

EVALUACION DE LA EFICACIA DE LA VACUNA ANTIRRABICA CEPA "ERA" EN BOVINOS: II. DURACION DE INMUNIDAD¹

DR. PIERRE SUREAU²

M.V.Z., M.S. CARLOS ARELLANO^{2, 3}

M.V.Z. DIODORO BATALLA^{2, 3}

Resumen

Con el objeto de conocer, en el ganado bovino, la duración de la inmunidad conferida por la vacuna antirrábica cepa "ERA", se expusieron a virus rábico patógeno bovinos que habían sido vacunados con uno y dos años de anterioridad, obteniéndose los siguientes resultados:

Tiempo después de la vacunación	Bovinos vacunados vivos/muertos	Bovinos sin vacunar vivos/muertos	% de protección
1 año	15/0	3/11	100
2 años	13/2	1/12	86

Se discute la notable elevación de anticuerpos observada en los animales vacunados después de la exposición al virus rábico patógeno.

Existen diversas técnicas de laboratorio para poder evaluar la efectividad de diferentes tipos de vacunas antirrábicas (OMS, 1967). Sin embargo, aún no se conoce la técnica más apropiada para evaluar las vacunas elaboradas en cultivos celulares, como es la vacuna cepa "ERA" (Abelseth, 1964); por lo tanto, en el presente trabajo se discutirán los resultados obtenidos a partir de la exposición, con virus rábico patógeno, en bovinos vacunados con uno y dos años de anterioridad. Técnica que aunque costosa, consideramos la más lógica y efectiva para poder evaluar la capacidad protectora de una vacuna.

La vacuna cepa "ERA" se probó de esta forma por Abelseth (1967), sólo que en esa ocasión se utilizó un aislamiento de virus rábico hecho a partir de glándulas salivales de zorra.

Con el objeto de complementar los estudios realizados y eliminar el concepto de que por posibles variaciones antigénicas de los virus rábicos prevalentes en las distintas regiones de América, la vacuna cepa "ERA" tuviera ciertas limitaciones en su uso, se procedió a realizar este estudio en el que se utilizó como cepa de exposición un aislamiento de virus rábico, obtenido a partir de glándulas salivales de vampiro. Además, se realizó un estudio serológico del efecto de la exposición en los animales vacunados, en comparación con los testigos no vacunados. El presente artículo comprende los estudios realizados los dos primeros años de duración del experimento, el cual fue diseñado a cuatro años.

Material y métodos

Bovinos. Se escogieron 120 vaquillas de la raza Angus⁴ adquiridas en zona libre de murciélagos hematófagos y durante el estudio fueron mantenidas en un rancho ubicado en la misma zona,⁵ con excepción del momento de la exposición o desafío con virus patógeno, en que fueron llevados a los locales del Ins-

¹ Resultados del primero y segundo año de pruebas realizadas dentro del Proyecto de Investigación sobre Rabia Paralítica (MEX 16 FAO), programa cooperativo de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Secretaría de Agricultura y Ganadería a través del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG., Km. 15½ Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

² Proyecto MEX 16 FAO.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG.

⁴ Donados por los laboratorios Connaught.

⁵ Rancho Experimental "La Campana", perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Apartado Postal 682, Chihuahua, México.

tituto Nacional de Investigaciones Pecuarias en Palo Alto, D. F.

Todo el lote de vaquillas fue adquirido en el mismo rancho y las edades fluctuaban entre 9 y 11 meses, se mantuvieron en observación durante un mes y se procedió a vacunar 60 animales, dejando 60 como testigos sin vacunar; los grupos de animales fueron escogidos al azar y aretados para su identificación.

Para los fines de este trabajo 15 animales vacunados y 14 no vacunados se desafiaron el primer año, el segundo año se expusieron 15 vacunados y 13 testigos.

Vacuna y vacunación. La vacuna cepa "ERA" fue recibida directamente de los laboratorios CONNAUGHT, en su presentación comercial, que consiste en frascos de 10 dosis liofilizadas y con diluyente adjunto. La vacuna se mantuvo en estricta refrigeración hasta el momento de su aplicación.

