

# EVALUACION DE LA VACUNA ANTIRRABICA INACTIVADA CEPA PASTEUR RIV EN BOVINOS, MEDIANTE DESAFIO CON LA CEPA PATOGENA DE VIRUS RABICO CASS-88<sup>a b</sup>

Sandra Cuevas Romero<sup>c</sup>

José Morales Ruíz<sup>c</sup>

Diódoro Batalla Campero<sup>c</sup>

Eliseo Hernández-Baumgarten<sup>c</sup>

Germán Colmenares Viladomat<sup>c</sup>

## RESUMEN

Con el propósito de evaluar en ganado bovino la inmunidad conferida por una vacuna inactivada de virus rábico, elaborada en cultivos celulares, cepa Pasteur-RIV, se seleccionaron 17 bovinos machos raza Holstein de entre, 1 y 2 años de edad, sin antecedentes de vacuna antirrábica y serológicamente negativos a rabia. Se inmunizaron 12 animales con 1 ml por vía intramuscular y 5 quedaron como testigos no vacunados. Después de la vacunación no se observaron lesiones en la zona de aplicación de la vacuna, ni se manifestaron reacciones de hipersensibilidad en los animales vacunados. Se colectaron muestras de suero los días, 7, 14, 21, 30, 60, 90, 180, 270, 365, 440, 547 y 560 después de la vacunación; y a los 7, 14, 21, 30 y 45 días después del desafío. La determinación del título de anticuerpos se realizó por la prueba de seroneutralización utilizando ratones de 21 días de edad. A partir del día 30 posvacunación, todos los animales vacunados tenían niveles de anticuerpos neutralizantes, mismos que se mantuvieron durante los siguientes 17 meses. Los animales fueron desafiados a los 560 días de iniciado el experimento, con la cepa de virus rábico CASS-88 empleando una dosis de  $50 \times 10^5$  DL<sub>50</sub> para ratón. Todos los animales del grupo testigo murieron de rabia entre los 10 y 12 días posdesafío; de los 12 animales vacunados, 9 sobrevivieron al desafío (75%) y los otros tres murieron entre los días 19 y 30 (25%). Los resultados indicaron que la vacuna antirrábica inactivada cepa Pasteur-RIV protegió al 75% del ganado expuesto.

Téc. Pec. Méx. Vol. 29 No. 1 (1991)

## INTRODUCCION

En los últimos años con la introducción de la tecnología basada en los anticuerpos mo-

noclonales, fue posible de manera convincente comprobar la existencia de los diferentes serogrupos del virus rábico que se presentan en los diversos aislamientos, sobre todo cuando se trata de cepas epizooticas aisladas de diferente especie animal y área geográfica\*. Actualmente la Organización Mundial de la Salud distribuye un "kit" de anticuerpos monoclonales para efectuar la serotipificación de los virus de rabia, así como virus patrón pertenecientes a los serogrupos hasta hoy identificados. En un examen retrospectivo resulta claro que la protección conferida por algunas vacunas, es poco eficiente debido a que los virus que se encuentran en los vectores pertenecen a un serogrupo diferente al de las vacunas<sup>2</sup>. Para evaluar la efectividad de los diferentes

a Recibido para publicación el 5 de junio de 1990.

b Este trabajo fue parcialmente financiado por INTERVET México, S.A. de C.V.

c Proyecto Rabia. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Km 15.5 Carretera México-Toluca, 05110, México, D.F.

\* Organisation Mondiale de la Sante. Report of WHO Workshop on NIH. Potency test for rabies vaccines. Geneva, 4-6 November 1985.

Report of German Green Cross/WHO Workshop on Monoclonal antibody in rabies diagnosis and research. Tonbach, Federal Republic of Germany, 27-28 May 1984.

tipos de vacunas antirrábicas, existen diversas técnicas de laboratorio diseñadas por la OMS<sup>9, 13</sup>. Las vacunas antirrábicas para bovinos, elaboradas en cultivos celulares, se han acreditado mediante el desafío experimental uno o dos años después de la inmunización de los bovinos, con un virus rábico patógeno<sup>1,5,10,14,15</sup>. El criterio de evaluación de vacunas antirrábicas, que se sigue actualmente en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología (CENID-M) ha sido desarrollado con base en las experiencias previas, dentro del proyecto de Rabia Parálitica Bovina<sup>3, 10, 15</sup> que consiste en vacunar un lote de 10 bovinos y dejar un grupo con igual número de testigos sin vacunar. El desafío se efectúa uno o dos años después de la vacunación, con una dosis de virus patógeno capaz de matar al 80% de los animales testigos. En la evaluación mediante el desafío experimental, se estableció que para que la vacuna se considere adecuada, ésta deberá proteger cuando menos al 80% de los animales vacunados<sup>10</sup>.

