

Comunicación del Académico de Número Dr. Guillermo G. Gallo

Tecnología recombinante y el control de la rabia en animales domésticos y salvajes

Resumen

La rabia es todavía un importante problema público en muchas partes del mundo. En 1993 y 1994 la Organización Mundial de la Salud O.M.S. comunicó más de 30.000 casos de rabia humana cada año. Las vacunas de rabia convencionales por vía parenteral han demostrado alta eficacia y seguridad y estas vacunas controlaron la rabia en animales domésticos. Sin embargo, la erradicación no es completa en los reservorios salvajes. Un recombinante del virus de vaccinia fue construido al insertar un gen de glucoproteína del virus de la rabia en el vector del virus de vaccinia. Esta estructura ha llevado a la eliminación de la rabia selvática de grandes áreas de los estados poblados como Nueva York y Texas.

Summary

Recombinant Technology Rabies control in domestic and wild animals, G.G. Gallo.

Rabies is still an important public problem in many parts of the world. For 1993 and 1994, the World Health Organization WHO reported more than 30.000 human rabies cases each year.

Conventional parenteral rabies vaccines have demonstrated high efficacy and safety, and these vaccines have controlled rabies in domestic animals. However eradication is not complete due to the wildlife reservoir. A vaccinia virus recombinant v V RG was constructed by inserting the glycoprotein gene of the rabies virus into the vaccinia virus vector. This has led to the elimination of sylvatic rabies from large areas of the more populated States like New York and Texas.

Gran parte de las vacunas utili-

zadas hoy en día se producen siguiendo las técnicas de Jenner y Pasteur. El objetivo de la biotecnología es desarrollar y desde luego producir vacunas que provean respuestas inmunes mayores a los antígenos polisacáridos o proteínas con mayor especificidad.

Estas vacunas deberían ser similares en su inocuidad a los productos inactivos y gran parte de ellas pueden requerir un adyuvante para alcanzar esta meta.

Con las vacunas atenuadas, se pretende proveer inmunidad sin causar la enfermedad o reacciones adversas. El objeto de la biotecnología es producir vacunas igualmente eficaces pero más seguras.

Gran parte de las vacunas virales atenuadas para uso veterinario no han sido bien caracterizadas o biológicamente clonadas y consisten en poblaciones virales mezcladas que se comportan de manera impredecible. En algunos casos el proceso de atenuación puede ser inadecuado y el producto final producir la enfermedad o muerte, especialmente en especies en las cuales la vacuna no ha sido adecuadamente probada. La serie de pasajes en el laboratorio puede ocasionar la reducción o pérdida de eficacia de vacunas para la especie originalmente susceptible.

Debería ser reconocido que la atenuación significa reducción en la patogenicidad, pero no necesariamente la completa pérdida de virulencia. Es de esperar que las vacunas biotecnológicas sean más predecibles en su rendimiento en cuanto a seguridad (inocuidad) que las atenuadas.

El conocimiento de la genética viral ha conducido a un mejoramiento de las vacunas tradicionales por la manipulación y creación de mutantes, genomas reordenados o vacunas con vectores recombinantes.

Mientras los biólogos moleculares, inmunólogos y científicos de varias disciplinas que abarcan las enfermedades infecciosas y parasitarias trabajan para desarrollar nuevas vacunas y adyuvantes para el siglo XXI, no olvidemos la admonición de Pasteur «Monsieur, c'est les microbes qui auront le dernier mot».

Hasta ahora, el uso de vacunas antirrábicas convencionales por vía parenteral ha demostrado su alta eficacia en el medio cuando las medidas preventivas combinan una vacuna efectiva con un buen método de administración.

De todas maneras, durante las campañas públicas de prevención, únicamente los perros y gatos enrolados son vacunados, mientras que los perros y gatos callejeros o sin dueños permanecen sin ser inmunizados.