La vacunación de las 60 vaquillas se realizó el 13 de noviembre de 1968, para lo cual se reconstituyó cada frasco en 20 cc de diluyente y se aplicaron 2 cc por vía intramuscular, en el anca de los animales, siguiendo las recomendaciones del laboratorio productor de la vacuna.

Virus de exposición. De entre varias cepas de virus rábico de campo, aislado del cerebro y glándulas salivales de vampiros capturados en diferentes zonas de la República Mexicana, se escogió, por su alta virulencia, el aislamiento "V.319 GS" obtenido a partir de las glándulas salivales de un murciélago *Desmodus rotundus*, capturado el 15 del febrero de 1969 cerca del poblado de Estación Vicente, en el municipio de Acatlán de Pérez Figueroa en el estado de Oaxaca, México.

Fijación en ratones y titulación de la cepa de exposición. Al ser aislada, la cepa tenía un título por vía intracerebral de 10^7 DLR 50/ml (Dosis Letales Ratón 50% por mililitro de inóculo) y $10^{2.2}$ DLR 50/ml por vía intramuscular. Debido al poco volumen del inóculo procedente de las glándulas salivales del vampiro y con objeto de estandarizar mejor la cepa, se procedió a dar 10 pases en ratones de tres semanas utilizando la vía intracerebral. Se consideró el décimo pase como la semilla maestra de la cepa de exposición, a partir de la cual se preparó un decimo-primer pase que se consideró como cepa de

exposición; la cosecha de cerebros provenientes de los ratones del decimo-primer pase, fue triturada y suspendida en una concentración al 20% en solución salina, bufferada con 0.75% de bovoalbúmina, quedando así preparada la cepa de exposición. Esta suspensión alcanzó un título de $10^{7.2}$ DLR 50/ml por vía intracerebral.

Titulación en bovinos. Con el objeto de conocer la dosis adecuada de virus por utilizar en el desafío de los animales vacunados, se procedió a titular la cepa de exposición en bovinos adultos, para lo cual se utilizaron 9 vacas divididas en tres lotes de 3 animales, cada grupo fue inoculado con una dilución diferente de virus; las diluciones fueron 1/5, 1/25 y 1/125 en las cuales había 20 millones de DLR₅₀, 4 millones de DLR₅₀ y 800,000 DLR₅₀ respectivamente.

Confrontación de los bovinos vacunados y testigos. La dilución de virus apropiada para la exposición de los animales vacunados y testigos, se aplicó en un volumen de 5 ml por vía intramuscular, inyectando 2.5 ml de inóculo a cada lado del cuello, en los músculos paravertebrales; se escogió este lugar por ser de más fácil acceso y ofrecer mayor seguridad para la persona que inocula, así como también por existir una mayor similitud con la vía natural de infección, ya que la mayor parte de las mordeduras que el vampiro inflige a los bovinos es en la tabla del cuello (Arellano, Sureau y Greenhall, 1971).

En la confrontación descrita en el presente trabajo se intentó aplicar 2,000,000 de DLR₅₀ por bovino, buscándose en la titulación de la cepa de exposición; las titulaciones de control practicadas en el inóculo inmediatamente después de la exposición demostraron que fueron aplicadas 1,000,000 de DLR₅₀ a los 13 meses y 1,600,000 de DLR₅₀ a los 24 meses.

Observación de los bovinos inoculados Quince días antes del desafío, los bovinos escogidos al azar para cada experimento fueron trasladados del Centro Experimental "La Campana" a los corrales del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias en Palo Alto, D. F., ambas localidades ubicadas en zona libre de rabia paralítica o derriengue. Después del desafío, los bovinos fueron observados durante 90 días, haciendo observación

clínica diaria, lectura de temperatura y muestreo para realizar estudios de patogenia (Arellano, Sureau y Greenhall, 1971). Después de los 180 días los animales vacunados sobrevivientes se enviaron de regreso al Rancho "La Campana".

