

ESTUDIO SOBRE UN INTENTO DE ANAFILACTOGENESIS E INMUNOGENESIS DE LA VACUNA V 319 EN PERROS.

MANUEL FERNANDEZ RUVALCABA ¹

ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN ²

HECTOR PEREZ ROMERO ³

RESUMEN

En vista de las posibilidades de provocar choque anafiláctico en perros, al utilizar para vacunarlos la cepa V-319 (Acatlán) en un principio elaborada para bovinos, se seleccionaron cinco perros de la raza Beagle, libres de anticuerpos contra la rabia, adultos machos y en buenas condiciones de salud, se les hicieron sangrados periódicos mensuales y a cada animal se le vacunó durante 10 meses (una dosis vacunal individual por mes). Antes y después de vacunarlos se determinaron sus constantes fisiológicas (temperatura, frecuencias cardíaca y respiratoria) a lo que siguió un período de observación de dos horas, después de lo cual se volvieron a registrar las mismas constantes. De la sangre recolectada se obtuvo el suero para ser analizado por la prueba de seroneutralización en ratón de 21 días. Los resultados indicaron que, no obstante

¹ Proyecto Hemoprotozoarios del Sector Pecuario, INIFAP-SARH, Km. 11.5, Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, Mor.

² Proyecto Biotecnología en Salud Animal, Sector Pecuario INIFAP-SARH. México, D.F., C.P. 05110.

³ Campo Experimental Pecuario de Pichucalco, Chis., Sector Pecuario, INIFAP-SARH.

los alérgenos puedan ser de muy variada composición y específica contra rabia, el contenido total de la vacuna no produjo choque anafiláctico durante las 10 vacunaciones y que el título de anticuerpos aumentó en progresión logarítmica.

INTRODUCCION

La rabia es una enfermedad infecciosa que afecta en forma natural o experimental a todos los animales de sangre caliente.

Esta enfermedad es causada por un virus con afinidad por el sistema nervioso central y otros órganos dentro de los cuales las glándulas salivales juegan un papel clave en la transmisión de esta entidad nosológica (Tierkel, 1975). El agente causal es un virus perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*, género *Lysavirus*, del que es virus tipo (Mathews, 1982).

Las bases para la prevención de la rabia fueron establecidas por Pasteur (1882), pero la primera vacuna susceptible de aplicación masiva fue la fenolada de Fermi y modificada por Semple (Atanasiu, 1974).

El primer ensayo de campo de la vacuna fenolada fue efectuado por Umeno, durante un severo brote de rabia en Tokio de 1918 a 1920 (Steel, 1967). El siguiente paso importante en la evolución de las vacunas antirrábicas fue el desarrollo de una vacuna de virus vivo modificado por pases sucesivos, primero en pollitos de un día y después en embriones de pollo (Koprowsky y Cox, 1948), Kissling (1958) fue el primero en desarrollar el virus rábico en cultivo primario de criceto (**Cricetus auratus**) y luego elaboró una vacuna a partir de cultivos celulares.

Después han seguido numerosas y exitosas vacunas antirrábicas a partir de diversas cepas de virus rábico (Abelseth, 1964).

Las vacunas preparadas en cultivos celulares deben carecer de elementos externos no regulables, así como de los propios y asegurar su inocuidad (Atanasiu, 1974; Arellano, 1970; Keith, 1975; Hernández y col., 1976).

La vacuna antirrábica V-319/Acatlán es preparada en cultivos celulares de la línea BHK 21 135 y fue desarrollada en México a partir de una cepa de murciélago vampiro (**Desmodus rotundus**), (Bijlenga y Hernández, 1981, 1984).

Antes de este trabajo se había estudiado la posibilidad de provocar choque anafiláctico en ganado inmunizado con vacuna elaborada en embrión de pollo, (Arellano y col., 1970). Después se hizo un estudio con la cepa vacunal antirrábica de origen vampiro V-319, en 20 bovinos inmunizados con una dosis en forma repetida (de 8 a 10 veces) con intervalos mensuales (Arellano y col., 1975).

