscando el DL 50%, mediante el método de Reed y Muench (15).

Para la titulación de la cepa de desafío en perros se utilizaron 21 perros criollos de diferentes sexos, cuya edad fluctuaba entre 1 y 2 años aproximadamente, identificándolos con aretes de plástico.

Con estos perros, que resultaron sero-negativos a anticuerpos de rabia, se formaron 3 lotes de 7 animales en el primer lote, 8 en el segundo y 6 en el tercero. A cada lote se le inoculó la dilución apropiada de la cepa de desafío (previamente

titulada en ratones). El primer grupo, fue inoculado con la suspensión sin diluir (original), el segundo grupo con una dilución 1:5 y el tercer grupo con una dilución 1:25, aplicando el inóculo con 2.5 ml. en cada masetero. Los perros se observaron por un período de 90 días, anotando el número de perros muertos en cada dilución y comprobando que habían muerto de rabia mediante la prueba de A.F. (3).

El 6 de Marzo de 1975 se vacunaron 10 perros raza Beagle, 5 machos y 5 hembras identificándose con los números 01, 03, 05, 07 y 15 para los machos y 02, 04, 06, 10 y 26 para las hembras. Se les inoculó una dosis vacunal por animal, por vía intramuscular en la región crural del miembro posterior. La finalidad de este trabajo fue doble: primero, constatar la inocuidad de la vacuna mediante la observación clínica de los perros durante 90 días, y después, con el objeto de conocer el título de anticuerpos generados por la vacuna, para lo que se tomaron muestras de suero con una periodicidad de 0, 30, 60 y 90 días postvacunación, procediendo a la cuantificación de la tasa de anticuerpos, por medio de la prueba de seroneutralización.

Una vez que se probó la inocuidad de la vacuna y su poder inmunizante, se procedió al desafío 90 días después de la -

vacunación. Los 10 perros Beagles vacunados y 8 perros criollos como testigos, mantenidos bajo las mismas condiciones, se inocularon por vía intramuscular en ambos músculos maseteros con 4 ml. de una dilución de 1:2 de la cepa de desafío (que fue capaz de matar el 80% de los animales a la titulación en perros).

Se observaron diariamente los perros desafiados, anotándose el número de perros muertos durante el experimento, efectuando pruebas de inmunofluorescencia en los animales muertos.

La prueba se dió por terminada 90 días después de la fecha de la confrontación con la cepa de desafío, observándose a los perros durante este tiempo.

De acuerdo al comité de expertos sobre rabia, durante la prueba, el 80% de los animales testigos deben morir por la enfermedad y el 80% de los animales vacunados deben sobrevivir al desafío sin mostrar signos de la enfermedad. Esta prueba reproduce con bastante fidelidad las condiciones de la infección natural, y puede llevarse a cabo con bastante facilidad pues sólo se requiere de una aplicación de la vacuna y una inoculación de confrontación. Además, se apega al criterio de algunos autores que mencionan que con el fin de determinar la potencia de la va

cuna a virus vivo producida en cultivos celulares en diferentes partes del mundo, se deben emplear en la confrontación una cepa de virus de calle aislada, en la misma localidad del laboratorio (12).

RESULTADOS:

1.- El título del macerado de las glándulas salivales para preparar la cepa de desafío fue de $10^{-6.9}$ /ml. DL₅₀ ratón. De acuerdo al Comité de Expertos en Rabia, se puede emplear una Cepa para Desafío con un título mayor de $10^{-5.5}$ /ml. DL₅₀, lo cual demuestra que la cepa obtenida, tiene un título aceptable para el trabajo experimental.

Cuadro 1.- Resultados de la titulación de la cepa de desafío.- Utilizando dos diluciones (1:5 y 1:25) así como la dilución original, se tituló la cepa de desafío según la técnica descrita en material y Métodos. El análisis se realizó siguiendo el Método de Reed y Muench (15). En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos en cuanto animales vivos y muertos, las sumas acumulativas ascendente y descendente, así como el total acumulativo y el porcentaje de mortalidad (total de muertos entre No. acumulativo por 100), el cual nos da el título correspondiente. El 80% de los animales muertos fue obtenido en la dilución original, por lo que dicha dilución fue tomada para la prueba de desafío con los perros vacunados.

DILUCION	VIVOS	MUERTOS	T.VIVOS	T.MUERTOS	No. ACUMU LATIVO	%
ORIGINAL	3	4	3	12	15	80
1:5	3	5	6	8	14	57
1:25	3	3	9	3	12	25

Cuadro 2.- Títulos de anticuerpos producidos por la vacuna V-319.-
Utilizando la técnica de seroneutralización en ratones, se evaluaron los títulos de anticuerpos en los perros que posteriormente se usaron en el desafío. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

No. del perro	0 Días	30 Días	60 Días	90 Días
01 +	1:25	> 125	> 625	1:585
02	< 5	1:56	> 625	1:585
03	< 5	1:56	1:64	1:50
04	< 5	> 125	> 625	1:631
05	< 5	1:38	< 25	< 25
06	< 5	> 125	> 625	1:1000
07	< 5	> 125	1:66	1:25
10	< 5	> 125	> 625	1:631
15	< 5	1:125	1:125	1:158
26	< 5	> 125	> 625	1:585

+ Este perro fue sangrado con anterioridad siendo seronegativo a anticuerpos de rabia.

