

CARACTERISTICAS DE UNA CEPA DE VIRUS RABICO AISLADA DEL CEREBRO DE DESMODUS ROTUNDUS

Dres. E. Fuenzalida¹ y O. P. Larghi¹

En este trabajo se describen algunas diferencias inmunogénicas entre una cepa aislada de Desmodus rotundus (DR19) y la cepa CVS, demostradas por seroneutralización y por protección cruzada; además se describe la virulencia de aquella cepa para cobayos, ratones y bovinos por distintas vías de inoculación. Basándose en los resultados obtenidos en estas experiencias, se recomienda el uso de una cepa de origen Desmodus para controlar la inmunidad conferida por vacunas para uso bovino tanto en esta especie como en animales de laboratorio.

Introducción

El Comité de Expertos en Rabia de la OMS, recomienda que "ninguna vacuna debe ser aprobada para uso en el campo a menos que demuestre, por medio de un experimento diseñado adecuadamente, que produce una inmunidad de por lo menos un año en la especie para la que se ha preparado" (1).

En el Canadá, donde la rabia bovina es producida por mordedura de zorros, se ha usado una suspensión de glándulas salivales de zorros rabiosos para evaluar la protección que la vacuna ERA confiere a bovinos (2).

Desde México hasta el norte de la Argentina, la rabia en bovinos se debe principalmente a la mordedura del *Desmodus rotundus* (3). Para medir la protección producida por vacunas antirrábicas destinadas a usarse en el ganado de estas regiones, debería emplearse en la exposición virus aislado directamente de aquellos quirópteros. Sin embargo, es muy difícil lograr este requisito debido a la imposibilidad de obtener un número suficiente de ejemplares

infectados para preparar el inóculo, en el volumen y la virulencia requeridos.

Los laboratorios del Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) han dedicado gran parte de sus tareas de investigación a evaluar la capacidad inmunogénica de diferentes vacunas antirrábicas para bovinos (4, 5). Para exponer a los animales vacunados se ha usado una cepa de virus rábico aislado de un *D. rotundus* en el Brasil^a, la que se ha mantenido en un número limitado de pasajes en ratones para conservar, en lo posible, sus características originales.

En este trabajo se estudian las características inmunogénicas y de virulencia de esta cepa para distintas especies animales.

Materiales y métodos

Animales. Se usaron ratones albinos de tres a cuatro semanas, hámsters de la misma edad, y cobayos de 300 a 400 gramos.

Los bovinos utilizados se criaron en el Campo Anexo del Centro o adquiridos en las vecindades de la zona, que se considera libre de rabia urbana y silvestre. Estos animales tenían de uno a cuatro años.

Cepas de virus rábico. La cepa DR19 es

¹ Del Centro Panamericano de Zoonosis, Ramos Mejía, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

^a Provista gentilmente por el Dr. R. A. da Silva, Instituto de Biología Animal, Río de Janeiro, Brasil.

la cepa de virus objeto de este estudio. Desde su aislamiento del cerebro de un *D. rotundus* se había pasado 18 veces por vía intracerebral (IC) en ratones. La CVS se obtuvo por intermedio de la Organización Mundial de la Salud y se usó como cepa estándar, en su pasaje en el ratón número 27. La Apipé-1 se usó en su primer pasaje en ratón, después de su aislamiento de un *D. rotundus* capturado en la isla Apipé, provincia de Corrientes, Argentina, en 1970.

Cada una de estas cepas fue inoculada IC en 100 a 200 ratones de tres a cuatro semanas de edad. Se cosecharon los cerebros de aquellos que presentaron postración y se preparó una suspensión al 20% (p/v), la que se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se distribuyó en ampollas en volúmenes de 1 ml, que luego se almacenaron a -70°C . Este fue el "lote de trabajo". Una parte de la suspensión centrifugada fue envasada y liofilizada, y pasó a ser el "lote semilla".

Virulencia. La cepa DR19 se tituló por vía IC en ratones y por vía intramuscular (IM) en ratones y cobayos. La dosis IC para ratón fue de 0.03 ml; la dosis IM para ratón fue de 0.1 ml. y para cobayos 0.3 ml. Los bovinos se infectaron en el músculo masetero con 2 ml de distintas diluciones de la suspensión viral.

Por otra parte, se intentó aislar virus de la saliva de los animales inoculados que desarrollaron la enfermedad y cuyos cerebros se sometieron a la técnica de Sellers (6) y de anticuerpos fluorescentes (AF) para rabia (7) con el fin de verificar la causa de la muerte.