Con la cepa V-319 también se han realizado trabajos de extinción antigénica (Hernández y col.), de inocuidad y respuesta serológica en bovinos (Diereharts y col., 1974; Hernández y col., 1976; López, 1974), en perros

(González, 1976; Hernández, 1977; Sagardía y col., 1982; Pérez y col., 1981), gatos (González y col., 1982) y ovicaprinos (Batalla y col., 1981).

La vacuna V-319 contiene pequeñas cantidades de suero de bovino, residuo del medio en que se cultivan las células, además el antígeno, el medio de cultivo, el estabilizador y los antibióticos. Al aplicar la vacuna en otras especies distintas al bovino, pues en esta quedó demostrado que no producía choque anafiláctico (Arellano y col., 1975), existe la posibilidad de que dicha entidad patológica se manifieste a la revacunación, provocada por alguna de estas sustancias (Fundemberg, 1978; Roitt, 1980; Rose y col., 1979).

Dado que esta cepa se utiliza en la actualidad con mucha frecuencia en perros, donde ha probado ser una vacuna eficaz, como se demuestra en los trabajos de los autores antes mencionados, y por haber sido en su principio elaborada para bovinos, se inició este estudio con la finalidad de determinar si la aplicación de la vacuna V 319 (Acatlán) en la dosis recomendada, era capaz de causar choques anafilácticos a la revacunación repetida, como ocurre con otros productos (Aksu y West, 1960; Auer y Lewis, 1911, 1912; Ishizaka, 1972). También resultó de interés cuantificar la tasa de anticuerpos producida con cada vacunación en forma continua, ya que sólo se ha estudiado en forma discontinua (Hernández, 1977; Sagardía y col., 1982; Pérez y col., 1981).

La anafilaxia aguda en el perro empieza a manifestarse a los 10 segundos de aplicada la dosis desencadenante y puede causar la muerte una hora después. El mediador principal es la histamina y el tejido principal de choque son las venas hepáticas. Los signos que preceden a la muerte

incluyen vómito que llega a tomar características fecales, diarrea, prurito, hipotermia, disnea, colapso, convulsiones y muerte (Ishizaka, 1972; Fundenberg y col., 1978; Rose y col., 1979).

MATERIAL Y METODOS

De una colonia de perros raza Beagle se seleccionaron cinco machos adultos con peso promedio de 12 kg., libras de anticuerpos neutralizantes contra el virus rábico y en buen estado de salud. El grupo de cinco perros resultó ser el más homogéneo de los animales disponibles. En la colonia los perros se identifican mediante el tatuaje, los utilizados en la prueba se aretaron con los números: 09, 13, 71, 73 y 75.

Cada animal sirvió como su propio testigo antes de la iniciación del experimento, para la medición de temperatura corporal y frecuencias cardíaca y respiratoria. La determinación de estas constantes se realizó siempre a la misma hora del día.

Cada perro recibió un régimen de 10 vacunaciones, a razón de una vacuna por mes y por individuo.

Antes de la vacunación se determinaron las constantes fisiológicas mencionadas, entonces se procedió a vacunar y volver a registrar dichas constantes; a lo que siguió un período de observación de dos horas y la medición de las constantes que se consideraron indicativas de una reacción sistémica indeseable. Se permitió la coagulación de la sangre colectada y la retracción del coágulo a temperatura ambiente por 12 horas, para obtener suero que se destinó a pruebas de seroneutralización. En estas pruebas se emplearon ratones albino suizo cepa CD1 de 21 días.

El lote de vacuna empleado durante todo el experimento procedió del lote 75-6 y se tituló por medio de la prueba de placa (Corzo, 1974), la cantidad de

proteína se cuantificó por la técnica de microejdall (Cramton y Harris, 1969).