Necropsia y diagnóstico. Los bovinos que después de presentar sintomatología de rabia, murieron o fueron sacrificados en la fase agónica, se sometieron a una necropsia completa. En todos los casos se tomaron varias muestras del sistema nervioso central (trígono olfatorio, cuerno de Amon, cerebelo y bulbo), para confirmar el diagnóstico mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes (OMS, 1967).

Estudios serológicos después de la exposición. Todos los animales, vacunados y testigos, fueron sometidos a sangrado para mues-

(20 millones de DLR₅₀) murieron 17 y 18 días después de la inoculación; los tres animales inoculados con la dilución 1/25 (4 millones de DLR₅₀) murieron 15, 17 y 23 días después de la inoculación; por último, de las tres vacas inoculadas con la dilución 1/25 (800,000 DLR₅₀) sólo una murió, 29 días después de la inoculación. De acuerdo con estos resultados, se decidió utilizar 2 millones de DLR₅₀ como dosis de exposición, considerando esta cifra como la adecuada para evitar una sobredosificación de virus.

Desafío de un año. El 13 de diciembre de 1969, trece meses después de la vacunación, se expusieron con 1,000,000 DLR₅₀, 15 animales vacunados y 14 testigos (Cuadros 2 y 3). Los 15 bovinos vacunados sobrevivieron la exposición (100% de protección) mientras que sólo 3 de los 14 bovinos testigos sobre-

CUADRO 1

Titulación de la cepa de exposición en bovinos

Número animales	Dilución	DLR ₅₀	Animales muertos	Animales sobrevivientes
3	1/5	20 millones	3	0
3	1/25	4 millones	3	0
3	1/125	800,000	1	2

treo serológico el día de la exposición y a los 7, 14, 21, 30, 60 y 90 días después de la exposición con virus rábico. En el desafío realizado 24 meses después de la vacunación, los animales se sangraron, además de los días mencionados, los días 2 y 4 después de la exposición.

Las pruebas de sueroneutralización se realizaron en ratones, según la técnica recomendada por la OMS (1967), usando como virus la cepa CVS, proporcionada por el Centro de Referencia de Rabia de la OMS.⁶

Resultados

Titulación de la cepa de confrontación en bovinos. De los animales que se utilizaron para titular la cepa de exposición (Cuadro 1) tres bovinos inoculados con la dilución 1/5

vivieron después de 180 días de observación (78% de mortalidad).

Desafío de dos años. El 13 de noviembre de 1970, después de 24 meses de haber sido vacunados, se expusieron con 1,600,000 DLR₅₀ 15 bovinos vacunados y 13 no vacunados (Cuadro 2) de los 15 vacunados, 13 sobrevivieron y dos murieron de rabia debido a la inoculación (86% de protección). De los 13 testigos solamente uno sobrevivió y 12 murieron de rabia (92% de mortalidad).

De las muestras de sistema nervioso central obtenidas a la necropsia de los bovinos que murieron de rabia o fueron sacrificados en fase agónica de la enfermedad, en todos se logró confirmar el diagnóstico.

Relación entre título de anticuerpos de los animales antes del desafío y la mortalidad observada. De los 15 bovinos que sobrevi-

⁶ Instituto Wistar de Filadelfia, E.U.A.

CUADRO 2

Resultados del desafío en bovinos vacunados y testigos

Fecha después de la vacunación	VACUNADOS		TESTIGOS	
	Sobreviv./Total	% Protección	Sobreviv./Total	% Mortalidad
12 meses	15/15	100%	3/14	78%
24 meses	13/15	86%	1/13	92%

vieron al desafío del primer año, 14 tenían título superior a 5 y uno tenía título de 3.

En el desafío de los 24 meses, los 13 bovinos vacunados que sobrevivieron tenían títulos de anticuerpos superiores a 5; de los dos animales vacunados que murieron, uno mostró título de 9 y el otro nunca demostró tener título (Cuadro 4).

