

# ESTRATEGIA DE INMUNOPROFILAXIS PARA LA PREVENCIÓN DE LA RABIA PARESIANTE UTILIZANDO UN VIRUS CANARYPOX RECOMBINANTE

## IMMUNOPROPHYLAXIS STRATEGY FOR THE PREVENTION OF PARALYTIC RABIES USING A RECOMBINANT CANARYPOX VIRUS

Débora Garanzini (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA], Instituto Nacional de Productos Biológicos [INPB], ANLIS), María Victoria Rossner (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA]), Rodolfo Stahringer (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA], Matías Micucci (Instituto Nacional de Productos Biológicos [INPB], ANLIS), Oscar Perez (Instituto Nacional de Productos Biológicos [INPB], ANLIS), María Paula Del Médico Zajac (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA], Susana Russo (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria [Senasa]) y Gabriela Calamante (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA]) - Argentina

### Resumen

La rabia paresiante es una enfermedad causada por el virus rábico transmitido por el vampiro común. En el norte de nuestro país, se registran anualmente un número limitado de casos por lo que es necesaria la implementación de medidas inmunoprolácticas para el control de los brotes. Teniendo en cuenta el cambio climático y la expansión del hombre, la población de vampiros ocupa nuevos territorios y, probablemente, se ampliará la región endémica en las próximas décadas. Los virus canarypox se utilizan eficientemente como vectores para el desarrollo de vacunas en mamíferos porque son capaces de inducir respuestas inmunes protectoras en ausencia de replicación. Para el virus rábico está ampliamente demostrado que la glicoproteína es el antígeno que induce inmunidad protectora. Previamente, en nuestro laboratorio, se obtuvo y evaluó la eficacia de un virus canarypox recombinante que expresa la glicoproteína del virus rábico (CNPV-RG), que posee una potencia relativa de 3,5 UI/mL (en el modelo de desafío intracerebral en ratones). El objetivo del proyecto, galardonado con el Premio Senasa a la Investigación Transferencia y Comunicación 2014-2015, es evaluar la inmunogenicidad de CNPV-RG en bovinos con la perspectiva de desarrollar una vacuna antirrábica de 3<sup>a</sup> generación para la prevención de la rabia paresiante.

**Palabras clave:** virus canarypox, virus de la rabia, rabia paresiante.

### Abstract

The paralytic rabies is a disease caused by rabies virus transmitted by vampire bats. The north of our country recorded a limited number of cases so implementation of immunoprophylactic measures for the control of outbreaks is required annually. According to climate change and the expansion of man, vampire population will occupy new territories and probably endemic region will expand in the coming decades. The canarypox virus is efficiently used as vector for vaccine development in mammals because they are capable of inducing protective immune responses in the absence of replication. For the rabies virus there is strong evidence showing that glycoprotein is the antigen that induces protective immunity. Previously, in our laboratory a recombinant canarypox virus expressing rabies virus glycoprotein (CNPV-RG) was obtained and evaluated showing a relative potency of 3.5 IU / mL (in mice intracerebral challenge model). The aim of this project, awarded with the 2014-2015 SENASA Prize for Research Transfer and Communication, is the evaluation of CNPV-RG immunogenicity in cattle with the perspective of developing a 3rd generation rabies vaccine to prevent paralytic rabies.

**Keywords:** canarypox virus, rabies virus, paralytic rabies

### Tema de investigación propuesto

La ejecución de este proyecto es una excelente oportunidad para vincular instituciones públicas y sus investigadores para que, sumando capacidades, trabajen en conjunto con el fin de contribuir al control de enfermedades zoonóticas endémicas de interés nacional y regional. Concretamente, en esta propuesta se abordará una estrategia para el control de rabia paresiante, pero los resultados que se desprendan de esta investigación alentarán la evaluación del candidato vacunal en otras especies blanco o el diseño de una estrategia similar (poxvirus no replicativos recombinantes) para control de otras enfermedades infecciosas de interés en medicina veterinaria. El equipo de

trabajo lo integran investigadores, becarios y personal técnico del Instituto de Biotecnología-CICVyA-INTA, de la EEA-Colonia Benítez de INTA, del Servicio de Vacuna Antirrábica del INPB-ANLIS y del Departamento de Rabia y Pequeños Animales del DILAB-Senasa. Este proyecto será financiado con fondos asignados por el Senasa al 1.º Premio a la Investigación Científica y Transferencia de equipos consolidados en temáticas de Sanidad Animal, y por los Proyectos de INTA PNBIO 1131032 y CHAFOR 1241305.

