

VALIDACION DE LA VACUNA CONTRA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) CEPA TEXCOCO EN CONDICIONES CONTROLADAS ^a

Arcelia Alvarado Islas^b
Pedro Mejía Sánchez^b
Octavio De Paz Villafán^b
Esteban Labradero Iñigo^b
Alvaro Aguilar Setién^b

RESUMEN

Con base en los requerimientos del Code of Federal Regulations (1992) (CFR) y de los requisitos mínimos de la Dirección General de Salud Animal (1977) (DGSA), se validó una vacuna inactivada y adyuvada contra Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), elaborada en el CENID-Microbiología, a partir de la "cepa" de origen nacional "Texcoco", previamente tipificada y evaluada inmunogénicamente. Del Campo Experimental Las Margaritas, ubicado en Hueytamalco Pue. México, se seleccionaron 25 bovinos seronegativos a IBR, se cuarentenaron y 20 de ellos fueron vacunados con una dosis de 5 ml., vía subcutánea, aplicando dos dosis vacunales con un intervalo de cuatro semanas; los 5 restantes quedaron como testigos, a los que se aplicó medio de cultivo estéril. El desafío se realizó en la novena semana, mediante escarificación en fosas nasales y vagina, con la "cepa" de referencia patógena IBR 758. Se obtuvieron muestras sanguíneas antes y con intervalos de 14 días posvacunación, observando las constantes fisiológicas durante tres semanas posdesafío. Los bovinos vacunados respondieron inmunogénicamente a los 14 días posvacunación, con niveles promedio de anticuerpos de 1:4, incrementándose con el segundo estímulo a 1:16 y con el desafío a 1:32, manteniendo sus constantes fisiológicas dentro de la normalidad y sin signos o lesiones imputables a IBR; mientras que los testigos, posdesafío iniciaron su respuesta inmune con niveles promedio de anticuerpos de 1:8, manifestando incremento de temperatura, dificultad para respirar, abundante secreción nasal y vaginal, placas en mucosa de los ollares y vesículas en vulva. Se demostró la efectividad de la vacuna al no enfermar ninguno de los animales vacunados y cubrir con los requisitos marcados por el CFR y la DGSA.

PALABRAS CLAVE: Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Herpes virus bovino-I (BHV-1), Vacunas, Adyuvantes.

Téc. Pecu. Méx. Vol. 35 No. 3 (1997)

INTRODUCCION

El virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) fue aislado por vez primera en México en 1974 (1); a partir de entonces, por estudios epizootiológicos se detectó la presencia de este agente en diversos estados del país (2, 3, 4), siendo la vacunación una de las mejores medidas para su control (4, 5, 6).

Actualmente existen en el mercado nacional dos tipos de vacunas polivalentes, que

incluyen entre otros al antígeno de IBR. Las elaboradas con virus vivo modificado (de cepa mutante termosensible), con las que se han realizado diversos trabajos de investigación, indicando ser productos eficaces e inocuos (7, 8, 9); sin embargo, al ser evaluadas en cuanto a su capacidad inmunogénica en nuestro país, los resultados no fueron del todo satisfactorios (10, 11), tal vez debido a un mal manejo de la cadena fría en el proceso de importación, transportación, almacenamiento o manipulación del biológico. Estas vacunas eran las únicas autorizadas por la Dirección General de Salud Animal (SAGAR) para su uso en México (5, 6, 11), por ser elaboradas con virus atenuado que se replica únicamente en el área de inoculación (fosas nasales),

^a Recibido para su publicación el 21 de noviembre de 1996.

^b Proyecto Complejos Neumónicos en Rumiantes. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, INIFAP SAGAR. Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, México D.F., C.P. 05110.
Apoyo Recibido: Campo Experimental Las Margaritas. PAIEPEME.

eliminando el riesgo de aborto al no multiplicarse en órganos profundos, de temperatura superior a la del tracto respiratorio (12); su inconveniente estriba principalmente en la excreción de la "cepa" vacunal en el lapso en que se inicia la inmunidad (aproximadamente 14 días), con una probable recombinación con cepas de campo, además de que los tipos de vacunas existentes en el mercado, no previenen la instalación de cepas patógenas al estado latente (6, 13).

