

**PROPOSICION DE UN METODO EXPERIMENTAL PARA PROBAR LA POTENCIA PARA VACUNAS ANTIRRABICAS DE VIRUS VIVO MODIFICADO PRODUCIDAS EN CULTIVOS CELULARES**

B. LÓPEZ BAÑOS<sup>1</sup>  
E. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN<sup>2</sup>

**Resumen**

Se compararon inmunológicamente cuatro cepas vacunales de origen de cultivos celulares: dos comerciales y dos experimentales, incluyéndose en la prueba una vacuna de referencia para propósitos de comparación. Se inocularon por vía intraperitoneal cuatro lotes de seis ratones de 21 días por cada dilución de las vacunas. Se efectuaron diluciones decimales de cada una de las vacunas y se inoculó con diluciones de  $10^{-1}$ , a  $10^{-4}$ , dejando cuatro lotes de ratones testigos sin vacunar; se procedió a sangrar un ratón de cada lote y los cinco restantes se desafiaron a los 8, 12, 15 y 21 días posvacunación.

Los desafíos se efectuaron por vía intramuscular con virus CVS previamente titulado y con una dosis capaz de matar al 80-100% de los testigos. Los índices máximos de protección observados con cada cepa vacunal fueron:  $10^{3.2}$  con cepa ERA,  $10^{6.2}$  con ERA, alto pasaje,  $10^{4.9}$  con cepa V-319 y  $10^{3.6}$  con cepa Mazatán. El título más bajo indica una mayor antigenicidad de la cepa. La cepa ERA original, Mazatán y V-319 fueron más antigénicas que la ERA, alto pasaje.

La técnica aparenta ser apropiada como prueba de constatación para vacunas antirrábicas elaboradas en cultivos celulares. Se encontraron diferencias inmunogénicas entre las cuatro cepas estudiadas. Dado el bajo número de ratones sangrados en este experimento, uno de cada lote, los títulos de anticuerpos circulantes no constituyeron una valoración de la protección al desafío de los animales vacunados.

En fecha reciente han empezado a surgir vacunas antirrábicas preparadas en cultivos celulares, que han demostrado tener mayor pureza y antigenicidad que las obtenidas con las mismas cepas de virus, pero propagadas en animales de laboratorio (Abelseth, 1964, 1967a; OMS, 1973). Estas vacunas tienen la ventaja adicional de que los factores causantes de complicaciones posvacunales en el sistema nervioso central no existen, o por lo menos hasta ahora no han sido notificados, habiéndose utilizado estas vacunas en un número considerable de animales y personas (OMS, 1973).

También es sabido que entre diferentes cepas de virus rábico, fijas o adaptadas a cultivos celulares, existe una marcada diferencia inmunogénica (Johnson, 1948; OMS, 1973). Estas diferencias hacen que algunas cepas vacunales, aun teniendo un buen título, sean de

poco valor como vacunas tanto para uso humano como veterinario.

Las pruebas clásicas de Habel y NIH (Centro Panamericano de Zoonosis, 1965; OMS, 1973), que fueron desarrolladas para probar la potencia de vacunas tipo Fermi o Semple en animales de laboratorio, han sido de muy poca utilidad para probar la potencia de vacunas de virus vivo obtenidas a partir de cultivos celulares. La prueba de potencia en cuyes da buenos resultados con vacunas preparadas en cultivos celulares. Tiene como desventajas el reducido número de animales que se emplean, el alto costo de los cuyes y sobre todo la irregularidad de los resultados obtenidos en ellos. En la actualidad existen algunas vacunas experimentales obtenidas a partir de cultivos celulares y que han sido probadas en diversas especies animales, con resultados que van desde excelentes hasta pésimos (Abelseth, 1964, 1967a, b).<sup>\*</sup> Es necesario contar con una prueba de potencia en animales de laboratorio que muestren una estrecha correlación con los resultados obtenidos en especies mayo-

Recibido para su publicación el 5 de abril de 1977.

<sup>1</sup> Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Cuautitlán Izcalli.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias-SARH. Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F.