La vacuna cepa "ERA" elaborada en cultivos celulares, se probó mediante desafío experimental por Abelseth<sup>1</sup>, utilizando como cepa de desafío un virus rábico aislado de glándulas salivales de zorra. Así mismo, Sureau *et al.*<sup>15</sup>, realizaron en México una evaluación en bovinos vacunados con la cepa "ERA" desafiados con el virus rábico "V.319 GS", obtenido de las glándulas salivales de un vampiro (*Desmodus rotundus*). Hernández, *et al.*<sup>10</sup>, evaluaron en bovinos la vacuna Alurabiffa producida en una línea celular derivada de embrión completo de hamster, empleando para el desafío la cepa de vampiro 5562/6bc.

En 1987 Soria, *et al.*<sup>14</sup> realizaron en Malzeville, Francia, la evaluación de una vacuna inactivada elaborada con cepa Pasteur RIV, empleando para el desafío una cepa de virus de campo de glándulas salivales de zorros muertos de rabia natural, obteniendo un 100% de protección en los bovinos vacunados a partir de una sola aplicación de la vacuna.

El objetivo del presente estudio fue eva-

luar la eficacia de una nueva vacuna inactivada, elaborada en cultivos celulares con la cepa Pasteur-RIV del virus de rabia, mediante el desafío experimental con la Cepa CASS-88<sup>6</sup>.

## MATERIALES Y METODOS

Cepas de virus rábico:

a) Vacuna: La vacuna empleada fue preparada a partir de la cepa Pasteur-RIV<sup>14</sup> de virus rábico, adaptado para crecer en la clona CT de la línea celular BHK-21. El virus fue inactivado con  $\beta$ -propiolactona y suspendido en amortiguador de glicina con 0.3% de Fosfato de aluminio (AIPO<sub>4</sub>) como adyuvante, con un valor de 5.0 unidades en la prueba de NIH. Esta vacuna fue recibida directamente de los laboratorios INTERVET de Holanda, en su presentación comercial, la vacuna se conservó en estricta refrigeración hasta su empleo 4 C.

b) Desafío: Se empleó la Cepa CASS-88<sup>5</sup> proporcionada por el Proyecto de Rabia del CENID-MICROBIOLOGIA INFAP-SARH, con un título de  $10^{7.1}$  DI<sub>50</sub>/ml. en ratón de 21 días.

Diseño Experimental:

a) Bovinos: Se seleccionaron 17 bovinos machos, raza Holstein adquiridos en una zona libre de murciélagos hematófagos; sin antecedentes de vacunación y serológicamente negativos a rabia. Todos los animales fueron adquiridos en el mismo rancho y se mantuvieron en observación durante dos semanas. Los bovinos se alojaron en las instalaciones del CENID-M. Los animales tomaron agua *ad libitum* y se alimentaron con una dieta comercial, suplementada con una mezcla de rastrojo de maíz, alfalfa deshidratada y avena.

b) Ratones: Se utilizaron 6628 ratones albinos cepa CD-1 de 21 días de edad para las pruebas de seroneutralización, titulación y reisolamiento del virus.

c) Grupos experimentales: Se formaron dos grupos de animales: El Grupo A, de 5 bovinos no vacunados; y el Grupo B, constituido por 12 bovinos vacunados al inicio

del experimento, por vía intramuscular, en la región glútea con 1 ml/animal, siguiendo las indicaciones del laboratorio productor de la vacuna. Los bovinos vacunados fueron alojados en un solo corral hasta que alcanzaron un promedio de media tonelada de peso; posteriormente fueron separados en seis corrales, conteniendo dos animales cada uno, y permanecieron así hasta el término del experimento. Los bovinos del grupo testigo se alojaron en un corral hasta que presentaron los primeros signos clínicos de rabia posteriores al desafío, después se les colocó en corrales individuales hasta su muerte. Todos los animales fueron observados diariamente.