Otro tipo de vacuna que se distribuye desde hace cuatro a cinco años en el mercado nacional, es la elaborada con virus inactivado y adyuvada, la cual supera a las inactivadas en su capacidad antigénica, al exacerbar la respuesta inmune por la adición del adyuvante (5, 6). Su principal ventaja estriba en no producir abortos ni excreción de virus vacunal, se aplica a ganado gestante, y confiere protección tanto local como general (14, 15); su desventaja es que, requiere de la aplicación de dos estímulos vacunales (5, 6). En México, se han evaluado vacunas comerciales de este tipo, en animales de laboratorio (conejos), teniendo respuesta inmune posterior a la aplicación del segundo estímulo vacunal (16, 17).

En el CENID-Microbiología, recientemente se elaboró una vacuna contra IBR del tipo inactivada y adyuvada, evaluándose su capacidad inmunogénica en animales de laboratorio (conejos), teniendo respuesta en producción de anticuerpos desde el primer estímulo vacunal, con incremento a la aplicación del segundo, y alta persistencia de la inmunidad (18).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad de dicha vacuna en bovinos, bajo condiciones controladas, con base en los requerimientos mínimos establecidos para la liberación de productos biológicos.

MATERIALES Y METODOS

Selección de Bovinos

Se realizó un muestreo serológico en los bovinos del Campo Experimental "Las Margaritas", ubicado en Hueytamalco, Pue., y se seleccionaron aleatoriamente 100 bovinos hembras de raza Cebú, negativas a Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), mediante la técnica de seroneutralización en placa (19). De estos 100 animales, se seleccionaron 24 vaquillas, las cuales fueron transportadas a los corrales de aislamiento de las instalaciones del CENID-Microbiología, donde después de un período de cuarentena y desparasitación, fueron utilizadas para la prueba de constatación de la vacuna.

Vacuna

La vacuna fue elaborada en el CENID-Microbiología, a partir de la "cepa" de origen nacional "Texcoco" (20), la cual fue replicada en cultivos celulares de la línea MDBK, inactivada con β -propiolactona y adicionada con un adyuvante, consistente en una emulsión de detergentes al 15% y aceites al 10% en volumen. Se omite la descripción detallada de los adyuvantes, por encontrarse en trámite de registro y patente (18).

Validación de Vacuna

Con base en los requerimientos del Code of Federal Regulation 1992 (CFR) (21) y la Dirección General de Salud Animal 1977 (22), se emplearon 25 bovinos libres de anticuerpos contra la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, divididos en dos grupos.

El grupo A, con 20 vaquillas Cebú, las que fueron sometidas a dos estímulos vacunales, con intervalo de cuatro semanas, en dosis de 5 ml. por vía subcutánea en la tabla del cuello. El Grupo B, fue el grupo testigo,

formado por cuatro vaquillas Cebú y un macho Holstein-Friesian, a los que se les aplicó medio de cultivo sobrenadante de cultivos celulares de la línea MDBK estéril, en las mismas dosis y vía de inoculación, por una sola ocasión el día 0.

El desafío de los animales (Grupos A y B) se realizó a las nueve semanas posaplicación del primer estímulo vacunal, por escarificación en fosas nasales (1ml) y vagina (1ml), con la "cepa" de referencia patógena IBR 758, con un título viral de $10^{6.0}$ TCID₅₀% (Dosis Infectantes en cultivos celulares 50%).

Se tomaron muestras sanguíneas del día 0 al 84 (23), con intervalos de 14 días después del primer estímulo vacunal, para la detección de la respuesta inmune mediante la técnica de seroneutralización en placa (19).

Posteriormente al desafío y durante tres semanas, los animales fueron observados para evaluar la presencia de hipertermia y de signos o lesiones que fueran atribuibles al virus de IBR (5).

Cultivos Celulares

Se emplearon cultivos celulares de línea MDBK "Madin Darby Bovine Kidney", donados por los laboratorios de Santa Ana Tecamac de la Dirección General de Salud Animal (SAGAR).

"Cepa" Viral

Se empleo la "cepa" de referencia patógena IBR 758, con título viral de $10^{6.0}$ TCID₅₀%, donada por el gobierno del Japón.

Diagnóstico

El diagnóstico serológico se realizó mediante la técnica de seroneutralización en placa (19), consistente en la elaboración de

diluciones dobles del suero problema, desde 1:2 hasta 1:128, a las que se adicionó el virus de referencia IBR 758, a una concentración de 50-300 TCID₅₀% y suspensión de células MDBK, a una concentración de 300,000 cel/ml. Se consideró como positivos a los sueros que desde la dilución 1:2 neutralizaron al virus, con base en los requerimientos que marca el CFR (21) y la SARH (22).

