

## EVALUACION DE UNA VACUNA COMERCIAL ANTIRRABICA INACTIVADA PARA BOVINOS, PRODUCIDA EN CULTIVO DE TEJIDOS (ALURABIFFA)

—Duración de inmunidad con desafío a tres años—

M.V.Z., M.S., PH. D. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN <sup>1</sup>  
M.V.Z. JOSÉ MORALES RUIZ <sup>2</sup>  
M.V.Z., M.S. CARLOS ARELLANO SOTA <sup>3</sup>  
M.V.Z. JESÚS CAMPOS VELA <sup>1</sup>  
M.V.Z. BENITO LÓPEZ BAÑOS <sup>4</sup>  
M.V.Z. HÉCTOR PÉREZ ROMERO <sup>2</sup>

### Resumen

Se efectuó la prueba de vacunación, con desafío a tres años, de la vacuna comercial Alurabiffa.

Se utilizó un lote de 30 vaquillas Hereford seronegativas a rabia. Se vacunaron diez con una dosis completa, diez con un décimo de dosis y diez quedaron como testigos sin vacunar. Se tomaron muestras de suero para la evaluación serológica de la vacuna a los 0, 7, 28 y 42 días, a los 3, 6 y 9 meses y a uno, dos y tres años después de la vacunación, así como a los 16 y 32 días después del desafío.

El desafío se efectuó a los tres años con cinco millones de dosis letales 50% para el ratón. En una prueba previa de titulación, se determinó que ésta era la dosis que mataba al 100% de los animales, sin incurrir en el exceso de dosis de desafío. La vacuna protegió al 100% de los animales que recibieron una dosis completa, al 88% de los animales que recibieron un décimo de dosis y los animales testigos murieron en un 100%. En conclusión, la vacuna resultó ser adecuada para la protección del ganado vacuno contra el derriengue hasta por tres años.

El grave problema que la rabia pareasante transmitida por murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*), representa para la ganadería de México (Valdez y Atristain, 1964; Johnson, 1948) y Latinoamérica (Málaga, 1959; Pawan, 1936; Acha, 1968), requiere cada día, con mayor urgencia, de productos biológicos que sean eficientes en la producción de una inmunidad duradera, así como seguros en su aplicación. En la actualidad, se tiende a la producción de biológicos que contengan antígenos lo más puros posible y que generen una respuesta inmunológica duradera y específica. Las vacunas antirrábicas han logrado esto por medio de los métodos de producción en cultivos celulares de diversos orígenes (Kissling, 1958; Brown, Merry y Brechenhauer, 1973). En México existen en

el mercado varias vacunas antirrábicas de virus modificado que se producen en cultivos celulares. Por otra parte, también está disponible la vacuna Alurabiffa que es una vacuna inactivada y que fue el objeto del estudio que aquí se notifica.

La vacuna Alurabiffa fue desarrollada por el Instituto Mérieux, en Francia, por Petermann *et al.* (1967) a partir de una cepa fija de virus de rabia (cepa Pitman-Moore), adaptada a células WI-38 en el Instituto Wistar de Filadelfia (Fernández, Wiktor y Koprowski, 1963). La cepa viral fue adaptada en el Instituto Mérieux a la línea celular NIL-II derivada de embrión de hamster (*Cricetus aureus*) completo (Diamond, 1967). El proceso de producción ha sido notificado por Petermann (1971). La vacuna puede presentarse liofilizada sin adyuvante, líquida con adyuvante a base de hidróxido de aluminio, con adyuvante oleoso o bien con Saponina, siendo estable antigénicamente en presencia de todos estos compuestos químicos (Petermann, 1971). La estabilidad antigénica de la vacuna ha sido ensayada por medio de la prueba del National Institute of Health de Estados Unidos (NIH), en ratones (Seligmann, 1973), después de tres años mantenida

Recibido para su publicación el 19 de noviembre de 1975.

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, km 15.5 Carretera México-Toluca, México 10, DF.

<sup>2</sup> Dirección General de Sanidad Animal, Control de Medicamentos, Dr. Mora 15, segundo piso.