\* Larghi, Comunicación Personal.

res, para ser utilizada como prueba de constatación de los diferentes lotes de vacunas en su fase comercial de producción. Es decir, no se busca una prueba de potencia en animales de laboratorio que sustituya las pruebas en otros animales cuando se trate de vacunas nuevas, sino una prueba para la constatación rutinaria de los lotes de producción de vacunas que ya han sido probadas mediante ensayos en animales de la especie para la que se recomienda.

### Material y métodos

Las cepas de virus empleadas en este estudio fueron: \*

a) Cepa ERA de bajo pasaje. Esta cepa fue aislada y atenuada por Abelseth (1964, 1967a, b). La vacuna utilizada en el presente trabajo pertenece al lote 883-1.

b) Cepa ERA de alto pasaje. Esta cepa se obtuvo del Instituto Wistar de Filadelfia, EE. UU., en donde ha sido desarrollada.\*\* Se preparó un lote de virus para este trabajo.

c) Cepa V-319/Acatlán. Este virus fue aislado y adaptado a cultivos celulares por Bijlenga y Hernández (1977a, b).

d) Cepa Mazatán-558. Esta cepa fue aislada y adaptada a cultivos celulares por los mismos autores (Bijlenga y Hernández, 1977a). Se preparó un lote de virus que se utilizó en este trabajo.

La vacuna de referencia fue producida por la "Division of Biological Standards" del National Institute of Health (NIH) de Bethesda, Maryland, EE. UU., de donde se adquirió y fue reconstituida según las instrucciones anexas, con 8 ml de diluyente que acompañaba a la vacuna. El lote empleado fue el 179 y se utilizó durante el período de vigencia del mismo.

Se utilizó virus rábico CVS como cepa de desafío, originalmente adquirido del Instituto Wistar de Filadelfia, EE. UU. Para la elaboración de la cepa de desafío se efectuaron cinco pases sucesivos en ratones, inoculando 0.5 ml de CVS por vía intramuscular en el muslo y cosechando el cerebro. Esto se hizo

\* Los títulos de cada vacuna están indicados en el Cuadro 1.

\*\* Koprowski, Comunicación personal.

con la finalidad de obtener virus que infectara con más regularidad los ratones por esa vía. El título del lote así preparado fue de  $10^{5.8}$  DL<sub>50</sub> cuando se tituló por vía intracerebral en ratones y de  $10^{1.3}$  DL<sub>50</sub> cuando se tituló por vía intramuscular.

### Prueba de potencia en ratones

Con cada una de las cepas vacunales incluyendo la vacuna de referencia se hicieron diluciones decimales de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . Para las vacunas comerciales se consideró como vacuna original o dilución cero, el volumen que resultó al reconstituir al volumen original dicha vacuna y lo mismo se consideró con la vacuna de referencia. Se inocularon 4 lotes de 6 ratones blancos de 3 semanas de edad por cada dilución de las vacunas, con un volumen de 0.1 ml por vía intraperitoneal. Se escogió esta vía porque se ha observado que los ratones adultos responden formando una buena inmunidad y no mueren como consecuencia de la inoculación (Granados, 1969; Maldonado, 1967). Junto con cada lote de animales vacunados se incluyó un lote de animales de las mismas características, a los que se les inyectó con el mismo volumen por vía intraperitoneal con medio de cultivo y se dejaron como testigos no vacunados.

Una semana después de la vacunación se sangró por punción cardíaca un ratón al azar de cada dilución, y los ratones restantes de ese mismo lote fueron desafiados con 0.2 ml de la dilución 1:20 de la cepa de desafío por vía intramuscular y fueron observados durante 21 días. La dosis de la cepa de desafío

CUADRO 1

Título de virus viable contenido en las vacunas utilizadas para inmunizar los ratones

ERA (bajo pasaje) <sup>1</sup>	10 <sup>5.9</sup> UFP *
V 319 <sup>1</sup>	10 <sup>8.0</sup> UFP
ERA (alto pasaje) <sup>2</sup>	10 <sup>8.4</sup> UFP
MAZATAN - 558 <sup>2</sup>	10 <sup>6.8</sup> UFP
VACUNA DE REFERENCIA	10 <sup>6.0</sup> DL <sub>50</sub> **

<sup>1</sup> Vacunas comerciales.