Recientemente, los fibrosarcomas, con vacunas inactivadas, en el sitio de inoculación en gatos han recibido gran atención. La incidencia de estos tumores malignos es de entre 0,1 % y 0,01 %. Aparentemente las vacunas que contienen adyuvantes (como la vacuna contra la rabia) estarían implicadas en este tipo de reacciones adversas. La población de gatos en EE.UU. es tres veces superior a la de perros. Los veterinarios deben registrar en la ficha del animal, la zona de vacunación recomendando, las partes distales de las extremidades para facilitar una posible intervención quirúrgica, por ejemplo la amputación en caso de fibrosarcoma.

El porqué de que los gatos superen en cantidad a los perros se atribuye a que se adaptan mejor a vivir en espacios reducidos, y a que son en general más limpios que los perros.

El costo de la vacuna tradicional contra rabia en Estados Unidos es de 0,57 de dólar por animal y de tres

veces más si se trata de vacunas recombinantes. Desde 1980, varios institutos se han interesado en el desarrollo de nuevas vacunas que se basan en la biotecnología moderna.

Rhone-Mérieux construyó un virus vaccinia recombinado con rabia vV-RG (virus de vaccinia conteniendo rabia glucoproteína), al insertar por recombinación en el virus de vaccinia el gen de la glucoproteína del virus de la rabia de la variedad ERA, (cepa de rabia tipo ERA) en el gen de la timidinaquinasa (TK) del virus vaccinia (variedad copenhagen). Este vector fue diseñado para el control de rabia vía oral.

El recombinante de éste virus de vaccinia vV-RG ha sido el objeto de muchos trabajos y publicaciones, sobre todo en animales salvajes por su aplicación en forma de cebo.

Para comprobar la estabilidad, la seguridad, y la eficacia de esta vacuna, se han realizado extensas pruebas en el laboratorio, así como pruebas de campo.

De 1989 a 1998, se dispersaron en Europa Occidental como doce millones de dosis para vacunar zorros rojos y en EE.UU. para vacunar mapaches y coyotes por vía oral usando un sistema de cebo (Registradas en USDA).

El uso del vV-RG (virus de vaccinia conteniendo rabia y glucoproteína) en Europa, ha llevado a la eliminación de la rabia selvática en una gran extensión de terreno, que como consecuencia ha sido liberada de la necesidad de vacunación.

Datos preliminares de las pruebas de campo de EE.UU. indican una reducción significativa en la incidencia de rabia en áreas donde se dispersó la vacuna.

La seguridad y potencia de éste virus de vaccinia conteniendo rabia

glucoproteína vV-RG también fue puesta a prueba por vía oral y parenteral. Su utilización no se aprueba por el riesgo zoonótico en seres humanos inmosuprimidos.

Todos los resultados están de acuerdo con la recomendaciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se construyó un segundo producto recombinante al insertar el gen de la glucoproteína del virus de la rabia de la variedad ERA, en el virus de la viruela del canario (ALVAC-vCP) para su uso parenteral, en animales de compañía.

La segunda de esta vacuna está asociada al ciclo reproductivo de este virus aviar que es abortivo en células mamíferas (no tiene riesgo zoonótico).

Todos los experimentos efectuados demostraron la excelente potencia de este virus de viruela de canario (vCP) en perros y gatos por vía parental, excluyendo la necesidad de usar un adyuvante reactogénico. (aprobada en US contra distemper en 1997 y rabia en gatos en 1998).

La seguridad completa, excelente potencia y eficacia, la estabilidad térmica, y la facilidad de uso de estas dos vacunas recombinantes abren con certeza una nueva era en la inmunización contra la rabia de animales salvajes o domésticos.

Pero estas dos vacunas recombinantes representan sólo nuevas herramientas.

No existe un programa que pueda tener éxito en el control de la rabia a nivel mundial sin la cooperación internacional.

La rabia es aún un problema de salud pública importante en muchas partes del mundo.

En 1993 y 1994 la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó de más de 30.000 casos humanos de rabia en cada año.

Los perros domésticos son los principales responsables por el mantenimiento de la epizootia y de la transmisión de la enfermedad al hombre. Aproximadamente el 95% de todos los casos de rabia animal, informados en todo el mundo, ocurre en perros, y hasta el 98 % de las fatalidades humanas son atribuibles a la mordedura de perros rabiosos.