La prueba de seroneutralización en ratones se efectuó de acuerdo a la técnica recomendada por la Organización Mundial de la Salud (Koprowski, 1976).

RESULTADOS

El lote de vacuna empleado en la prueba dió un título de $10^{7.3}$ unidades formadoras de placa (Corzo, 1974). La cantidad total de la vacuna reconstituida tuvo un contenido proteínico de 1.083 mg/ml.

Las observaciones clínicas indicaron que los animales se mantuvieron dentro de los límites fisiológicos normales (Cuadro 1 y Gráficas 1, 2 y 3). Durante el período de observación de dos horas, posteriores a cada vacunación mensual, no se detectaron alteraciones en la conducta y los valores de la determinación final de las constantes fisiológicas analizadas después de la fase de observación fueron muy semejantes a las tomadas al principio. Los cinco perros sobrevivieron hasta la conclusión del experimento y aún mucho tiempo después. La sangre obtenida nunca mostró a lo largo del experimento alteraciones en el mecanismo fisiológico de la coagulación, si bien se obtuvo antes de la revacunación.

En el Cuadro 2 se anota la tasa de anticuerpos neutralizantes del virus rábico proveniente de las muestras de sangre tomadas en la revacunación mensual. La tasa de anticuerpos en cada uno de los perros alcanzó muy pronto títulos de sueros hiperinmunes, también se aprecia el promedio de incremento logarítmico y los títulos finales.

DISCUSION

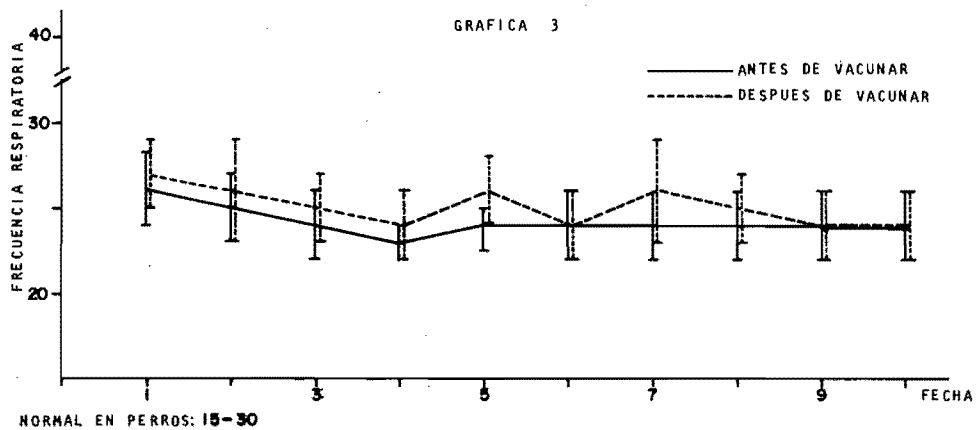
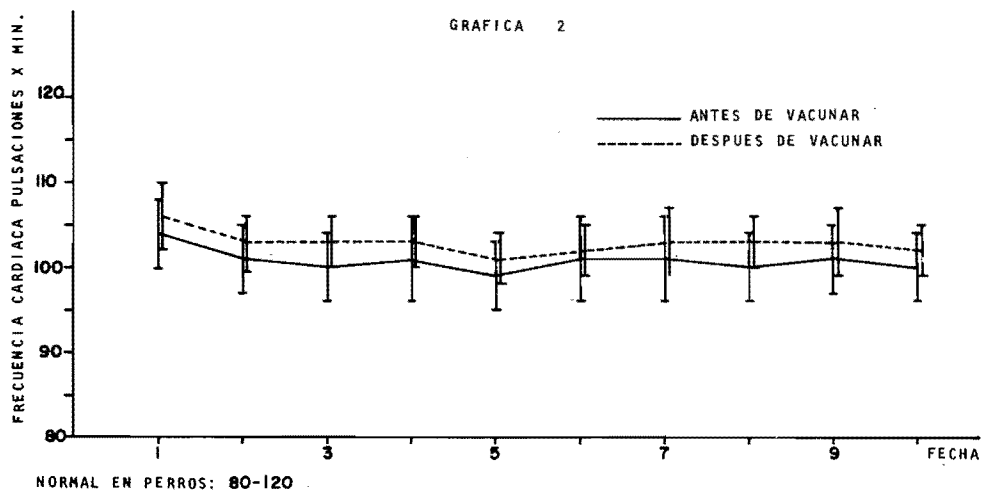
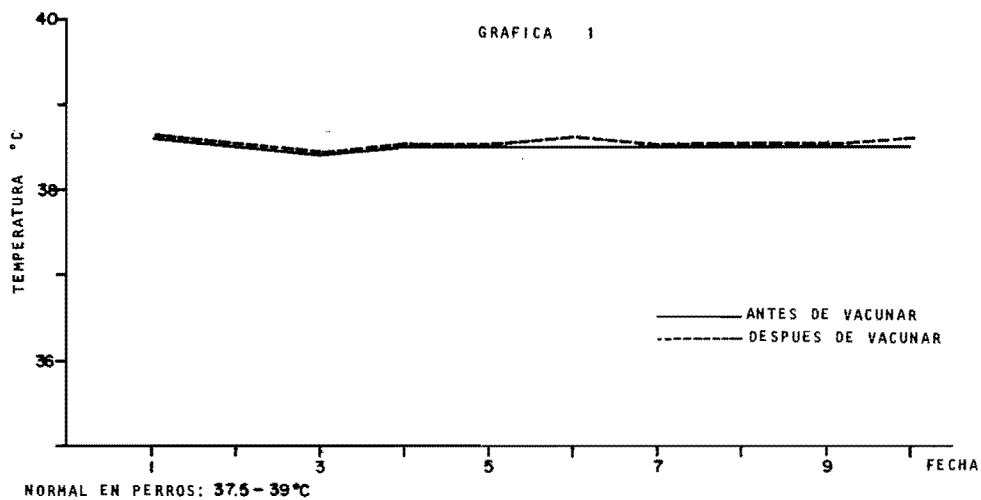
El título del lote 75-6 de la vacuna V-319 (Acatlán) empleado en el experimento