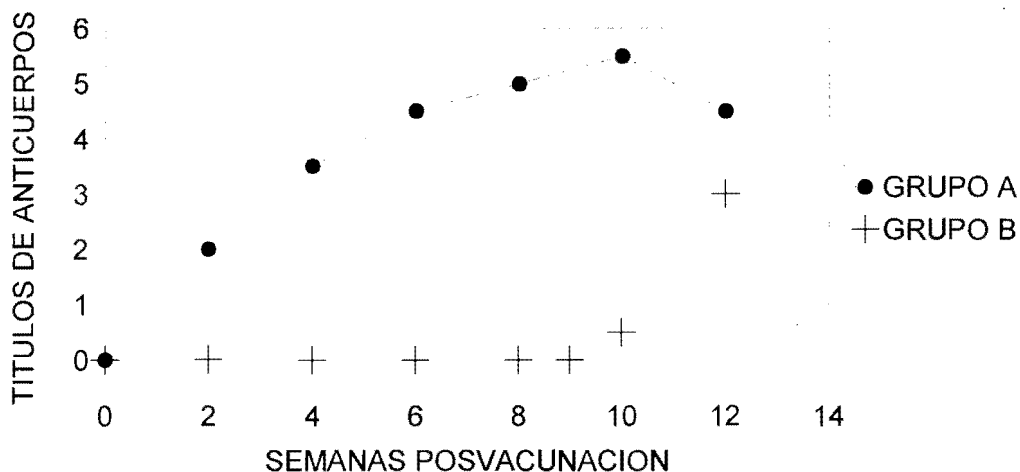
RESULTADOS

Las vaquillas del Grupo A, seronegativas al inicio del estudio, mostraron con el primer estímulo vacunal una respuesta inmune con títulos que fueron desde 1:2 hasta 1:32, con predominio de 1:2 y con un nivel promedio de anticuerpos de 1:4 en el 70% de los animales. Al segundo estímulo vacunal, los títulos oscilaron entre 1:8 y 1:64, con predominio de 1:8 y oscilando entre 1:8 y 1:16 en el 100% de los animales. Una semana después de haber realizado el desafío, los títulos se elevaron desde 1:16 a 1:128, con predominio de 1:16, siendo el promedio de anticuerpos entre 1:32 y 1:64.

El Grupo Testigo (Grupo B) se mantuvo negativo hasta la novena semana en que se realizó el desafío, después del cual, un bovino inició la producción de anticuerpos a un nivel de 1:8, y con el mismo título a los 14 días (día 84) el total del grupo testigo (Gráfica 1).

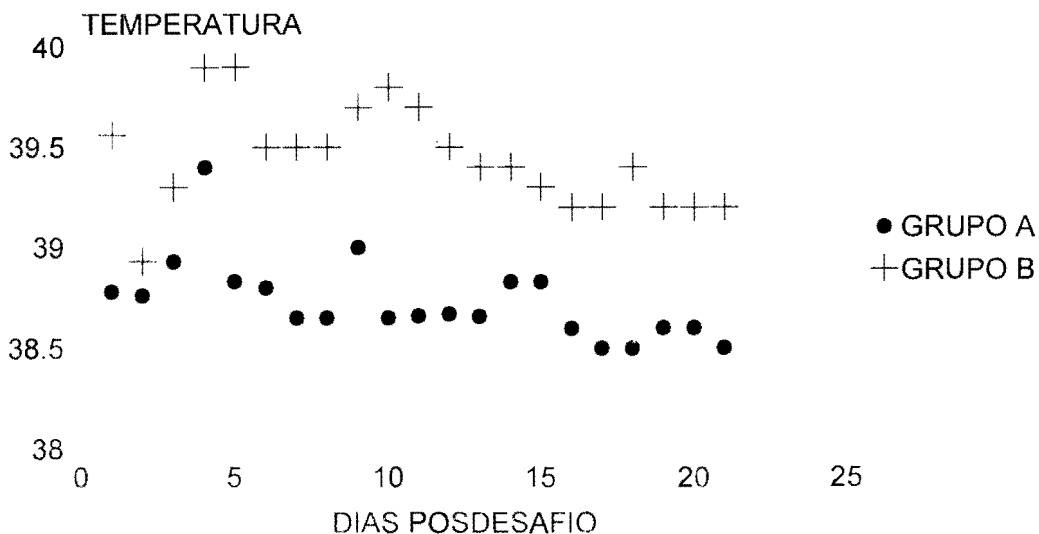
Durante las tres semanas de observación posdesafío, los bovinos vacunados mantuvieron la temperatura dentro de la normalidad (38.5 a 39.5 C), mientras que en el Grupo Testigo se manifestaron fluctuaciones, con elevación entre 39.5 y 41C (Gráfica 2).