## Relevancia y justificación del proyecto

La rabia pareasiente es una enfermedad epidémica y recurrente causada por el virus rábico transmitido por el vampiro común (*Desmodus rotundus*). Afecta principalmente a bovinos y equinos y, con menor frecuencia, a otras especies domésticas de producción (camélidos sudamericanos, cabras, cerdos, etc.), animales silvestres y al hombre. Esta enfermedad es endémica en el norte de la Argentina –al norte del paralelo 29° S y al este del meridiano de 66° O– (Figura 1) (Delpietro y Russo, 1996), donde existe una población bovina de alrededor de una decena de millones de cabezas. Sin embargo, a principios del año 2014, se confirmó el primer brote de rabia en el norte cordobés (San José de la Dormida, departamento Tulumba) que afectó a vacunos, equinos y algunos animales silvestres como corzuelas. Si bien el brote afectó a nueve animales que murieron por la infección, se vacunaron más de 16.000 cabezas y se recomendó la vacunación preventiva del personal en condición de riesgo.



Figura 1: Mapa indicando la dispersión del vampiro común (*Desmodus rotundus*) y de la rabia pareasiente en la Argentina. Fuente: Senasa. Véase: <<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=860&io=3242>>.

El impacto económico de esta enfermedad es importante, ya que la mortalidad del ganado puede ser mayor al 50 %. Esto depende de la población del vampiro en la zona y de la rapidez en la aplicación de las medidas de control. Teniendo en cuenta el cambio climático y la expansión del hombre, la población de vampiros ocupa nuevos territorios y, probablemente, hará que se amplíe la región endémica en las próximas décadas.

La vacunación periódica y masiva es la forma de prevención más eficaz y es fundamental para el control del brote en el establecimiento afectado y aquellos ubicados en zonas cercanas.

Históricamente, el control de la rabia en nuestro país se realizaba con vacunas de primera generación (tipo Fuenzalida-Palacios) elaboradas en instituciones públicas, como el Instituto Malbrán, el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur y el Instituto Biológico Tomás Perón. La eficacia de estas vacunas, preparadas por amplificación viral en tejido nervioso de rata o ratón lactante e inactivadas, permitió controlar el gran brote de rabia canina en el año 1976, en el que el principal foco fue la provincia de Buenos Aires, y cubrir subsiguientes campañas de vacunación hasta la primera década del siglo XXI.

La producción de este tipo de vacunas fue discontinuada en el año 2011. Actualmente, el Ministerio de Salud de la Nación, a través del Programa Nacional de Control de Enfermedades Zoonóticas adquiere, mediante licitación, vacunas antirrábicas de uso veterinario elaboradas en cultivos celulares e inactivadas. Su distribución es ajustada a las provincias ubicadas en zonas donde la rabia tiene impacto, ante la aparición de focos.

Las vacunas basadas en virus rábico inactivado (producidas por amplificación viral en sustratos celulares) son efectivas pero presentan ciertas desventajas por la composición indefinida del antígeno, posibilidad de reversión, manipulación de grandes cantidades del patógeno en las plantas de producción, necesidad de estricta cadena de frío y dificultad para diferenciar animales infectados de vacunados. La búsqueda de vacunas alternativas que aseguren una adecuada protección de la población susceptible y

reduzcan los riesgos y costos que implican la producción y uso de vacunas convencionales es prioritaria para las campañas de erradicación de enfermedades infecciosas.