d) Pruebas serológicas: A todos los bovinos se les sangró por la vena yugular, utilizando tubos vacutainer\* sin anticoagulante, con el siguiente calendario: 7, 14, 21, 30, 60, 90, 180, 270, 365, 440, 547 y 560 días después de la vacunación; y 7, 14, 21, 30 y 45 días después del desafío. El experimento se dió por terminado 45 días después de la muerte del último animal del grupo testigo. La determinación de los niveles de anticuerpos, se realizó por la prueba de Seroneutralización descrita por Atanasiu<sup>4</sup>.

e) Desafío: El desafío se realizó a los 560 días después de la vacunación con la Cepa CASS-88 de virus rábico, se aplicaron 20 ml/animal, por vía intramuscular, con una dosis total de  $50 \times 10^6$  DL<sub>50</sub>/ml ratón; se repartió la dosis en la región de los músculos maseteros derecho e izquierdo. Antes y después de la inoculación se tomaron muestras del inóculo para determinar su título viral<sup>11,12</sup>. Los bovinos fueron observados durante 90 días después del desafío.

f) Identificación y aislamiento del virus. Los bovinos con signología de rabia, que murieron o fueron sacrificados en la fase agónica, se sometieron a la necropsia. En todos los casos se tomaron muestras del sistema nervioso central (trígono olfatorio, Cuerno de Ammon, cerebelo y médula oblonga). El virus de rabia se identificó por la técnica de anticuerpos fluorescentes<sup>8</sup>; y

el reaislamiento viral se efectuó mediante la técnica descrita por Koprowsky<sup>12</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

a) Vacunación: En los animales inmunizados con la vacuna preparada con la cepa Pasteur-RIV, no se manifestaron reacciones de hipersensibilidad, ni se observaron alteraciones macroscópicas en la zona de aplicación. La evolución de la respuesta serológica de los 17 bovinos durante el curso del experimento, se muestra en la Figura 1, donde no se observan variaciones estadísticamente significativas en los títulos de anticuerpos entre los muestreos. En todos los animales vacunados, el nivel de anticuerpos fue detectable a partir del séptimo día posvacunación; al día catorce, 6 de los 12 animales tenían anticuerpos neutralizantes; siete días después 11 de los 12 bovinos; y al mes todos los animales alcanzaron niveles de anticuerpos neutralizantes, mismo que se mantuvieron con un título promedio (expresado como el recíproco de la dilución que protegió al 50% de los ratones), de 1/465, durante el experimento. La respuesta serológica de los bovinos vacunados se resume en el Cuadro 1. En los animales testigos no se detectaron anticuerpos anti-rábicos durante el curso del experimento; excepto un bovino que 12 días después del desafío presentó un nivel detectable de anticuerpos (Cuadro 2).

b) Desafío a los 18 meses: La cepa de desafío aplicada en los bovinos no presentó diferencia logarítmica en el título viral antes y después de su aplicación. Los primeros signos clínicos de rabia aparecieron en los animales del grupo testigo al octavo día posdesafío, caracterizados por: salivación excesiva (Figura 2), lagrimeo, parálisis de los músculos hioideos y mandibulares, incoordinación, postración y muerte. Todos los animales del grupo testigo murieron de rabia (100% de mortalidad), entre los días 10 y 12 posdesafío (Cuadro 2). Tres de los bovinos vacunados que al momento del desafío presentaban títulos de anticuerpos de 1/63, 1/141 y 1/275 respectivamente, murie-

\* Marca Registrada por Becton Dickison.