GRAFICA 1. RESPUESTA INMUNE EN BOVINOS EN PRUEBA DE VALIDACION DE LA VACUNA DE IBR



LOS NIVELES PROMEDIO DE ANTICUERPOS SE EXPRESAN EN TRANSFORMACION LOGARITMICA BASE 2, SIENDO 1,2,3, ETC., LOS RESPECTIVOS LOGARITMOS DEL INVERSO A LAS DILUCIONES 1:2, 1:4, 1:8, ETC. DIA O PRIMER ESTIMULO VACUNAL, SEMANA 4 SEGUNDO ESTIMULO VACUNAL, SEMANA 9 DESAFIO

GRAFICA 2. NIVELES DE TEMPERATURA POSTDESAFIO EN BOVINOS DURANTE LA VALIDACION DE LA VACUNA CONTRA IBR



Por otra parte, en el Grupo A, durante la fase posvacunación, así como en la fase posdesafío, no se observaron alteraciones ni lesiones atribuibles a la vacunación, ni al virus de desafío, manteniéndose sin secreciones ni lesiones en el área de escarificación, imputables a IBR (Figuras 1, 2). Por otra parte, en el Grupo Testigo (B), a partir del segundo día posdesafío, los bovinos iniciaron con exudado nasal y vaginal, ligero

exudado ocular, dificultad para respirar y eritema en ollares y vulva; a partir del tercer día, se incrementó el exudado nasal y vaginal, y se apreciaron placas en la mucosa de los ollares y vesículas en vulva. Estas últimas lesiones persistieron durante tres semanas (Figuras 4, 5). El macho Holstein-Fresian de este mismo grupo, inició a los 4 días con eritema en el prepucio, seguido de una balanopostitis acentuada.