Los conocimientos derivados de la biología molecular, la ingeniería genética y la inmunología permiten diseñar estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas de composición definida que combinan seguridad y eficacia. Existen numerosos ejemplos que demuestran que en países en vías de desarrollo es posible articular la inversión estatal con la industrial para generar servicios y productos biotecnológicos de impacto productivo y social. De esta forma, se podrían superar los inconvenientes de las vacunas tradicionales mencionados creando vacunas basadas en microorganismos vivos no replicativos, diseñadas racionalmente para que, induciendo diferentes vías del sistema inmune, sean seguras y efectivas para la prevención de enfermedades infecciosas.

En la producción de vacunas de nueva generación basadas en poxvirus, inicialmente, se utilizó el virus vaccinia (VV) y se expresaron una gran variedad de genes foráneos derivados de diferentes agentes infecciosos (Belsham *et al.*, 1990; Elango *et al.*, 1986; Mackett *et al.*, 1984; Paoletti *et al.*, 1984). Sin embargo, ciertos efectos secundarios asociados con la inoculación, sumados al amplio rango de hospedadores, desalentaron la utilización del VV como sistema de expresión para vacunas a virus vivo. Entonces, el interés en el uso de poxvirus recombinantes como vacunas se focalizó en otros miembros de la misma familia que poseen un rango de hospedadores más restringido y que, a su vez, permiten usar la amplia experiencia acumulada con el virus vaccinia. Los avipoxvirus (virus fowlpox y canarypox [CNPV]) ocupan una posición única en cuanto a que su rango de hospedadores está altamente restringido, generando así una infección productiva solo en sus hospedadores naturales. Esta característica posibilitó el empleo de algunos avipoxvirus como vectores seguros para vacunas vivas recombinantes tanto en sanidad animal (revisado en Weli y Tryland, 2011) como en salud humana (revisado en Choi y Chang, 2013; Rollier *et al.*, 2011).

Por un lado, los CNPV solo replican en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) y

son incapaces de replicar o de finalizar la morfogénesis en la mayoría de las células de mamíferos, por lo cual se consideran no replicativos al ser inoculados en ratones, bovinos, cerdos y humanos. Por otro, si bien los avipoxvirus replican en FEP, los vectores virales se diseñan utilizando cepas vacunales y su inoculación no produce lesiones en el sitio de aplicación y, además, no se ha descrito reversión al fenotipo patogénico. Existen trabajos publicados que demuestran que cepas vacunales de CNPV y los virus recombinantes derivados de esta no replican productivamente en líneas celulares correspondientes a especies no aviares incluidas aquellas derivadas de mono, ratón, gato y humano (Pacchioni *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 1995). Actualmente, existen vacunas registradas contra influenza equina, rabia felina, moquillo, West Nile y leucemia felina basadas en CNPV recombinantes (Draper y Heeney, 2010).

En el diseño racional de vacunas es importante tener en cuenta que la inmunidad antivector puede alterar la eficacia de las revacunaciones, y que los programas de vacunación requieren, en general, la aplicación de varias dosis a ciertos intervalos según la vacuna. En este contexto, los vectores basados en CNPV son los de elección, ya que la inmunidad anticanypox no altera la *performance* de las subsecuentes dosis refuerzo (Poulet *et al.*, 2007). Además, otras de las ventajas de las vacunas basadas en CNPV son:

- I) El virus es extremadamente estable a condiciones ambientales adversas, por lo cual se eliminaría la necesidad de una estricta cadena de frío para su almacenamiento y distribución.
- II) La vacuna puede ser administrada por diferentes vías.
- III) Tiene la capacidad de inducir respuestas tanto humorales como celulares contra el antígeno foráneo, por lo que genera inmunidad duradera.
- IV) La flexibilidad de empaquetamiento del genoma permite delecionar grandes cantidades de genoma viral e insertar al menos 25 kpb de ADN foráneo, permitiendo así crear vacunas multivalentes.
- V) Los poxvirus recombinantes son genéticamente estables, ya que la expresión del gen heterólogo sigue

siendo detectada luego de un alto número de pasajes a baja multiplicidad de infección en fibroblastos de embrión de pollo.