Sueros inmunes. Se hicieron mezclas de sueros en partes iguales de la siguiente manera:

ERA-I: Sueros de 16 bovinos que se habían sangrado 30 días después de inmunizados con vacuna ERA (8).

ERA-II: Sueros de ocho bovinos inmunizados con vacuna ERA, que recibieron un

refuerzo con la misma vacuna a los 30 días de la primera vacunación y se sangraron ocho días más tarde.

CRL-I: Sueros de 10 bovinos inmunizados con vacuna de cerebro de ratón lactante (CRL) adsorbida en hidróxido de aluminio (9), sangrados 30 días después de la vacunación.

CRL-II: Sueros de los 10 bovinos anteriores (CRL-I), sangrados 200 días después de la vacunación.

HEP-I: Sueros de 10 bovinos inmunizados con vacuna Flury HEP (10), sangrados 30 días después de la vacunación.

HEP-II: Sueros de los bovinos anteriores (HEP-I) sangrados 200 días después de la vacunación.

Seroneutralización. Las cepas virales DR19 y CVS se compararon mediante la prueba de seroneutralización (11), frente a las mezclas de sueros ya descritas.

Vacunas. Se emplearon las siguientes: la CRL-CVS, que es de tipo CRL (12) producida con la cepa CVS solamente. La CRL-DR19, vacuna tipo CRL producida sólo con la cepa DR19, y la Ref-CPZ-1, que es una vacuna de referencia preparada en los laboratorios de CEPANZO, y cuyo valor antigénico es igual a 0.66 de la vacuna de referencia de los NIH, lote 173, determinado por la prueba de potencia de esos Institutos (13).

La potencia de las dos primeras vacunas se determinó por medio de aquella prueba usando la Ref-CPZ-1 como vacuna de referencia y exponiendo los ratones inmunizados con las cepas CVS y DR19. La dosis efectiva 50% (DE_{50}) fue determinada de acuerdo con la dilución en que las vacunas protegieron el 50% de los animales vacunados, tal como se describió anteriormente (14).

Resultados

En el cuadro 1 se presentan los títulos obtenidos con las cepas CVS, DR19 y

CUADRO 1—Comparación de los títulos obtenidos con tres cepas de virus rábico en animales de laboratorio.

Cepa	Ratón adulto		Cobayo
	IC, DL ₅₀ /0.03 ml	IM, DL ₅₀ /0.1 ml	IM, DL ₅₀ /0.3 ml
CVS	107.0	103.0	101.7
DR19	106.4	103.4	104.9
Apipé-1	104.5	102.0	102.8

Apipé-1, cuando se las inoculó IC en ratones adultos, e IM en cobayos. Con las tres cepas se observó que la vía IM fue menos infectante en ratones que la IC, con una diferencia de títulos entre ambas vías que iban desde 2.5 a 4 log. En la inoculación IM en cobayos, las cepas DR19 y Apipé-1 fueron más infectantes que la cepa CVS.

En el cuadro 2 se señalan los períodos de incubación de DR19 observados en ratones, cobayos y hámsters inoculados por vía IC e IM.

Las impresiones de cerebros de ratones postrados o muertos después de la inoculación de DR19, teñidas con la técnica de Sellers, presentaron escasos corpúsculos de Negri, de tamaño reducido y poca variación en su forma; en cambio, con la técnica de AF se evidenció abundante cantidad de antígeno.

CUADRO 2—Períodos de incubación de la cepa DR19 en animales de laboratorio.

Especie	IC (en días)	IM (en días)
Ratón adulto	6-8	7-9
Cobayo	N.H. ^a	10-18
Hámster	7	9

^a No hecho.

El cuadro 3 muestra los resultados de la inoculación IM de 33 bovinos con la cepa DR19. Veinticinco de estos animales (75%) murieron de rabia, 23 de ellos tuvieron períodos de incubación que fluctuaron entre 10 y 32 días y dos casos enfermaron después de los 120 días. Las diluciones más efectivas fueron 10^{-1.3} y 10^{-1.7}. En todas las edades se obtuvo una mortalidad del 75% al 100%, excepto en uno de los experimentos en que se usó la dilución 10^{-2.0} y en el cual se logró infectar sólo el 40% de los animales inoculados.

Le eliminación del virus DR19 por saliva solamente pudo comprobarse en dos de los cuatro hámsters inoculados (cuadro 4), mientras que no pudo aislarse el virus de la saliva de cobayos ni de bovinos que murieron de rabia.

