

**VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO PARA CERDOS.
III. RESPUESTA INMUNITARIA CON VACUNAS EMULSIFICADAS
POR VIBRACION ULTRASONICA O POR AGITACION MECANICA¹**

Ivo Gomes²; P. Augé de Mello²; A. Alonso Fernández²; Kleise de Freitas Costa²

RESUMEN

La respuesta inmunitaria y la protección de cerdos vacunados por vía intraperitoneal con vacunas antiaftosas de emulsión doble con adyuvante oleoso fue evaluada por comprobación y por examen de anticuerpos. Una vacuna fue emulsificada con un equipo de ultrasonido (Vacuna 1) y la otra con un equipo mecánico (Vacuna 2). Ambas vacunas fueron analizadas por las DP₅₀ en cobayos. Todas las pruebas indicaron que las dos vacunas eran satisfactorias. Sin embargo, la Vacuna 2 fue ligeramente superior a la 1.

También se demostró que un índice de seroprotección (ISP) de 3,0 o un título de microneutralización de 2,5 indican un alto grado de protección de los cerdos. Un valor bajo de ISP no necesariamente indica ausencia de protección.

De los 22 cerdos que presentaron lesiones, 20 se tornaron VIA positivos. Sin embargo, sólo 6 de los 38 cerdos sin lesiones desarrollaron anticuerpos VIA a los 15 días postinoculación. Esta observación merece ser destacada ya que un alto porcentaje de bovinos vacunados que no desarrollaron lesiones después de inoculados, se tornaron VIA positivos (9). Esta diferencia podría indicar una diferencia fundamental en la presentación subclínica de fiebre aftosa en bovinos y porcinos.

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (2) fue comunicado el éxito obtenido con la vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con vacunas antiaftosas inactivadas con adyuvante oleoso en emulsión doble.

¹ Este trabajo fue realizado en parte con un subsidio del Instituto Vallée S/A, Uberlândia, MG, Brasil.

² Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

En un estudio posterior (3) con vacunas similares aplicadas por vía intraperitoneal, a los 30 días postvacunación (DPV) fue observada una buena correlación entre el nivel de anticuerpos y los resultados a la comprobación. En estas experiencias se obtuvieron resultados semejantes en las comprobaciones, por inoculación y por contacto.

Este experimento se realizó para comparar vacunas oleosas de emulsión doble preparadas con emulsificadores de ultrasonido³ o mecánico⁴. Los resultados de este estudio también contribuyen para el desarrollo de un método adecuado para determinar la potencia de las vacunas antiaftosas.

MATERIALES Y METODOS

Virus

Las cepas de virus de la fiebre aftosa usadas para la producción de la vacuna fueron O₁ Campos, A Bagé, A Venceslau y C₃ Indaial.

Todas las cepas usadas para la producción de vacunas eran de origen bovino y fueron pasadas en células BHK₂₁ de 7 pasajes como máximo.

El virus O₁ Campos usado para la inoculación de los porcinos fue del 11^o pasaje en bovino.

Vacunas

Los antígenos usados para la preparación de las vacunas fueron producidos en la Planta Piloto de Producción de Vacunas del Centro en frascos ro-lantes con células BHK₂₁ Clon 13. Las suspensiones de virus fueron inactivadas con 0,001 M de etileneimina binaria (BEI) durante 24 horas (4).

Las características de los antígenos se indican en el Cuadro 1. Las vacunas fueron preparadas con igual volumen de las suspensiones de los antígenos

³ Minisonic, Ultrasonic Ltd. Otley Road Shipley, West Yorkshire, England.

⁴ Silverson Machine (Sales) Ltd., London.

RESULTADOS

Las medias de los títulos de neutralización de los sueros a los 30 DPV están indicadas en el Cuadro 2. Se puede observar que los antígenos O y A indujeron mejor respuesta que el C y que los títulos obtenidos con la vacuna emulsificada con el equipo de Silverson (Vacuna 2) son más altos que los obtenidos con el equipo de ultrasonido (Vacuna 1). También se observa que es una constante la buena relación de la respuesta título de anticuerpo/dosis.

En la comprobación uno de los cerdos control inoculado murió. El otro inoculado, así como los tres contactos sin vacunar desarrollaron severas lesiones de fiebre aftosa. Las respuestas individuales para el virus O₁ de cada uno de los cerdos vacunados están indicadas en los Cuadros 3 y 4. Aquí, también se puede observar el descenso gradual en los índices de seroprotección (ISP) y en el título de microneutralización (TMN) con la dilución de la vacuna, a excepción del ISP de la dilución 1:3 de la Vacuna 1. Además se observa la misma correlación de la respuesta lesiones podales/dosis, con excepción del grupo correspondiente a la dilución 1:3 de la Vacuna 2 en la que tres cerdos muestran lesiones en 1 ó 2 patas.

