

Determinación de la extinción antigénica de la vacuna V-319 Acatlán virus vivo atenuado en ovinos

Antigenic extinction of the V-319 Acatlan modified live virus rabies vaccine in sheeps

José E. Weimersheimer Rubí^a, Diódoro Batalla Campero^b, Sandra Cuevas Romero^a,
Dante González Salazar^b

RESUMEN

El objetivo fue determinar el título necesario de la vacuna V-319 Acatlán para proteger a los ovinos contra la rabia en zonas endémicas. Se utilizaron cinco borregos por grupo con los siguientes títulos virales: Grupo A $10^{4.0}$, B $10^{5.1}$ y C $10^{6.19}$ DL₅₀ por dosis vacunal; el Grupo D se dejó como testigo negativo. Los sangrados fueron a los 0, 15, 30, 60, 90, 180 y 360 días. Se utilizó la prueba de seroneutralización para determinar los títulos de anticuerpos. Para el desafío se utilizó la cepa de rabia CASS-88, de origen vampiro con un título de $7.7 \times 10^{6.0}$ DL₈₀ en ratón, utilizándose nueve borregos negativos a rabia como testigo positivo. Los resultados demostraron que la vacuna V-319 Acatlán, virus vivo atenuado estimuló un buen título de anticuerpos hasta los 360 días, ya que el grupo C presentó una media de 1.10 UI de protección, a los 15 días de 1.42 UI, a los 30 días 5.28, 60 días 3.87, 90 días 2.0, 180 días 1.59 y a 360 días 1.10 UI. En los Grupos A y B se detectaron anticuerpos hasta los 90 y 180 días post vacunación, por lo cual no fueron desafiados. Al desafío sobrevivieron 4 de 5 animales vacunados del grupo C (80 %) y el grupo testigo positivo murieron 8 de 9 animales (88.9 %). El grupo D fue negativo. Se concluye que la vacuna V-319 Acatlán, con un título de $10^{6.19}$ DL₅₀ por dosis, protege a los borregos hasta por 360 días, según lo establece la Norma Oficial Mexicana (NOM-35-ZOO-1996).

PALABRAS CLAVE: Rabia, Ovinos, Vacuna, Título, Anticuerpos, Desafío.

ABSTRACT

In order to obtain the required titer for the V-319 Acatlan live virus vaccine necessary to protect sheep against rabies in endemic areas, five Rambouillet cross bred lambs per group were vaccinated in accordance with the following viral titers: Group A $10^{4.0}$, Group B $10^{5.1}$ and Group C $10^{6.19}$ LD₅₀ per dose. Five lambs (Group D) were not vaccinated and used as negative control. Blood samples were taken at 0, 15, 30, 60, 90, 180 and 360 d post vaccination. Antibody titers were obtained by means of a serum neutralization test. Nine rabies negative lambs were used as positive control for the CASS-88 challenge strain of vampire origin with a $7.7 \times 10^{6.0}$ LD₈₀ in mice titer. Results show that the modified V-319 Acatlán live virus vaccine produced good protection to Group C up to 360 d post vaccination, with an average 1.10 IU protection at 15 d, 1.42 IU at 30 d, 5.28 IU at 60 d, 3.87 IU at 90 d, 2.0 IU at 180 d and 1.10 IU at 360 d. In Groups A and B antibodies were found only at 90 and 180 d post vaccination so they weren't challenged. Four of the Group C lambs survived the challenge (80 %) and 88.9 % (9 animals) of the positive control group died. Group D was negative. These results prove that the V-319 Acatlán live virus rabies vaccine with a $10^{6.19}$ LD₅₀ virus titer per dose meets all the requirements to protect sheep for 360 d as required by the Mexican Official Standards (NOM-35-ZOO-1996).

KEY WORDS: Rabies, Sheep, Vaccine, Titre, Antibody, Challenge.