<sup>2</sup> Vacunas experimentales.

\* Unidades formadoras de placa por mililitro.

\*\* Título por mililitro del virus vacunal, determinado en ratones de 21 días por vía intracerebral antes de inactivar.

correspondió a 30 dosis letales, 50% para ratón, o sea la dosificación que mató al 100% de los ratones no vacunados, sin incurrir en el exceso de virus de desafío.

Se hizo lo mismo a los 12, 15 y 21 días después de la vacunación con los demás lotes de ratones. Todas las manipulaciones de virus, sin importar la cepa, se efectuaron en refrigeración, utilizando hielo escarchado.

Por vía intracardiaca, con agujas del número 27, a cada ratón se le extrajeron 0.5 ml de sangre, la cual fue diluida inmediatamente en 0.5 ml de solución salina fisiológica estéril, dejándose en refrigeración a 4 C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron los sueros a 1,500 rpm durante 10 minutos, y se extrajo todo el sobrenadante, el cual se consideró como suero diluido 1:3, se inactivó en baño maría a 56 C durante 30 minutos y se guardó a -20 C para su posterior estudio.

El procedimiento que se siguió en la interpretación de los datos arrojados en el desafío de los ratones vacunados con cada cepa, a diferentes tiempos posvacunación fue el siguiente:

$$IP = \frac{\log. T}{\log. DP_{80}}$$

donde

$$DP_{80} = \log. Dil < 80 - (FC \times \log. RD)$$

y

$$FC = 80 - (P < 80) \\ (P > 80 - (P < 80))$$

Abreviaturas:

IP = Índice de protección.

T = Título de la vacuna expresada en unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml).

DP<sub>80</sub> = Dosis que protegen el 80% de los animales desafiados.

FC = Factor de corrección (se calcula por el método de Reed and Muench modificado por Pizzi) (1950).

RD = Rango de dosis.

Dil < 80 = Dilución que protege menos del 80% de los animales desafiados.

P < 80 = Protección menor de 80%.

P > 80 = Protección mayor de 80%.

## Resultados

Los Cuadros 2 a 7 contienen los resultados de las vacunas estudiadas. Los resultados expuestos son valores promedio de dos pruebas, en la mayoría de los casos. En el Cuadro 1 se expresan los valores de los títulos de las vacunas utilizadas. Los Cuadros 2 a 6 contienen resultados de seroneutralización y porcentaje de protección. El Cuadro 7 es un resumen de los índices de protección de las diferentes vacunas a distintos tiempos posvacunales.

## Discusión

Aun cuando los títulos de virus de las vacunas en estudio difieren grandemente entre sí (Cuadro 1), los resultados de las pruebas realizadas pueden compararse. Los índices de protección presentados (Cuadros 2 a 7) indican el número de unidades formadoras de placas que constituyen una dosis capaz de proteger al 80% de los ratones. La de referencia es una vacuna inactivada preparada con virus fijo de rabia y, por tanto, los índices de protección obtenidos con esta vacuna están expresados como el número DL<sub>50</sub> para ratón que, después de la inactivación, es capaz de proteger al 80% de los ratones vacunados.

Los resultados anotados en los cuadros corresponden al promedio de dos observaciones como mínimo. No se observaron discrepancias al repetir la misma prueba, por lo que se considera que los resultados reflejan la situación inmunológica real de los ratones usados en la misma.

Si se toma el índice de protección observado con la vacuna de referencia a los 21 días (Cuadro 7) como base de comparación con las otras vacunas, se notará que: la vacuna ERA bajo pasaje y la vacuna V-319 se encuentran dentro de los límites de confianza al 90% de la vacuna de referencia, es decir, que pasan la prueba de potencia. De las vacunas probadas, la única que dio un valor de protección a los 8 días, fue la vacuna V-319. A los 12 días, la única que no dio un índice de protección medible fue la ERA alto pasaje. Los 15 días posvacunación fue la fecha más temprana en que todas las vacunas arrojaron un índice de protección, pero éste fue bajo. A los 21 días la prueba dio sus mejores resultados.