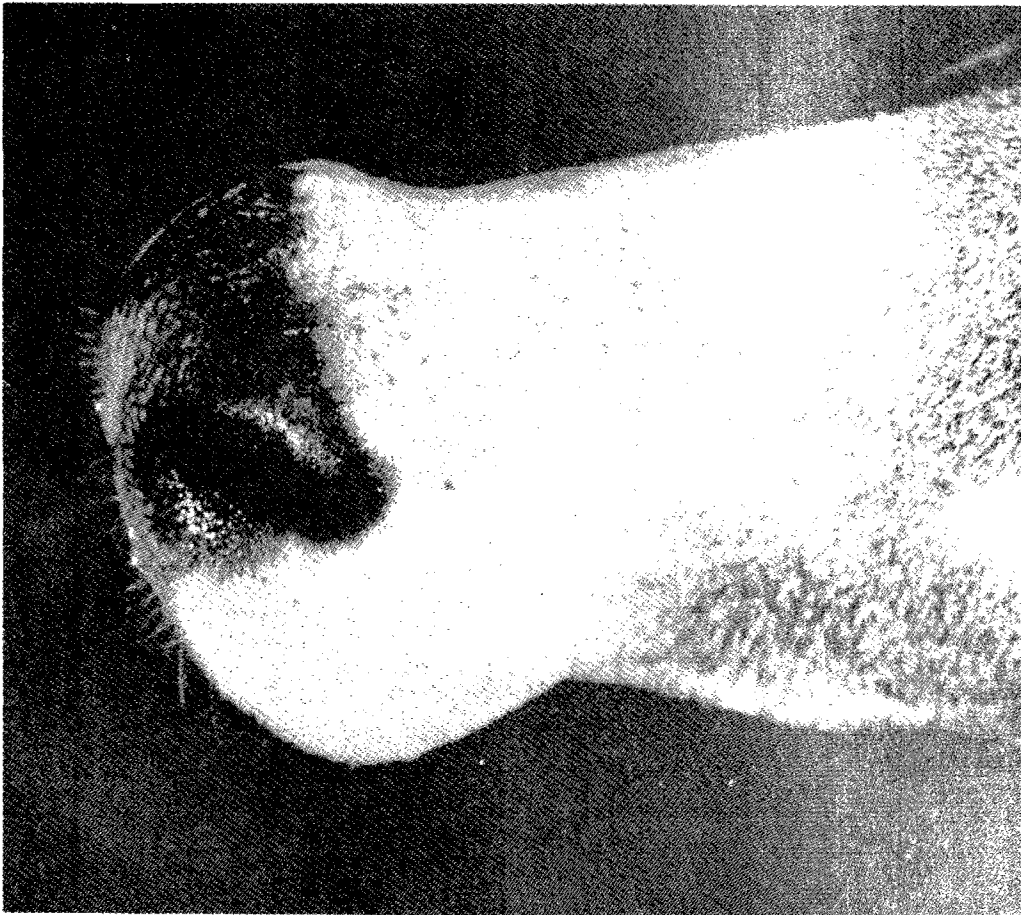


FIGURA 1. FOSAS NASALES DE UN BOVINO VACUNADO LIBRES DE SECRECIÓN O LESIONES A LOS 3 DÍAS DEL DESAFÍO, REALIZADO POR ESCARIFICACIÓN CON LA CEPA PATÓGENA DE REFERENCIA IBR758



FIGURA 2. VULVA DE NOVILLA VACUNADA LIBRE DE SECRECION, LESION O INFLAMACION A LOS 3 DIAS POSDESAFIO, EN EL AREA DE ESCARIFICACION CON LA CEPA DE REFERENCIA IBR 758

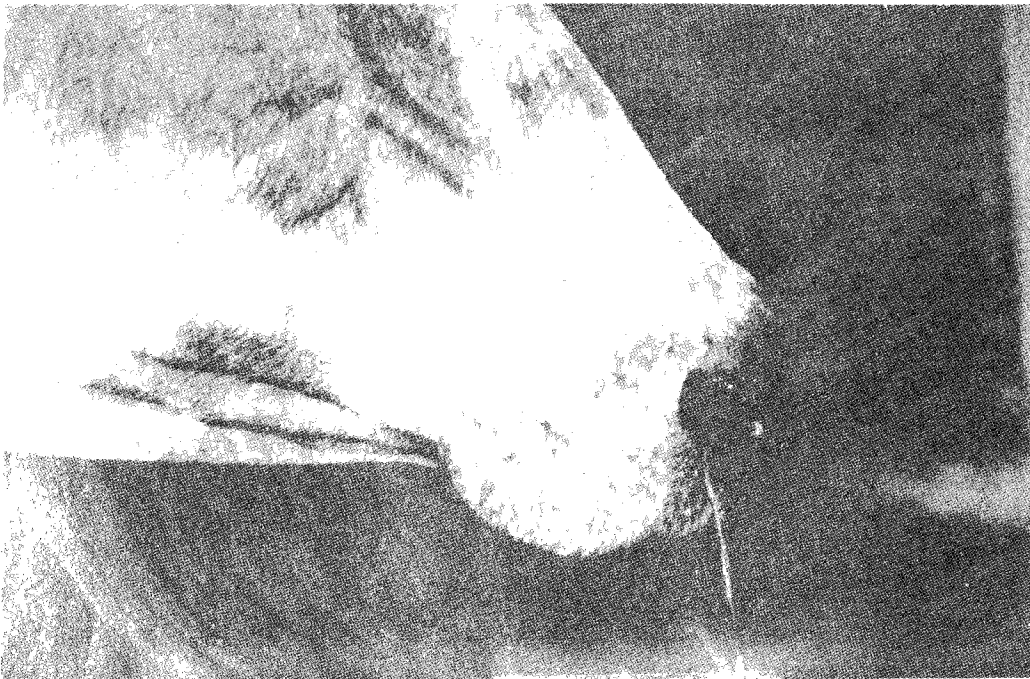


FIGURA 3. FOSAS NASALES DE BOVINO TESTIGO A LOS 3 DIAS POSDESAFIO, CON ABUNDANTE SECRECION NASAL Y ERITEMA EN EL AREA DE ESCARIFICACION CON LA CEPA DE REFERENCIA IBR758