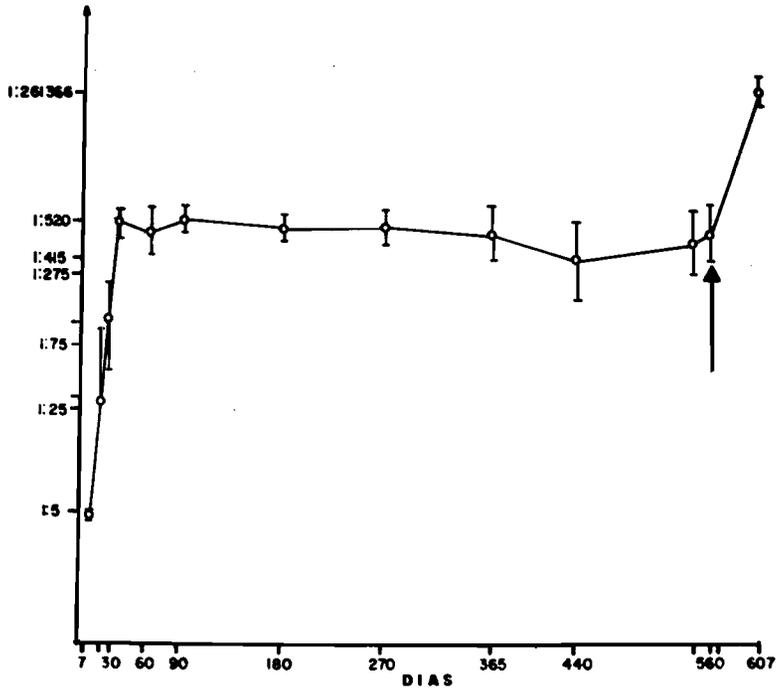


Figura 1. Evolución de la respuesta serológica promedio, durante 607 días, en los doce bovinos vacunados con la cepa Pasteur-RIV y desafiados (flecha) al día 560. Los títulos se expresan como el recíproco de la dilución que protegió al 50% de los ratones en la prueba de seroneutralización.



Figura 2. La salivación excesiva fue el signo principal observado en los bovinos del grupo testigo (no vacunados), expuestos experimentalmente con la cepa CASS-88 de virus rábico.

CUADRO 1. RESPUESTA SEROLOGICA CONTRA EL VIRUS DE RABIA EN 12 BOVINOS VACUNADOS CON LA CEPA PASTEUR-RIV DURANTE 560 DIAS

	DIA												
	1	7	14	21	30	60	90	180	270	365	440	547	560
Bovino													
1	0	5*	9	25	457	302	186	398	> 625	> 625	309	625	625
2	0	5	5	82	625	625	625	501	> 625	> 625	398	> 625	625
3	0	5	66	37	398	436	625	257	> 625	501	251	309	275
4	0	5	56	32	625	489	625	288	> 625	354	> 625	> 625	> 625
5	0	5	9	13	537	57	625	> 625	> 625	> 625	407	625	625
6	0	5	10	61	625	625	625	501	398	75	53	63	63
7	0	5	5	45	625	338	625	269	218	147	33	100	223
8	0	5	9	125	625	625	625	269	125	251	104	125	625
9	0	5	91	32	625	625	625	501	> 625	> 625	380	625	625
10	0	5	11	66	234	526	625	> 625	> 625	501	79	141	141
11	0	5	11	70	234	625	625	> 625	398	> 625	169	501	398
12	0	5	ND	338	625	363	625	> 625	510	> 625	501	> 625	> 625

\* Los datos representan el recíproco de la dilución de suero que protegió al 50% de los ratones por la prueba de seroneutralización<sup>1</sup>  
 ND: No determinado

ron entre los días 19 y 30 posdesafío, obteniendo un 75% de protección. Los resultados se presentan en el Cuadro 2.

Todas las muestras del sistema nervioso central obtenidas a la necropsia de los bovinos que murieron o que fueron sacrificados en la fase agónica, fueron positivas a rabia por la técnica de anticuerpos fluorescentes, y de todos estos encéfalos se recuperó el virus en ratones, al séptimo día posinoculación. Los ratones presentaron los primeros signos clínicos a partir del sexto día posinoculación y fueron cosechados en la fase parálitica.

En todos los bovinos vacunados, se detectaron niveles de anticuerpos antirrábicos a partir del séptimo día, mismos que se mantuvieron durante los 560 días antes del desafío, lo que indica que la vacuna confiere una respuesta humoral duradera,<sup>1, 10, 14, 15</sup> El desafío de los 17 bovinos con la Cepa CASS-88 se realizó a los 560 días posvacunación, presentando una protección del 75%.