La elevación del ISP y del TMN después de la comprobación es indicación de que hubo una buena exposición al virus de comprobación. En relación a esto, se destaca el alto número de cerdos que no desarrollaron lesiones y permanecieron negativos para los anticuerpos VIA a los 15 días des-

pués de la comprobación. No obstante, varios cerdos presentaron una elevación de anticuerpos en las pruebas de seroprotección o microneutralización.

Los efectos de la enfermedad en cerdos con lesiones en una o dos patas fueron menores que en los controles sin vacunar o aquellos correspondientes a la dilución 1:27 de la Vacuna 1 que fueron afectados severamente. Los cerdos con lesiones benignas continuaron comiendo, sus movimientos no fueron perjudicados y las lesiones cicatrizaron rápidamente.

El Cuadro 5 resume los resultados de la comprobación de los cerdos en relación al nivel de anticuerpos. De 27 cerdos con ISP entre 0,0–0,9, sólo 11 generalizaron. Por tanto, un bajo valor de seroprotección en un cerdo vacunado no necesariamente indica falta de protección. Los 19 cerdos con ISP $\geq 3,0$ estaban protegidos. Siete cerdos con TMN $\leq 1,4$ generalizaron y 31 de los que tenían valores $\geq 2,5$ estaban protegidos.

La media de los ISP y TMN de los cerdos con lesiones en las 4 patas fue de $0,43 \pm 0,08^9$ y $1,54 \pm 0,16$ respectivamente. Estos valores para los cerdos sin lesiones fueron $3,02 \pm 0,35$ y $2,96 \pm 0,10$ respectivamente. Los ISP y TMN de los cerdos que tenían una o dos patas afectadas fueron más bajos pero no significativamente diferentes de los totalmente protegidos (ISP $2,11 \pm 0,57$ y TMN $2,64 \pm 0,18$).

⁹Media y error típicos de la media.

CUADRO 2. Promedio de los títulos de microneutralización en cerdos a los 30 días después de vacunados con series de diluciones de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso

Dilución de la vacuna	Vacuna 1 (Ultrasonido)			Vacuna 2 (Mecánico)		
	Virus			Virus		
	O	A	C	O	A	C
1:1	$3,2 \pm 0,25^a$	$3,3 \pm 0,22$	$2,7 \pm 0,45$	$\geq 3,5$	$\geq 3,5$	$3,3 \pm 0,22$
1:3	$2,5 \pm 0,54$	$2,2 \pm 0,30$	$2,0 \pm 0,25$	$3,3 \pm 0,22$	$2,9 \pm 0,37$	$2,8 \pm 0,49$
1:9	$1,7 \pm 0,45$	$1,7 \pm 0,53$	$1,6 \pm 0,59$	$3,0 \pm 0,39$	$3,0 \pm 0,36$	$2,6 \pm 0,39$
1:27	$\leq 1,2$	$\leq 1,5$	$\leq 1,2$	$2,2 \pm 0,31$	$2,2 \pm 0,25$	$1,9 \pm 0,39$

^aPromedio y error típico.

O, A y C. La valencia A se preparó con iguales volúmenes de las suspensiones A Bagé y A Venceslau.

CUADRO 1. Características de los antígenos usados para la preparación de las vacunas

Virus	Título infeccioso en cultivos celulares/ml	Título FCs ₀ ^a
O ₁ Campos	10 ^{6,6}	1:24
A Bagé	10 ^{7,6}	1:28
A Venceslau	10 ^{7,4}	1:26
C ₃ Indaial	10 ^{7,2}	1:16

^aPrueba de fijación del complemento (4 UHC₅₀/90 min.).

Vacuna 1: Fue preparada con un equipo de ultrasonido. Para tal fin, 450 ml de una mezcla de 9 partes de aceite mineral⁵ y una parte de monooleato de manitol⁶ fueron emulsificadas con 450 ml de una suspensión de antígeno trivalente para formar una emulsión agua en aceite (emulsión primaria).

Esta emulsión tenía características similares a las vacunas usadas en las experiencias anteriores (5). La emulsión primaria fue nuevamente emulsificada con 900 ml de solución buffer fosfato (SBF), pH 7,4 conteniendo 2% de polioxietileno 20 monooleato de sorbitol⁷ y mertiolato (concentración final 1:30.000 p/v) para formar una emulsión de agua en aceite en agua (emulsión doble).

Vacuna 2: Fue preparada a partir de la misma suspensión de antígeno, usando un emulsificador mecánico.

La emulsión primaria contenía 150 ml de la fase oleosa preparada como fue descrito en la Vacuna 1 y 150 ml de suspensión del antígeno trivalente.

Para preparar la emulsión doble fueron añadidos 300 ml de SBF, pH 7,4, conteniendo 2% de polioxietileno 20 monooleato de sorbitol y mertiolato, 1:30.000.

⁵Marcol 52 – Exxon Corporation, USA.

⁶Arlacel A – ICI America Inc., Atlas Chemicals Division.