Los resultados obtenidos en pruebas de po-

tencia en bovinos por otros investigadores (Abelseth, 1964, Bijlenga y Hernández, 1977a, 1977b), indican que ambas son buenas vacunas. Los resultados obtenidos con la cepa ERA alto pasaje, indican que se trata de una vacuna que requiere una gran cantidad de unida-

des formadoras de placa para inmunizar adecuadamente a los animales y por tanto se considera que no es una buena vacuna. En este caso también, los resultados de estas pruebas coinciden con los obtenidos por otros investigadores en pruebas de potencia en bovi-

CUADRO 2

Prueba de potencia en ratones de la vacuna ERA (bajo pasaje)

Diluciones	Tiempo después de la vacunación en días							
	8		12		15		21	
	SN *	D **	SN	D	SN	D	SN	D
10 <sup>-1</sup>	192	57.1	<12	90.9	12	80.0	192	100
10 <sup>-2</sup>	< 12	22.2	<12	66.6	>192	50.0	< 12	72.7
10 <sup>-3</sup>	< 12	8.3	<12	30.0	< 12	27.2	12	60
10 <sup>-4</sup>	< 12	0	<12	15.3	< 12	7.6	< 12	22.2
Testigo	< 12	0	<12	0	< 12	0	< 12	0
	I P = 0 ***		I P = 104.5 UFP/ml		I P = 104.9 UFP/ml		I P = 103.2 UFP/ml	

\* Seroneutralización expresada como el antilogaritmo de la dilución de suero capaz de neutralizar al 50% de las placas.

\*\* Porcentaje de animales protegidos al desafío con 30 DL<sub>50</sub> de virus de rabia CVS aplicado por vía intramuscular.

\*\*\* Ninguna dilución protegió el 80% de los ratones desafiados.

I P = Índice de protección.

UFP/ml Unidades formadoras de placa por mililitro.

CUADRO 3

Prueba de potencia en ratones de la vacuna ERA (alto pasaje)

Diluciones	Días después de la vacunación							
	8		12		15		21	
	SN *	D **	SN	D	SN	D	SN	D
10 <sup>-1</sup>	96	70.0	192	75.0	>192	100.0	>192	88.8
10 <sup>-2</sup>	>192	46.0	< 12	42.8	96	86.6	96	54.5
10 <sup>-3</sup>	< 12	25.0	12	20.0	48	50.0	12	28.0
10 <sup>-4</sup>	< 12	4.7	< 12	11.7	< 12	26.6	< 12	10.5
Testigo	< 12	3.8	< 12	4.5	< 12	5.5	< 12	4.1
	I P = 0***		I P = 0		I P = 105.2		I P = 106.1	

\* Seroneutralización, expresada como el antilogaritmo de la dilución de suero capaz de neutralizar el 50% de las placas.

\*\* Porcentaje de animales protegidos al desafío con 30 DL<sub>50</sub> de virus de rabia CVS por vía intramuscular.

\*\*\* Ya que ninguna dilución protegió al 80% de los ratones desafiados.

I.P. = Índice de protección.

nos.\* El caso de la cepa Mazatán es diferente ya que, según las pruebas, se trata de una buena cepa vacunal; sin embargo, los resultados preliminares de Bijlenga y Hernández

(1977a y 1977b), indican que no se trataba de una buena cepa vacunal.

La correlación de las pruebas en animales de laboratorio, de las que aquí se informa, y los resultados en el campo con las cuatro cepas vacunales examinadas, es del 75%, lo cual

\* Larghi, Comunicación Personal.

CUADRO 4

Prueba de potencia en ratones de la vacuna V 319

Diluciones	Tiempo después de la vacunación en días							
	8		12		15		21	
	SN *	D **	SN	D	SN	D	SN	D
10 <sup>-1</sup>	48	100.0	48	88.8	>192	100.0	>192	100.0
10 <sup>-2</sup>	<12	87.5	192	44.4	192	80.0	96	81.8
10 <sup>-3</sup>	<12	42.8	<12	25	96	62.0	192	60.0
10 <sup>-4</sup>	<12	10.0	<12	13.0	<12	25.0	<12	30.0
Testigo	<12	7.1	<12	5.5	<12	0	<12	8.3
	I P = 10 <sup>1.8</sup> UFP/ml		I P = 10 <sup>5.8</sup> UFP/ml		I P = 10 <sup>5</sup> UFP/ml		I P = 10 <sup>4.9</sup> UFP/ml	

\* Seroneutralización expresada como el antilogaritmo de la dilución de suero capaz de neutralizar el 50% de las placas.