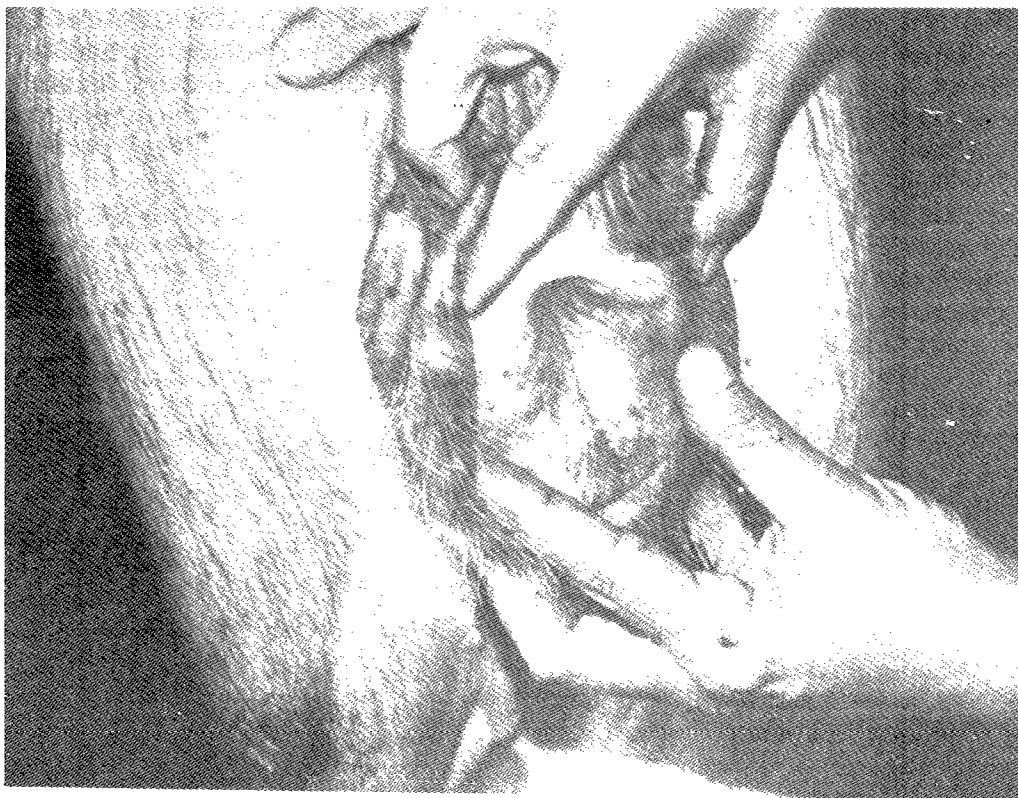


FIGURA 4. VULVA DE NOVILLA TESTIGO A LOS 3 DIAS POSDESAFIO CON ERITEMA, VESICULAS Y ABUNDANTE SECRECION VAGINAL EN EL AREA DE ESCARIFIACION CON LA CEPA DE REFERENCIA IBR758.

DISCUSION

La pobreza antigénica de las primeras vacunas inactivadas que salieron al mercado (5, 6), quedó superada al adicionar en ellas un adyuvante (de diversos tipos, según el elegido por el productor), el cual tiene la capacidad de incrementar los niveles de inmunidad, en forma superior a los desarrollados con una vacuna inactivada sola (24). Lo que dio origen a la creación de las vacunas inactivadas/adyuvadas.

La vacuna contra IBR inactivada/adyuvada del CENID-Microbiología, evaluada previamente en conejos con resultados satisfactorios y superiores a los de las vacunas comerciales (18), mostró su efectividad e inocuidad al validarse en

bovinos, donde resalta su grado de protección después del desafío, ya que los animales vacunados se mantuvieron dentro de la normalidad y no se presentaron signos ni lesiones imputables a la vacunación ó al virus patógeno de IBR. Observando posdesafío en el grupo testigo alteraciones, signos y lesiones típicas de la enfermedad de IBR.