C U A D R O 1.

PROMEDIO DE CONSTANTES FISIOLÓGICAS DURANTE 10 MESES DETERMINADAS MENSUALMENTE ANTES Y DESPUES DE VACUNAR CEPA V-319/ACATLAN A 5 PE RROS BEAGLE.

Vacuna Mensual #	TEMPERATURA °C		FRECUENCIA CARDIACA PULSACIONES POR MIN.		FRECUENCIA RESPIRATORIA.	
	ANTES	DESPUES	ANTES	DESPUES	ANTES	DESPUES
1	38.6 ± .07	38.6 ± .07	104 ± 4.3	106 ± 3.7	26 ± 2.0	27 ± 2.0
2	38.5 ± .03	38.5 ± .05	100 ± 3.6	103 ± 3.1	25 ± 1.8	26 ± 2.7
3	38.4 ± .04	38.4 ± .06	100 ± 3.8	103 ± 3.4	24 ± 1.6	25 ± 2.3
4	38.5 ± .02	38.5 ± .04	101 ± 4.6	102 ± 3.3	23 ± 1.3	24 ± 1.9
5	38.4 ± .06	38.5 ± .05	99 ± 4.5	101 ± 3.5	24 ± 1.4	26 ± 2.6
6	38.5 ± .03	38.5 ± .16	101 ± 4.7	102 ± 3.3	24 ± 2.0	24 ± 2.1
7	38.5 ± .05	38.5 ± .07	101 ± 5.0	103 ± 3.8	24 ± 1.8	26 ± 2.5
8	38.5 ± .03	38.5 ± .16	100 ± 4.0	103 ± 3.4	24 ± 1.6	25 ± 2.2
9	38.5 ± .04	38.5 ± .10	101 ± 4.5	103 ± 3.6	24 ± 1.9	24 ± 2.1
10	38.5 ± .05	38.6 ± .08	100 ± 4.3	102 ± 3.0	24 ± 1.8	24 ± 2.1
Normal: 37.5-39°C (Cabrera, 1974 Dukes, 1979).		Normal: 80-120/min. (Cabrera, 1974 Dukes, 1979).		Normal 15-30 (Cabrera, 1974 Dukes, 1979).		