<sup>3</sup> Fideicomiso Campaña Nacional contra la Garrapata, Av. Constituyentes 161, 5º piso.

<sup>4</sup> Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

a 4°C, después de una semana y también después de un mes a 37°C. La presentación de la vacuna en México es en forma líquida, completamente inactivada, filtrada, absorbida a hidróxido de aluminio y Saponina (como adyuvantes).

El criterio de evaluación de vacunas antirrábicas para bovinos que se sigue actualmente en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías, ha sido desarrollado a partir de experiencias previas en el proyecto (Arellano, Sureau y Batalla, 1971; Sureau, Arellano y Batalla, 1971; Arellano *et al.* 1971), así como por criterios internacionales sugeridos por la Oficina Sanitaria Panamericana (Fuenzalida y Larghi, 1972).

El método consiste en vacunar un lote de 10 bovinos y dejar un grupo igual de testigos sin vacunar. El desafío se efectúa uno o varios años después de la vacunación, con una dosis de virus virulento capaz de matar al 80% de los testigos. Para que una vacuna se considere adecuada, ésta deberá de proteger por lo menos al 80% de los animales vacunados. La vacuna Alurabiffa había sido ensayada en bovinos hasta por 17 meses con buenos resultados (Petermann, 1969).

## Material y métodos

**Vacuna.** La vacuna empleada fue la Alurabiffa del sub lote N° 1 que formó parte del lote N° 8 comercial, con un título antes de inactivar de  $10^{7.0}$  y un índice de protección de 9.6 en comparación con el lote 178 de vacuna de referencia NIH<sup>1</sup> (Seligmann, 1973).

**Animales experimentales.** Se investigaron serológicamente 30 bovinos de raza Hereford (hembras), de un año de edad, procedentes de una zona libre de rabia. La investigación serológica se efectuó por medio de la prueba de seroneutralización (Atanasiu, 1973) en ratones. Los resultados fueron negativos a anticuerpos rábicos en diluciones 1:2 y 1:5 en todos los animales.

**Vacunación.** Los 30 animales seleccionados para la prueba se subdividieron en tres grupos. El primer lote de 10 bovinos fue vacunado con una dosis completa por vía intra-

<sup>1</sup> La vacuna Alurabiffa fue proporcionada por Rhodia Mexicana, SA.

muscular. El segundo lote de 10 bovinos fue vacunado con un décimo de dosis de la vacuna diluida en solución salina hasta completar el volumen original de la vacuna (2 ml) y aplicada también intramuscularmente. El tercer lote de 10 bovinos no fue vacunado, quedando como grupo testigo. Todos los animales del experimento fueron sangrados con el fin de obtener sueros a los 0, 7, 28 y 42 días, así como a los 3, 6, 9 y 12 meses después de la vacunación.

El desafío de los animales se efectuó a los tres años después de la vacunación. El muestreo serológico se continuó efectuando anualmente hasta una semana antes del desafío, así como a los 16 y 32 días después de éste. Muestras de todos los sueros fueron enviadas al Instituto Mérieux para comprobaciones adicionales, a solicitud suya.

**Cepa de desafío.** Se empleó la cepa de vampiro 5562/6bc IM que había sido sometida a seis pases seriados por vía intramuscular en becerros y fue titulada en bovinos adultos a fin de seleccionar la dosis que matara al 80-100% de los bovinos testigos en el desafío. El título de la cepa en ratones fue de  $10^{8.5}$  DL<sub>50</sub>/ml por vía intracerebral en ratones de 21 días.

La dosis empleada fue de  $5 \times 10^6$  DL ratón<sub>50</sub> por bovino, ajustada a un volumen de 20 ml y aplicada en los músculos maseteros en ambos lados, utilizando 10 ml de inóculo por lado. Después del desafío se mantuvieron en observación los sobrevivientes durante tres meses y se dio por terminado el experimento.

**Prueba de seroneutralización.** Se efectuó en ratones blancos de 21 días (Atanasiu, 1973), utilizando para ello entre 20 y 100 DL<sub>50</sub> de virus CVS. Se consideraron seropositivos aquellos que dieron un título igual o superior a 1:5.