VI) La inmunización se consigue en ausencia de replicación viral, se elimina así la posibilidad de una diseminación del vector en los animales vacunados y, por consiguiente, no es posible la dispersión por contacto hacia animales no vacunados o hacia el ambiente en general.

Asimismo, durante la producción de las vacunas basada en CNPV no se manipulan los agentes infecciosos que causan enfermedad, lo cual disminuye considerablemente los costos de producción porque no se requieren laboratorios de alta seguridad biológica y elimina la posible diseminación de los patógenos por escapes durante la producción de vacunas. Sobre la base de estos datos, estos vectores son excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas, pues permiten rápidas respuestas frente a un brote de enfermedad.

El antígeno seleccionado para expresar desde el vector basado en canarypox es la glicoproteína (G) del virus rábico (Figura 2). Es una proteína de transmembrana, que emerge como microprotuberancias superficiales y funciona como ligando del receptor celular. La glicoproteína es el principal antígeno responsable de inducir inmunidad (celular y humoral) protectora en el hospedador (Lafon *et al.*, 1983).

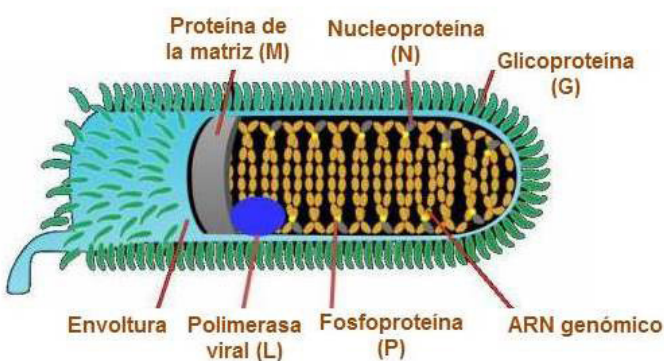


Figura 2: Esquema del virus rábico

Modificado de: <<http://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>>.

En el Instituto de Biotecnología-INTA se obtuvo un virus canarypox recombinante que expresa la glicoproteína del virus rábico (CNPV-RG). En colaboración con INPB-ANLIS y DILAB-Senasa, se demostró su eficacia en el modelo ratón de desafío intracerebral. Se determinó que CNPV-RG posee una potencia relativa de 3,5 UI/mL (Zanetti *et al.*, 2012) y que liofilizado y almacenado a 4 °C durante 6 meses conserva una potencia mayor a 1,5 UI/mL (Miccuci *et al.*, 2013). Sobre la base de estos antecedentes, el estudio de la inmunogenicidad de CNPV-RG en bovinos es de gran importancia regional para el control de una enfermedad zoonótica endémica que afecta la productividad y la salud humana.

### Objetivos y resultados esperados

El objetivo general de este proyecto es evaluar la inmunogenicidad de CNPV-RG en bovinos.

En el área de salud animal es fundamental el diseño racional de nuevas vacunas que sirvan como estrategia de respuesta rápida frente a situaciones de emergencia. En este contexto, y sobre la base de resultados previos del grupo de investigación, resulta primordial la evaluación de un nuevo candidato vacunal para la prevención de la rabia pasesante en zonas endémicas de nuestra país. La eficacia del virus recombinante CNPV-RG fue evaluada en el modelo de desafío intracerebral en ratones, con anterioridad al inicio de esta propuesta (Zanetti *et al.*, 2012). Durante este proyecto, se espera determinar su inmunogenicidad en bovinos, especie blanco, con el propósito de continuar su estudio como candidato vacunal contra la rabia. De acuerdo con los antecedentes de nuestro grupo en la evaluación de CNPV-RG en el modelo ratón, se espera observar una inducción de anticuerpos seroneutralizantes del virus rábico que sea duradera en el tiempo. Los resultados que se obtengan durante la ejecución de este proyecto constituirán una etapa más en la evaluación del candidato vacunal CNPV-RG con la perspectiva de disponer de una nueva herramienta inmunoproláctica para la prevención de la rabia pasesante en situaciones de emergencia.



