

# **Alternativa para inactivar vacunas antirrábicas, usando radiación gamma (Co-60)**

José E. Weimersheimer Rubí\*  
Elizabeth Loza Rubio\*

---

## **Abstract**

The objective of the following study was to determine the adequate doses of gamma radiation to inactivate a very common rabies vaccine used in Mexico (V-319 Acatlán strain), without damaging its antigenic capabilities and determining its stability and shelf life. The vaccine titre before irradiation was 10 7.3 LD 50% x ml in suckling mice. The vaccine was irradiated with four different levels of gamma radiation (Co-60) to inactivate the virus. Immunogenicity was tested with the US National Hygiene Institute (NIH) test, and complete inactivation was controlled inoculating the vaccine intracerebrally in 3 day suckling mice. The vaccine was tested with FAS 16 adjuvant and without it. With 3.5 Kgy, the relative potency was 4.189 U.I., and 8 out of 16 suckling mice died. With 5.8 Kgy it was 4.093 U.I., and two mice out of the 16 inoculated died; with 8.4 Kgy it was 3.141 U.I., and neither of the 16 inoculated mice died. With 9.3 Kgy it was 0.952 U.I., and the mice did not die but the titre was not sufficient according to the Mexican Federal Regulations. The vaccine without the adjuvant provided very low immunogenicity. Antigenic stability variation did not affect the level of immunogenicity. The titre was always according to the WHO and the Mexican requirements, except with the dose of 9.3 Kgy of gamma radiation (Co-60). Total inactivation of the vaccine was achieved with 8.4 Kgy of radiation dose, and it provided a good level of protection (3.141 U.I.). Shelf life of this inactivated vaccine maintains a protection level above the required by the Mexican regulation (1.0 U.I.) even at 720 days of storage at 4°C.

**KEY WORDS:** RABIES VIRUS, VACCINE, GAMMA RADIATION, STABILITY, SHELF LIFE.

## **Resumen**

El objetivo de este trabajo fue encontrar la dosis adecuada de radiación gamma (Co-60) para inactivar una vacuna veterinaria antirrábica de uso común en México, sin dañar su capacidad antigenica. Además se determinó la participación de un adyuvante hecho a partir de saponinas, así como su estabilidad y caducidad. Para ello, se irradió un lote de vacuna antirrábica con un título de 10 7.3 DL 50% en ratón lactante que se expuso a diferentes dosis de radiación: 3.5 ; 5.8; 8.4 y 9.3 Kilograys (Kgy). Se realizó la prueba de inocuidad a cada sublote irradiado. La protección inferida se determinó mediante la prueba del Instituto Nacional de Higiene, de los Estados Unidos de América (NIH). La mejor dosis fue de 8.4 Kgy donde la protección fue de 3.141 UI, y en la prueba de inocuidad no se presentó mortalidad en ratones lactantes. La respuesta fue estadísticamente mejor ( $P<0.05$ ) cuando se adicionó adyuvante. La estabilidad entre sublotes tuvo una variación mínima en los títulos obtenidos por la prueba de NIH. Por lo que concierne a la caducidad, el biológico indujo una buena inmunidad ( $x$  1.20 U.I) hasta los 720 días. Se concluye que la radiación gamma es una buena alternativa para inactivar vacunas antirrábicas, ya que a 8.4 Kgy conservan todas sus propiedades en cuanto a potencia, inocuidad, estabilidad y caducidad de un buen inmunógeno.

**PALABRAS CLAVE:** RABIA, VIRUS, VACUNA, RADIACION GAMMA, ESTABILIDAD, CADUCIDAD.

---

Recibido el 11 de septiembre de 1998 y aceptado el 21 de abril de 1999.

