

## EVALUACION DE LA ANTIGENICIDAD DE UNA VACUNA ANTIRRABICA CONCENTRADA a

Elizabeth Loza-Rubio b  
Eliseo Hernández Baumgarten c

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener una vacuna antirrábica de elevada antigenicidad, para su posterior uso en humanos. Se elaboraron cuatro lotes de cosechado de virus rábico con la cepa V-319/Acatlán, que se inactivaron mediante radiación gamma y se concentraron usando acetato de zinc. Cada lote se subdividió en dos, quedando: 1A vacuna concentrada dializada con adyuvante, 2A vacuna concentrada dializada sin adyuvante, 3A vacuna concentrada sin dializar con adyuvante, 4A vacuna concentrada sin dializar sin adyuvante y sus respectivos testigos negativos (b) que se emplearon sin concentrar, así como, sobrenadantes de células sin concentrar y no inoculadas (C). La antigenicidad de cada sublote se evaluó mediante la técnica de NIH. Al realizar el estudio estadístico, se encontró que las vacunas concentradas presentaron una antigenicidad más elevada, con respecto a sus controles ( $p < 0.05$ ). Se concluye que el método empleado para concentrar esta vacuna es adecuado, ya que eleva su antigenicidad.

PALABRAS CLAVE: Vacuna antirrábica concentrada, Prueba de potencia, NIH.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 33 No. 2 (1995)

### INTRODUCCION.

En Julio de 1885, Pasteur realizó el primer tratamiento con virus rábico en una persona mordida por un perro rabioso, Joseph Meister no sólo no enfermó de rabia, sino que además no presentó complicaciones ulteriores al tratamiento (1, 2). En más de un siglo de experiencia acumulada, la vacunación antirrábica posexposición ha sufrido numerosos cambios en la vacuna, pero el esquema de inmunización ha sufrido pocas modificaciones. En los años de uso de la vacunación profiláctica se han observado tanto fallas (personas que aún con el tratamiento después de la exposición mueren de rabia), como complicaciones posvacunales (3).

La mejor forma de evitar la rabia en humanos, consiste en vacunar perros y gatos para eliminar la rabia en estos animales, como riesgo de contagio para el humano (4). Desde este punto de vista, se

continúa la búsqueda de antígenos lo más puros posibles, que generen una buena respuesta inmune y que además sea duradera y específica (5). Con las vacunas se ha logrado esto, por medio de los métodos de producción en cultivos celulares (6); sin embargo, frecuentemente el virus rábico es un antígeno pobre en las vacunas inactivadas; por ello, es importante asegurarse que una vacuna para uso en campañas antirrábicas, contenga una gran cantidad de antígeno (7).

En México, los ensayos para concentrar antígeno de virus rábico han sido escasos; en 1982, se intentó hacer una vacuna antirrábica inactivada concentrada, pero los resultados no fueron satisfactorios (8); en estos estudios se empleó una cepa de origen vampiro (V-319/Acatlán) (9). En países donde existe la rabia paralítica bovina o derriengue, cada vez es mayor el número de personas agredidas por quirópteros (10).

Las pruebas de potencia de Habel y del NIH están lejos de reproducir las condiciones de la exposición natural, así como la pauta ordinaria en administración de la vacuna; sin embargo, estas pruebas dan una buena

a Recibido para su publicación el 5 de Septiembre de 1994.

b Proyecto. Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Microbiología Veterinaria. Carr. Federal México Toluca km. 15.5, Col. Paio Alto. CP. 05110. México D.F.

c Unidad de Posgrado. FES-Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

idea de la actividad protectora de una vacuna en condiciones naturales (7). La prueba del NIH, es la técnica oficial de actividad *in vivo* para probar la potencia de vacunas elaboradas a partir de cultivos celulares y de vacunas preparadas con virus purificados (7, 11).

Dada la necesidad de tener una cepa nativa, con alto título viral, para poblaciones donde a veces la respuesta inmune no es suficiente, como pudiera suceder en primates y humanos, se desarrollo este estudio, cuyo objetivo fue obtener una vacuna antirrábica de elevada antigenicidad, para posteriormente emplearla en humanos.

