

RESPUESTA INMUNITARIA EN BOVINOS VACUNADOS CON VACUNAS  
ANTIAFTOSA INACTIVADAS, PRODUCIDAS  
CON 5 CEPAS DEL SUBTIPO O<sub>1</sub>

IMMUNE RESPONSE OF CATTLE AFTER VACCINATION WITH INACTIVATED  
FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINE OF 5 STRAINS OF SUBTYPE O<sub>1</sub>

D. Abaracón\*, I. Gomes\*

INTRODUCCION

En 1971 se propagó en el sur del Brasil una onda epizoótica de fiebre aftosa causada por la cepa O<sub>1</sub> Brasil/70, afectando también bovinos vacunados. La mayoría de las vacunas empleadas entonces eran elaboradas con la cepa de virus O<sub>1</sub> Campos, Brasil/1955.

El objetivo de este trabajo fue el estudio comparativo de vacunas elaboradas con diferentes cepas del virus subtipo O<sub>1</sub> de la fiebre aftosa que actúan en América del Sur y en particular, frente al virus denominado O<sub>1</sub> Brasil/70.

MATERIAL Y METODOS

*Cepas de virus*

Para la preparación de las vacunas experimentales fueron usadas las siguientes cepas de virus:

- a) O<sub>1</sub> Campos (Campos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, 1955).
- b) O<sub>1</sub> Brasil/70 (Bage, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, 1970).

INTRODUCTION

In 1971 an epizootic of foot-and-mouth disease (FMD) of subtype O<sub>1</sub> strain Brazil/70 spread through the south of Brazil which also affected vaccinated cattle. Most vaccines used at the time were produced with O<sub>1</sub> strain Campos, Brazil/1955.

The objective of the present study was to make a comparative study of vaccines with different O<sub>1</sub> subtype strains occurring in South America to determine if this would give protection against O<sub>1</sub> Brazil/70.

MATERIALS AND METHODS

*Virus strains*

For experimental vaccine production the following virus strains were used:

- a) O<sub>1</sub> Campos (state of Rio de Janeiro, Brazil, 1955).
- b) O<sub>1</sub> Brazil/70 (Bage, State of Rio Grande do Sul, Brazil, 1970).

---

\* Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

c) O<sub>1</sub> Caseros (Caseros, Santa Fe, República Argentina, 1967) usada en Argentina para la producción de vacunas.

d) O<sub>1</sub> Urubamba (Perú 1963) usada en Perú y Ecuador para la producción de vacunas.

e) O<sub>1</sub> Pacheco (Florida, Uruguay, 1962) usada en Uruguay para la producción de vacunas.

#### *Antígenos*

Todos los cultivos de células BHK-21 se produjeron con una misma semilla de células en botellas de Roux. En el momento de la inoculación de los virus cada botella contenía entre 80 y 90 millones de células. Se empleó el medio de MacPherson & Stoker (1) con 10% de suero bovino como medio de crecimiento.

Para cada virus se utilizaron cinco botellas de Roux. Se agregó 90 ml de medio de mantención sin suero, de tal forma que a cada mililitro correspondiese aproximadamente 10<sup>6,0</sup> células de la monocamada celular. Los cultivos fueron cosechados después de observar el efecto citopático completo, lo que ocurrió entre las 20 y 26 horas postinfección.

Las suspensiones víricas fueron inactivadas con acetiletileneimina (AEI) al 0,05% durante 24 horas a 37° C (2 y 3).

#### *Adyuvantes*

Hidróxido de aluminio: Se utilizó una suspensión coloidal de hidróxido de aluminio, ajustada a una concentración de 2% de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Saponina\*: Se preparó en solución acuosa al 5% y se ajustó el pH a 8,0 con buffer glicocola.

c) O<sub>1</sub> Caseros (Santa Fe, Republic of Argentina, 1967) used for vaccine production in Argentina.

d) O<sub>1</sub> Urubamba (Peru, 1963) used for vaccine production in Peru and Ecuador.

e) O<sub>1</sub> Pacheco (Uruguay, 1962) used for vaccine production in Uruguay.

#### *Antigens*

All BHK-21 cell cultures used were produced from the same cell stock, grown in Roux bottles. The cultures contained 80-90 million cells at the time of use. The growth medium was McPherson & Stoker (1) with 10% bovine serum.

Five culture bottles were inoculated with each of the virus stocks. A volume of 90 ml maintenance medium without serum was added. The cultures were harvested when cytopathic effect was observed, 20-26 hours after infection.