± = Error Standard.



CUADRO 2.

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

TATUAJE	0 DIAS	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7	MES 8	MES 9	MES 10	4 MESES DESPUES
09	< 1:5	> 2.09	> 4.19	> 4.48	5.18	> 5.50	6.29	> 7.69	> 8.39	> 8.6	9.06	9.05
13	< 1:5	> 2.09	> 4.19	> 3.99	4.68	> 5.02	5.72	> 6.43	> 7.11	> 7.81	7.82	7.82
71	< 1:5	> 2.09	> 4.19	> 4.41	5.11	> 5.86	6.44	> 6.55	> 7.25	> 7.86	7.9	7.9
73	< 1:5	> 2.09	> 4.19	> 4.69	5.39	> 5.39	5.62	> 6.32	> 7.02	> 7.72	9.05	9.05
75	< 1:5	> 2.09	> 4.19	> 4.78	5.48	> 5.48	5.69	> 6.39	> 7.09	> 7.39	7.6	7.6
X LOG.	< 1:5	> 2.09	> 4.19	> 4.47	5.16	> 5.45	5.97	> 6.67	> 7.37	> 7.87	8.28	8.28
DIFERENCIAS X LOG.	0	> 2.09	2.1	0.28	0.69	0.29	0.52	0.7	0.7	0.5	0.41	0

Lease como Logaritmo base 10

Valor final = 4 meses después.

resultó 10 veces superior al recomendado como protector para perros ($10^{6.5}$) y por lo tanto, este ensayo fue en forma indirecta una prueba de seguridad para la vacuna aplicada en perros. Dado que la cantidad de vacuna capaz de provocar sensibilización tanto en el perro como en cualquier animal, es muy pequeña y su riesgo de tornarse en dosis desencadenante consiste en la sensibilidad o idiosincrasia individual, en la naturaleza del alérgeno que se use y en la repetición del estímulo antigénico (Fundenberg y col., 1978; Rose y col., 1979; Roitt, 1980), el presente estudio al mismo tiempo mostró ser una prueba de inocuidad. El hecho de que no se observara ninguna reacción indeseable en los perros vacunados a lo largo del experimento, indica que el contenido total no fue capaz de provocar un choque anafiláctico.

Deberían llevarse a cabo posteriores estudios para dilucidar el comportamiento de la vacuna V-319 con relación a la anafilaxia local (cutánea). Debido a que las moléculas de anticuerpos actúan

an sobre todo por neutralización de los receptores antigénicos de los virus cuando se trate de ellos (Fundenberg, 1978), esto significó otro punto de preocupación en torno a la posible neutralización del virus vacunal por parte de los anticuerpos de una vacunación previa, pues compiten de esta manera por el virus vacunal y merman así su rendimiento antigénico. Pero en el presente estudio ésto no sucedió.

El incremento logarítmico de la tasa de anticuerpos era esperado, pero fue una sorpresa que alcanzara tales niveles y en forma tan rápida.

Esto hace posible la elaboración de sueros hiperinmunes a partir de perros y además; permite recomendar la vacunación anual de los perros sin temor, aún en zonas de alto riesgo, puesto que aquí es demostrado que la vacuna se puede aplicar hasta con un lapso de un mes y durante 10 repeticiones.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que la vacuna V-319 es un biológico inocuo

para perros, que no provocó choque anafiláctico y que tuvo un altísimo efecto estimulador en la tasa de anticuerpos analizada.