## MATERIALES Y METODOS

Este experimento se condujo en cuatro fases:

**FASE I.** Elaboración del cosechado de virus rábico.

Se subcultivaron células línea BHK-21, hasta obtener monoestratos confluentes en roladores de botellas, las cuales se infectaron con la cepa V/319-Acatlán (de origen vampiro) (10), posteriormente se les agregó medio de mantenimiento. Con la cosecha se elaboraron cuatro lotes de vacuna; para lo cual, se estandarizaron las condiciones de trabajo, empleando los mismos medios, tiempo y temperatura de incubación e infección, así como velocidad de rotación de los cultivos. Cada uno de los lotes que se elaboraron incluyeron dos botellas testigo con monoestratos no inoculados (13).

**FASE II.** Concentración del antígeno de virus rábico.

Cada lote se inactivó empleando el método de radiación gamma (14), el virus se precipitó con solución saturada de acetato de zinc al 1 M en proporción 5:1.

La mezcla se mantuvo en refrigeración (4 C+/-1 C) durante toda la noche.

Luego se centrifugó durante 60 min a 2,500 g; a la pastilla formada se le resuspendió con ácido etilendiaminotetra-acético al 17.5%, en un volumen de 1.25% del original (15, 16); todo lo anterior siguiendo los requerimientos mínimos que marca la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) (17), para la elaboración de productos biológicos.

Cada lote se subdividió en dos, quedando de la siguiente manera: 1 A Vacuna concentrada dializada con adyuvante (FAS-16); 2 A vacuna concentrada dializada sin adyuvante; 3 A vacuna concentrada sin dializar con adyuvante y 4 A vacuna concentrada sin dializar sin adyuvante. Los controles B se emplearon sin concentrar, pero con los cuatro tratamientos que se les dió a las concentradas. Asimismo, se incluyó una serie C que usó el medio sobrenadante de células sin inocular, expuestas a los cuatro tratamientos anteriores.

**FASE III.** Evaluación de la antigenicidad mediante la prueba del NIH.

A cada uno de los lotes se aplicó la prueba de NIH en ratones, según el método descrito por Seligmann E B Jr en 1973 (7). El virus estándar fijo (CVS), empleado para el desafío tuvo 17 dosis letales para todos los lotes.

El desafío de cada grupo de lotes se hizo simultáneamente, a fin de poder comparar los resultados; además se realizaron cuatro repeticiones por lote de manera independiente; los resultados se procesaron mediante análisis de varianza (19).

## RESULTADOS

Al realizar el análisis estadístico, se encontró que las vacunas concentradas (a) tuvieron una antigenicidad más elevada con respecto a los testigos sin concentrar, (B9 con una confianza del 95%) ( $p < 0.05$ ); al realizar la prueba de Tukey (19), para ver

sí había diferencias entre tratamientos (a) no se encontró evidencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) para asegurar que son diferentes (Cuadro 1). La Gráfica 1, indica los promedios representados en potencia relativa (PR), obtenidos de las cuatro repeticiones en cada uno de los tratamientos de las vacunas concentradas y sin concentrar; en ella, puede observarse el aumento que presentan las primeras (A) sobre los testigos (B). Por lo que respecta al testigo sin infectar y sin concentrar (c), al realizar el desafío todos los ratones murieron, como era de esperarse.

## DISCUSION

Con base en lo anterior, puede decirse que la técnica de concentración empleada en este experimento, es apropiada ya que no se requiere de gran tecnología y la antigenicidad que se obtiene en cada uno de los tratamientos es superior a cuando éstos mismos se aplicaron sin concentrar. Sin embargo, es recomendable usar el método de diálisis para liberar a la vacuna concentrada de los efectos indeseados que las sales presentan sobre los ratones usados en la prueba del NIH.

En esta fase, no se valoró la inocuidad debido a que la vacunación es intraperitoneal y se requería de sacrificar a los ratones a diferentes tiempos, para analizar la peritonitis.