Ninguno de los animales utilizados como testigos no vacunados demostró tener anticuerpos en el momento del desafío (Cuadro 4).

3 meses; sin embargo, los títulos se mantuvieron muy arriba de como estaban antes del desafío (Cuadro 4).

Uno de los animales vacunados que murió en la exposición de los 24 meses, presentó una reacción serológica similar ya que tenía al momento del desafío, un título de 9 y dos semanas después alcanzó un título de 1/1000, sin embargo, murió de rabia a las tres semanas no obstante que tenía anticuerpos circulantes con títulos de 1/3125.

El otro bovino vacunado que murió se com-

CUADRO 3

Fecha de mortalidad después del desafío

Tiempo de la confrontación después de vacunación	Fecha de muerte de los bovinos					Sobrevivientes a 180 días	Total de muertos inoculados
	menos de 14 días	14/30 días	:30/60 días	:60/90 días	:90/180 días		
Un año testigos	0	9 (64%)	2 (14%)	0	0	3 (22%)	11/14
Un año vacunados	0	0	0	0	0	15 (100%)	0/15
2 años testigos	0	19 (77.5%)	1 (7.5%)	1 (7.5%)	0	1 (7.5%)	12/13
2 años vacunados	0	2 (14%)	0	0	0	13 (86%)	2/15

Reacción inmunológica después del desafío. En la exposición de los 13 meses, se observó una elevación de anticuerpos bastante considerable en los 15 animales vacunados después de 7 días de exposición. Estos títulos se mantuvieron altos hasta tres semanas del desafío, disminuyendo paulatinamente al cabo de 2 y

portó serológicamente en forma similar a los testigos no vacunados; nunca desarrolló anticuerpos y después de la inoculación experimental sólo alcanzó un título de 1/56 a la tercera semana después de la exposición.

Entre los 27 testigos no vacunados en los 2 experimentos, hubo nueve animales que

CUADRO 4

Comportamiento serológico de los bovinos vacunados y testigos después de la confrontación

Tiempo después de la confrontación	5	5-24	25-124	125-624	625-3125	3125	Total de animales
BOVINOS VACUNADOS QUE SOBREVIVIERON							
1 semana	0	0	4	10	8	6	28
3 semanas	0	0	8	8	10	0	28
3 meses	0	0	11	14	2	1	28
BOVINOS VACUNADOS QUE MURIERON (22 DIAS)							
1 semana	0	0	1	0	1	0	2
3 semanas	0	0	1	0	0	1	2
BOVINOS TESTIGOS QUE SOBREVIVIERON							
1 semana	4	0	0	0	0	0	4
3 semanas	3	1	0	0	0	0	4
3 meses	2	2	0	0	0	0	4
BOVINOS TESTIGOS QUE MURIERON							
1 semana	23	0	0	0	0	0	23
3 semanas	8	12	1	0	0	0	21 ¹

¹ 2 bovinos murieron antes de las 3 semanas.

nunca desarrollaron anticuerpos antirrábicos, 8 de ellos murieron y uno sobrevivió los 180 días de observación. Los otros 18 testigos desarrollaron en algún momento anticuerpos, pero el título nunca sobrepasó 1/25; de estos, 15 animales murieron y 3 sobrevivieron al periodo de observación. Es importante hacer notar que ninguno de los animales testigos desarrolló anticuerpos 7 días después de la inoculación del virus, cosa que siempre se observó en los animales vacunados (Cuadro 4).

Discusión

Aunque no se ha establecido un estándar para evaluar la eficacia de las vacunas antirrábicas elaboradas en cultivo celular, para los fines de este trabajo se decidió considerar una vacuna como efectiva, si en la prueba de exposición sobrevivía el 80% de los animales vacunados y moría por lo menos el

80% de los testigos no vacunados; en base a este criterio, se puede decir que la vacuna antirrábica cepa "ERA" es eficaz, por lo menos por 24 meses, ya que tanto en el desafío de los 13 meses como en el de los 24 meses, más del 80% de los animales vacunados sobrevivieron y por lo menos el 80% de los testigos murieron.