Se han establecido comparaciones entre las vacunas elaboradas con virus termosensibles y las inactivadas, resaltando la superioridad en efectividad de las primeras, por poseer un antígeno vivo atenuado, incapaz de replicarse en tejidos con temperaturas

superiores a los 38 C, y por consiguiente con un imposible acceso al feto; sin embargo, como se mencionó anteriormente, no se evita la dispersión de la "cepa" vacunal en el hato; ni se previene con ningún tipo de estas vacunas, la instalación de "cepas" patógenas en estado latente. Por otra parte, con estas vacunas se han realizado en México evaluaciones en cuanto a su capacidad inmunogénica, en las que, cuando se aplicó un solo estímulo vacunal, la seropositividad fue de 33.35% (11) y cuando se aplicaron dos estímulos vacunales con intervalo de 11 meses, siguiendo un esquema de vacunación (becerras/vaquillas a los 7 y a los 18 meses de edad) y con muestreos sanguíneos en las épocas de invierno y primavera, la seropositividad fue del 65.8% en los dos sangrados (10). Mientras que con la vacuna inactivada/adyuvada del CENID-Microbiología la seropositividad fue de 70 y 100% al primer y segundo estímulos vacunales, respectivamente. El requisito mínimo que marcan el Code of Federal Regulation y la Dirección General de Salud Animal es de 80% (21, 22).

Lo ideal de una vacuna sería que, fuera de bajo costo, inocua, no infectara en forma latente, prevenir la infección de "cepas" de campo en forma latente, no diseminarse, etc.; sin embargo, las vacunas existentes no satisfacen uno o varios de estos requisitos (6).

La efectividad de la vacuna del CENID-Microbiología del INIFAP, cubre la mayoría de los principales requisitos mencionados, pero ni ésta, ni ninguna otra de las vacunas existentes, evitan la instalación de "cepas" de campo. Sin embargo, esta vacuna posee las cualidades de inocuidad y efectividad, puesto que no infecta en forma latente, no produce abortos y no se disemina, debido a que el antígeno consiste en un virus inactivado.

INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VACCINE (TEXCOCO STRAIN) VALIDATION UNDER CONTROLLED CONDITIONS

SUMMARY

A Mexican produced, inactivated adjuvant-mixed vaccine against bovine infections rhinotracheitis (IBR) was tested according to the Code of Federal Regulations (USA) and the Dirección General de Salud Animal (México). The Texcoco IBR virus strain used for production of this immunogen has been previously characterized. Twenty five adult bovine (from "Las Margaritas" ranch in Hueytemalco, Puebla) and seronegative to IBR virus were quarantined and used for this assay. Twenty bovines received two 5 ml doses subcutaneously 4 weeks apart and the other five remained as non vaccinated controls receiving only cell culture medium. Nine weeks after initial vaccination all animals were challenged by scarification of the nasal and vaginal mucosa with the reference IBR 758 virus strain. Blood was collected before vaccination and every 14 days post-vaccination. Physiological values were recorded during 3 weeks post-challenge. Vaccinated animals showed specific antibodies 14 days post-vaccination, with average titers 1:4. Titers increase (average titers 1:16) with the second vaccination and with challenge (average titers 1:32). No physiological alterations or clinical signs were observed in vaccinated animals. The control animals developed specific antibodies only after challenge (average titers 1:8) and showed fever, nasal and vaginal secretion, breathing difficulties and mucopurulent spots in vaginal and nasal mucosae. We concluded that the studied IBR vaccine covered the established standards.

KEY WORDS: Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), Vaccines, Adjuvants.

REFERENCIAS

1. Martell M, Soto L, Castellanos L, Mc Cauley H H, Johnson D W. IBR virus isolated from two epizootics in Mexican dairy cattle. *Agri Practice. Vet. Med./Small. Anim. Clin.* 1974;1045.
2. De Quevedo J M, Aguilar S A, Correa G P, Berruecos J M. Algunos aspectos epizootiológicos de la rinotraqueitis infecciosa bovina. *Téc. Pecu. Méx.* 1978; 34 61.
3. Suzan V M, Onuma M, Romero E A, Murakami Y. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhoea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in México. *Jpn. J. Vet. Res.* 1983; 31 125.
4. Vilchis M C, Susana M V, Rosales B C, Aguilar S A, Vargas L J, Peña M I, Jorge G M J, Batalla C D. Estudio epizootiológico de la rinotraqueitis infecciosa bovina en ganado productor de leche y productor de carne. *Téc. Pecu. Méx.* 1985; 49, 106.
5. Aguilar S A. El virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (Bovine Herpesvirus 1): Propiedades y vacunación en: *Ciencia Veterinaria UNAM* ed. por Ricardo Moreno Chan 1987; (4) 161-202.
6. Aguilar S A. Recomendaciones para la prevención contra la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (Bovine Herpesvirus 1, BHV-1) en. *V Curso Internacional de Reproducción Bovina. Academia de Investigación en Biología de la Reproducción A. C.* 1993, 253-262.

