

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFECTO PATOGENICO DE VACUNAS ANTIRRABICAS  
CEPA FLURY DE LEP INOCULADAS INTRACEREBRAL-  
MENTE A POLLOS DE UN DIA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

**ALBERTO J. FERNANDEZ CASILLAS**

México, D. F.

1966



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO PATOGENICO DE VACUNAS ANTIRRABICAS  
CEPA FLURY DE LEP INOCULADAS INTRACEREBRAL-  
MENTE A POLLOS DE UN DIA

TESIS PROFESIONAL

ALBERTO JAVIER FERNANDEZ CASILLAS

MEXICO, D. F. 1966

00915

**A MIS PADRES:**

**Cesáreo Fernández Gürr.**

**Hortensia C. de Fernández.**

**A la memoria de mi querido tío**

**DON JAVIER LUJAN BLANCO**

**A mi tía.**

**CARMEN F. DE LUJAN.**

**A MIS HERMANOS Y FAMILIARES.**

Expreso mi agradecimiento a la Dra. Aurora Velázquez y al Dr. Alfredo Téllez Girón por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, por su guía y su orientación técnica

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

**A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.**

**AL HONORABLE JURADO.**

## INTRODUCCION.

Los primeros intentos de inmunización con material procedente de ave, fueron realizados por A. Marie (6) del Instituto Pasteur de Paris. En sus investigaciones observó que el virus rábico, pasado a través de pollos y pichones, reducía su virulencia para el conejo y cobayo; que estos animales inoculados con material nervioso de aves que habían sucumbido a la infección rábica, mostraban aumento de resistencia contra la exposición intramuscular con virus fijo de calle. Pero la atenuación progresiva del virus en las aves, impidió realizar con regularidad los pases en serie y el procedimiento se consideró inaplicable.

En los últimos decenios, el desarrollo de las vacunas antirrábicas con virus modificado y preparadas en embrión de pollo, hizo posible la producción comercial en gran escala que era necesaria para la realización de programas nacionales de control mas eficaces y prácticos, basados en la inmunización periódica y masiva de la población canina, así como para la prevención de la rabia en otras especies animales y en el hombre. En su preparación se pueden utilizar dos cepas diferentes de virus rábico modificado, la cepa Flury o la cepa Kelev, pero la primera ha recibido mayor aceptación mundial.

Originalmente, la cepa Flury fué aislada del tejido nervioso de una niña, así llamada, que murió de rabia el 24 de Marzo de 1939.

Leach y Johnson (5) de los Laboratorios de la División-Internacional de Salubridad, de la Fundación Rockefeller aislaron el virus pasándolo directamente del huésped humano a pollitos de un día y lo mantuvieron por pases continuados en estos últimos -- animales. En el pase de aislamiento, los pollitos presentaron parálisis después de treinta días y en los pases seriados, el período de incubación se redujo hasta 6 días, observándose aumento progresivo de virulencia para el pollo y disminución de patogenicidad para el conejo, cobayo y ratón.

Esta cepa de virus rábico adaptada al pollito de un día, en su 136° pase, fué proporcionada por Johnson a Koprowski y Cox- (8) quienes la adaptaron al embrión de pollo mediante pases seriados. Esta nueva adaptación originó mayores modificaciones en las propiedades patogénicas del virus durante el curso del 40° al 50° pase en embrión de pollo que se caracterizaron por pérdida de invasividad por vía parenteral en perros y conejos, y por aumento de la virulencia para las mismas especies animales, aún cuando sea -- introducido el virus por vía intracerebral. Tales condiciones -- fueron aprovechadas para elaborar la vacuna segura y eficaz para los perros, la cual es denominada con las siglas LEP ("low egg -- passage).

En el curso de pases posteriores en huevos embrionados, la cepa Flury sufrió otros cambios profundos en su patogenicidad. A partir del 180° pase, fué aparente su incapacidad para matar al

ratón adulto y después del 182° pase en adelante, dejó de matar - al ratón joven de 14 días, pero los ratoncitos lactantes permanecieron totalmente susceptibles a la inoculación intracerebral. Las vacunas preparadas con virus de esta misma cepa después de un número de pases que puede variar entre 187 y 210 son denominados --- con las siglas HEP ("high egg passage"); pueden aplicarse eficaz--- mente para la inmunización, con un mayor margen de seguridad que--- las preparadas con la forma LEP, en ciertas especies animales par--- ticularmente en los bovinos.