\*\* Porcentaje de animales protegidos al desafío con 30 DL<sub>50</sub> de virus de rabia CVS por vía intramuscular.

I.P. = Índice de protección.

UFP/ml Unidades formadoras de placa por mililitro.

CUADRO 5

Prueba de potencia en ratones de la vacuna Mazatán-558

Diluciones	Tiempo después de la vacunación en días							
	8		12		15		21	
	SN *	D **	SN	D	SN	D	SN	D
10 <sup>-1</sup>	>192	75.0	12	100.0	>192	93.0	>192	100.0
10 <sup>-2</sup>	>192	51.1	>192	100.0	>192	76.9	>192	100.0
10 <sup>-3</sup>	12	12.5	<12	62.5	24	70.0	>192	85.0
10 <sup>-4</sup>	<12	9	<12	33.3	<12	22.2	12	60.0
Testigo	<12	0	<12	9	<12	8.3	<12	0.0
	I P = 0***		I P = 10 <sup>4.3</sup> UFP/ml		I P = 10 <sup>5</sup> UFP/ml		I P = 10 <sup>3.6</sup> UFP/ml	

\* Seroneutralización expresada como el antilogaritmo de la dilución de suero capaz de neutralizar el 50% de las placas.

\*\* Porcentaje de animales protegidos al desafío con 30 DL<sub>50</sub> de virus de rabia CVS por vía intramuscular.

\*\*\* Ninguna dilución protegió el 80% de los ratones desafiados.

I.P. = Índice de protección.

UFP/ml Unidades formadoras de placa por mililitro.

indicaría ya una prueba bastante confiable para la constatación de vacunas antirrábicas preparadas en cultivos celulares. El hecho de que la cepa Mazatán no haya sido examinada exhaustivamente, indica que su potencial como cepa vacunal no es en realidad conocido.

En los Cuadros 2 y 6 se presentan los datos de título de anticuerpos inhibidores de placas detectado en un ratón de cada lote (Sedwick y Wiktor, 1970) y el porcentaje de protección conferido a los ratones. Podrá notarse que existe una diferencia entre la tasa de anticuerpos y el porcentaje de protección. La prueba de reducción de placas es más sensible que la prueba de seroneutralización en ratones

(OMS, 1973); la mayor diferencia en los títulos observados entre las dos pruebas (dos logaritmos de diferencia) ocurre en las primeras dos semanas después de la vacunación, y la menor diferencia (un logaritmo de diferencia) entre las dos pruebas ocurre de tres semanas en adelante. Esto podría ser debido a que la prueba de reducción de placas sea más sensible que la prueba en ratones para detectar anticuerpos tempranos (OMS, 1973) o al reducido número de ratones sangrados en cada lote. El primer tipo de anticuerpos producidos por un animal en respuesta a un estímulo antigénico, está constituido por macroglobulinas 19S (IgM) de alto peso molecu-

CUADRO 6

Prueba de potencia en ratones de la vacuna de referencia

Diluciones	Tiempo después de la vacunación en días							
	8		12		15		21	
	SN *	D **	SN	D	SN	D	SN	D
10 <sup>0</sup>							>192	91.6
10 <sup>-1</sup>	<12	20.0	24	87.7	12	92.3	192	58.3
10 <sup>-2</sup>	<12	0.0	12	28.5	<12	80.0	12	42.8
10 <sup>-3</sup>	<12	0.0	<12	16.6	<12	66.6	<12	28.5
10 <sup>-4</sup>	<12	0.0	<12	11.7	<12	44.4	<12	14.2
Testigo	<12	0.0	<12	10	<12	11.1	<12	0
	I P = 0***		I P = 10 <sup>3.9</sup> DL <sub>50</sub> /ml		I P = 10 <sup>3.0</sup> DL <sub>50</sub> /ml		I P = 10 <sup>4.4</sup> DL <sub>50</sub> /ml	

\* Seroneutralización, expresada como el antilogaritmo de la dilución de suero capaz de neutralizar el 50% de las placas.