The virus suspensions were inactivated with 0.05% acetyl-ethyleneimine (AEI) for 24 hours at 37° C (2, 3).

#### *Adjuvants*

Aluminum hydroxide: a colloid suspension of aluminum hydroxide was used at a concentration adjusted to 2% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Saponin\*: a 5% aqueous solution was prepared and the pH adjusted to 8.0 with glycocol buffer.

#### *Vaccines*

Of the inactivated virus suspension, 750 ml were mixed with 250 ml of the aluminum hydroxide suspension. This mixture was

---

\* Partida PQ 7, 7/7/69 obtenida de Food Industries Ltd. 89/93  
New Zealand Ave. Walton on Thames, Surrey, England.

*Vacunas*

Se mezclaron 750 ml de la suspensión de virus inactivado y 250 ml de hidróxido de aluminio. Esta mezcla se agitó durante 2 horas a 4° C y luego se dejó en reposo durante 48 horas para permitir la sedimentación del Al (OH)<sub>3</sub>. Entonces se retiró el líquido sobrenadante en la cantidad necesaria para que, después de agregar glicerina, saponina y mertiolate, cada dosis monovalente de 2,5 ml tuviese 3,75 ml de la suspensión vírica original, 1,25 ml de hidróxido de aluminio, 5% de glicerina neutra, 0,1% de saponina y 1:30.000 de mertiolate.

*Bovinos*

Se usó un lote de 48 novillos de raza Hereford, de 18 a 20 meses de edad, con un peso medio de 250 kg. Estos animales nunca habían sido vacunados y fueron criados y mantenidos en un establecimiento sin ocurrencia de fiebre aftosa por más de 8 años. Durante todo el experimento los animales fueron mantenidos en el establecimiento de origen. El día de la vacunación los bovinos fueron sorteados para formar cinco grupos. Dos grupos de 12 bovinos cada uno recibieron, respectivamente, las vacunas elaboradas con los virus O<sub>1</sub> Campos y O<sub>1</sub> Brasil/70. Las otras tres vacunas se probaron en grupos de 8 bovinos.

*Vacunación*

A cada bovino se le aplicó 2,5 ml de vacuna por vía subcutánea; 90 días después se revacunarón con la misma vacuna los grupos vacunados con O<sub>1</sub> Campos y O<sub>1</sub> Pacheco.

shaken for 2 hours at 4° C. After 48 hours of sedimentation sufficient supernatant fluid was removed so that after addition of glycerin, saponin and merthiolate, each monovalent dose of 2.5 ml contained the equivalent of 3.75 ml of the original virus suspension. Each dose also contained 1.25 ml of aluminum hydroxide suspension, 5% neutral glycerin, 0.1% saponin and 1:30,000 merthiolate.

*Cattle*

A total of 48 Hereford cattle 18-20 months old weighing an average of 250 kg were used. These cattle had never been vaccinated and were raised and maintained on a farm where FMD had not occurred for 8 years. During the experiment the animals remained on the farm. On the day of vaccination the cattle were randomly divided into 5 groups. Two groups of 12 cattle each were vaccinated with O<sub>1</sub> Campos and O<sub>1</sub> Brazil/70 vaccines, respectively. The other 3 vaccines were tested on 3 groups of 8 cattle each.

*Vaccination*

Cattle were vaccinated subcutaneously with 2.5 ml of vaccine. At 90 days cattle groups vaccinated with O<sub>1</sub> Campos and O<sub>1</sub> Pacheco were revaccinated with the same vaccine.

*Antibody assay*

Sera were collected at 0, 21 and 90 days post-vaccination (DPV) and also at 90 days post-revaccination. The mouse protection test (4) was used to determine immune response of

*Prueba de anticuerpos*

Se colectó suero a los 0,21 y 90 días postvacunación (DPV) y a los 90 días después de la re-vacunación. La respuesta inmunitaria de los bovinos se midió con la prueba de protección en ratones (4) y los resultados se expresaron como los porcentajes de expectativa de protección (PEP) (5).

the cattle and results expressed as the expected percentages of protection (EPP) (5).

## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los títulos de fijación de complemento y de infectividad de las suspensiones víricas.

## RESULTS

Table 1 shows complement fixation titers as well as infectivity titers of the virus suspensions.

**TABLA 1: Títulos de fijación del complemento y infectividad de las cepas de virus usadas en la producción de las vacunas**

**TABLE 1: Complement fixation and infectivity titers of FMD virus strains used for the production of the experimental vaccines**

Cepa/strain	FC*/CF*	Título/titer**
O <sub>1</sub> Campos	1/20	7,2
O <sub>1</sub> Urubamba	1/8	7,6
O <sub>1</sub> Caseros	1/11	8,1
O <sub>1</sub> Pacheco	1/15	7,0
O <sub>1</sub> Brasil/70	1/12,5	6,9

\* Fijación del complemento 90 minutos con 3 unidades de complemento.