## Resultados

Los resultados de las pruebas de seroneutralización se ilustran en los Cuadros 1 y 2, con dosis completa y con un décimo de dosis respectivamente. Ninguno de los animales testigo desarrolló anticuerpos durante el tiempo que duró el experimento.

El 100% de los animales que recibieron una dosis completa de vacuna, tenía anticuerpos

CUADRO 1

Resultados de seroneutralización en bovinos vacunados con una dosis completa de vacuna alurabiffa

Animal No.	Tiempo de sangrado después de la vacunación							
	7 Días	28 Días	42 Días	90 Días	180 Días	1 Año	2 <sup>1</sup> Años	3 Años
956	125 <sup>1</sup>	> 625	194	> 625	66	66	18	162
957	478	> 625	255	125	16	47	13	< 125
958	74	> 625	3 125	281	56	56	23	< 125
959	> 625	> 625	> 625	> 3 125	6 025	> 1 202	72	2 399
960	95	> 625	478	> 3 125	389	125	23	83
961	> 125	> 625	625	189	56	56	41	< 125
962	32	> 625	1 261	1 200	56	9	—	—
963	8	> 625	> 625	125	77	56	18	< 125
964	16	> 625	346	295	56	11	3	< 125
965	> 625	> 625	625	4 073	870	204	95	419

- <sup>1</sup> Recíproco del título de seroneutralización, en todos los datos anotados en la tabla.
- <sup>2</sup> Resultados de seroneutralización del Instituto Mérieux.
- <sup>3</sup> Murió el animal de intoxicación en la pastura (negativo a rabia).

antirrábicos detectables una semana después de la vacunación (Cuadro 1), en tanto que el 70% de los animales vacunados con un décimo de dosis desarrolló un nivel de anticuerpos igual o superior a 1:5, 28 días después de la vacunación.

De los resultados de la titulación de la cepa

de desafío se informará por separado, pero para los propósitos de esta publicación, la dosis empleada fue aquella que mató al 100% de los animales de la titulación, es decir  $5 \times 10^6$  dosis letales para el ratón. La siguiente dosis empleada en la titulación fue de  $1 \times 10^6$  dosis letales para el ratón y mató al 40% de

CUADRO 2

Resultados de seroneutralización en bovinos vacunados con un décimo de dosis de vacuna alurabiffa

Animal No.	Tiempo de sangrado después de la vacunación							
	7 Días	28 Días	42 Días	90 Días	180 Días	1 Año	2 <sup>1</sup> Años	3 Años
945	< 5 <sup>1</sup>	25	37	120	7	8	7	18
946	< 5	11	7	14	< 5	—	—	—
947	< 5	< 5	< 5	< 5	11	< 5	4	< 25
948	< 5	5	13	12	10	< 5	0	< 25
949	< 5	< 5	< 5	13	11	5	3	< 25
950	< 5	8	13	44	20	< 5	< 7	< 25
951	< 5	12	5	37	66	11	3	< 25
952	< 5	5	32	< 5	77	25	6	< 25
953	< 5	5	11	12	47	47	< 7	11
954	< 5	13	25	13	47	25	6	< 25

- <sup>1</sup> Recíproco del título de seroneutralización, en todos los datos anotados en el cuadro.
- <sup>2</sup> Resultados de seroneutralización del Instituto Mérieux.
- <sup>3</sup> Murió el animal de timpanismo (negativo a rabia).

CUADRO 3

Resultados del desafío, con cinco millones de dosis letales para el ratón, efectuado tres años después de la vacunación, usando la cepa de desafío 5562/6bc-IM de origen de vampiro

Lote	Animales muertos <sup>1</sup>	Animales sobrevivientes	Porcentaje de protección	Total
Dosis completa	0	9	100	9
Un décimo	1	8	88	9
Testigos	8	0	0	8
Total	9	17	—	26

<sup>1</sup> Muertes específicas de rabia. Todas las muertes ocurrieron entre el día 14 y el 26 después del desafío. Los animales se mantuvieron en observación durante dos meses después de la última muerte específica de rabia.

los animales, lo cual indica que la dosis empleada es la mínima que mató al total de los animales sin incurrir en una dosis excesiva de virus de desafío.