A mediados de 1980, la continuada carga social y económica de la enfermedad indujo a la OMS, a reforzar el número de programas nacionales dirigidos al control de la rabia canina, principalmente por inmunización masiva de perros.

En 1985 se efectuó en Lima - Callao (Perú) una masiva campaña de vacunación antirrábica.

Fueron vacunados en un mes 270.000 perros (65 %) de la población estimada.

Los casos de rabia informados declinaron drásticamente no observándose nuevos casos en humanos.

Todos los datos demostraron los excelentes resultados obtenidos bajo condiciones de campo con una vacuna con adyuvante e inactivada producida en cultivo celular. (IMRAB»)

Muchos países eliminaron la rabia de los animales domésticos pero la enfermedad está aún presente en reservorios salvajes (zorros, mapaches, zorrinos, chacales, coyotes, lobos, murciélagos). Se necesitaba el desarrollo de otro tipo de herramienta (vacuna): Una vacuna que se podía replicar, ser segura, administrada por vía oral, y usando un cebo atractivo (VRG).

Debido a que en algunos países de Asia y Africa se ha mencionado un bajo porcentaje de vacunación de perros, se consideró que la vacu-

nación antirrábica por vía oral ayudaría alcanzar a esos perros.

En términos de logística, el sistema de vacunación oral podría ser hecho en adición a la vacunación parenteral en campañas de vacunación masiva. En cuanto a la evolución tecnológica de las vacunas tradicionales, fue el jefe del Departamento de Virología de Biondesarrollo, Merial, Lyon, Francia, Gilles E. Chappuis, el implicado en el desarrollo de un segundo tipo de recombinantes.

Este segundo recombinante fue construido como ya se ha dicho, insertando el gen de la glicoproteína del virus rábico de la cepa ERA, en el virus de la viruela del canario (ALVAC -vCP). La seguridad de este virus es completamente asumido por el ciclo abortivo de replicación de este virus aviar en células de mamíferos han resultado exitoso, sin necesidad de una adyuvante reactogénico. La completa seguridad, excelente potencia y eficacia, estabilidad térmica, y la facilidad de uso de estas vacunas recombinantes abren una nueva era para la inmunización de animales domésticos o salvajes contra la rabia.

Vigilancia Epidemiológica de la rabia en las Américas.

Organización Panamericana a la Salud (OPS)-1977.

La Argentina después de dos años sin ocurrencia de rabia humana, informó un caso ocurrido en una zona rural, ocasionado por un murciélago insectívoro.

Respecto a la rabia en animales silvestres, 96 % de 8.238 casos registrados en 1997, fueron informados por EE.UU. La especie más afectada fue el mapache con 4.300 casos.

Muchas gracias.

- Distribución de casos de rabia humana: 1 caso (murciélago no hematófago).
- Casos de rabia en perros.

ARGENTINA

1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
57	34	68	101	43	15	8	6

- Casos de rabia en gatos: no se denunció ninguno en 1997.
- Casos de rabia en bovinos: 82 casos confirmados por laboratorios.
- Casos de rabia en otros animales domésticos (incluye equinos, ovinos, caprinos y cerdos): 9 casos confirmados por laboratorios.
- Rabia en animales silvestres en la Argentina en 1997: En total 15 casos informados por laboratorios y confirmados.
- Rabia en animales silvestres (1997) -distribución de casos, según especies. Argentina: 9 por murciélago no hematófago, 4 por zorro, 1 por coatí, 1 por búfalo (casos informados y confirmados por laboratorios).
- No se registraron casos de rabia en perros en 1998.
- No se registraron casos de rabia en humanos en 1998.
- Se registraron casos de rabia en murciélagos: Abril de 1999, 1 caso de rabia en *Lasiurus cinereus* y en Mayo del mismo año 1 caso de rabia en *Molossops brachymeles* en Morón y San Martín, Pcia. de Buenos Aires, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA:

