

DESAFIO DE BOVINOS CON VIRUS RABICO DE ORIGEN VAMPIRO A LOS 360 DIAS DE VACUNADOS CONTRA LA RABIA CON LA "CEPA" PASTEUR INACTIVADA^a

José E. Weirmersheimer Rubí^b
Arcelia Alvarado Islas^b
Esteban Labrandero Iñigo^b
George M. Baer^c
Myrna G. Adriano^b
Juan I. Monroy Basilio^b
Diódoro Batalla Campero^d

RESUMEN

Weirmersheimer R J E, Alvarado I A, Labrandero I E, Baer G M, Adriano M G, Monroy B J I, Batalla C D. *Téc Pecu. Méx.* 1999;37(2)25-30. Para lograr la protección de los animales expuestos a la Rabia Paralítica Bovina, o Derriengue, la Norma Oficial Mexicana dispone que las vacunas contra el Derriengue de nuevo registro deben pasar una prueba de potencia en bovinos, utilizando para exponerlos una "cepa" de origen vampiro, capaz de matar por lo menos al 80% de los animales del grupo testigo y que deben sobrevivir el 80% de los animales vacunados por lo menos durante 360 días después de la inmunización. El objetivo de este trabajo fue determinar la protección conferida por una vacuna comercial en ganado bovino, con desafío a un año, con virus de origen vampiro; así como la titulación de anticuerpos contra la rabia por la prueba de sueroneutralización a los 0, 14, 30, 60, 90, 180 y 360 días. Los resultados obtenidos de 13 animales vacunados fueron los siguientes, representados por una media ponderada aritmética de los títulos de anticuerpos: 0 días < 1:5 (-); 14 días 1:7.5; 30 días 1:14.76; 60 días 1:23.25; 90 días 1:20.50; 180 días 1:18.40; y a los 360 días 1:9.67. Con la media ponderada logarítmica se obtuvieron los siguientes resultados: 0 días < 1:5 (-), 14 días 1:5.0; 30 días 1:14.03; 60 días 1:17.06; 90 días 1:15.85; 180 días 1:15.14; 360 días 1:7.94. Se desafiaron cinco de los vacunados, ninguno de ellos murió mientras que de los cinco animales testigos desafiados murieron cuatro (80%). Se concluye que la vacuna reúne los requisitos mínimos establecidos por la Norma Oficial Mexicana y que puede ser utilizada para la prevención del Derriengue.

PALABRAS CLAVE : Rabia, Derriengue, Vacuna, Desafío, Bovinos.

La Rabia Paralítica Bovina (Derriengue), transmitida por la mordedura del murciélago

hematófago, vector de la Rabia, es un grave problema que produce cuantiosas pérdidas económicas a la ganadería del país (1,2). Los métodos utilizados actualmente para su prevención son: el control de las poblaciones de murciélagos hematófagos, mediante la utilización de sustancias anticoagulantes y la vacunación del ganado en riesgo, empleando biológicos con antígenos purificados, que generen una

- a Recibido el 26 de mayo de 1997 y aceptado para su publicación el 7 de mayo de 1999.
- b INIFAP. CENID-Microbiología. Carretera México-Toluca Km. 15.5, Méx. D.F., Col. Palo Alto CP 05110.
- c Laboratorios Baer. Cuautla 150.Col.Condesa.C.P. 06140.
- d Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México.

respuesta inmunogénica duradera (3). Los productos que actualmente logran este objetivo son las vacunas producidas en cultivos celulares, con virus activo modificado. Las de tipo inactivado también logran este objetivo y a la vez tienen mayor resistencia a las altas temperaturas, debido a su estabilidad viral, variando su caducidad de 1 a 3 años, dependiendo de su manejo (1).

Para obtener mayor seguridad respecto a la protección conferida al ganado, al utilizar vacunas elaboradas con virus de la Rabia que pudieran tener algunas variaciones antigénicas respecto del virus rábico transmitido por el murciélago hematófago, es necesario evaluar los biológicos contra el Derriengue, mediante el desafío experimental con "cepas" de origen vampiro (2,4).

Actualmente, la Norma Oficial Mexicana (N.O.M., 035-Zoo-1996) (2) establece que para el control de calidad de los biológicos antirrábicos, se les debe realizar la prueba de potencia del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH) (5,6,7), la cual se realiza en ratones. Esta prueba ha permanecido sin cambios por varios años; sin embargo, la presencia de brotes aislados de rabia en animales vacunados con vacunas de potencia comprobada, mediante la prueba mencionada, ha indicado que estas confieren diferentes grados de protección (3).

Esta norma establece que a las nuevas vacunas contra el Derriengue se les debe de realizar una prueba de potencia en bovinos, desafiándolos con un virus rábico

de origen vampiro, capaz de matar por lo menos al 80% de los animales del grupo testigo y cuando menos conferir un 80% de protección a los vacunados (2).