La característica de la cepa DR19 para ser neutralizada por sueros obtenidos de bovinos inmunizados con diferentes vacunas se presenta en el cuadro 5. En él se comparan los títulos obtenidos cuando los sueros se mezclaron con aquella cepa y con la cepa CVS. En la prueba se constató que el poder neutralizante de los sueros fue

CUADRO 3—Mortalidad producida en bovinos con la cepa DR19 por vía IM en el masetero.^a

Edad de los bovinos (en años)	Dilución usada	Muertos/inoculados	Porcentaje de mortalidad	Período de incubación (en días)
1	10 ^{-1.7}	5/5	100	14-30
1	10 ⁻²	4/5	80	15-160
1	10 ⁻²	2/5	40	20-26
2-4	10 ^{-1.3}	6/8	75	16-32
2-4	10 ⁻²	3/4	75	16-123
2-3	10 ^{-1.3}	5/6	83	10-25

^a Dosis: 2 ml.

CUADRO 4—Eliminación del virus por la saliva de distintas especies de animales infectados con la cepa DR19.

Especie	Número de animales infectados	Número de animales con virus en la saliva
Cobayos	10	0
Bovinos	13	0
Hámsters	4	2

CUADRO 5—Comparación de los títulos de SN frente a CVS y DR19 de sueros de bovinos inmunizados con distintas vacunas.

Sueros ^a	Cepas	
	CVS (29 DL ₅₀)	DR19 (31 DL ₅₀)
ERA I	45 ^b	10
ERA II	840	41
CRL I	211	29
CRL II	31	18
HEP I	75	8
HEP II	4	<2

^a Véase el texto.
^b Recíproca de la dilución que protege al 50% de los ratones inoculados.

constantemente menor frente a la cepa DR19. Un suero que tenía título bajo de SN con CVS, fue negativo con DR19.

En el cuadro 6 aparecen los resultados obtenidos en la prueba cruzada de los NIH, de vacunas tipo CRL preparadas con DR19 y con CVS. La vacuna elaborada con DR19 tuvo un valor antigénico 15 veces menor al de la vacuna preparada con el virus fijo CVS, cuando ambas fueron expuestas a esta última cepa. Cuando la exposición fue realizada con la cepa DR19, ambas vacunas tuvieron un valor antigénico similar, aunque todas las vacunas incluyendo la de referencia, fueron más potentes al ser confrontadas con DR19 que al serlo con CVS. Las DL₅₀ de confrontación empleadas con ambas

cepas fueron prácticamente las mismas, 79 para CVS y 74 para DR19.

Discusión

La cepa de virus rábico denominado DR19 parece conservar algunas características originales de virus de la calle, a pesar de los pasajes experimentados en ratones. La diferencia principal con el virus fijo CVS consiste en su gran efectividad para infectar animales de laboratorio por vía IM, observándose una mayor similitud en este aspecto con el virus Apipé-1, de reciente aislamiento. Se necesitaron 10^{6.3} DL₅₀ IC en ratones para que el CVS infectara cobayos por vía IM, mientras que solo 10^{2.5} DL₅₀ en ratones de la cepa DR19 y 10^{2.7} de la cepa Apipé-1 fueron suficientes para infectar los cobayos por aquella vía. Por otra parte, el aislamiento del virus de la saliva de animales inoculados con la cepa DR19 sería una evidencia más de que conserva características de virus de la calle. El hámster fue la especie que eliminó virus por la saliva y de acuerdo con Reagan *et al.* (15), es más susceptible al virus rábico que los ratones.

Llaman la atención los resultados de la prueba de SN con sueros de bovinos inmunizados con tres tipos de vacunas antirrábicas (ERA, HEP y CRL) donde los títulos obtenidos con la cepa DR19 fueron menores que los obtenidos con CVS, a pesar de que las cantidades de DL₅₀ usadas para cada virus fueron prácticamente las mismas (31 y 29 DL₅₀, respectivamente).

CUADRO 6—Potencia de vacunas tipo CRL preparadas con CVS o DR19, desafiadas con virus CVS o DR19 en la prueba de los NIH.

Vacuna	Cepa de desafío, prueba de los NIH			
	CVS (79 DL ₅₀)		DR19 (74 DL ₅₀)	
	DE ₅₀ ^a	VA ^b	DE ₅₀ ^a	VA ^b
CRL-CVS al 2.5%	200	22	>625	5
CRL-DR19 al 5%	14	1.5	>625	5
Ref-CPZ-1 al 10%	9	1	>125	1

^a DE₅₀ recíproca de la dilución de la vacuna que protege al 50% de los ratones vacunados.
^b Valor antigénico.