SUMMARY

In view of the possibilities to provoke anaphylactic shock in dogs utilizing for vaccinate the V-319/Acatlan strain originally elaborated for bovines, was selected five beagle dogs, adults males, in good health conditions and free of antibodies against rabies. It was made periodic bleeds monthly and was vaccinated during ten months, one vaccine each month and for each dog.

Before and later to vaccinate was determined corporal temperature, cardiac and respiratory frequency, later a direct period of observation of two hours was accomplished.

Of the blood serum was recolected, for study of seroneutralization test.

The results indicated that the total content of vaccine V-319 (Acatlan) do not produced anaphylactic shock along the experiment, and the antibodies was always in increase.

LITERATURA CITADA

- ABELSETH, M.K., 1964. An attenuated vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Canadian Veterinarian*. 5:279.
- ACKASU, A. and G.B. WEST, 1960. Anaphylaxis in the dog. *Int. Arch. Allerg.* 16:326.
- ARELLANO, S.C., BATALLA, C.D. y SUREAU, P. 1970. Estudio del choque anafiláctico producido por la vacunación antirrábica (Cepa Flury) en embrión de pollo. Memorias de la VII Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México, D. F.
- ARELLANO, S. C., CRUZ, G.A., CAMPOS, V.J., MORALES, R.J., GONZALEZ, V.D., IBARRA, V.F., MAR, C.R., HERNANDEZ, B.E., 1975. Avances en el estudio de la cepa vacunal antirrábica de origen vampiro. Memorias de la XII Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, México, D. F.
- ATANASIU, P. 1974. Consideraciones sobre los nuevos tipos de vacunas antirrábicas. *Salud Pública en México*, 16 (3):437.
- AUER, J., and LEWIS, P.A. 1911. Lethal cardiac anaphylaxis in the rabbit. *J. Exp. Med.* 14:476.
- AUER, J., and LEWIS, P.A. 1912. The physiology of the immediate reaction of the anaphylaxis in the guinea pig. *J. Exp. Med.* 12:151.
- BATALLA, C.D., MENDEZ, J., GONZALEZ, D., GARCIA, F. y OROS, D. 1981. Prueba de inocuidad y antigenicidad de la vacuna antirrábica V-319/Acatlán en borregos y cabras. Memorias de la XV Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, México, D. F.
- BIJLENGA, G. and HERNANDEZ, B.E. 1980. Adaptation attenuation and plaque purification of a rabies isolate (V-319) from a vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Cornell Vet. J.* 70(3).
- BIJLENGA, G. and HERNANDEZ, B.E. 1984. Plaque purified rabies virus (Strain V-319) derived from a vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Mexico: Vaccine potential. *Cornell Vet. J.* 74:155.
- CABRERA, V.M., 1972. Guía para el estudio de los medios de investigación clínica en los animales. Apuntes impresos FMVZ-UNAM México, D. F., p.4.
- CRAMPTON, W.E. and HARRIS, L.E. 1969. Applied animal nutrition. 2a. Edition by **Freeman and Company**.
- CORZO, C.D., 1974. Estudios comparativos de las pruebas de seroneutralización de rabia en dos sistemas biológicos diferentes y pruebas de seroneutralización comparativas *in vitro*. Tesis Profesional, FMVZ-UNAM, México, D. F.
- DIEREHARTS, D., BIJLENGA, G., ZAVALA, F., CAMPOS, J., MORALES, J., JOHANNES, W., 1974. Evaluación de la vacuna antirrábica de origen vampiro (respuesta inmunológica en condiciones de campo). XI Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México, D. F.
- DUKES, H.H. 1979. *Veterinary Physiology*. 9a. Ed. **Editorial Comstock Publishing Associates**. Cornell University Press pp. 89, 183 y 187.
- FUNDEMBERG, H.H., STITES, P.D., CALDWELL, L.J., WELLS, V.J., 1978. *Inmunología*

clínica, 2a. ed. **Editorial El Manual Moderno** México, D. F.