El objetivo del estudio fue evaluar la protección conferida al ganado bovino por la vacuna antirrábica inactivada "cepa" Pasteur, mediante el desafío al año, utilizando virus de Rabia de origen vampiro, titulado previamente en la misma especie.

Se emplearon 13 bovinos procedentes de una área libre de Derriengue, raza Brahman, de 12 meses de edad, con peso promedio de 200 kg, serológicamente negativos a la rabia, los cuales fueron vacunados por vía intramuscular (IM) con 1 ml del biológico, según recomendación del laboratorio productor. Se sangraron a partir de la vena coccígea a los 0, 30, 60, 90, 180 y 360 días posvacunación. Previamente la "cepa" de desafío fue titulada en seis bovinos de la misma raza, de 12 meses de edad, libres de anticuerpos contra Rabia, para determinar la dosis letal 80% en bovinos. Otros 12 bovinos de la misma raza y edad integraron el grupo testigo, de los cuales fueron seleccionados al azar cinco animales para utilizarlos con este fin en la prueba.

Se utilizaron ratones de la "cepa" CD-1, de 21 días de edad para la realización de las pruebas de sueroneutralización con cuatro diluciones.

Para la determinación de la dosis letal (DL) 80% se inocularon seis bovinos de 12 meses de edad, en los músculos maseteros, con 5 ml de volumen total, de

tres diferentes diluciones del virus del vampiro seleccionado. Por ello se formaron tres grupos de dos animales cada uno; el primer grupo fue inoculado con 5×10^4 DL₅₀% para el ratón por ml via intracerebral; el segundo grupo con 5×10^5 DL₅₀%/ml y el tercer grupo con 5×10^6 DL₅₀%/ml. Los bovinos se mantuvieron en las unidades de aislamiento del CENID-Microbiología, INIFAP, SAGAR, Palo Alto, D.F., durante toda esta fase del estudio. Después de ser inoculados, se les observó diariamente para detectar los signos clínicos de la enfermedad. A los bovinos que murieron con signos de rabia, se les realizó la necropsia, en todos los casos se tomaron muestras del sistema nervioso central. El virus de la rabia se identificó por la técnica de anticuerpos fluorescentes como prueba confirmatoria (9).

Se vacunaron 13 animales de aproximadamente 12 meses de edad con una sola dosis de la vacuna inactivada, la cual tenía un valor antigénico de por lo menos 2.0 UI, determinada por la prueba del (NIH).

La vacuna se aplicó por vía IM, en la tabla del cuello, a la dosis recomendada por el laboratorio productor de 1 ml. Se tomaron muestras sanguíneas de cada animal a los 0, 14, 30, 60, 90, 180 y 360 días posvacunación para la determinación de los títulos de anticuerpos, mediante la prueba de seroneutralización (SN). Además de los 13 animales vacunados, se incluyeron 12 animales más como testigos. Estos 25 animales se mantuvieron en corrales de zona restringida libre de derriengue, siendo estos de igual procedencia.

De los 13 bovinos vacunados, a los 12 meses posvacunación, fueron escogidos cinco animales; dos con los títulos más altos, (1:16 y 1:13) dos con títulos medios (1:10 y 1:10) y uno con título menor de 1:10, que fueron expuestos con la cepa de origen vampiro; al igual que cinco de los 12 testigos negativos a rabia y que fueron escogidos al azar. La dosis de exposición que se utilizó fué de $10^{6.0}$ DL₅₀%/ml en ratón. Los animales expuestos fueron examinados diariamente para detectar los posibles signos de rabia. Al morir se les realizó el diagnóstico por la prueba de inmunofluorescencia.

Mediante la prueba de SN en ratones, se obtuvieron los resultados por animal, y a la vez la media ponderada logarítmica (MPL) y la media aritmética ponderada (MPA) de títulos de anticuerpos de los 13 animales vacunados y muestreados a diferentes tiempos. En los animales inmunizados con la vacuna en estudio, no se observaron signos atribuibles a la aplicación de la vacuna, ni se observaron alteraciones macroscópicas en la zona de aplicación del biológico.