A pesar de que en la prueba de SN no se incluyó un suero anti-DR19 fue evidente que los sueros de los bovinos inmunizados con distintos tipos de vacuna, todas preparadas con cepas originalmente aisladas de perros, neutralizaron más a la cepa CVS que a la DR19.

Lo ocurrido en las pruebas de potencia de los NIH donde todas las vacunas protegieron el 50% de los ratones vacunados (DE_{50}) en diluciones mayores cuando se confrontaron con DR19 que cuando se lo hizo con CVS, podría explicarse de la siguiente manera: el virus de confrontación constituye un refuerzo para los animales inmunizados previamente, y produce una respuesta secundaria. Si bien las respuestas secundarias comienzan a los tres días, no se completan hasta después de los ocho días del refuerzo. En este caso la cepa CVS, con un corto período de incubación, habría producido la enfermedad antes de completarse la respuesta secundaria; en cambio, la cepa DR19 habría completado su incubación cuando esa respuesta estaba en pleno apogeo. Como consecuencia, las vacunas habrían producido una mayor protección contra esa cepa viral.

Gallia (16) obtuvo resultados de alguna manera similares a los nuestros en las pruebas de seroneutralización e inmunidad cruzada, aunque las técnicas usadas en ambos casos fueron distintas; Gallia usó concentraciones constantes de sueros y vacunas contra diluciones de virus de desafío, mientras que en este trabajo se mantuvo constante esta última contra extinción del suero y del antígeno de las vacunas.

La cepa Bolívar usada por Gallia era similar a la DR19, por provenir ambas de un ciclo de rabia que es mantenido en la naturaleza por los vampiros. Además, las cepas Pasteur y CVS usadas por Gallia y estos autores, respectivamente, provienen del ciclo de rabia canina. Todas estas cepas tienen las mismas características para su

identificación frente a un suero antirrábico, pero hay que aceptar diferencia en su patogenicidad y en este trabajo se presentan algunas diferencias inmunológicas entre DR19 y CVS.

Dado que las vacunas para bovinos que se usan en América Latina son para proteger esa especie contra la rabia transmitida por vampiros, la cepa DR19 o una similar sería más apropiada que cepas aisladas de perros o zorros, para medir la inmunidad de bovinos vacunados. Considerando que lo mismo debe aplicarse para el control de potencia de vacunas de uso bovino en animales de laboratorio, CEPANZO está usando la cepa DR19 con este propósito hace ya algún tiempo, y sería conveniente que todos aquellos que controlan ese tipo de vacuna también usaran esta cepa o una similar.

Resumen

Una cepa de virus rábico (DR19) aislada del cerebro de *Desmodus rotundus* y mantenida con un número limitado de pasajes en ratón, ha conservado algunas de sus propiedades de virus de la calle: eliminación del virus por saliva en hámsters, mayor infectividad por vía intramuscular para animales de laboratorio que la cepa CVS y buena infectividad para bovinos por esa ruta de inoculación. Por otra parte, se demostraron diferencias entre las cepas DR19 y CVS por medio de seroneutralización y protección cruzada. Se sugiere la conveniencia de usar una cepa proveniente de vampiro para controlar vacunas antirrábicas para uso bovino en América Latina. □

Agradecimientos

Se agradece la valiosa cooperación de B. Szyfres, Director del Centro Panamericano de Zoonosis sin cuyo apoyo este estudio no se hubiera realizado. La eficaz asistencia técnica de G. D. de Perdomo, H. Rocha, J. C. Areitio y R. Balsamello es muy apreciada.