\*Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Carretera México-Toluca, km 15.5, C.P. 05110, México, D.F. Correo electrónico:  
weimer@micro.inifap.conacyt.mx

## Introducción

La vacunación masiva contra la rabia en diferentes especies es todavía altamente recomendada por la Organización Mundial de la Salud, como una de las contribuciones más importantes respecto del control de este padecimiento.<sup>1,2</sup>

Las presentaciones comerciales de vacunas antirrábicas son de virus vivo modificado y de virus inactivado<sup>3</sup>. Estas últimas ofrecen un manejo más fácil y mayor seguridad en el ámbito rural, por ser más estables a variaciones de temperatura y a la exposición solar<sup>4</sup>. Cabe mencionar que las vacunas de tipo inactivado no requieren de el proceso de liofilización, lo que facilita su producción.<sup>5</sup>

Dichos biológicos inactivados poseen una buena capacidad antigenica si el título viral o la masa antigenica es la adecuada, usando un adyuvante que sea inocuo y favorezca en buena forma el contacto antígeno-anticuerpo. Una premisa importante en el producto inactivante es que no debe destruir la conformación antigenica viral, ya que fácilmente se puede llegar a la destrucción viral debido a sobreexposición, o dejar virus activo dentro del biológico por una exposición insuficiente, pudiendo tener algunas consecuencias con virus no suficientemente fijos,<sup>4,6</sup> implicando la probabilidad de su difusión.

Se han utilizado varios agentes inactivantes para los biológicos de origen viral, desde solución salina fisiológica fenolizada, la cual actualmente no se utiliza debido a que aunque se emplee a la dosis adecuada, produce cierta destrucción viral. También se ha utilizado la  $\beta$ -propiolactona como agente inactivante, a ésta se le han encontrado algunos inconvenientes,<sup>7</sup> como el que puede provocar oncogénesis por hidrólisis deficiente o mala dosificación, requiere rigurosa congelación para su almacenamiento, su titulación es laboriosa, y se debe hacer cada vez que se descongele el producto inactivante. Recientemente se ha usado la radiación gamma (Co-60) para la esterilización de diferentes productos farmacéuticos, cosméticos, y sueros entre otros; asimismo, para inactivar diferentes biológicos tanto bacterianos como virales, sin que hasta la fecha se hayan notificado efectos indeseables, siendo un proceso rápido.<sup>8,9,10,11,12,13</sup>

Con el marco anterior, el objetivo de este trabajo fue encontrar la dosis adecuada de radiación gamma (Co-60) para inactivar una vacuna veterinaria antirrábica (V/319 Acatlán) de uso común en México, sin dañar su capacidad antigenica. Además se determinó la participación de un adyuvante de índole comercial (FAS 16), así como la estabilidad y caducidad del biológico en estudio.

Irradiador Gamma Cell-500 con fuente de Co-60 de 30 Kci de actividad inicial y capacidad de 801.

\*\* Fort Dodge, Sevilla 821, Colonia Portales, 03300, México, D.F.

## Material y Métodos

### Elaboración del biológico e irradiación

Se elaboró un lote de vacuna antirrábica (V/319 Acatlán) de uso común en biológicos veterinarios en México,<sup>14</sup> se obtuvo un título de  $10^{7.3}$  DL 50% en ratón lactante. Este producto se subdividió en sublotes que fueron expuestos a diferentes dosis de radiación gamma: 3.5, 5.8, 8.4, y 9.3 Kgy. Cabe mencionar que el irradiador\*, después de suspender la producción de energía la sigue liberando por algunos momentos, por lo que en este proceso hay siempre una pequeña fluctuación en la dosis; en este caso se tomó el rango mayor de cada dosis evaluada.

### Prueba de inocuidad

A cada sublote se le realizó la prueba de inocuidad, se inocularon 16 ratones lactantes con 0.02 ml de vacuna por vía intracerebral, éstos fueron observados durante un periodo de 21 días.<sup>15</sup> Esta prueba dio la pauta para determinar la mejor dosis de radiación gamma, eligiéndose la que no produjese la muerte a los animales inoculados, así como la que presentó una potencia relativa igual o mayor a 1.0 U.I.<sup>7</sup>