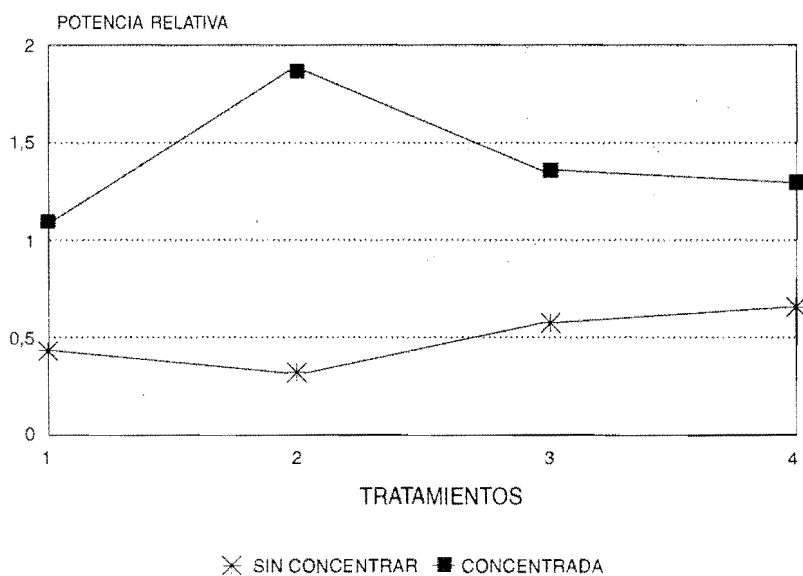
Si bien la técnica de NIH, ha probado a lo largo del tiempo su utilidad para dar una idea de la inmunogenicidad de vacunas elaboradas a partir de cultivos celulares y de vacunas preparadas con virus purificados (7, 11); en la actualidad, la tendencia es probar las vacunas en el usuario final (especie blanco), ya que por ejemplo en perros, se vacuna una sola vez al año y se espera que la protección dure 12 meses o más; en cambio, en ratones se aplican seis dosis de vacuna los días lunes, miércoles y viernes durante dos semanas, y al siguiente lunes se realiza el desafío (7), por lo que la acción del adyuvante FAS-16, de fijar al antígeno en el sitio de la vacunación y liberarlo poco a poco para que la estimulación antigénica sea más prolongada (18, 20), pudo haber quedado enmascarada. (Eliseo Hernández B. 1993 comunicación personal). Por otra parte, la prohibición de agregar adyuvantes en vacunas antirrábicas humanas, se deriva del peligro de causar encefalitis alérgica y desmielinización del sistema nervioso

**CUADRO 1**  
ANTIGENICIDAD PRESENTADA POR LAS VACUNAS ANTIRRABICAS  
CONCENTRADAS

TRATAMIENTOS							
1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B
1.39*	2.95*	1.53*	1.005*	0.9	0.16	0.7	0.85
0.68*	1.34*	1.13*	1.34*	0.43	0.01	0.65	0.61
1.25*	1.42*	1.47*	1.33*	0.43	0.89	0.67	0.79
1.38*	1.80*	1.46*	1.45*	0.08	0.30	0.16	0.18
$\bar{X}$ 1.17*	1.87*	1.39*	1.28*	0.46	0.34	0.54	0.60

\* Estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ )  
Expresado en potencia relativa

**GRAFICA 1**  
**PROMEDIO DE POTENCIA RELATIVA DE LOS TRATAMIENTOS.**



central, lo cual no aplica a las vacunas producidas en cultivos celulares.

Se recomienda continuar con este tipo de experimentos, orientados a realizar pruebas de inocuidad en primates por varias vías, así como reemplazar la línea celular BHK-21 por alguna línea autorizada para ser empleada en humanos.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al MC. Víctor Manuel Banda Ruiz, por su asistencia en el manejo del programa de cómputo.

### EXPERIMENTAL CONCENTRATION AND ANTIGENICITY EVALUATION OF A RABIES VACCINE.

#### SUMMARY

In an attempt to develop a rabies vaccine with elevated antigenicity, for use in human beings, four batches of rabies vaccine were elaborated with the V-319/Acatlán strain rabies virus. Zinc acetate was used to concentrate the virus. Each batch was divided in two parts: 1 A, concentrated and dialized vaccine with adjuvant; 2 A, concentrated and dialized vaccine without adjuvant; 3 A, concentrated vaccine non-dialized but with adjuvant; 4 A, concentrated vaccine non-dialized without adjuvant and their respective negative controls (B); and unconcentrated non infected cell supernatant (C). Antigenicity of each vaccine lot was evaluated by the NIH method. The results show that all concentrated vaccines were better than unconcentrated ones ( $p < 0.05$ ) This method is adequate to increase the antigenicity of this product.