- 1- BROCHIER B., AUBERT M.F.A. PASTORET P.P., MASSON E., SCHON J. LOMBARD M., CHAPPUIS G., LANGUET B., and DESMETTRE P., Field use of vaccinia rabies-recombinant vaccine for the control of sylvatic rabies in Europe and North America. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* (1996) 15, 947-970.
- 2- CADOZ M., ESTRADY A., MEIGNIER B., TAYLOR J., TARTAGLIA J., PAOLETTI E., and PLOTKIN S., immunization with canary pox was expressing rabies glycoprotein. *Lancet* (1992) 339, 1429-1432.
- 3- CHAPPUIS G., LANGUET B., DURET C., and DEMETTRE P.: Dog rabies vaccination. The use of recombinant poxviruses by oral and parenteral route. *Proceedings of the symposium on rabies control in Asia, Jakarta, Indonesia. April 27-30 1993. WHO -Fundation Merieux ISBN2- 84039-029-9, PP 125-138.*
- 4- CHAPPUIS G., Development of rabies vaccine in rabies control in Asia. Third international symposium on rabies control in Asia. September 11-15, 1996 Wuhan, China. Ed. B. Dodet, F:X Meslin, Elsevier, Paris, 1997.
- 5- CHAPPUIS G., Neonatal inmunity and immunisation in early ages. Lessons from veterinary medicine. *Vaccine* (1998) 16, 1468.1472.
- 6- CHMEL B., CHAPPUIS G., BULLON F., CARDENAS E., DAVED DE BEUBLAIN T., MAUFRAIS M.C. and GIAMBRUNO, E. Serological results of a dog vaccination campaign against rabies in Peru. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* (1987) 6,97-11.
- 7- DEMETTE P., LANGUET B., CHAPPUIS G., BROCHIER B., THOMAS I., LECOQ J.P., KIENY M.P., BLANCOU J., AUBERT M., ARTOIS M., and PASTORET P.P. Use of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* (1984) 312, 163-166.
- 9- TAYLOR J., TARTAGLIA J., and RIVERE M. Aplications of canarypox (ALVAC) vector in human and veterinary vaccination.
- 10- WORLD HEALTH ORGANIZATION Repport de consultation OMS sur les criteres des essais pratiques de vaccination antirabique orale des chiens et des carnivores sauvages. Geneva (1-2 Mars 1989), WHO/ RAB.RES/ 89.32
- 11- WORLD HEALTH ORGANIZATION 3rd consultation on oral inmunization of dogs against rabies. Ganeva (1992)
- 12- WORLD HEALTH ORGANIZATION 4rd consultation on oral inmunization of rabies. Geneva (1994).

13- KREBS JW; SMITH JS; RUPPRECHT CE; CHILDS JE; Rabies surveillance in the United States during 1997

14- ROSCOE DE; HOLTE WC; SORHAGE FE; CAMPBELL C; NIEZGODA M; BUCHANNAN R; DIEHL D; NIU HS; RUPPECHT CE. Efficacy of an oral vaccinia-rabies glycoprotein recombinant vaccine in controlling epidemic raccoon rabies in New Jersey.

15- NOAH DEL; DRENZEK CL; SMITH JS; KREBS JW; SJADDOJ; SANDERLIN D; WILFIELD D; OLSON JG; RUPPRECHT CE; CHILDS JE. Epidemiology of human rabies in USA, 1980 to 1996.

16- ROBBINS AH; BORDEN MD; WINDMILLER BS; NIEZGODA M; MARCUS LC; O'BREIN SM; MC GUILL MW; DE MARIA A JR; RUPPRECHT CE. Prevention of the spread of rabies to wild life by oral vaccination of raccoons in Massachusetts USA.

17- STEELMAN HG., HENKE SE; MOORE GM. Gray fox response to baits and attractants for oral rabies vaccination.

18- HANLON CA; NIEZGODA M; HAMIR AN; SCHUMACHER C; KOPROWSKI H; RUPPRECHT CE. First North American field release of a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus.

19. MC GUILL MW; KREINDEL SM; DE MARIA A JR; ROBBINS S; HANLON SA; RUPPERCHT CE. Human contact with bait containing vaccine for control of rabies in wildlife.