La evaluación de la respuesta serológica de los 13 animales vacunados se muestra en el Cuadro 1 y Gráfica1. En todos los animales vacunados se detectaron anticuerpos a partir del séptimo día posvacunación. Los títulos más altos de anticuerpos obtenidos fueron a los 60 días después de la vacunación, con una MPL de 1:17.06, empezando a descender a los 90 días (1:15.85) y así sucesivamente, a los 180 días (1:15.14) y a los 360 días (1:7.94). En la MPA el mayor título se

Cuadro 1. Resultados de la titulación de anticuerpos de los animales vacunados

IDENTIF. BOV.	TIEMPO POSINOCULACION (EN DIAS).						
	0	14	30	60	90	180	360
052	< 1:5	1:7	1:12	1:13	1:10	1:16	1:16
024	< 1:5	1:7	1:12	1:16	1:18	1:16	1:11
016	< 1:5	1:3	1:11	1:16	1:32	1:20	1:8
004	< 1:5	1:12	1:21	1:23	1:23	1:22	1:14
022	< 1:5	1:15	1:16	1:11	1:11	1:7	1:3
006	< 1:5	1:15	1:24	1:81	1:28	1:30	1:13
020	< 1:5	1:5	1:12	1:34	1:34	1:32	1:7
026	< 1:5	1:2	1:9	1:16	1:11	1:11	1:7
014	< 1:5	1:12	1:20	1:16	1:16	1:13	1:8
008	< 1:5	1:8	1:28	1:21	1:28	1:28	1:10
010	< 1:5	1:2	1:7	1:9	1:7	1:9	1:5
162	< 1:5	1:3	1:7	1:28	1:33	1:28	1:19
012	< 1:5	1:6	1:11	1:20	1:16	1:8	1:6
MED ARI	< 1:5	1:7.5	1:14.7	1:23.2	1:20.5	1:18.4	1:9.67
MED LOG	0	1:5.0	1:14.03	1:17.06	1:15.85	1:15.14	1:7.94

Títulos < 1:5 = Negativos

Todos los controles fueron menores de 1:5 en este período (Negativos).

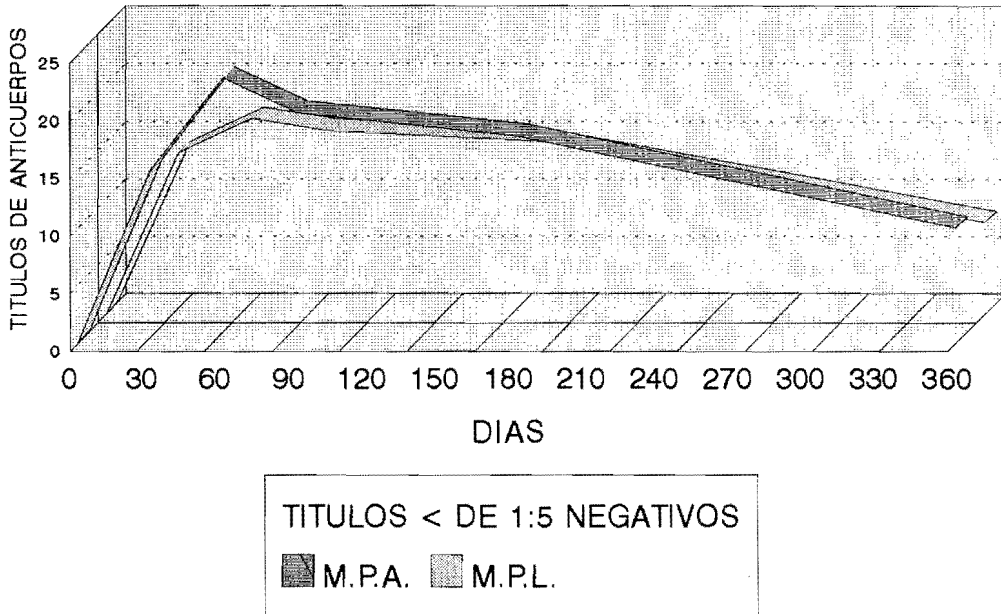
presentó en igual forma a los 60 días (1:23.25); a los 90 días comienza a descender a 1:20.50, a 180 días a 1:18.40 y a 360 días a 1:9.67. De los seis animales utilizados para la titulación de la cepa de desafío, se obtuvo 100% de mortalidad en los grupos 1 y 2, y en el 3 un 50%; por lo cual se determinó que la dosis adecuada para realizar el desafío fue de 5×10^6 DL₅₀/ml en ratón.

Posdesafío, los primeros signos clínicos de rabia en los animales del grupo testigo aparecieron a los siete días después, caracterizados por salivación excesiva, incoordinación, postración y muerte. De los 12 animales testigos negativos a anticuerpos contra la rabia, se seleccionaron

cinco, los cuales fueron desafiados; cuatro murieron de rabia entre los 10 y 21 días posdesafío, siendo corroborado el diagnóstico clínico presuntivo por la prueba de inmunofluorescencia, ya que las muestras de los cuatro cerebros trabajados resultaron positivas. De los cinco animales vacunados, todos sobrevivieron al desafío.