### Prueba de potencia

La protección inferida se determinó usando la prueba del Instituto Nacional de Higiene (NIH) de Estados Unidos de América.<sup>14, 15</sup> Se probó la utilidad del adyuvante comercial FAS-16, usándose según lo recomienda el laboratorio productor<sup>\*\*</sup>; para determinar su utilidad se realizó la prueba "t" de Student con una confianza del 95%.<sup>16</sup>

### Estabilidad

La estabilidad o grado de variación de esta vacuna se evalúo en siete sublotes de la vacuna inactivada que presentó la dosis adecuada para este inmunógeno. Su potencia se cuantificó empleando la prueba de NIH<sup>14,15</sup>, en un tiempo no mayor a los 30 días, con mantenimiento a 4°C. Los resultados obtenidos en este experimento se sometieron a una prueba de Ji-cuadrada<sup>16</sup> para determinar su grado de variabilidad.

### Caducidad

Se estableció por la prueba de NIH a los días 0, 15, 30, 60, 90, 180, 360, 390, 450 y 720 días. Durante este periodo la vacuna irradiada se mantuvo en refrigeración (4-8°C).<sup>17</sup>

## Resultados

En el Cuadro 1 pueden observarse los resultados

obtenidos con las cuatro diferentes dosis de radiación gamma empleadas. Asimismo, puede notarse que cuando a la vacuna se le adicionó el adyuvante FAS-16 hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ), con respecto al biológico sin dicho adyuvante. En cuanto a la prueba de inocuidad, las dosis de 3.5 y 5.8 Kgy no fueron eficientes para la inactivación, pues algunos animales murieron con signos de la enfermedad, en cambio a 8.4 y 9.3 Kgy todos los ratones sobrevivieron; sin embargo, a 8.4 Kgy se consideró la dosis adecuada, puesto que además de tener buena inocuidad presentó 3.141 UI de protección.

En la Figura 1 se aprecian los resultados en UI de la estabilidad de los siete sublotes que se evaluaron. Mediante la prueba estadística se encontró que no existió diferencia significativa entre sublotes ( $P<0.05$ ). La Figura 2 muestra las UI que se obtuvieron en las diferentes fechas en que la caducidad fue evaluada; a los 720 días el biológico conserva todavía una protección adecuada (1.2 UI).

## Discusión

Se obtuvo que la mejor dosis para inactivar el biológico contra rabia conservando las propiedades adecuadas fue a 8.4 Kgy, esta dosis es más alta que la empleada para vacunas de lengua azul, en la cual 2.5 Kgy han sido suficientes para una adecuada inactivación.<sup>18</sup> Asimismo, ha ocurrido con el virus de Aujeszky en donde la radiación gamma actuó como un buen inactivante tanto *in vitro* (cultivo celular), como *in vivo* (conejos).<sup>19</sup>

Se han realizado también ensayos con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) presente en médula ósea, y se determinó que a dosis de 20 Kgy no se destruía completamente; sin embargo, cuando la médula se irradia puede ser empleada para trasplantes sin riesgo de transmisión.<sup>20</sup> Esta dosis varía cuando se trata del virus de hepatitis C que necesita 17 Kgy para poder ser inactivado en tejidos.<sup>21</sup>

Cuadro 1

**POTENCIA RELATIVA EN UI DE CADA SUBLOTE DE VACUNA ANTIRRÁBICA CON Y SIN ADYUVANTE Y PRUEBA DE INOCUIDAD**

Tratamiento	Vacuna irradiada s/adyuvante*	Vacuna irradiada c/adyuvante*	Prueba de inocuidad
3.5 Kgy	0.035 <sup>a</sup>	4.189 U.I. <sup>b</sup>	** 8/16 ***
5.8 Kgy	0.042 <sup>a</sup>	4.093 U.I. <sup>b</sup>	2/16
8.4 Kgy	0.060 <sup>a</sup>	3.141 U.I. <sup>b</sup>	0/16
9.3 Kgy	0.056 <sup>a</sup>	0.952 U.I. <sup>b</sup>	0/16

Valores con diferente literal son estadísticamente diferentes ( $P<0.05$ ).