La fecha de vacunación fue el 6 de marzo de 1975 y las muestras de suero fueron tomadas desde los 30 días hasta los 3 meses.

Con los datos del cuadro 2, se calcularon las medias geométrica y aritmética de los títulos obtenidos por los animales en la seroneutralización, a los distintos sangrados. Los resultados se indican en el cuadro 3.

Cuadro 3.- Medias Geométricas y Aritmética de los títulos de seroneutralización a diferentes tiempos de sangrado.

	0 Días	30 Días	60 Días	90 Días
MEDIA GEOMETRICA	8.3	32.0	63.4	85.2
MEDIA ARITMETICA	7.0	102.5	403.0	727.5

Los datos proporcionados por las medias, indican un aumento creciente en la formación de anticuerpos generados por la vacunación, con una dosis simple de la vacuna Cepa V-319.

Cuadro 4.- Títulos de los animales vacunados y testigos en el momento del desaffo y resultados del mismo.- A los 3 meses de la vacunación los animales fueron desafiados usando la cepa de "calle" en su dilución original según quedó asentado anterior-

mente. En el cuadro 4 se indican los títulos obtenidos en los animales vacunados y los testigos, así como el resultado del desafío. El diagnóstico de rabia en los animales muertos se realizó mediante la prueba de inmuno-fluorescencia (A.F.), la que indicó que todos los animales muertos (que fueron testigos) eran positivos a rabia.

No. PERROS VACUNADOS:	TITULOS DE Ac. A LOS 3 MESES.	RESULTADOS DESAFIO.	DIAGNOSTICO POR A.F.
01	1:1585	Sobrevivió	
02	1:1585	"	
03	1:50	"	
04	1:631	"	
05	<25	"	
06	1:1000	"	
07	1:25	"	
10	1:631	"	
15	1:158	"	
26	1:1585	"	
<u>TESTIGOS:</u>			
33	<5	Murió	+
34	<5	Sobrevivió	
35	<5	Murió	+
44	<5	"	+
57	<5	"	+

60	<5	Murió	+
76	<5	Sobrevivió	
77	<5	"	

La inoculación de la cepa de desafío se hizo en ambos -
músculos maseteros con dos dosis a una dilución de 1:2 de la ce
pa original; las muestras del suero de los perros testigos, fueron
tomadas un mes antes del desafío. La prueba se dió por terminada,
90 días después de la inoculación de confrontación. Es importa
nte hacer notar que de los 8 animales testigos, sólo 3 sobrevivi
vieron, dando un porcentaje de mortalidad del 62.5%.

DISCUSION

Los resultados obtenidos con el lote de perros vacunados por primera vez con la vacuna de cultivos celulares V-319/Acaclán, confirman, en una escala más amplia, las observaciones de Bijlenga y Zavala. Estos autores utilizaron tres perros y observaron que no hubo efectos adversos a la vacunación y que los animales vacunados, no excretaban el virus vacunal en la saliva.

Utilizando diez perros, en el presente trabajo, no se observó un alza en la temperatura normal de los perros después de la vacunación. Los animales tuvieron temperaturas normales, tanto inmediatamente después de la vacunación, como los días subsecuentes. La vacunación tampoco causó un cambio en el comportamiento de los animales vacunados durante los tres meses de observación post-vacunal. Ningún animal murió de rabia como consecuencia de la vacunación. Estas observaciones confirman, que la vacuna fue inocua para los animales utilizados en el experimento.

El Cuadro 2 presenta los resultados de seroneutralización en cada uno de los perros vacunados. A los 30 días de la vacu-

nación el 100% de los perros tenía anticuerpos detectables que variaron de 1:38 hasta más de 1:125. La mayor parte de los perros incrementó su título de anticuerpos a la dilución 1:25, que fue la más baja que se probó. Estos resultados indican, que desde el punto de vista serológico, la vacuna resultó poseer una buena antigenicidad en perros.

Los resultados de la titulación de la cepa de desafío en ratones fue de $10^{-6.9}$ /ml. DL 50 ratón. De acuerdo con el Comité de Expertos en Rabia, una cepa de desafío con título igual o superior a $10^{-5.5}$ /ml., es adecuada (12). Lo anterior indica que el título de la cepa de desafío fue de acuerdo a las normas internacionales. La titulación en perros indica que la cepa original, es decir sin diluir, fue la que dió una mortalidad del 80%. Dado que se desea que el desafío sea severo, pero no excesivo, se utilizó esta dosis de virus por perro, para hacer el desafío. El cerebro de todos los animales que murieron en la titulación de la cepa de desafío fue examinado por la técnica de inmunofluorescencia para rabia. Sólo se incluyeron en la titulación, los animales positivos a inmunofluorescencia y que mostraron signos claros de rabia antes de morir.