Los reportes de rabia en ovinos, en la mayoría de los casos se deben a mordeduras de perros o por

Reported rabies cases in sheep are mostly due to dog bites or transmitted wild fauna. In 1980 rabies

Recibido el 17 de diciembre de 2002 y aceptado para su publicación el 10 de abril de 2003.

a INIFAP. CENID - Microbiología. Carretera México/Toluca, Km. 15.5 Col. Palo Alto. CP 05110. Tél.55700616. weimer@micro.inifap.conacyt.mx. Correspondencia y solicitud de separatas al primer autor.

b UAEM. Universidad Autónoma del Estado de México.

la participación de la fauna silvestre en la transmisión a ésta u otras especies. En 1980 la rabia se diagnosticó en ovinos Pelibuey, en zonas de Yucatán, México, sin existir antecedentes de mordedura de perro ni participación de fauna silvestre; pero sí se encontraron animales mordidos por murciélagos hematófagos. Lo anterior sugiere la posibilidad de encontrar el borrego involucrado en los tres sistemas epizootiológicos de la rabia, es decir la forma urbana, silvestre y la rural⁽¹⁾. Esta clasificación es un tanto arbitraria y se basa en la forma de transmisión, reservorios y perpetuación de la enfermedad en los animales.

Se conoce que en algunos Estados o zonas, la enfermedad se presenta en forma enzoótica, manteniéndose en forma estable, e inclusive en algunos casos se incrementa su incidencia y prevalencia. Debido a esto, el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP), en forma conjunta con la FAO⁽²⁾, desarrolló la vacuna antirrábica V-319 Acatlán a partir de un virus rábico aislado de glándulas salivales de un murciélago hematófago, elaborada en cultivos celulares, y la cual ha resultado ser eficaz, ya que desarrolla altos títulos de anticuerpos en diferentes especies⁽³⁾.

La cepa V-319 Acatlán ha demostrado una gran antigenicidad para la prevención de la rabia en bovinos y caninos^(4,5); ha demostrado su inocuidad y respuesta serológica en perros a un año de vacunación⁽⁶⁾, la ausencia de problemas indeseables en perros⁽⁷⁾, inocuidad y antigenicidad en cerdos a 30 y 60 días post vacunación⁽⁸⁾; en cabras y borregas resulta ser inocua y antigénica a igual dosis vacunal bovina⁽⁹⁾, como también resultó ser inocua y antigénica en gato doméstico a los 30, 60 y 90 días post vacunación⁽¹⁰⁾. Con la vacuna V-319 Acatlán en forma inactivada utilizada en borrego Pelibuey, se encontró respuesta antigénica a 360 días post vacunación con un título vacunal de $10^{7.0}$ DL_{50} x ml antes de inactivar⁽¹¹⁾.

EL objetivo de este trabajo fue el de encontrar la dosis óptima de virus vacunal, V-319 Acatlán para la inmunización de los borregos con vacuna de virus vivo atenuado, con desafío a los 360 días posvacunación.

was diagnosed in Pelibuey sheep in the State of Yucatán, México although no dog bites or wild fauna transmissions were found, but animals bit by a haematophagous bat were spotted. The above suggests a possibility to be able to find sheep involved in the three rabies epizootiological systems, rural, urban and wild⁽¹⁾. This classification is arbitrary and is based on rabies transmission, on its reservoirs and how it survives in animals.

It is a known fact that in some States or areas of Mexico this disease is enzootic and stable, and even in some cases its incidence and prevalence increases. The Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP) jointly with FAO⁽²⁾, developed the Acatlán V-319 rabies vaccine from cell tissue cultures of salivary glands of haematophageous vampires, which has been very effective and capable of developing high titers of antigens in several animal species⁽³⁾.

The V-319 Acatlán strain has shown high antigenicity for prevention of rabies in bovines and canines^(4,5), safety and serological response in dogs one year post vaccination⁽⁶⁾ and also no undesirable problems in dogs⁽⁷⁾ and safety and antigenicity in swine at 30 and 60 d post vaccination⁽⁸⁾, in goats and sheep shows safety and antigenicity at the same doses as in bovines, as well as in cats at 30, 60 and 90 d post vaccination⁽¹⁰⁾. An antigenic response at 360 d post vaccination was found when the Acatlán V-319 inactivated virus vaccine at $10^{7.0}$ LD_{50} per ml titer before modification was applied to Pelibuey sheep.

The objective of the present study was to determine the best vaccine virus dose for the Acatlán V-319 vaccine to immunize lambs with modified live rabies virus, and challenged at 360 d post vaccination.