\* 1.0 Unidad Internacional de protección (mínimo requerido por la Norma Oficial Mexicana, 1996)

\*\* Animales muertos.

\*\*\* Animales inoculados

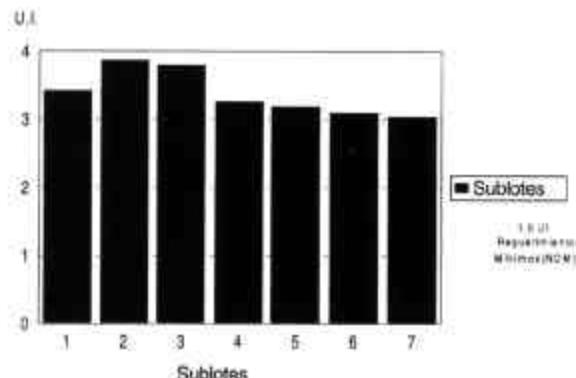


Figura 1. Estabilidad de la vacuna antirrábica inactivada con radiación gamma.

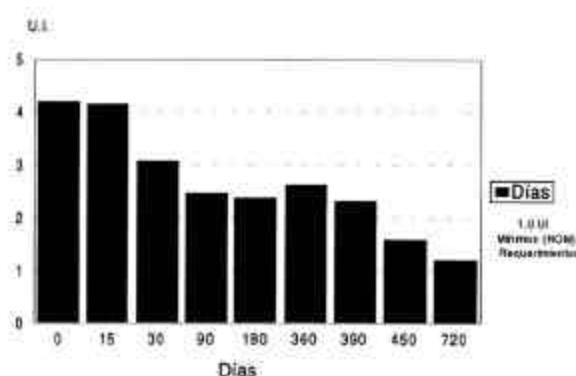


Figura 2. Caducidad de una vacuna antirrábica inactivada con radiación gamma.

Las diferencias entre las dosis empleadas, puede explicarse por los cambios en el genoma de cada uno de los virus, pues la forma de acción de las radiaciones ionizantes provenientes de emisiones gamma resultan generalmente en la ruptura del esqueleto de los enlaces fosfodiéster presentes, en este caso en el ARN. De esta manera genes enteros pueden ser inactivados debido a cambios en la secuencia de bases.<sup>22</sup>

Respecto de la estabilidad, tomando en cuenta que es una vacuna inactivada, el inmunógeno antirrábico irradiado presentó una adecuada estabilidad entre los sublotes evaluados; es decir, la radiación inactivó de manera semejante a cada uno de ellos, por lo que no se corre el riesgo de que algún sublote produzca una adecuada protección y los otros no.

En cuanto a la caducidad, el biológico en estudio mantuvo una potencia de 1.2 UI a los 720 días, conservando una protección superior a lo estipulado en los requerimientos mínimos indicados por la Norma Oficial Mexicana.<sup>23</sup> Mostró una caducidad similar a una vacuna antirrábica inactivada con  $\beta$ -propiolactona,<sup>24</sup> la cual mantiene su protección alrededor de dos años. Además, se hace patente la importancia de adicionar un adyuvante a las vacunas inactivadas, con el propósito de potenciar la respuesta inmune del agente primario, pues la vacuna irradiada con adyuvante mejoró notablemente su efecto.

## Agradecimientos

Se agradece al ININ (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Unidad de Radiación Gamma) por su participación en la inactivación del biológico en estudio.