REFERENCIAS

- (1) Comité de Expertos de la OMS en Rabia. Quinto Informe. (*Ser Inf Téc 321*) Ginebra, págs. 16, 1966.
- (2) Abelseth, M. K. "Vacunas de cultivos de tejido". En *Primer Seminario sobre Rabia para las Américas*. Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, págs. 286-294, 1969.
- (3) Acha, P. N. "Epidemiología de la rabia bovina paralítica y de la rabia en murciélagos". En *Primer Seminario sobre Rabia para las Américas*, Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, págs. 103-132, 1969.
- (4) Atanasiu, P. et al. "Etudes sur l'immunité antirabique des bovins vaccinés. I. Comparaison des niveaux d'anticorps antirabiques neutralisants obtenus sur les bovins à l'aide de divers vaccins, au cours d'une année". *Ann Inst Pasteur* 114:339-348, 1968.
- (5) Fuenzalida, E. et al. "Rabies immunity in vaccinated cattle". En *Proc Ann Meet USAHA* 73, octubre de 1969.
- (6) Sellers, T. F. "A new method for staining Negri bodies of rabies". *Amer J Public Health* 17:1080-1081, 1927.
- (7) Goldwasser, R. A. y Kissling, R. E. "Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens". *Proc Soc Exp Biol Med (N.Y.)* 98:219-223, 1958.
- (8) Abelseth, M. K. "An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture". *Canad Vet J* 5:279-286, 1964.
- (9) Fuenzalida, E. y Fábrega, G. F. "Vaccin antirabique pour bovines". *Bull Office Int Epizoot* 67:443-449, 1967.
- (10) Koprowski, H.; Black, J., y Nilsen, D. L. "Studies on chick embryo adapted rabies virus. VI. Further changes in pathogenic properties following prolonged cultivation in the developing chick embryo". *J Immun* 72:94-106, 1954.
- (11) Atanasiu, P. et al. "Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons". *Bull WHO* 14:593-611, 1956.
- (12) Fuenzalida, E. y Palacios, R. "Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirábica". *Bol Inst Bact (Chile)* 8:3-10, 1955.
- (13) Seligman, E. B. "Potency test requirements of the United States National Institutes of Health (NIH)". En *World Health Organization, Laboratory Techniques in Rabies*. 2a ed. Ginebra, págs. 145-154, 1966.
- (14) Sikes, R. K. y Larghi, O. P. "Purified rabies vaccine: Development and comparison of potency and safety with two human rabies vaccines". *J Immun* 99:545-553, 1967.
- (15) Reagan, R. L.; Day, W. C., y Brueckner, A. L. "Rabies street virus in Syrian hamsters and in Swiss albino mouse". *Proc Soc Exp Biol (N.Y.)* 81:654-656, 1952.
- (16) Gallia, F. Diferencias inmunológicas entre el virus fijo Pasteur y los virus de rabia paralítica venezolana. *Bol Inst Invest Vet (Venezuela)* 3:371-390, 1946.

Characteristics of a rabies virus strain taken from the brain of
Desmodus rotundus (Summary)

A rabies virus strain (DR19), isolated from the brain of a vampire bat (*Desmodus rotundus*) and maintained by a limited number of passages through mice, retained some of its street virus properties: elimination of the virus through saliva in hamsters; greater ability to infect laboratory animals through intramuscular inoculation than that of the CVS rabies virus strain; and good ability to infect cattle through

said means of inoculation. In addition, differences between the DR19 and CVS strains were proven by serum neutralization and cross-immunization. The report recommends using a rabies virus strain taken from *Desmodus* in testing the immunity conferred by antirabies vaccines administered to cattle and laboratory animals in Latin America.

Características de uma cepa de vírus rábico isolada do cérebro de
Desmodus rotundus (Resumo)

Uma cepa de vírus rábico (DR19) isolada do cérebro de *Desmodus rotundus* y mantida com um número limitado de passagens em

rato, conservou algumas de suas propriedades de vírus da rua: eliminação do vírus por saliva em "hamsters", maior propensão a infecção por

via intramuscular para animais de laboratório que a cepa CVS e boa infectividade para bovinos por essa via de inoculação. Por outra parte, foram demonstradas diferenças entre as cepas DR19 e CVS por meio de sero-neutralização e

proteção cruzada. Sugere-se a conveniencia de utilizar uma cepa proveniente de vampiro para controlar vacinas antirrábicas para uso bovino na América Latina.

Caractéristiques d'une souche de virus rabique préparée à partir
du tissu cérébral de *Desmodus rotundus* (Résumé)

Une souche de virus rabique (DR19) préparée à partir du tissu cérébral de *Desmodus rotundus* et maintenue avec un nombre limité de passages chez la souris, a gardé quelques-unes de ses propriétés de virus des rues: élimination du virus par la salive chez les hamsters, une plus grande contagiosité par voie intramusculaire pour les animaux de laboratoire que la souche CVS et une assez forte

contagiosité pour les bovins par cette voie d'inoculation. D'autre part, on a constaté des différences entre les souches DR19 et CVS au moyen de la séroneutralisation et de l'immunisation croisée. L'auteur recommande l'emploi d'une souche provenant de vampires en vue d'exercer un contrôle sur les vaccins antirabiques destinés aux bovins en Amérique latine.