GONZALEZ, V.D. 1976. Respuesta serológica a la vacunación antirrábica con cachorros Beagle de diferentes edades procedentes de madres vacunadas y no vacunadas. Tesis Profesional FMVZ-UNAM, México, D. F.

GONZALEZ, D., BATALLA, D. y GONZALEZ, J. 1982. Inocuidad y respuesta serológica a la vacuna antirrábica V-319/Acatlán en gato doméstico a los 30, 60, 90, 240 y 365 días posvacunación. **Téc. Pec. Méx.**, 42:74.

HERNANDEZ, E.M. 1976. Boletín sobre la rabia paralítica INIP-SAG. México, D. F.

HERNANDEZ, B.E., CAMPOS, V.J., SAGARDIA, R.J., SANCHEZ, A. y RAMSDEN, R., 1976. Prueba de extinción antigénica de la vacuna V-319/Acatlán contra el derriengue en bovinos desafiados al año de vacunación. Memorias de la XIII Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México, D. F.

HERNANDEZ, H.G., 1977. Inocuidad y respuesta antigénica de la vacuna antirrábica V-319/en perros. Tesis Profesional FMVZ-UNAM, México, D. F.

ISHAZAKA, K., 1972. Immunological diseases, 2a. Ed. **Editorial Blackwell Scientific Public** p. 385.

KEITH, S.R. 1982. Rabia, epidemiología, diagnóstico, vacunación y tratamiento en el hombre. **La Prensa Médica Mexicana**, p. 195.

KISSLING, A., 1958. Growth of rabies virus in non nervous tissue culture. **Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.** p.98.

KOPROWSKI, H., and COX, H.R., 1948. Studies on chinchilla embryo adapted rabies virus. **J. Immunology** 60:533.

KOPROWSKI, H., 1976. Prueba de incubación en ratón. Técnicas de laboratorio en rabia. 3a. edición. OMS. Ginebra, Suiza.

LOPEZ, B.B., 1974. Inmunogenicidad de las cepas: Era (bajo pasaje), Era (alto pasaje), V-319 y Mazatlán 558 adaptadas a cultivos celulares en ratones albinos suizo adultos. Tesis Profesional FMVZ-UNAM. México, D. F.

MATTHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. **Intervirology, Editorial Karger Medical and Scientific Publishers.** 17 (1-3):109.

PASTEUR, L., 1882. Lettre sur la rage. **C.R. Acad. Sc.** 95:1087.

PEREZ, R.H., GONZALEZ, D., FERNANDEZ, M., HERNANDEZ, E., OROS, D., MARTELL, M., GARCIA, F., 1981. Inmunidad provocada por la cepa V-319/Acatlán en perros a los 30 meses de la vacunación. **Téc. Pec. Méx.**, 41:76.

ROITT, I., 1980. Essential immunology. Fourth edition. **Editorial Blackwell Scientific Publication.** p. 221.

ROSE, R.N., MILGROM, F., VAN OSS, C.J., 1979. Principios de inmunología 2a. edición, **Editorial C.E.C.S.A.** México, D. F.

SAGARDIA, J., HERNANDEZ, E., GONZALEZ, D., FERNANDEZ, M., PEREZ, H. Duración de la inmunidad conferida por la vacuna V-319/Acatlán contra la rabia en perros con desafío a un año de la vacunación. **Téc. Pec. Méx.** 43:87.

STEEL, H. J. 1976. Nuevos conceptos sobre la epidemiología y control de la rabia. Memorias del 1er. Seminario Internacional de la rabia para las Américas. B. Aires, Argentina.