Ante el desafío se logró obtener un 100% de protección en los animales vacunados y un 80% de mortalidad en los testigos; por lo que se cumplió en lo establecido por la N.O.M-035-Zoo-1996 (2). A partir del séptimo día, y hasta los 365 días posvacunación, se detectaron anticuerpos antirrábicos mediante la prueba de seroneutralización, lo que indica que la

Gráfica 1.- Media ponderada logarítmica y arimética de anticuerpos en los animales vacunados.



vacuna estimula una respuesta inmune rápida y duradera; y a la vez protección contra la enfermedad hasta por lo menos 365 días posvacunación; corroborado por el desafío con la "cepa" de virus rábico origen vampiro a los 12 meses después de la aplicación del biológico.

La dosis utilizada para el desafío, de $10^{6.0}$ DL₅₀ %/ml determinada en ratón, fue suficiente para cumplir con los requisitos de la Norma Oficial Mexicana; por lo tanto, con base en los resultados obtenidos se concluye que la vacuna en estudio cubre los requerimientos necesarios para utilizarse como agente inmunizante, ya que protege al ganado expuesto a la enfermedad

por lo menos por 365 días posvacunación, si se maneja el producto como lo establece el laboratorio productor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México (PAIEPEME) y a su personal, por el financiamiento parcial y la ayuda prestada en el manejo de los semovientes. También se agradece a los laboratorios Pfizer S.A. de C.V. por haber financiado parcialmente este experimento.

CHALLENGE OF BOVINES WITH A VAMPIRE RABIES VIRUS 360 DAYS AFTER VACCINATION WITH AN INACTIVATED RABIES VACCINE (PASTEUR STRAIN)

SUMMARY

Weimersheimer RJE, Alvarado IA, Labrandero I E, Baer GM, Adriano MG, Monroy BJI, Batalla CD. *Téc. Pecu. Méx.* 1999;37(2):25-30. The epizootiologic condition in México requires that the efficacy of a bovine rabies vaccine must be tested by challenge studies. The new Mexican Official Standards (NOM) require that all bovine rabies vaccines must be tested using a rabies vampire bat strain for challenge and at least 80% of the vaccinated animals will survive while at least 80% of the unvaccinated control animals will die. In this experiment 13 animals were vaccinated with an inactivated cell culture vaccine of Pasteur strain origin. Serum samples were taken at 0,14,30,60,90,180 and 360 days after vaccination. Serum neutralization tests in mice indicated that all vaccinated animals had significant rabies antibody levels by 14 days, being the best at 60 days after vaccination, levels which were maintained until the end of the study. At 360 days, 5 from 13 vaccinated animals, and 5 controls were challenged with a known vampire strain of virus (titer $10^{6.0}$ mouse intracerebral LD 50%/ml). All vaccinated animals survived the challenge whereas four of five controls died of rabies. These results indicated that this inactivated rabies vaccine, Pasteur origin, protected 100% of vaccinated cattle against vampire bat rabies for at least 12 months.

KEY WORDS: Rabies, Derriengue, Vaccine, Challenge, Bovines.

REFERENCIAS

1. Hernández BE. La rabia pareasiente bovina: Definición del problema y metodología. *Ciencia Veterinaria*, 1976;(1):104-129.
2. 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.
3. Aguilar SA, Pastoret PP, Kresschmer R. Anticuerpos monoclonales en Rabia. Avances en el uso de vacunas 1885-1985. Garza RJ, De Guzman GF (eds), Secretaria de Salud, México D.F., 1986:48-53.
4. Cuevas S, Colmenares G, Batalla D, Hernández E. Selección de un virus rábico de origen vampiro para utilizarse como cepa de desafío en bovinos. *Vet. Méx.* 1989; XX (3):271.
5. *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Edited by: Kaplan, M. N., Koprowsky, H (ed), Series No. 23. WHO, Geneva. 1973:276.
6. Batalla CD, Arellano SC, Sureau P. Evaluación serológica de las vacunas antirrábicas para bovinos que existen actualmente en México. *Téc. Pecu. Méx.* 1971;(18):22.
7. Hernández BE, Morales RJ, Arellano SC, Campos VJ, Lopez BB, Perez RH. Evaluación de una vacuna antirrábica inactivada para bovinos, producida en cultivo de tejidos. (Alurabifa). *Téc. Pecu. Méx.* 1992;30(1):57.
8. Cuevas RS, Ruiz JM, Batalla CD, Hernandez BE, Colmenares VG. Evaluación de la vacuna antirrábica inactivada cepa Pasteur RIV en bovinos, mediante desafío con la cepa patógena del virus rábico CASS-88. *Téc. Pecu. Méx.* 1991;(29)1:1.
9. Seligmann EB. The NIH test for Potency. In: *Laboratory techniques in Rabies*. 3rd ed. Kaplan MM, Koprowsky H (eds). Series No. 23. WHO, Geneva, 1973:279.