Se considera conveniente discutir más ampliamente y en forma separada las dos exposiciones con virus rábico, ya que se obtuvieron resultados con diferencias interesantes. En la inoculación experimental realizada 13 meses después de la vacunación, sólo se inoculó a los animales del experimento con 1.000.000 de DLR₅₀, lo que posiblemente dio como resultado que solamente murieran 11 de los 14 (78%) bovinos testigos no vacunados de la prueba.

En el desafío realizado en los animales 24 meses después de haber sido vacunados, se inoculó con 1.600.000 DLR₅₀ de virus rábico

o sea 60% más dosis letales ratón (DLR₅₀) que en la exposición de los 12 meses; este hecho puede explicar que en la segunda inoculación experimental, realizada 24 meses después de la vacunación, 2 de los 15 animales vacunados hayan muerto de rabia pese a la vacunación. Es importante hacer notar que estos 2 animales tenían los títulos de anticuerpos más bajos del grupo de animales vacunados (Cuadro 3).

Con respecto a la relación entre el título de anticuerpos de los animales antes del desafío y la mortalidad observada como producto del mismo, en el 96% de los casos, en que el bovino vacunado presenta título de anticuerpos detectables por la prueba de suero-neutralización, el animal en cuestión está protegido a una infección de virus rábico que no sobrepase las dosis utilizadas en estos experimentos (1.6 millones de DLR₅₀). Un mayor número de experimentos de este tipo y un amplio análisis estadístico de los mismos, podrían dar un método práctico y muy valioso para evaluar la eficacia de las vacunas antirrábicas en bovinos, ya que conociendo el índice de correlación entre el título de anticuerpos y la resistencia a la infección, bastaría conocer el título de anticuerpos, para poder determinar la eficacia de la vacuna usada.

Un fenómeno interesante observado en el presente experimento fue la notable elevación de anticuerpos que se produjo, en los animales vacunados, a partir del séptimo día del desafío, en contraste con el grupo testigo no vacunado, en el que al séptimo día no se observó respuesta inmunológica detectable y que posteriormente ésta fue mínima. Después de la inoculación experimental, el 100% de los animales vacunados elevó considerablemente el título de anticuerpos circulantes en la sangre, que en algunos casos fue superior a

1/3125, por lo que se puede concluir que cuando un animal está bien inmunizado, la exposición que pueda sufrir a un virus rábico de campo, en vez de perjudicarlo, actuaría como un refuerzo haciendo que aumente su inmunidad contra la rabia.

Summary

In order to know, in cattle, the duration of immunity given by the ERA strain anti-rabies vaccine, cattle that had been vaccinated one and two years before, were exposed to a pathogenic virus strain, obtaining results as follows:

Time after vaccination	Cattle vaccinated survivals/ Deaths	Cattle non vaccinated survivals/ Deaths	% protection
1 year	15/0	3/11	100
2 years	13/2	1/12	86

Comments are made in relation with the high antibody titers observed after challenge among the vaccinated cattle.

Literatura citada

- ABELSETH, M. K., 1964, An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue cultures, *Can. Vet. Jour.*, 5 (11): 279-286.
- ABELSETH, M. K., 1967, Further studies on the use of "ERA" rabies vaccine in domestic animals, *Can. Vet. Jour.*, 8 (10) 221-227.
- ARELLANO, C., P. SUREAU y A. M. GREENHALL, 1971, Preferencia de la predación del vampiro en relación a la edad y raza del ganado y a la época del año, *Téc. Pec. en Méx.* 17.
- Connaught Medical Research Laboratories, 1969, ERA Rabies Vaccine, *Veterinary Publication*, No. 56.
- OMS, 1967, La Rabia, Técnicas de Laboratorio, *Monografía No. 23*, 2a. ed., 173-178 y 61-71.