Debido a muerte de animales durante el curso del experimento, se desafiaron nueve animales del primer grupo, vacunado con una dosis completa, nueve del segundo grupo, vacunado con un décimo de dosis y ocho animales del grupo testigo. Uno de los animales murió de timpanismo y tres de intoxicación por un lote de pastura contaminado con plantas tóxicas que se adquirió comercialmente durante la época de invierno. El total de animales desafiados tres años después de la vacunación fue de 26.

Los resultados del desafío se anotan en el Cuadro 3. Del primer lote no murió ningún animal; del segundo grupo murió un animal y del lote testigo murieron los ocho animales desafiados. La mortalidad del lote testigo fue del 100%, lo que indica que se trató de un desafío válido.

La protección del primer grupo fue del 100% y del segundo del 88%. Los primeros síntomas de rabia empezaron a los 11 días después del desafío y se caracterizaron por: salivación excesiva, lagrimeo, incoordinación del tren posterior, parálisis de los músculos linguales, fiebre, taquicardia y muerte. La totalidad de las muertes específicas de rabia ocurrieron entre los 14 y 26 días después del desafío. Todos los animales muertos durante el experimento, tanto antes como después del

desafío, fueron sometidos a una necropsia. Los cerebros de los animales que resultaron negativos a inmunofluorescencia fueron inoculados por vía intracerebral en ratones, a fin de determinar si la causa de la muerte era rabia o alguna otra. Un animal con el número de identificación 948 murió 50 días después del desafío, de aparente timpanismo y también este animal resultó negativo a rabia después de efectuarse las pruebas descritas. Los resultados de la seroneutralización efectuada con los sueros obtenidos a los 16 y 32 días después del desafío se anotan en el Cuadro 4. En los animales vacunados, el desafío actuó como dosis de refuerzo ya que todos respondieron con altos títulos de anticuerpos, en tanto que los testigos no desarrollaron niveles detectables de anticuerpos.

La mayoría de las muestras de suero enviadas al Instituto Mérieux se perdieron o se echaron a perder en el transporte. Sólo ocasionalmente se recibieron lotes de suero con una persona que los llevaba consigo. La muestra de suero de dos años de la vacunación se terminó, debido a que fue necesario repetir varias veces la prueba de seroneutralización. Por este motivo se incluyen en los cuadros los resultados del Instituto Mérieux. La aparente baja de la tasa de anticuerpos se debe a las condiciones en que fue efectuada la prueba en Francia, pero aun así es útil en el sentido de que los animales se mantenían positivos (título de SN igual o superior a 1:5) o negativos, según el caso.

## Discusión

Bajo las condiciones de esta prueba, la vacuna Alurabiffa resultó adecuada para proteger al ganado bovino contra el derriengue. La respuesta obtenida a los siete días de la vacunación con una dosis completa (Cuadro 1) indica que el 100% de los animales tenía anticuerpos detectables a esta fecha tan temprana. Esta observación es valiosa en sí misma, ya que por ello convierte a Alurabiffa en la vacuna de elección para emplear en los sitios en donde está ocurriendo un brote activo de derriengue. La estabilidad térmica de la vacuna por otra parte la hace apropiada para su aplicación en sitios de difícil acceso en donde no siempre es posible mantener la vacuna en refrigeración.

La mortalidad del 100% de los animales testigos indica que se trata de una prueba válida en la que se efectuó un desafío severo pero no excesivo, tal y como era el propósito de esta prueba.

Los animales vacunados con una dosis completa fueron protegidos en un 100% tres años después de la vacunación. Los animales que recibieron un décimo de dosis quedaron protegidos en un 88% (un nivel de protección aceptable) después de tres años de la vacunación (Cuadro 3).