El desafío experimental de los bovinos ocasionó en todos los animales vacunados que el título de anticuerpos se elevara considerablemente al 7o. día posdesafío. Este fenómeno ya ha sido observado<sup>10, 15</sup>, lo que confirma que cuando un animal está bien inmunizado, la exposición a un virus rábico de campo, actúa como refuerzo, aumentando la respuesta inmune contra el virus rábico. Uno de los bovinos del grupo testigo presentó niveles de anticuerpos detectables por seroneutralización en ratón, los otros permanecieron serológicamente negativos, esto debido posiblemente a la sensibilidad de la prueba, y considerando que no se está evaluando la inmunidad celular en los bovinos.

## CONCLUSION

La respuesta serológica de los doce bovinos a partir de una sola aplicación del biológico, sugiere que es una vacuna con un

CUADRO 2. RESPUESTA SEROLOGICA POSTERIOR AL DESAFIO EXPERIMENTAL CON LA CEPA DE VIRUS RABICO CASS-88 EN 17 BOVINOS

Bovino	Días posdesafío					
	1	7	14	21	30	45
1	625 <sup>+</sup>	21379	363078	389045	389045	389045
2	625	389045	389045	389045	389045	389045
3	61	389045	89125 <sup>a</sup>			
4	625	389045	36307	389045	389045	77624
5	625	389045	389045	389045	389045	251188
6	269	17182	22908	363078 <sup>b</sup>		
7	218	77624	389045	389045	389045	389045
8	625	45708	389045	251188	181970 <sup>1</sup>	30902
9	625	389045	389045	389045	389045	389045
10	138	251188	389045	389045	338844 <sup>c</sup>	
11	389	389045	389045	389045	389045	389045
12	625	389045	389045	389045	389045	389045
13*	0	0 <sup>d</sup>				
14*	0	0 <sup>e</sup>				
15*	0	0 <sup>f</sup>				
16*	0	0 <sup>g</sup>				
17*	0	100 <sup>h</sup>				

\* Los datos representan el recíproco de la dilución de suero que protegió al 50% de los ratones en la prueba de seroneutralización<sup>1</sup>.

+ El desafío se realizó 560 días posvacunación con la cepa CASS-88.

a Murió a los 19 días posdesafío.

b Murió a los 24 días posdesafío.

c Murió a los 30 días posdesafío.

\* Animal del grupo testigo no vacunado.

d Murió a los 10 días posdesafío.

e, f Mueren a los 11 días posdesafío.

g, h Mueren a los 12 días posdesafío.

buen potencial como vacuna inactivada contra cepas Americanas del virus rábico. Los resultados indicaron que la vacuna antirrábica inactivada, elaborada en cultivo celular con la Cepa Pasteur RIV, protegió el 75% del ganado contra el virus rábico de campo (Cepa CASS-88) a una dosis de exposición de  $50 \times 10^6$  DI<sub>50</sub> en ratón. Es opinión de los autores, que las condiciones de desafío observadas en este experimento serían difíciles de ocurrir en una exposición natural de campo por lo que consideramos que la vacu-

na merece un estudio más a fondo en condiciones de campo, pues promete ser efectiva para prevenir la rabia pareasiente bovina.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Subdirector de Servicios Técnicos Esteban Labrandero Iñigo y al personal a su cargo por la ayuda prestada en el manejo de los semovientes durante el experimento, así como a Eulalia Sánchez Valdez por su colabo-

ración en el trabajo de laboratorio y al Dr. Abel Ciprián Carrasco por su valiosa ayuda en la revisión del documento. También se agradece a los Laboratorios Intervet México, S.A. de C.V. por la donación de los bovinos utilizados en el experimento.