KEY WORDS: Antirrabies concentrated vaccine, Potency test, NIH.

## REFERENCIAS

1. Carpenter P. Microbiología. México: Interamericana, 1982:225.
2. Silva M. Infección accidental de rabia en el hombre. Salud Pública de México. 1974;16 (3) 429.
3. Fuenzalida R L, Palacios V H R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirrábica. Bol. Inst. Bact. Chile. 1955; 8:3.
4. Batalla C D. Prevención y control de la Rabia en humanos y otras Especies. En: Morilla G A (ed). Inmunología Veterinaria. 1989:397-428.
5. Hernández B E, Morales R J, Arellano S C, Campos V J, López B B, Pérez R H. Evaluación de una vacuna comercial antirrábica inactivada para bovinos, producida en cultivo de tejidos (Alurabiffa): Duración de la inmunidad con desafío a tres años. Téc. Pecu. Méx. 1976; 30:57.
6. Brown A, Merry L, Brechenhaver C. Modified live virus rabies vaccine produced from Flury high embryo passage virus grown on a stablished canine kidney cell line: Three years duration immunity study in dogs. Am. J. Vet. Res. 1975; 34:1427.
7. Seligmann E B Jr. NIH test. In: Kaplan M M, Koprowski H (eds). Laboratory Technics in Rabies. Switzerland 1973: 294-302.
8. Anaya D R, Hernández B O, Hernández D E. Concentración de antígeno del virus rábico producido en cultivos celulares para desarrollar una vacuna inactivada. Reunión de Investigación Pecuaria en México. México D.F. 1982:81.
9. Bijlenga C, Hernández B E. Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies virus isolate (V-319) from a vampire bat (*Desmodus rotundus*). Cornell Vet. 1980; 70:290.
10. Flores-Crespo R. Rabia en humanos transmitida por murciélagos vampiros en países de América. Téc. Pecu. Méx. 1991; 29 (1) 25.
11. Ferguson M, Schild C G. Current status of rabies vaccine potency testing. In: Kuwert E, Merieux C, Koprowski H, Bögel K (eds). Rabies in the tropics. Germany 1985: 305-311.
12. Hernández B E. Vacuna antirrábica de origen murciélagos vampiro, cepa V-319/Acatlán para proteger al ganado bovino contra la rabia pareasiente en México. Boletín informativo. INIP. 1976.
13. Rentería F J, Hernández B E. Evaluación de la producción de la vacuna antirrábica V-319/Acatlán producida en cultivo celular de pase bajo y cultivo celular en pase alto, empleando la línea 13 Sci-7. Téc. Pecu. Méx. 1985; 48:30.
14. Weimersheimer R J, Loza R E. Desarrollo de un método de inactivación a base de radiación gamma, para la vacuna antirrábica V-319/Acatlán. Avances en Ciencias Veterinarias. 1991; 6:70.
15. Loza R E, Hernández B E. Concentración de antígeno de virus rábico producido en cultivo celular como apoyo para la técnica de Contraímmunoelectroforesis (CIE). Téc. Pecu. Méx. 1988; 26 (3) 267.
16. Loza R E, Mejía S P, Hernández B E. Veliación, un antígeno de virus rábico concentrado para la técnica de Inmunolectroforesis por Contracorriente. Folleto de Investigación N° 1. INIFAP-SARH. México D.F. 1993.
17. Dirección General de Sanidad Animal. Requerimientos Mínimos de calidad que deberán llenar los productos biológicos para uso veterinario. SARH. B-6. 1977.
18. Organización Mundial de la Salud. Coadyuvantes inmunológicos. serie de informes técnicos NI 595. Suiza. O. P. S. 1976:7.
19. Steel R G D, Torrie J H. Bioestadística: Principios y Procedimientos 2a ed. México:Mc Graw Hill, 1988:621.
20. Vanselow BA. The application of the adjuvants to veterinary medicine. Vet. Bull. 1987; 57:881.