Bajo las condiciones de este experimento, la protección conferida por la vacuna puede predecirse con un cierto grado de confianza con base en los resultados de seroneutralización. Sólo dos animales entre 18 vacunados (11%) se comportaron en forma distinta de la esperada. La vaca N° 947 no mostró anticuerpos detectables en su suero más que a los 180 días con un título de 1:11, es decir que siempre mantuvo un título muy bajo de anticuerpos y, sin embargo, sobrevivió al desafío (Cuadros 2 y 4). La vaca N° 953, por otra parte, mostró títulos detectables de anticuerpos a partir de los 42 días y, sin embargo, sucumbió al desafío virulento (Cuadros 2 y 4).

Este tipo de fenómeno ya ha sido observado (Arellano, 1974), lo cual es más frecuente con vacunas de virus modificado preparadas en cultivo de tejidos, de donde se desprende que todas las vacunas preparadas con estos métodos de producción deban ser sometidas a una prueba crítica similar a la que nos ocupa y no es suficiente con saber el nivel de anticuerpos inducidos por las mis-

mas. Arellano (1974) señalaba que es probable que la inmunidad celular juegue un papel importante en la protección contra la rabia. Si este fuera el caso, la evaluación de la inmunidad humoral detectada con las pruebas de seroneutralización no tendría más valor que el de una mera indicación de calidad de una vacuna, sin constituir una prueba definitiva.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, con la vacuna Alurabiffa, se desprende que es una vacuna adecuada para la protección antirrábica del ganado bovino durante tres años, ya que aun la décima parte de la masa antigénica de la misma confirió un nivel aceptable de protección a los tres años.

CUADRO 4

Resultados de seroneutralización después del desafío con la cepa 5562/6bc-IM de origen de vampiro

Animal No.	Tiempo de sangrado después del desafío		
	16 días	32 días	
956	> 125 <sup>1</sup>	631	Una dosis
957	281	< 125	
958	> 625	331	
959	> 625	13,940	
960	> 625	> 625	
961	900	281	
963	280	281	
964	480	281	
965	> 3125	125	
945	—	1413	0.1 dosis
947	> 3125	331	
948	218	1202	
949	> 625	389	
950	> 625	1950	
951	> 625	1413	
952	> 625	1660	
953	457	murió <sup>2</sup>	
954	416	173	
890	< 10	murió <sup>2</sup>	Testigos
891	murió <sup>2</sup>	murió <sup>2</sup>	
892	< 10	murió <sup>2</sup>	
893	< 10	murió <sup>2</sup>	
896	murió <sup>2</sup>	murió <sup>2</sup>	
897	< 10	murió <sup>2</sup>	
898	< 10	murió <sup>2</sup>	
899	murió <sup>2</sup>	murió <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> Recíproco del título de seroneutralización en todos los datos del cuadro.

<sup>2</sup> Muerte específica de rabia.

## Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento por la ayuda proporcionada en la realización de este trabajo a los Dres. Zenón Barrios y Alejandro Sánchez, del Centro Experimental Pecuário de Tulancingo, Hgo. Asimismo agradecemos a los Dres. Georges Memery, Flavio Zavala, Enrique Appendini, Lidio Bahena y Raúl Monner, de Rhodia Mexicana, SA, la ayuda proporcionada.

## Summary

A vaccination trial with challenge after three years was conducted. The vaccine tested was the commercially available "alurabiffa" vaccine. Thirty Hereford heifers serum-negative to rabies were used. Ten received one complete dosis of vaccine each. Ten received

one tenth of a dosis of vaccine each and ten were left as controls.

Serum samples were obtained at 0,7, 28 and 42 days, at 3, 6 and 9 months and one two and three years after vaccination, as well as 16 and 32 days after challenge.

The challenge was conducted three years after vaccination with a challenge dosis of five million mouse LD<sub>50</sub>. The challenge dosage had been previously determined by titration in cattle to be sufficient to kill 100% of unvaccinated controls without being an excessive challenge. The vaccine protected 100% of vaccinated animals with one full dosis, 88% of vaccinated with one tenth of a dosis, while 100% of unvaccinated controls died of rabies. The vaccine, thus, proved adequate for protection of cattle against paralytic rabies (Derriengue) for up to three years.