Como Johnson había señalado que los cerebros de pollos in--- fectados con la cepa Flury daban resultados irregulares cuando --- eran titulados en ratones y que se obtenían mejores títulos de la DL<sub>50</sub> con más mortalidad uniforme en los pollitos de un día, Kopro--- wski y Cox (8) también emplearon ambas especies para titular el - contenido del virus en las suspensiones de los embriones infecta--- dos que representaban diferentes niveles de la adaptación en los--- primeros 80 pases consecutivos. La comparación de los títulos DL- 50, en ratones y pollitos de un día inoculados intracerebralmente con las mismas suspensiones, indicó una sensibilidad mayor de los pollitos en los primeros pases. Por el 60° pase, los títulos en - los pollitos fueron iguales o ligeramente inferiores a los obteni--- dos en ratones. Los mismos investigadores dicen que aunque es di--- fícil precisar las alteraciones que pudieron ocurrir en las caracte--- rísticas patogénicas de la cepa Flury durante sus adaptaciones-

al pollo y al embrión de pollo, parece no haber sufrido durante -  
80 pases un cambio profundo en su invasividad intracerebral para -  
el ratón, hamster, rata, cobayo y pollo de un día. Posterior in--  
formación relacionada con el efecto patógeno para el pollito de -  
un día, no se ha podido localizar o no existe.

Por el estudio de estos datos, se encontró deseable hacer -  
pruebas exploratorias sobre el efecto patógeno para los pollos de  
un día, originado por las vacunas comerciales que se encuentran -  
en el mercado, y preparadas con la cepa Flury LEP, con la esperan -  
za de lograr alguna información, que de ser interesante, sirviera  
como orientación de otros trabajos de aplicación práctica en el -  
estudio de este tipo de vacuna.

## MATERIAL Y METODOS.

### VACUNAS:

A) Se utilizaron vacunas antirrábicas en embrión de --- pollo con la cepa Flury LEP (bajo pasaje) y desecadas al vacío fabricadas por cuatro diferentes laboratorios comerciales. En cada prueba se emplearon dos muestras del mismo laboratorio, las cuales se reconstituyeron según instrucciones del fabricante y se --- probaron separadamente. Las vacunas se identificaron por su procedencia, numerándolas del 1 al 4.

B) Para comparación se utilizaron dos muestras de vacuna antirrábica de un laboratorio, preparada con cepa Flury de HEP (alto pasaje) y desecada al vacío. Las dos vacunas recibieron el mismo tratamiento que las de prueba.

### ANIMALES:

Para revelar la patogenicidad de la cepa Flury en sus --- formas LEP y HEP, así como para titulaciones del virus, se utilizaron 14 lotes de 25 pollitos de un día de edad, raza leghorn, obtenidos de una misma Planta de Incubación de tipo comercial.

### METODOS DE PRUEBA:

A) A cada vacuna, reconstituida con el diluyente proporcionado por el fabricante, se adicionó agua destilada estéril para completar un volumen de 10 ml. Esta suspensión, que representa la dilución  $10^{-1}$  fué inmediatamente inyectada intracerebralmente a ---

cada uno de los 25 pollitos que forman un lote usando dosis de ---  
0.03 ml.

B) Después de la inoculación, los pollitos fueron colocados en criadora tipo de batería para mantenerlos en condiciones favorables para su desarrollo y observación durante un período de treinta días. Los pollitos que acusaron manifestaciones nerviosas atribuibles a la rabia, fueron sacrificados y se les extrajo el cerebro. Una parte se conservó en congelación para uso posterior y otra parte se utilizó para verificar el examen histopatológico.

C) Para constatar la practicabilidad del método de titulaciones del virus en pollitos de un día, se emplearon los fragmentos de cerebro obtenidos de los primeros pollitos que enfermaron en cada lote de prueba. Un gramo de material cerebral, triturado en mortero de Ten- Broeck y suspendido en 9 ml. de agua destilada estéril, constituye la dilución  $10^{-1}$  con la cual se prepararon diluciones hasta  $10^{-5}$ . Para controlar posibles contaminaciones bacterianas, el diluyente fué adicionado con 1000 UI de Penicilina G potásica y 1 microgramo de sulfato de dihidroestreptomina por ml.