## SUMMARY

In order to evaluate the immune response in cattle elicited by inactivated vaccine strain Pasteur-RIV produced in cell culture, 17 one of two year old Holstein steers were selected on the basis of their having no history of antirabies vaccination as well as no detectable antibodies to rabies virus. Twelve animals were immunized with 1 ml of vaccine I.M. The nonvaccinated control group consisted of 5 animals. No lesions or hypersensitivity reaction were observed at the vaccination site. Serum samples were taken on days 7, 14, 21, 30, 60, 90, 180, 270, 365, 440, 547 and 560 postinoculation and 7, 14, 21, 30 and 45 days postchallenge. The seroneutralization test in mice was used to determine the antibody titres. All the vaccinated animals had protective antibody levels from day 30 postvaccination, which were maintained until the end of the experiment. Animals were challenged 560 days postvaccination using the vampire bat strain CASS-88 ( $50 \times 10^6$  DI<sub>50</sub> in mice). All control animals died of rabies between 10 to 12 days postchallenge, as well as three from the vaccinated group between days 19 and 30. The remaining nine vaccinated animals survived the challenge. These results indicate that the inactivated rabies vaccine strain Pasteur-RIV protected 75% of cattle against vampire bat transmitted rabies for at least 18 months.

## LITERATURA CITADA

1. ABELSETH, M.K., 1964. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue cultures. *Can Vet J*, 5, 11: 279-286.
2. AGUILAR-SETIEN, A., PASTORET, P.P., OROS, C.D. y KRETSCHMER, R., 1986. Anticuerpos monoclonales en Rabia. En: Avances en el Uso de Vacunas 1885-1985. Editado por: Garza-Ramos, J. Franco de Guzmán, G., 48-53. *Secretaría de Salud*, México, D.F.
- 3.- ARELLANO, S.C., SUREAU, P. y BATALLA, C.D., 1971. Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa "ERA" en bovinos: I. Antigenicidad. *Tec. Pec. Mex.* 18: 12-15.
4. ATANASIU, P., 1973. Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Edited by: Kaplan, M. M., Koprowsky, H., Series No. 23. 314-320 WHO, Geneva.
5. Code of federal regulations. The National Archives of the United States. Parts 1 to 199. As of January, 1982.
6. CUEVAS, R.S., COLMENARES, V.G., BATALLA, C.D. y HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, E., 1989. Selección de un virus rábico de origen vampiro para utilizarse como cepa de desafío en bovinos. *Vet. Mex.* 20.
7. Departamento de Control de Productos Biológicos, Farmacéuticos, Alimenticios y Equipo para Animales., 1977. Requerimientos mínimos de productos biológicos para bovinos, En: *Requisitos Mínimos de Calidad que deberán llenar los Productos Biológicos para Uso Veterinario*, Sección. III parte B-2. Editado por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Subsecretaría de Ganadería. *Dirección General de Sanidad Animal*. México, D.F.
8. GOLDWASSER, R.A. and KISSLING, R.E., 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* 98: 219-223.
9. HABEL, K., 1973. Habel test for potency. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd. ed. Edited by: Kaplan, M.M., and Koprowsky, H., Series No. 23. 276-277. WHO, Geneva.
10. HERNÁNDEZ, B.E., MORALES, R.J., ARELLANO, S.C., CAMPOS, V.J., LÓPEZ, B.B. y PÉREZ, R.H., 1976. Evaluación de una vacuna comercial antirrábica inactivada para bovinos, producida en cultivo de tejidos (Alurabiffa). *Tec. Pec. Mex.* 30: 57-63.
11. KOPROWSKY, H., 1973. The mouse inoculation test. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Edited by: Kaplan, M.M., Koprowsky, H., Series No. 23. 85-93. WHO, Geneva.
12. LORENZ, R.J. and BOGEL, K., 1973. Method of Reed and Muench. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Appendix 1. 3rd ed. Edited by: Kaplan, M.M., Koprowsky, H., Series No. 23. 329-332. WHO, Geneva.
13. SELIGMANN, E.B., 1973. The NIH test for potency. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd. ed. Edited by: Kaplan, M.M., Koprowsky, H., Series No. 23. 279-286. WHO, Geneva.
14. SORIA, B.R. y BLANCOU, J. 1987. Evaluación de la inmunidad conferida en bovinos por una vacuna antirrábica producida en cultivo celular a partir de virus inactivados. *Vet. Mex.*, 18: 207-213.
15. SUREAU, P., ARELLANO, S.C. y BATALLA, C.D., 1971. Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa "ERA" en bovinos: II. Duración de la inmunidad. *Tec. Pec. Mex.* 18: 17-21.