La confrontación de los perros vacunados se efectuó en -

conjunción con un lote de perros callejeros seronegativos a rabia y que sirvieron como testigos no vacunados. En el cuadro 4 se exponen los resultados de la confrontación. Ninguno de los perros vacunados murió como consecuencia del desafío, en tanto que cinco de los ocho perros testigos, murieron de rabia como consecuencia del desafío. Es de lamentarse que se haya tenido la necesidad de emplear perros sin historia de vacunaciones antirrábicas, lo cual tuvo como consecuencia una escasa mortalidad en los perros testigos (62.5%), en lugar de un 80% como hubiera sido necesario para un desafío válido*. Sin embargo, el hecho de que ni siquiera el perro 05 haya muerto como consecuencia del desafío, dado que tenía un título menor a 1:25, es una fuerte indicación de que la vacuna, si protegió a los perros vacunados. Los perros vacunados no mostraron ningún cambio de comportamiento como consecuencia del desafío, siendo particularmente ilustrativo el hecho de que una perra parió y amamantó normalmente a sus cachorros durante el período de observación, después del desafío.

* El presente trabajo es parte de una serie de trabajos sobre la eficacia de la vacuna antirrábica V-319/Acatlán en perros.

CONCLUSIONES

- 1.- La vacuna V-319/Acatlán resultó inocua para los diez perros incluidos en este experimento.
- 2.- La vacuna V-319/Acatlán resultó altamente antigénica para nueve de los diez perros incluidos en este experimento y moderadamente antigénica para el décimo.
- 3.- La cepa de desafío tenía título suficiente para causar el 80% de mortalidad en perros no vacunados.
- 4.- Aún cuando el desafío no fue válido, existe una fuerte indicación de que la vacuna V-319/Acatlán, sí protege a los perros contra la rabia.

- 1.- Abelseth M.K.; Further studies on the use of ERA rabies -
vaccine in domestic animals.
Can. Vet. Jour, Vol. 8, No. 10, October (1967).

- 2.- Arellano S.C.; Evaluación de la eficacia de la vacuna Cepa
Flury contra rabia Parálitica.
Técnica Pecuaria en México 19:9-14, (1969).

- 3.- Atanasiu; Primer Seminario Internacional sobre Rabia para
las Américas. Centro Panamericano de Zoonosis. Cap. V,
Diagnóstico de la Rabia p. 197.
24-29 Sept. Buenos Aires, Argentina (1967).

- 4.- Bijlenga and Hernández; Adaptation, Attenuation and Plaque -
Purification of a Rabies Isolate (V-319) from a Vampire -
Bat (Desmodus rotundus).
J.A.V.M.A. (1976) (en Prensa).

- 5.- Bijlenga and Hernández; Testing of the Vaccine Potential of -
the Plaque Purified Rabies Virus Strain V-319 Derived from
a Vampire Bat (Desmodus rotundus) in México.
J.A.V.M.A. (1976) (en Prensa).

- 6.- Blood-Henderson; Medicina Veterinaria.
Edit. Interamericana México, D. F. (1970), p. 579'583.
- 7.- Habel K.; Técnica de Laboratorio Aplicada a la Rabia.
Oficina Sanitaria Panamericana Editada por la OMS, Ginebra, Suiza. Serie Monográfica No. 23. (Varios Autores)
(1959), p. III.
- 8.- Habel K.; Primer Seminario Internacional sobre Rabia para
las Américas. Centro Panamericano de Zoonosis. Cap.
VII, Vacunas Antirrábicas.
24-29 Sept. Buenos Aires, Argentina (1967), p. 260-262.
- 9.- Hagan Bruner G.; Enfermedades Infecciosas de los Animales
Domésticos.
La Prensa Médica Mexicana, México, D. F. (1969) p. 799.
- 10.- Irvin A.D.; The Epidemiology of Wildlife Rabies.
Vet. Rec. (1970) p. 333-348.
- 11.- Jensen y Mackey.; Enfermedades de los bovinos en los corrales
de engorda. UTEHA. México, D. F. (1973) p. 60.

- 12.- Koprowski H.; Técnicas de Laboratorio Aplicadas a la Rabia.
Editada por la OMS. Ginebra, Suiza.
Serie Monográfica No. 23 (Varios Autores) (1959) p. 133.

- 13.- Kruif Paul de.; Los Cazadores de Microbios.
Edit. Diana. México, D. F. (1975) p. 174-187.

- 14.- Programa para el control de la rabia en los Estados.
Secretaría de Salubridad y Asistencia,
Dirección Gral. de Servicios Coordinados de Salud Pública.
Dirección Gral. de Epidemiología y Campañas Sanitarias. México, D. F. (1975).

- 15.- Reed and Muench.; A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent and Points.
The American Journal of Hygiene Vo. 27
May. (1936) No. 3.

- 16.- Sikes R.K.; Evaluation of canine rabies vaccines. Rabies.
Edited By Yasuïti Nagano and Fred M. Davenport University Park Press. Tokyo (1973).