En cada prueba se utilizaron 5 pollitos por dilución y se inyectaron intracerebralmente con dosis de 0.03 ml. Durante un período de 25 días fueron observados diariamente. Las muertes --- ocurridas antes del 5° día después de la inoculación, se conside-

raron inespecíficas y no se incluyen en los resultados.

Los cerebros de pollitos que mostraron manifestaciones nerviosas fueron sometidos a examen histopatológico por los métodos de Sellers y Wilhite, para comprobación diagnóstica.

El título de la  $DL_{50}$  correspondiente a cada vacuna fue determinado por el método de Reed y Muench (11).

## RESULTADOS.

Las manifestaciones de rabia, en los diferentes grupos de pollitos inoculados con diluciones al 1:10 de las vacunas de prueba, se presentaron en períodos variables. Estas manifestaciones consistieron en excitación, incoordinación en la marcha, parálisis de los miembros y otros síntomas de encefalitis, sin embargo, no pudo ser bien apreciada la duración de la enfermedad debido a que un buen número de los pollitos con parálisis fueron sacrificados para extraerles el cerebro a fin de confirmar la especificidad de la infección, por la presencia de corpusculos de Negri. Y para ensayar la titulación del virus en otros grupos de pollitos de un día. Cuando no fueron sacrificados, murieron después de 4 a 6 días. Por lo tanto, el efecto patogénico del virus contenido en las vacunas es apreciado en términos de letalidad.

A partir del 5° día de la inoculación se observaron los primeros signos del padecimiento, pero el mayor número de animales gravemente enfermos fué registrado entre el 10° al 15° día, período en el cual fueron sacrificados o se dejaron morir.

El resumen de resultados obtenidos después de un período de treinta días de observación, es mostrado en el cuadro siguiente; los datos corresponden a los dos grupos de 25 pollitos que fueron inoculados, cada uno con una muestra diferente de vacuna pero del mismo laboratorio.

Cuadro I.

Vacunas:	Relación de mortalidad	Porcentaje de mortalidad.
1.	13/50 (1)	26
2.	17/50	34
3.	7/50	14
4.	11/46 (2)	24

(1) = N° de muertes/N° de pollos en la prueba.

(2) = 4 pollos no fueron incluidos en la prueba por muerte inespecífica.

Los resultados obtenidos en los ensayos de titulación del virus en pollitos de un día, empleando los cerebros de pollos que primeramente sucumbieron a la inoculación intracerebral de las suspensiones preparadas con vacunas, quedan incluidos en el cuadro siguiente:

Cuadro II.

Origen de los cerebros inoculados.	DILUCIONES					Título DL <sub>50</sub> /0.03ml.
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	
vacuna 1.	5/5	4/5	2/5	2/5	0/5	3 (1)
vacuna 2.	4/5	3/5	2/5	2/5	0/5	2.6
vacuna 3.	2/5	3/5	3/5	1/5	0/5	2.4
vacuna 4.	2/5	2/5	2/5	1/5	0/5	1.8

(1) = Logaritmo  $10^{-n}$ .

En cuanto a los resultados de la inoculación intracerebr-  
bral practicada en 50 pollitos de un día, empleando suspensiones  
al 1:10 de vacunas preparadas con cepa Flury HEP (alto pasaje), -  
fueron totalmente negativas. Ninguno de los pollos mostró altera-  
ción alguna en su comportamiento y desarrollo, durante un período  
de treinta días.

## DISCUSION.

De las cepas de virus rábico conocidas, la Flury es la única que, desde su aislamiento, ha sido mantenida en pollos y en embriones de pollo. Durante el curso de los pases seriados, ocurrieron cambios de patogenicidad para diferentes mamíferos, que sirvieron para normar su uso como vacunas y fijar las bases de su estandarización.

A pesar que el pollo es el huésped donde se originaron tan importantes modificaciones, Koprowski y Cox (8) dejaron de registrar los títulos de la DL. 50 para este animal, al nivel del 60° pase de la serie de re-adaptación al embrión de pollo, y dicen que durante 80 pases, el virus no sufrió cambios más profundos en su "invasividad" intracerebral para el ratón, hamster, rata, cuyos y pollitos de 1 día de edad.

Como hasta el nivel del 176-180° pase en embriones, el virus dejó de ser letal para el ratón adulto, se pensó que condición similar podría existir para el pollo de 1 día. Para explorar esta situación, se consideró la posibilidad de que los laboratorios productores de vacunas antirrábicas, estuvieran utilizando la cepa Flury con pases posteriores al 60° pase o próximos al límite correspondiente al virus HEP, y que el estudio de ese material podría revelar alguna indicación al respecto.