7. Tood J D, Volenec F J, Paton J M. Interferon intranasal administration of avirulent infections bovine rhinotracheitis virus associations of interferon in nasal secretions with aerly resistance to challenge with virulent virus. *Infect. Immun.* 1972; (5) 699.
8. Zygraich N, Huygelen C, Vascoboinic E. Vaccination of calves against infectious bovine rhinotracheitis using a temperature sensitive mutant. 13th. International congress of IABS, Budapest Part B. Selected Veterinary vaccines. *Develop. Biol. Standard* 1974; (26) 8.14.
9. Jay D G. Local and systemic cellular and antibody immune response of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccines administered intranasally or intramuscular. *J. of Vet. Res.* May. 1978.
10. Ayala B G, Prado A F J, Vilchis M C, Diaz A E. Patrón de comportamiento de anticuerpos contra IBR en becerras y vaquillas holstein-fresian bajo un esquema de vacunación. *Téc. Pecu. Méx.* 1989; 27 (1) 22.
11. Vilchis M C, Sosa R M, Alvarado I A, Aguilar S A, Hernández V R, Batalla C D. Evaluación de la vacuna TSV-2 de IBR/PI³ en bovinos nacionales productores de leche. *Téc. Pecu. Méx.* 1991; 29 (1) 19.
12. Smithkline. Noticias Norden. Rinotraqueítis infecciosa bovina en ganado bovino lechero. *Boletín. Fuente: Subdirección de Epizootiología. Dirección General de Sanidad Animal SARH.* 1982; 10 6p.
13. Fechner J. Vacunas y vacunación de los animales domésticos. 1ª ed. en español, Zaragoza España: Acribia, 1966; 25.
14. Soulebot J P, Brun A, Dubourget P. Vaccins et vaccinatoin contre la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Develop. Biol. Standard* 1982; 52 415.
15. Soulebot J P, Guillemin F, Brun A, Dubourget P, Espinasse J., Terre J. Infectiuos bovine rhinotracheitis: study on the experimental induced disease and its prevention using an inactivated, adjuvated vaccine. *Develop. Biol. Standard* 1982; 52 463.
16. Alvarado I A, Mejia S P, De Paz V O, Aguilar S A. Evaluación y comparación en conejos de vacunas comerciales contra rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) en: *Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Acapulco Mex.* 1994: 214.
17. Alvarado I A, Mejia S P, De Paz V O, Aguilar S A. Comprobación de la efectividad de vacunas comerciales contra Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) en: *Memorias del XXIV Congreso Nacional de Microbiología, Veracruz Ver.* 1995: J-31
18. Alvarado I A, Mejia S P, De Paz V O, Labrandero I E, Aguilar S A. Elaboración y evaluación en conejos de cuatro tipos de adyuvantes para una vacuna contra rinotraqueítis infecciosa bovina. *Téc. Pecu. Méx.* 1995: 33 (3) 125.
19. Jenney E W, Wessman S J, Spinka F L. Serologic microfiltration techniques. U.S. Department of agriculture. Animal and plant health inspection service. Ames Iowa 1978; 16.
20. Alvarado I A, Aguilar S A, Mejia S P, De Paz V O, Vilchis M C. Aislamiento y tipificación de una cepa de herpes virus bovino I, del tipo vulvovaginitis pustular infecciosa. *Téc. Pecu. Méx.* 1993; 31 (2) 72.
21. Code of Federal Regulations. Animals and animal products. Cytology section. Biologics virology laboratory 1992; 9 584-586.
22. SARH. Requerimientos mínimos de calidad que deberán llenar los productos biológicos para uso veterinario. Dirección General de Salud Animal. México 1977.
23. Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico. Dirección General de Salud Animal. Recolección y envío de muestras de al laboratorio de diagnóstico de patología animal. México. *Boletín* 1976.
24. Vanselow B A. The aplication of adjuvants to Veterinary Medicine. *Veterinary Buletin.* 1987; 57 (11) 881.