Antibody titers were determined through serum neutralization in mice at weaning, with different bleeding time periods. A challenge with the CASS-88^(12,13) rabies virus strain, of vampire origin was performed 360 d post vaccination. This study was carried out at Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CENID Microbiología under controlled conditions and

Se determinaron los títulos de anticuerpos por seroneutralización en ratón de destete, a diferentes tiempos de sangrado de los animales. Se realizó un desafío con la cepa de virus rábico CASS-88^(12,13), de origen vampiro a los 360 días después de la aplicación del biológico. El presente trabajo se hizo en el CENID-Microbiología, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en condiciones controladas y con una dieta de mantenimiento a base de concentrado y forraje.

Para cada dilución de vacuna se vacunaron cinco borregos adultos, cruce de Rambouillet, formándose cuatro grupos: Grupo A con un título de $10^{4.0}$ DL₅₀ dosis total por ml; Grupo B con un título de $10^{5.1}$ DL₅₀; el Grupo C con un título de $10^{6.19}$ DL₅₀. En el Grupo D se utilizaron cinco borregos como controles negativos. A la vez se usaron nueve borregos más, de la misma cruce como testigos positivos, y desafiados con una dosis de $7.7 \times 10^{6.0}$ DL₈₀ en ratón lactante. La dilución viral usada en el desafío se determinó en un trabajo anterior como la dosis idónea en esta especie para el desafío⁽¹³⁾ utilizándose ésta como dosis de desafío para los animales del Grupo C del y control positivo. Los borregos de los grupos A y B no fueron desafiados, ya que a los 90 días el grupo A y a los 180 días el grupo B después de la vacunación, ya no se detectaron anticuerpos seroneutralizantes.

En el grupo C, las medias de los resultados fueron las siguientes: al día 0 todos los animales fueron negativos a anticuerpos contra rabia; a los 15 días se tuvo una media de 1.42 UI de protección; a los 30 días una media de 5.28 UI; 60 días 3.87 UI; 90 días 2.0 UI; 180 días 1.59 UI y 360 días 1.10 UI. Al desafío, de los nueve borregos inoculados con una dosis de $7.7 \times 10^{6.0}$ DL₈₀, ocho murieron (88.9 %) con los signos clásicos de rabia, lo que fue corroborado por la prueba de inmunofluorescencia. Los cinco animales del grupo D, utilizados como controles negativos, se mantuvieron clínicamente sanos durante todo el periodo experimental.

Los resultados indican que desde los 15 días después de haber sido vacunados, los animales ya

animals were fed with a maintenance diet based on concentrates and forage.

Five adult Rambouillet cross sheep adults were vaccinated with each vaccine dilution. Thus, four groups of five animals each were constituted: Group A vaccinated with a $10^{4.0}$ LD₅₀ per ml dose, Group B vaccinated with a $10^{5.1}$ LD₅₀ per ml dose, Group C vaccinated with a $10^{6.19}$ LD₅₀ per ml dose and Group D as negative controls. Besides, nine lambs of the same cross were used as positive controls and challenged with a $7.7 \times 10^{6.0}$ LD₈₀ in unweaned mice virus dose. This virus dilution was determined as the most suited for the challenge in a previous study⁽¹³⁾ and was also used in Group C and positive control animals. Animals in Groups A and B were not challenged, because Group A at 90 d post vaccination and Group B at 180 d post vaccination did not show any serum neutralizing antibodies.

Averages for Group C were the following: on day 0 post vaccination, all animals did not show any rabies antibodies, at 15 d post vaccination a 1.42 IU protection average was determined, at 30 d post vaccination a 5.28 IU protection average was found, at 60 d post vaccination a 3.87 IU protection average was determined, at 90 d post vaccination a 2.0 IU protection average was found, at 180 d post vaccination a 1.59 IU protection average was determined, and at 360 d post vaccination a 1.10 IU protection average was found. At the challenge of the nine positive control animals inoculated with the $7.7 \times 10^{6.0}$ LD₈₀ virus dose, eight (88.9 %) died showing the classic rabies signs, whose presence was corroborated through immunofluorescence. All Group D animals stayed clinically healthy during the whole test.