\*\* Porcentaje de animales protegidos al desafío con 30 LD<sub>50</sub> de virus de rabia CVS por vía intramuscular.

\*\*\* Ya que ninguna dilución protegió al 80% de los ratones desafiados.

CUADRO 7

Resumen del índice de protección de cada una de las cepas probadas

CEPAS PROBADAS	8 DIAS	12 DIAS	15 DIAS	21 DIAS
ERA (bajo pasaje)	0	10 <sup>3.4</sup> *	10 <sup>4.9</sup>	10 <sup>3.2</sup>
ERA (alto pasaje)	0	0	10 <sup>5.2</sup>	10 <sup>6.1</sup>
V 319	10 <sup>4.8</sup>	10 <sup>5.8</sup>	10 <sup>5.0</sup>	10 <sup>4.9</sup>
MAZATAN - 558	0	10 <sup>4.3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3.6</sup>
VACUNA DE REFERENCIA	0	10 <sup>3.9</sup> **	10 <sup>3</sup> **	10 <sup>4.4</sup> **

\* Unidades formadoras de placas por mililitro.

\*\* LD<sub>50</sub> para ratón antes de inactivar.

lar ( $16^6$  daltons) y de baja especificidad y avidez por el antígeno (Gordon y Ford, 1972).

El segundo tipo de respuesta inmune está constituido por anticuerpos 7S (IgG) de menor peso molecular ( $2 \times 10^5$  daltons), pero de mayor especificidad y avidez por el antígeno. La depresión del índice de protección (aumento de UFP/ml capaz de proteger al 80% de los animales) observado en todos los casos a los 15 días después de la vacunación, probablemente reflejó el cambio de inmunoglobulinas 7S. Aun cuando éste sea el caso, todavía se observan discrepancias entre la tasa de anticuerpos y el grado de protección observado. Por lo anterior, se considera que la cuantificación de anticuerpos por el método de reducción de placas en el suero de ratones no es un índice confiable de la potencia de vacunas. Quizá la inmunidad celular juegue un papel más importante en la protección de los ratones contra el desafío virulento (Hernández, 1976).

Cabría preguntarse por qué no se extiende el período posvacunal a más de 21 días. Las razones para no hacer esto son varias: el ratón es un animal muy precoz y de vida muy corta. Si se extendiera el período de inmunización, existe el peligro de trabajar con animales viejos y su respuesta inmune estaría condicionada más por la edad que por la calidad del antígeno. Además, la susceptibilidad del ratón por vía intramuscular (u otra vía extra-neural) a la rabia disminuye con la edad (Koprowski, 1948). La cantidad de virus necesaria para el desafío aumenta por semanas, llegando el momento en que el título de virus en el lote de desafío sería insuficiente para matar aun a los controles no vacunados. El costo de la prueba de constatación aumenta considerablemente con períodos más largos, no sólo por concepto de alimentación y cuidado a los animales, sino también por el mayor espacio de trabajo necesario para contener una gran población de ratones en estudio.

Por último, es de notarse que la prueba usada en este estudio fue capaz de detectar dife-

rencias en la inmunogenicidad de las cepas estudiadas. La cepa ERA bajo pasaje fue la más inmunogénica, seguida por la Mazatán; en tercer lugar, la cepa V-319 y la menos inmunogénica de las cepas estudiadas fue la cepa ERA alto pasaje.