## Metodología propuesta

Se plantea realizar un protocolo de inmunización similar al que se utiliza con las vacunas convencionales (virus rábico inactivado), donde se aplicarán dos dosis separadas por un período de treinta días, y se determinarán los niveles y perfiles de anticuerpos específicos contra el virus rábico en función del tiempo.

Para la producción del stock vacunal, cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo se infectarán con el virus CNPV-RG a baja multiplicidad de infección. Las células infectadas se cosecharán cuando se observe efecto citopático generalizado, se someterán a tres ciclos de congelado/descongelado (para lisar las células y liberar las partículas virales), se centrifugarán a baja velocidad (para descartar el *debris* celular), se alícuotarán y almacenarán a -80 °C. Una alícuota se utilizará para titular el *stock* viral obtenido (Zanetti *et al.*, 2012).

Se utilizarán diez terneros serológicamente negativos para el virus rábico (determinado por ELISA) que se inmunizarán por vía subcutánea con  $10^8$  unidades formadoras de placa de CNPV-RG (al tiempo 0, 30 y 365 días) y se realizarán sangrías exploratorias a distintos tiempos para evaluar la respuesta inmune específica. Brevemente, los anticuerpos totales y los isotipos séricos (IgG1 e IgG2) dirigidos contra el virus rábico se analizarán por ELISA utilizando anticuerpos comerciales (anti IgM, IgG, IgG1 e IgG2). Deberán implementarse las condiciones óptimas del ensayo: selección del antígeno que se usará para la sensibilización de las placas: virus rábico inactivado y/o glicoproteína recombinante expresada en el sistema baculovirus/células de insecto (Russo y Peralta, 2011), dilución de uso, bloqueante apropiado, tiempos de incubación con las muestras y los anticuerpos detectores. Además, se determinarán los niveles de anticuerpos seroneutralizantes utilizando el protocolo de determinación de anticuerpos *in vivo* (Zanetti *et al.*, 2012).

Es importante destacar que CNPV-RG es un microorganismo genéticamente modificado (MGM) por lo cual las actividades propuestas serán realizadas previa autorización de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA), dependiente de la Dirección de Biotecnología, del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.

## Perspectivas

A pesar de la extensa cantidad de vacunas veterinarias disponibles, existe la necesidad de disponer de agentes inmunoprolifáticos que mantengan tanto las mejores características de las vacunas a virus muerto o a subunidad (por ejemplo, la seguridad) como las ventajas de las vacunas convencionales a virus vivo (por ejemplo, la eficacia). Como se indicó anteriormente, los CNPV han sido evaluados exitosamente para la prevención de enfermedades de interés tanto en salud humana como en sanidad animal, induciendo así respuestas inmunes protectoras en ausencia de replicación. Durante la producción de vacunas basadas en CNPV no se manipulan los agentes infecciosos que causan enfermedad, lo cual disminuye considerablemente los costos de producción porque no se requieren laboratorios de alta seguridad biológica y elimina la posible diseminación de los patógenos por escapes durante la producción de vacunas. En este sentido, estos vectores son excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas.

La disponibilidad de vacunas que contribuyan al control de la rabia pasesiente es fundamental para minimizar el impacto económico y sanitario en la producción ganadera y disminuir el riesgo para la salud pública. En países donde la actividad agropecuaria reviste gran importancia a nivel económico, se utilizan vacunas de segunda generación inactivadas, pero no existiría *a priori* ningún impedimento para el cambio de tecnología hacia vacunas de tercera generación basadas en vectores virales no replicativos.

En este proyecto se evaluará la inmunogenicidad en bovinos de un candidato vacunal, denominado CNPV-RG, que protegió a ratones frente al desafío intracerebral de virus rábico con una potencia relativa de 3,5 UI/mL. El candidato vacunal está basado en un vector viral de canarypox que no replica en mamíferos, pero es capaz de expresar *in vivo* la glicoproteína del virus rábico, principal antígeno inductor de inmunidad protectora.