Results show that from 15 d post vaccination, animals presented protection titers higher than 1.0 IU, which increased dramatically at 30 d post vaccination to a 5.28 IU protection average, starting to decrease at 60 d (3.87 IU average), and continuing to diminish at 90 d (2.0 IU average), 180 d (1.59 IU average) and 360 d (1.1 IU average). All cases comply with the Mexican Official Standards (NOM-35-ZOO-1996)⁽¹⁴⁾ which specifies

presentaron títulos mayores a 1.0 UI de protección, incrementándose en forma notoria a los 30 días, siendo los títulos más altos en este periodo de tiempo con una media de 5.28 UI, empezando a decrecer a los 60 días (media de 3.87 UI). A los 90 días siguieron bajando los títulos a una media de 2.0 UI. A los 180 días los títulos siguieron decreciendo (media de 1.59 UI) y a los 360 días fueron aún menores (media de 1.10 UI). En todos los casos se cumplen con los requerimientos mínimos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-35-ZOO-1996)⁽¹⁴⁾ que especifica que las vacunas antirrábicas deben de tener un título igual o mayor a 1.0 Unidades Internacionales de protección para ser aprobadas. Esto implica que la vacuna V-319 Acatlán, con un título viral de $10^{6.19}$ DL₅₀ se mantiene vigente hasta los 360 días con un título aceptable, cumpliendo los requerimientos mínimos de la legislación mexicana.

LITERATURA CITADA

1. OMS/OPS. Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud. Centro Panamericano de Zoonosis. Primer seminario sobre rabia parálitica de las Américas. Argentina. 1976.
2. Bijlenga G, Hernández BE. Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies isolate, (V 319) from a vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Rev Cornell Vet Research* 1980;70:10-8.
3. Hernández BE. La rabia pareasiente bovina: Definición del problema y metodología. *Ciencia Veterinaria* 1976;(1):104-129.
4. Hernández BE, Campos VJ, Sagardía JE, Pérez RH, González SD, Fernández RM, Ramsden R. Prueba de extinción antigénica de la vacuna V-319 Acatlán contra el "Derriengue" en bovinos desafiados al año de la vacunación [resumen]. XIII Reunión anual del INIP. México DF. 1976:39.
5. Laboratory techniques in rabies. 3rd ed. Kaplan MN, Koprowsky H editors, Series N° 23. WHO, Geneva. 1973:276.
6. García FR, Pérez RH, Hernández BE, Oros CD, Sagardía JE, Martell RM. Prueba de extinción antigénica de la vacuna V-319

that vaccines against rabies should show a 1.0 IU protection to be approved. This implies that the Acatlán V-319 vaccine, showing a $10^{6.19}$ LD₅₀ viral titer is still valid at 360 d post vaccination, thus complying with the NOM-35-ZOO-1996 standard.

End of english version

-
- Acatlán contra la rabia en perros desafiados al año de vacunación [resumen]. XI Congreso nacional de microbiología; Zapopan, Jal. 1979:146.
7. Fernández RM, Hernández BE, Pérez RH. Estudio sobre la posible reacción anafiláctica en perros Beagle usando la cepa vacunal V-319 Acatlán [resumen]. XIV Reunión anual del INIP-SARH. 1977:86.
 8. Pérez LH, González SD, Batalla CD, Martell RM. Inocuidad y antigenicidad de la vacuna antirrábica V-319 Acatlán en cerdos (serología) [resumen]. XVII Reunión de microbiología. Oaxaca, Oax. 1980:42.
 9. Bijlenga G, Hernández BE. Testing of the vaccines potencial of the plaque purified rabies virus strain V-319 isolated from a vampire bat (*desmodus rotundus*). *Cornell Vet Research* 1981:70:10-18.
 10. González SD, Oros CD, Batalla CD. Antigenicidad de la vacuna V-319 Acatlán en gato doméstico a un año de su vacunación. [resumen] XII congreso nacional de microbiología. Mérida, Yucatán. 1981:62.
 11. Batalla CD, Méndez JE, González SD, Oros CD. Prueba de inocuidad y antigenicidad de la vacuna antirrábica, V-319 Acatlán en borregos y cabras [resumen]. XII Congreso nacional de microbiología. Mérida, Yucatán. 1981:64.
 12. Cuevas RS, Colmenares VG, Batalla CD, Hernández BE. Selección de un virus rábico de origen vampiro para utilizarse como cepa de desafío en bovinos. *Vet Méx* 1989.20:271-275.
 13. Cuevas RS, Wimersheimer RJ, De Paz VO, Hernández BE, Batalla CD. Utilización del virus rábico de origen vampiro "Cass-88" como cepa de desafío en ovinos. *Vet Méx* 1996;27(4):339-342.
 14. 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, Méx.D.F.,26 de junio de 1996;1:10.