## Literatura citada

- ACHA, P., 1968, La rabia pareasiente en América Latina, *Bull. Of. San. Pan.*, 5:511-432.
- ARELLANO, S.C.; P. SUREAU, y D. BATALLA C., 1971, Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa "ERA" en bovinos: I. Antigenicidad, *Téc. Pec. Méx.*, 18:12-15.
- ARELLANO, S.C.; P. SUREAU; D. BATALLA C., y J. MORALES R., 1971, Evaluación de la eficacia de la vacuna cepa "Flury", contra la rabia parálitica bovina, *Téc. Pec. Méx.*, 19:9-14.
- ARELLANO, S.C., 1974, Experiencias de campo con vacunas de origen de cultivo de tejidos, *VI Reunión Anual de Sanidad Animal*, México, DF.
- ATANASIU, P., 1973, Quantitative assay and potency tests of antirabies serum and immunoglobulin, in Laboratory techniques in rabies, *World Health Organization*, Geneva 3rd Ed. pp. 314-320.
- BROWN, A.; L. MERRY, and C. BRECHENHAUER, 1973, Modified live virus rabies vaccine produced from Flury High Embryo Passage virus grown on an established canine kidney cell line: Three years duration of immunity study in dogs, *Am. J. Vet. Res.*, 34:1427-1432.
- DIAMOND, L., 1967, Two spontaneously transformed cell lines derived from the same hamster embryo culture, *Intl. J. Cancer*, 2:143-152.
- FERNÁNDEZ, M.V.; T.J. WIKTOR, and H. KOPROWSKI, 1963, Mechanism of the cytopathic effect of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues, *Virology*, 21:128-132.
- FUENZALIDA, E., y O.P., LARCHI, 1972, Características de una cepa de virus rábico aislada de cerebro de *Desmodus rotundus*, *Bol. of. San. Pan.*, 73: 93-99.
- HABEL, K., 1973, Chapter 18. General considerations on vaccine production, in Laboratory techniques in rabies, *World Health Organization*. Geneva, 3rd Ed. pp. 189-191.
- JOHNSON, H.N., 1948, Derriengue: Vampire bat rabies in Mexico, *Am. J. Hyg.*, 47:189-204.
- KISSLING, R.E., 1958, Growth of rabies virus in non nervous tissue culture, *Proc. Soc. expl. Biol. Med.*, 98:223-225.
- MÁLAGA ALBA, A., 1959, La rabia de los murciélagos como problema veterinario y de salud pública tropical, *Ciencia Veterinaria*, 4:520-531.
- PAWAN, J.L., 1936, The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus*, Wagner, 1890), *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 30:101-131.
- PETERMANN, H.G.; R. LANG; R. BRANCHE, et J.P. SOULEBOT, 1967, Rapports XVIII<sup>e</sup> Congrès Mondial Vétérinaire, Paris, *Murray-Print*, Paris, pp. 227-230.
- PETERMANN, H.G.; J.P. SOULEBOT; R. LANG; R. BRANCHE, et C. MACKOWIAK, 1969, Immunisation active des bovins contre la rage avec un vaccin inactivé préparé à partir d'un virus obtenu sur culture de cellules, *C.R. Acad. Sc. Paris*, 268:1352-1353.

PETERMANN, H.G., 1971, Vacunas inactivadas en la rabia de carnívoros y herbívoros, *XIX Congreso Mundial de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, México, DF.

SEDWICK, W.D., and T.J. WIKTOR, 1967, Reproducible plaquing system for rabies, lymphocitic choriomeningitis and other RNA viruses in BHK-21/13S agarose suspensions, *J. Virol.*, 1 N° 6:1224-1226.

SELIGMANN, E.B., Jr., 1973, The NIH test for po-

tency, in *Laboratory techniques in rabies*, World Health Organization, Geneva, 3rd Ed., pp. 279-286.

SUREAU, P.; C. ARELLANO S., y D. BATALLA C., 1971, Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa "ERA" en bovinos: Duración de inmunidad, *Téc. Pec. Méx.*, 18:16-21.

VALDEZ ORNELAS, O., and G. ATRISTAIN, 1964, Bat rabies in Mexico, *South. Vet.*, 1:13-16.