### Summary

This work was conducted in order to establish the experimental basis to develop a new method that could be used as a potency test to evaluate tissue culture live antirrabic vaccines. Also the immunogenicity of two commercial tissue culture vaccines and two strains of rabies virus adapted to tissue culture were compared. A reference vaccine was included in the test. Four batches of 6 mice were intraperitoneally vaccinated with each of the strains of rabies virus being tested. The mice used were 21 days old white swiss. The viruses tested were diluted tenfold from  $10^0$  and a lot of mice were vaccinated with each dilution. Four batches of uninoculated mice were left as controls. One mouse from each dilution was bled at 8, 12, 15 and 21 days after vaccination and the rest of the mice were challenged on those same dates. The challenge was conducted by intramuscular route with a previously titrated CVS with enough virus to kill 80-100% of controls. The protection indexes observed were  $10^{3.2}$  with ERA strain,  $10^{6.1}$  with ERA high passage,  $10^{4.9}$  with strain V-319 and  $10^{3.4}$  with Mazatán strain a lower logarithm in protection index means a more antigenic strain. The ERA, Mazatán and V-319 proved more antigenic than ERA high titer. The technique seems adequate as a quality control test for tissue culture vaccines. There were significant differences in the immunogenicity of the four strains studied. Given the low number of mice bled, the antibody titers do not constitute a valid prediction of the behavior of the mice to challenge.

### Literatura citada

- ABELSETH, M.K., 1964, An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture, *Can. vet. J.*, 5:84-87, 279-286.
- ABELSETH, M.K., 1967a, Vacunas antirrábicas producidas en cultivo de tejidos, *Memorias del 1er. Se-*

*minario Internacional sobre Rabia para las Américas*, Buenos Aires, Argentina.

- ABELSETH, M.K., 1967b, Further studies on the use of "ERA" rabies vaccines in domestic animals, *Canad. vet. J.*, 8:221-227.

- BIJLENCA, G. and E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, 1977a, Testing of the vaccine potential of the plaque purified rabies virus Strain V-319, Derived from a vampire bat (*Desmodus rotundus*), in: *Br. Vet. J.* (in press).
- BIJLENCA, G. and E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, 1977b, Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies isolate V-319 from a vampire bat (*Desmodus rotundus*), *Br. Vet. J.* (in press).
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, 1965, *Curso Teórico-Práctico sobre Laboratorio y Epidemiología de la Rabia*, Buenos Aires, Argentina.
- GORDON, B.L. and K.K. FORD, 1972, *Essentials of immunology*, 1st edition, F.A. Davis Co., Philadelphia, Pa.
- GRANADOS HERNÁNDEZ, J., 1969, Respuesta inmunogénica de ratones a una vacuna anti-rábica elaborada en tejido homólogo y otra en tejido heterólogo, tesis de Médico Veterinario Zootecnista, *Fac. de Med. Vet. y Zoot.*, UNAM.
- HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, E.M., 1976, La rabia parásitante bovina: definición del problema y metodología de control. *Ciencia Veterinaria*, R. Moreno Chan Editor, Prensa Universitaria. 1:104-126.
- JOHNSON, H.N., 1948, Derriengue vampire bat. Rabies in Mexico, *Am. J. Hyg.*, 47, 204.
- KOPROWSKI, H. and H.R. COX, 1948, Studies on chick embryo adapted rabies virus I. Culture characteristics and pathogenicity, *J. Immunol.*, 60:533-538.
- MALDONADO COUTTOLENC, A., 1967, Estudio de anticuerpos neutralizantes contra la rabia a nivel celular o histógeno y sanguíneo. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista, *Fac. de Med. Vet y Zoot.*, UNAM.
- OMS, Organización Mundial de la Salud, 1973, Laboratory techniques in rabies monograph Series N° 23, *WHO*, 3rd. ed. Geneva, Switzerland.
- PIZZI, M., 1950, Sampling variation of the fifty per cent end-point determined by the Reed and Muench (Behrens) method. *Hum. Biol.* 22, N° 3, 151-190.
- SEDWIK, W.D. and T.J. WIKTOR, 1970, Reproducible plaquing system for rabies, lymphocytic choriomeningitis, and other ribonucleic acid viruses in BHK-21/13S agarose suspensions, *J. Virol.*, 1:138-142.
- STOKER, M. and I. MAC PHERSON, 1964, Syrian hamster fibroblast cell line BHK-21 and its derivatives, *Nature*, 203:1355-1457.