Por los resultados de las inoculaciones intracerebrales

en cada uno de los grupos de pollitos, empleando las vacunas diluidas a  $10^{-1}$ , es evidente que el virus contenido en las vacunas de los 4 laboratorios comerciales, retiene aún su capacidad para matar al pollito, pero en grado variable (Cuadro I). En todos los casos, la mortalidad fué inferior al 50%, variando entre 34% a 14%, lo cual significa que el título  $DL_{50}$  es menor de  $10^{-1.0}$ . Comparando estos resultados con el título de  $10^{-4.75}$ , del 60° pase y último pase registrado por Koprowski y Cox (8), se observa considerable diferencia que puede atribuirse, principalmente, a dos factores combinados: (a) cantidad reducida de virus en las vacunas; y (b) grado de patogenicidad del virus empleado como vacuna.

En relación con este aspecto, son interesantes los resultados de las titulaciones del virus en los cerebros de pollitos que sucumbieron o se sacrificaron en estado avanzado de parálisis. Desde luego, la especificidad de la infección fué previamente comprobada por la presencia de Corpúsculos de Negri, por los métodos de Sellers y Wilhite (13).

Los resultados sumarizados en el Cuadro II, muestran una capacidad letal mayor del virus de cada vacuna, después del pase intracerebral, aunque los aumentos no fueron en la misma proporción. En los cerebros inoculados con las Vacunas 2 y 3, que habían causado la mortalidad mayor y menor (34% y 14%), los títulos

de la  $DL_{50}$  fueron del orden  $10^{-2.6}$  y  $10^{-2.4}$  respectivamente. En cambio, los inoculados con las Vacunas 1 y 4, que tuvieron índices de mortalidad muy semejantes (26% y 24%), proporcionaron títu los  $DL_{50}$  de  $10^{-3.0}$  y  $10^{-1.8}$ . Es significativo que la Vacuna 4, en ambas pruebas - inoculación directa y de titulación- haya mostrado el menor grado de patogenicidad. Estos hechos dan la impresión que el pase intracerebral inicial, sirvió para "fijar" o "realzar" la capacidad propia del virus de cada vacuna para matar al pollito, como simple resultado de la propagación óptima de las partículas virales más activas. Koprowski, Black y Nelsen (9) dicen que el virus Flury, en sus formas LEP y HEP, representan, en sus respectivos estados de adaptación, una población de partículas virales heterogeneamente patógenas para diferentes mamíferos. No obstante de no haber incluido al pollo en sus ensayos para separarlas, confirman el concepto de la existencia de diferentes formas de virus en las diversas fases de adaptación. Por lo tanto, es muy posible que entre los segmentos de la serie del 60° al 180° - pase, las poblaciones heterogéneas virales acusen menor capacidad letal para el pollito a medida que se acercan al nivel del 180° pase. La prueba comparativa, verificada con la vacuna preparada con virus Flury HEP (180° pase en adelante), claramente mostró que el virus también ha perdido la capacidad de matar al pollito, como la perdió para matar al ratón adulto. Este resultado confirma el concepto anterior y puede servir de base para un pro-

cedimiento complementario que ayude a distinguir las formas LEP y HEP.

Así pues, por los resultados obtenidos con los procedimientos anteriormente descritos, se llegó a la comprobación de -- que el virus rábico existente en cada una de las vacunas comercia les ensayadas, pertenece a la cepa Flury en su forma LEP, y muy - posiblemente, con un número de pases comprendido en la porción su perior de la serie, siguiendo el orden decreciente del título --- DL<sub>50</sub> alcanzado, después de un pase intracerebral por el pollito - de 1 día de edad.