\* Complement fixation at 90 minutes with 3 units of complement.

\*\* Log<sub>10</sub> ID<sub>50</sub> en cultivo celular/ml.

\*\* Log<sub>10</sub> cell culture ID<sub>50</sub>/ml.

La Tabla 2 muestra el PEP de los virus homólogos 21 días postvacunación (DPV). Se observa sólo una pequeña diferencia entre los virus. A los 90 DPV los niveles de anticuerpos

The EPP are listed in Table 2. At 21 DPV all strains protected well against the homologous virus, but at 90 DPV protection decreased considerably. The vaccine O<sub>1</sub> Campos

bajaron considerablemente, observándose para la vacuna O<sub>1</sub> Campos un PEP de 56%, seguida por la vacuna O<sub>1</sub> Pacheco con 44%. Con respecto a las vacunas O<sub>1</sub> Urubamba, O<sub>1</sub> Caseros y O<sub>1</sub> Brasil/70 los PEP fueron inferiores. En relación a la respuesta inmunológica frente a la cepa heteróloga O<sub>1</sub> Brasil/70, todas las muestras en estudio presentaron PEP bastante elevados a los 21 DPV. Sin embargo, a los 90 días esos valores cayeron significativamente y sólo la vacuna de virus O<sub>1</sub> Campos alcanzó valores de PEP de 49%.

produced an EPP of 56% followed by vaccine O<sub>1</sub> Pacheco with 44%. The EPP of the other vaccine, O<sub>1</sub> Urubamba, O<sub>1</sub> Caseros and O<sub>1</sub> Brazil/70, were lower. All strains produced high levels of protection against the O<sub>1</sub> Brazil/70 at 21 DPV. However by 90 DPV the EPP values had decreased considerably and only the vaccines with strain O<sub>1</sub> Campos gave some degree of residual protection (EPP 49%).

TABLA 2: *Porcentaje de expectativa de protección de bovinos vacunados con vacunas del subtipo O<sub>1</sub>, frente a la cepa homóloga de producción y la cepa O<sub>1</sub> Brasil/70, a los 21 y 90 días postvacunación*

TABLE 2: *Expected percentage of protection of cattle vaccinated with vaccines of subtype O<sub>1</sub> against the homologous production strain and strain O<sub>1</sub> Brazil/70 at 21 and 90 days post-vaccination*

Vacunas/Vaccines	Cepa/Strain			
	Homóloga/Homologous		O <sub>1</sub> Brasil/70	21 DPV 90 DPV
	21 DPV*	90 DPV	21 DPV	90 DPV
O <sub>1</sub> Campos	100	56	98	49
O <sub>1</sub> Urubamba	94	32	95	14
O <sub>1</sub> Caseros	84	32	82	12
O <sub>1</sub> Pacheco	99	44	100	29
O <sub>1</sub> Brasil/70			88	25

\* Días postvacunación/Days post-vaccination.

En vista de los resultados más promisorios encontrados con las cepas O<sub>1</sub> Campos y O<sub>1</sub> Pacheco, fue de interés conocer los PEP que las vacunas producidas con estos virus podrían presen-

In view of the more promising results obtained with the vaccine of strains O<sub>1</sub> Campos and Pacheco, the 21 DPV sera of these vaccines were also tested against the other O<sub>1</sub> strains.

tar frente a las demás cepas en estudio, además de la cepa O<sub>1</sub> Brasil/70. Como se puede observar en la Tabla 3, la amplitud de la cobertura inmunológica fue excelente también para las cepas O<sub>1</sub> Caseros y Urubamba.

Como se puede observar en la Tabla 4, en la revacunación a los 90 días, la cepa O<sub>1</sub> Campos presentó un PEP superior a 80% frente a si misma, a la cepa O<sub>1</sub> Pacheco y a la O<sub>1</sub> Brasil/70, mientras que la O<sub>1</sub> Pacheco presentó resultados satisfactorios frente a la O<sub>1</sub> Brasil/70, pero fue inferior cuando enfrentada a si misma y a la cepa O<sub>1</sub> Campos.

As shown in Table 3 both vaccines also gave excellent immunological coverage for strains O<sub>1</sub> Caseros and Urubamba.