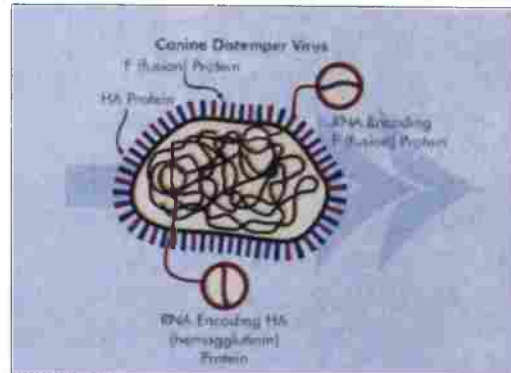
20. FEARNEYHOUGH MG; WILSON PJ; CLARK KA; SMITH DR; JOHNSTON DH; HICKS BN; MOORE GM. Results of an oral rabies vaccination program for coyotes.

21. MACKOWIAK M; MAKI J; MOTES-KRIMEYER L; HARBIN T; VAN KAMPER K. Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vector vaccine obtained by recombinant technology.

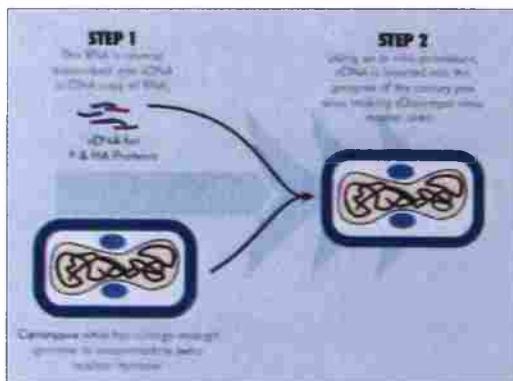
Diapositivas:



Nº 1- Tipo 3. Esquema de la «Construcción» de una vacuna recombinante tipo 3 (Recombitek TM r CDV).

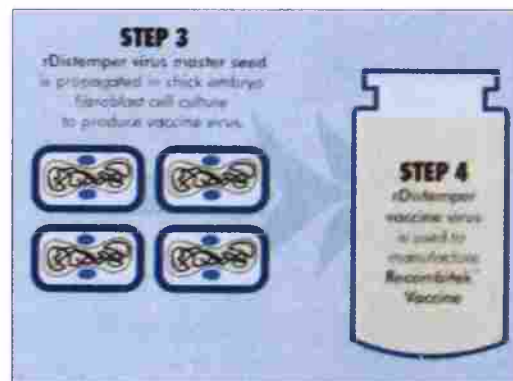


Nº 2- Virus del Distemper (moquillo canino).



Nº 3- Paso 1. El RNA es transcrito en sentido opuesto como cDNA (un DNA copia de RNA).

Paso 2. Usando un procedimiento in vitro, cDNA, es insertado en el genoma del virus canarypox produciendo el germen maestro del virus o rDistemper (moquillo).

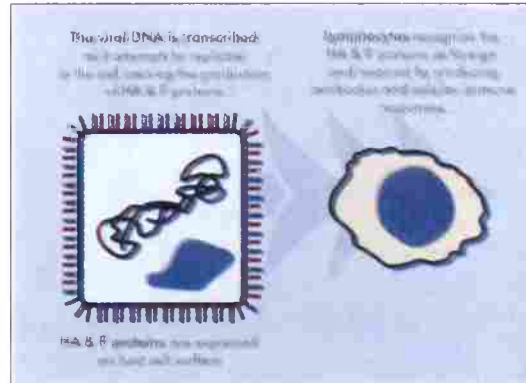


Nº 4- Paso 3. El germen maestro del virus o Distemper (moquillo) es propagado en un cultivo de fibroblastos de embrión de pollo para producir el virus de la vacuna.

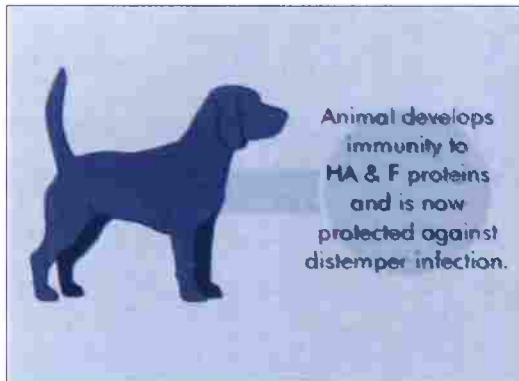
Paso 4. El virus de la vacuna rDistemper (moquillo) es usado para manufacturar la vacuna Recombitek TM.