En el norte de nuestro país, se registran anualmente casos de rabia en bovinos, y es necesaria la aplicación de medidas inmunoprolifáticas para el control del brote. En este contexto, disponer de nuevas vacunas seguras y efectivas, cuya producción elimine la manipulación

de grandes cantidades del agente patógeno contra el cual están dirigidas, resulta estratégico a nivel nacional y regional. La participación de tres instituciones públicas de nuestro país (INTA, ANLIS y Senasa) es adecuada para llevar adelante esta propuesta, ya que cada una aportará su *expertise* en la temática.

## Bibliografía

- Belsham G., Brangwyn J., Ryan M., Abrams C. y A. King (1990), "Intracellular expression and processing of foot-and-mouth disease virus capsid precursors using vaccinia virus vectors: influence of the L protease", *Virology* 176, pp. 524-530.
- Choi Y. y J. Chang (2013), "Viral vectors for vaccine applications", *Clin Exp Vaccine Res* 2, pp. 97-105.
- Delpietro H. A. y R. G. Russo (1996), "Aspectos ecológicos y epidemiológicos de la agresión del vampiro y de la rabia paralítica en la Argentina y análisis de las propuestas efectuadas para su control", *Rev. Scient. Tech. (O.I.E.)* 15 (3), pp. 971-984.
- Draper S. J. y J. L. Heeney (2010), "Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer", *Nat Rev Microbiol* 8, pp. 62-73.
- Elango N., Prince G., Murphy B., Venkatesan S., Chanock R. y B. Moss (1986), "Resistance to human respiratory syncytial virus (RSV) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein", *Proc Natl Acad Sci USA* 83, pp. 1906-1910.
- Lafon M., Wiktor T. J. y R. I. Macfarlan (1983), "Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies", *J Gen Virol.* 64, pp. 843-851.
- Mackett M., Smith G. L. y B. Moss (1984), "General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes", *J. Virol.* 49, pp. 857-864.
- Micucci M., Zanetti F., Rudak L., Jurado R., De Filippo J., Garanzini D., Perez O. y G. Calamante (2013), "First development of antirrabies vaccine using the canarypox vector platform in latin America", *XXIV Rabies in the Americas (RITA)*, Canadá.
- Pacchioni S., Volonté L., Zanutto C., Pozzi E., De Giuli Morghen C. y A. Radaelli (2010), "Canarypox and fowlpox viruses as recombinant vaccine vectors: an ultrastructural comparative analysis", *Arch Virol.* 155, pp. 915-924.
- Paoletti E., Lipinskas B., Samsonoff C., Mercer S. y D. Panicali (1984), "Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D", *Proc Natl Acad Sci USA* 81, pp. 193-197.
- Poulet H., Minke J., Pardo M. C., Juillard V., Nordgren B. y J. C. Audonnet (2007), "Development and registration of recombinant veterinary vaccines. The example of the canarypox vector platform", *Vaccine* 25, pp. 5606-5612.
- Rollier C. S., Reyes-Sandoval A., Cottingham M. G., Ewer K. y A. V. Hill (2011), "Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight", *Curr Opin Immunol* 23, pp. 77-382.
- Russo S. y A. Peralta (2011), "Expresión de la glicoproteína G del virus rábico y su utilización con fines de diagnóstico", *X Congreso Argentino de Virología*. Revista Argentina de Microbiología Supl. 1 Vol. 43 Buenos Aires, p. 68.
- Taylor J., Meignier B., Tartaglia J., Languet B., VanderHoeven J., Franchini G., Trimarchi C. y E. Paoletti (1995), "Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species", *Vaccine* 13, pp. 539-549.
- Weli S. C. y M. Tryland (2011), "Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors", *Virol J.* 8, pp. 49-63.

Zanetti F., Rudak L., Miccuci M., Conte Grand D., Luque A., Russo S., Taboga O., Perez O. y G. Calamante (2012), “Obtención y evaluación preliminar de un virus canarypox recombinante como candidato a vacuna antirrábica”, *Rev. Argent. Microbiol.* 44, pp. 75-84.