De la discusión anterior, surge otra posible aplicación, basada en las experiencias de Koprowski y Cox (8) y en los mismos resultados aquí presentados. Esos investigadores, verificando --- otra serie de 25 generaciones por la técnica de pases alternos en pollos y embriones, observaron que el decrecimiento del título -- DL<sub>50</sub>, ocurrido en los primeros pases de la serie directa de em-- brión, era eliminada claramente, y como después de pases más avan zados, el título en los ratones llegó a igualarse en ambas series, entonces descontinuaron la serie alterna, al nivel del 25° pase.- Este hecho deja entrever la conveniencia del empleo de uno o dos- pases alternos cuando las pruebas de las vacunas preparadas, en - escala comercial, con la cepa Flury HEP, indiquen decrecimiento del título DL<sub>50</sub> en el ratón, persistente e indeseable. Puesto que - - el virus se sigue manteniendo ininterrumpidamente en la misma es-

pecie animal, el uso restringido del pase alterno tendría solamente el efecto de "fijar" la cualidad patogénica del virus necesaria para mantener los títulos  $DL_{50}$  en un nivel satisfactorio. Sin embargo, este recurso técnico requiere una investigación confirmatoria para ser aplicable.

Por último, el empleo del pollito de 1 día de edad como sujeto de experimentación, ofrece algunas ventajas prácticas. No siempre es posible lograr resultados uniformemente satisfactorios cuando no se dispone de un buen número de ratones de la misma edad, procedencia, raza y sexo. Cuando se agrupan ratones machos-adultos, o hembras y machos, frecuentemente ocurren pérdidas por riñas, o los animales están bajo constante tensión. Mientras que con el empleo de pollitos, se evitan esos inconvenientes, es fácil adquirirlos de la misma edad, sexo y raza, y a un menor costo. Basta tener una criadora con su equipo de alimentación para satisfacer las necesidades requeridas para períodos de observación de 30 días.

## CONCLUSIONES.

1. La cepa de virus rábico Flury de "Bajo pasaje" (LEP) contenida en las cuatro vacunas preparadas por 4 diferentes laboratorios comerciales, pudo ser reconocida por medio de la inoculación intracerebral en pollitos de 1 día de edad.
2. Las pruebas intracerebrales de titulación de la  $DL_{50}$ , en pollitos de 1 día, y empleando como material de prueba los cerebros de pollitos previamente inoculados con las vacunas comerciales, revelaron diferencias en su patogenicidad que pueden ser relacionadas con el número de pases verificados durante el mantenimiento.
3. La cepa Flury de "Alto pasaje" (HEP) de dos vacunas comerciales, no mostró efecto patogénico aparente para el pollito de 1 día, lo que también la distingue de la forma LEP.
4. Los resultados obtenidos con los procedimientos empleados en estudio de carácter exploratorio, sugieren algunas aplicaciones prácticas que han sido ampliamente discutidas en el texto.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Camargo F., Velázquez E. A., Inmunidad con virus rábico Flury, adaptado al embrión de pollo D. G. I. P. Palo Alto México D.- F. 1951.
- 2.- Dawson R. James., Infection of chicks and embryos with rabies. Science N° 2309 vol. 89, 1939.
- 3.- Dawson R. James., Am. Jour. Pub. Health, vol. p. 177. 1941.
- 4.- Hagan W. A. y Bruner D. W., Enfermedades Infecciosas de los - animales domésticos. P. 690-691, 1961.
- 5.- Leach C. N. Johnson H. N. Rabies vaccine modified virus - - - avianized is produced in chicks embryos from Flury strain of rabies virus insolated by Leach an Johnson, Am. Jour. Trop. - Med. vol. 20 p. 355, 1940.
- 6.- Marie A. Etude experimentale de la rage Paris 1909.
- 7.- Kigler I. K. y Bernkof H. Characteristics of a fixed rabies - virus cultivate on developing chick embryos Poc. Soc. Explt.- Biol. and Med. 45, 1940, p. 332-335.
- 8.- Koprowski H. Cox H. Estudios on chick embryo adapted rabies - virus. Jour. Immunol. vol. 60 p. 533, 1948.
- 9.- Koprowski H. J. A. Black., D. J. Nelsen. Studies on chick - - Embryo Adapted Rabies Virus. VI Further changes in Pathogenic Propietes Following, Prolonged cultivation in the developing chick Embryo. 1954, J. of Immunology.

- 10.- Koprowski H. Immunization with modified living virus with -  
particular reference to rabies Med. Vet. vol. 47 p. 144-150.  
1952.
- 11.- Merchant I. A. Veterinary Bacteriology of virology p. 918- --  
919, 1958.
- 12.- Reed L. J. and Muench H. a simple metod of estimating fifty -  
per cent end-points Amer. Jour. Hygiene vol. 27. p. 493-497,  
1938.
- 13.- World Health Organization. Laboratory techniques in rabies -  
1959.