Nº 5- El virus es dado como vacuna al animal. El virus entra en la célula huésped.



Nº 6- Las proteínas HA y F son emitidas por la célula huésped. El DNA viral, es transcrito cuando intenta replicarse en la célula causando la producción de HA y proteínas F. El macrófago toma las proteínas extrañas Ha y F las presenta a los linfocitos.



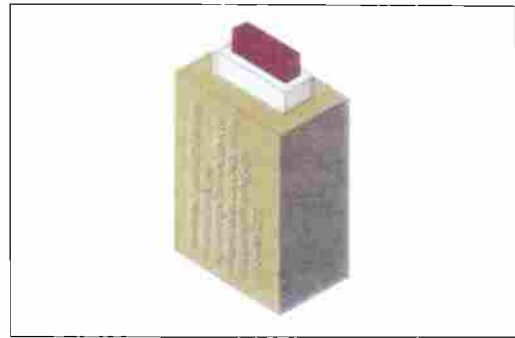
Nº 7- El animal desarrolla inmunidad a las proteínas HA y F y ahora está protegido contra la infección de moquillo.



Nº 8- Cebos contenidos vacunas recombinantes para rabia, en especies salvajes.



Nº 9- Cebos saborizados, con harina de pescado, usados para mapaches, coyotes y zorros rojos. Para zorros grises, llevan en su preparación, alimento para perros.



Nº 10- Todo los cebos, se identifican y llevan medidas de precaución por si accidentalmente son ingeridos por personas. Son diseminados, por aviones o helicópteros, resisten fuertes golpes, pero son frágiles a la mordedura de los animales.



Nº 11- Perro afectado de rabia.

Recombinantes- ¿Qué son?

- Bacteria, levaduras o virus logrados por ingeniería genética,
- Nueva tecnología (originada en los '70s)
- Rápido desarrollo- La tecnología del futuro

¿Por qué Recombinante?

- Seguridad- permite al cuerpo desarrollar una respuesta inmune con riesgo mínimo
 - no organismos patogénicos
 - puede no requerir auxiliares
- Enfoca el sistema inmunológico en los antígenos claves necesarios para la inmunidad
- Permite usar vías alternas de inoculación

Tipos Recombinantes

Definidos por el Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA)

- Tipo 1 (subunidad)- microorganismo logrado con ingeniería genética para producir una proteína que es cultivada para usarse en un huésped objetivo
- Tipo 2 (gen borrado)- microorganismo con material genético removido, reduciendo así su virulencia
- Tipo 3 (vectorial)- microorganismo con nuevo material genético el cual es emitido cuando es insertado en un huésped objetivo

Tipo 3 Recombinantes

- Nuevo material genético es insertado en un microorganismo
- El organismo modificado es administrado en un animal receptor y entra en las células
- Proteína antigénica es producida por las células huéspedes
- El sistema inmune reconoce la nueva proteína y responde con una respuesta inmune apropiada

- Ejemplos
- Raboral VRG®
(vaccinia virus)
- rDistemper & Rabia (canary pox)

Raboral V-RG®

- Vacuna vectorial (vaccinia virus), resultado de la ingeniería genética, emisora del gen de glicoproteína de la Rabia (tipo 3 recombinante).
- Primera y única vacuna oral que cuenta con licencia del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA) para el control de la rabia en la fauna salvaje.
- Usada exitosamente para controlar brotes de rabia en Texas, Florida, Nueva Jersey, Nueva York, Ohio, Massachusetts, Vermont.

Ventajas de Recombinantes Tipo 3

- No se usan organismos patógenos
- No se usan adyuvantes
- Inmunidad extensa
 - respuesta humoral (anticuerpos)
 - respuesta mediante células

Virus del Distemper (Moquillo Canino)