## Referencias

1. López MS, Uribe JG, Ruíz MC, Tapia CR. Panorama epidemiológico de las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria en México. *Enf Infec Microbiol* 1995;15:76-88.
2. Atanasiu P. Interferón y vacunación antirrábica. *Salud Pública Méx* 1982;24:123-128.
3. Hernández BE. La rabia paresiente bovina; definición del problema y metodología de control. *Cienc Vet* 1976;1:104-156.
4. Cunha RG, Silva RA, Silva NM. Effect of stabilizer on the esin tenence of the immunizing potency of an inactivated antirrabies vaccine. *Rev Bras Biol* 1977;37:345-350.
5. Weimersheimer RJ, Rentería FJ, Batalla CD. Respuesta inmunológica a 360 días conferida por la cepa V-319 Acatlán, inactivada en borrego Pelibuey. *Téc Pecu Méx* 1987;25:238-242.
6. Brodorotti HSV, Manhel H. Inactivation of viruses and bacteria in sewage sludge by gamma radiation. *Zentbl Bakt Parasit (Abt I)* 1980;1708:71-78.
7. Peterman HG, Sobleboy JP, Lang-Branche R. Vaccination against rabies of carnivores and herbivores with an inactivated vaccine produced in tissue culture. *Boll Soc Sci Vet Méd Comp Lyon* 1971;73:123.
8. Bartocze MJ, Roszkowski M. The effect of ionizing radiation in the course of Aujezsky disease virus infection in mice. *Bull Vet Inst* 1978;22:63-69.
9. Jordan RT, Kempe IL. Inactivation of some animal viruses with gamma radiation from cobalt. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;6:212-215.
10. Larghi OP, Saw OP, Nevel AE, Rodríguez A. Ethylenimine propiolactone inactivated rabies vaccine of tissue culture origin. *J Clin Microbiol* 1976;3:26-29.
11. Rentería FJ, Weimersheimer RJ, Batalla CD. Respuesta inmunológica en bovinos conferida por la cepa V-319 Acatlán inactivada, con influencia de la edad al momento de la vacunación. *Téc Pecu Méx* 1987;25:383-386.
12. Fernández MJ. Current experience of calibration of radiators in Cuba. *Radiat Phys Chem* 1990;35:826-827.
13. Organización Mundial de la Salud. Bases técnicas para la legislación referente a los alimentos irradiados. Informe de un comité mixto FAO-OIEA-OMS, de expertos. Serie de informes técnicos 1996 N° 316, Ginebra, Suiza: FAO-OIEA -OMS, 1996.
14. Loza-Rubio E, Hernández BE. Evaluación de la antigenicidad de una vacuna antirrábica concentrada. *Téc Pecu Méx* 1995;33:87-97.
15. Koprowski H. Prueba de inoculación al ratón. En: Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Técnicas de laboratorio en rabia*. 3<sup>a</sup> ed. Ginebra, Suiza: OMS, 1976:86.
16. Steel RGD, Torrie JH. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2<sup>a</sup> ed. México (DF): McGraw-Hill; 1988:621-624.
17. Weimersheimer RJE, Loza-Rubio E. Caducidad de una vacuna antirrábica inactivada con radiación gamma (Cobalto 60). *Téc Pecu Méx* 1996;34:172-174.
18. Zhihua L, Kegao P, KhaiLi Z, Gen L, Yuling H, FuZhong Z, et al. Development of inactivated vaccines for bluetongue in China. Proceedings of the 1<sup>st</sup> Southeast Asia and Pacific Regional Bluetongue Symposium; 1996 August 22-24; Canberra, Australia. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 1996:227-230.
19. Ulbrich F. Antigenic effect of Aujeszky's virus after inactivation by gamma irradiation. *Arch Exp Vet* 1988;42:254-260.
20. Fideler BM, Vangness CT Jr, Moore T, Li-ZE, Rasheed S. Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone patellar ligament bone grafts obtained from infected cadavera. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:1032-1035.
21. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM. Transmission of the hepatitis C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:214-224.
22. Stryer L. *Bioquímica*. 4<sup>a</sup> ed. México (DF): Reverté S.A., 1996.
23. Norma Oficial Mexicana. NOM-035-ZOO-1996. Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la rabia en las especies domésticas. Diario Oficial de la Federación. Segunda sección. México (DF). 26 junio 1996;1:10.
24. Rentería FJ, Weimersheimer RJE, Hernández BO, Hernández BE. Avances en el desarrollo de una vacuna antirrábica elaborada con la cepa V-319/Acatlán inactivada con β-propiolactona. *Téc Pecu Méx* 1985;49:143-147.