As can be seen from Table 4, at 90 days after revaccination strain O<sub>1</sub> Campos produced a mean EPP of more than 80% for the homologous virus as well as for strains O<sub>1</sub> Pacheco and Brazil/70. The vaccine with strain O<sub>1</sub> Pacheco gave satisfactory results against O<sub>1</sub> Brazil/70 but was inferior when tested against the homologous virus and O<sub>1</sub> Campos.

TABLA 3: *Porcentaje de expectativa de protección de bovinos vacunados con vacunas producidas con las cepas O<sub>1</sub> Campos y O<sub>1</sub> Pacheco frente a los virus O<sub>1</sub> Caseros y O<sub>1</sub> Urubamba, a los 21 días postvacunación*

TABLE 3: *Expected percentage of protection of cattle vaccinated with vaccines produced with strains O<sub>1</sub> Campos and O<sub>1</sub> Pacheco against strain O<sub>1</sub> Caseros and O<sub>1</sub> Urubamba at 21 days post-vaccination*

Vacunas/Vaccines	Virus	
	O <sub>1</sub> Caseros	O <sub>1</sub> Urubamba
O <sub>1</sub> Campos	100	89
O <sub>1</sub> Pacheco	98	95

TABLA 4: *Porcentaje de expectativa de protección de bovinos 90 días después de la revacunación con vacunas de las cepas O<sub>1</sub> Campos y O<sub>1</sub> Pacheco, frente a las cepas homólogas y O<sub>1</sub> Brasil/70*

TABLE 4: *Expected percentage of protection of cattle 90 days after revaccination with vaccine produced with strains O<sub>1</sub> Campos and O<sub>1</sub> Pacheco against the homologous strain and O<sub>1</sub> Brazil/70*

Vacunas/Vaccines	Virus		
	O <sub>1</sub> Campos	O <sub>1</sub> Pacheco	O <sub>1</sub> Brasil/70
O <sub>1</sub> Campos	81	87	96
O <sub>1</sub> Pacheco	53	64	83

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

A los 21 días todas las vacunas, menos la preparada con O<sub>1</sub> Caseros, protegieron bien frente a los respectivos virus homólogos y a la cepa O<sub>1</sub> Brasil/70. Esas vacunas también fueron mejores que la vacuna O<sub>1</sub> Brasil/70.

A los 90 DPV, la cepa O<sub>1</sub> Campos dio una protección satisfactoria contra el virus O<sub>1</sub> Brasil/70 y asimismo, una protección excelente 90 días después de la revacunación.

En este tipo de experimento, es importante notar, que la prolongación del período de observación por 90 días después de la vacunación o de la revacunación, permite una diferenciación más clara entre las respuestas inmunitarias provocadas por las distintas cepas en estudio.

Puede concluirse que vacunas producidas con la cepa O<sub>1</sub> Campos darían en los bovinos una respuesta inmunitaria aceptable contra la cepa O<sub>1</sub> Brasil/70, causante del brote de 1971 y que no había ventaja en usar la cepa Brasil/70 en lugar de O<sub>1</sub> Campos.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

At 21 DPV all vaccines except that prepared with O<sub>1</sub> Caseros protected well against the homologous virus and strain O<sub>1</sub> Brazil/70. These vaccines were also superior to that produced with O<sub>1</sub> Brazil/70.

At 90 DPV strain O<sub>1</sub> Campos gave satisfactory protection against O<sub>1</sub> Brazil/70 and excellent protection at 90 days after revaccination.

It is important to note that, in this type of experiment, extending the observation period to 90 days after vaccination or revaccination allows for a clearer differentiation among immune responses produced by the various strains under study.

It can be concluded that vaccines produced with strain O<sub>1</sub> Campos would give an acceptable immune response in cattle against strain O<sub>1</sub> Brazil/70 which caused the outbreak in 1971; there would thus be no advantage in using strain Brazil/70 instead of O<sub>1</sub> Campos.

## REFERENCIAS - REFERENCES

1. STOKER, M.; MACPHERSON, I.  
Syrian hamster fibroblast cell line BHK-21 and its derivates. *Nature* 203: 1355-1357, 1964.
2. BROWN, F.; ERICK, J.  
Application of agar-gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.* 82: 444-447, 1959.

3. BROWN, F.; HYSLOP, N. St. G.; ERICK, J; MORROW, A.W.  
The use of acetyl ethyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg.* 61 (3): 337-344, 1963.
4. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I.  
El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmuno-lógica. *Gac. vet.* 19 (110): 243-267, 1957.
5. GOMES, I.; ASTUDILLO, V.  
Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1975.