⁷Tween 80 – ICI America Inc., Atlas Chemicals Division.

Prueba de potencia en cobayos

Fueron preparadas las diluciones de la vacuna (1:3, 1:9 y 1:27) en SBF, pH 7,4. Con la vacuna sin diluir y con cada dilución fueron inoculados por vía intramuscular con 0,25 ml, 6 cobayos de 3 a 4 meses de edad y con 550 ± 50 g de peso.

A los 30 DPV los cobayos fueron inoculados por vía intradermopltar con 10³ dosis generalizantes 50% (DG₅₀) de la cepa O₁ Campos. Las lesiones en las patas no inoculadas fueron observadas a los 5 días después de inoculados. La vacuna emulsificada con ultrasonido proporcionó 9 DP₅₀ y la preparada con el emulsificador mecánico tuvo 27.

Prueba de potencia en cerdos

Se utilizaron cerdos híbridos Humus-Seghers⁸, recién destetados, de dos meses de edad y con un peso aproximado de 20 kg. Grupos de 8 cerdos fueron vacunados por vía intraperitoneal con 3 ml de la vacuna pura o con diluciones similares a las preparadas para los cobayos.

A los 30 DPV los animales vacunados fueron colocados en contacto con dos cerdos sin vacunar, inoculados por vía intradermopltar con 10⁴ DI₅₀RL de la cepa O₁ Campos y con tres cerdos controles sin vacunar.

Los animales fueron examinados únicamente a los 10 días después de la inoculación.

Examen de anticuerpos

Los cerdos fueron sangrados antes de la vacunación, a los 30 DPV y 15 días después de la comprobación.

El examen de anticuerpos fue realizado por se-roprotección (6), microneutralización (7) y por doble difusión en gel de agar para anticuerpos VIA (1).

⁸Humus Agrícola S/A. Via Armando Salles Oliveira, SP-322 km 356, Pitangueiras, SP, Brasil.

CUADRO 3. Respuesta de cerdos vacunados con vacuna de fiebre aftosa con adyuvante oleoso en forma de emulsión doble (Vacuna 1 – ultrasonido) e inoculados con el virus O₁ Campos

Dilución de la vacuna	Suero N°	30 días postvacunación			15 días postinoculación		
		ISP	TMN	Lesiones	ISP	TMN	VIA
1/1	1	≥ 5,3	3,2	Neg.	≥ 5,5	3,3	-
	2	≥ 4,3	2,9	Neg.	≥ 5,5	3,3	-
	3	≥ 5,3	3,0	Neg.	4,8	4,1	-
	4	2,6	3,5	Neg.	≥ 5,5	2,9	-
	5	2,5	3,0	Neg.	2,1	2,3	-
	6	≥ 5,3	3,6	Neg.	≥ 5,5	3,2	-
	7	4,9	3,2	Neg.	≥ 5,5	4,1	-
	8	≥ 5,3	3,2	Neg.	≥ 5,5	2,9	-
1/3	9	0,8	2,9	Neg.	≥ 4,5	2,9	-
	10	1,0	2,9	Neg.	≥ 4,5	3,3	-
	11	0,8	2,3	Neg.	≥ 4,5	2,2	-
	12	0,0	1,7	Neg.	≥ 4,5	2,9	+
	13	0,8	3,2	Neg.	≥ 4,5	2,6	-
	14	0,5	2,6	4 P	≥ 5,5	≥ 3,5	+
	15	0,7	2,9	Neg.	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
	16	0,0	1,8	Neg.	≥ 4,5	≥ 3,5	+
1/9	17	0,4	1,7	4 P	≥ 5,4	2,9	+
	18	0,4	2,3	Neg.	≥ 5,4	3,3	-
	19	0,7	≤ 1,2	4 P	≥ 5,4	3,3	+
	20	0,9	2,0	2 P	≥ 5,4	3,3	+
	21	0,7	1,8	4 P	≥ 5,4	3,2	+
	22	0,4	≤ 1,2	4 P	≥ 5,4	≥ 3,6	+
	23	1,3	2,4	2 P	≥ 5,4	≥ 3,6	-
	24	0,4	1,5	Neg.	≥ 4,4	3,3	-
1/27	25	0,4	≤ 1,2	4 P	5,4	2,7	+
	26	0,4	≤ 1,2	4 P	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
	27	0,4	1,7	Neg.	5,4	≥ 3,5	-
	28	0,0	≤ 1,2	4 P	5,4	3,2	+
	29	0,2	≤ 1,2	4 P	5,4	≥ 3,5	+
	30	0,2	≤ 1,2	4 P	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>

^aMuertos después de inoculados con virus, no relacionados con FA.

^bMuertos después de inoculados con virus, probablemente debido a FA.

+ = Positivo.

- = Negativo.

ISP = Índice de seroprotección.

TMN = Título de microneutralización.

P = Patas.

CUADRO 4. Respuesta de cerdos vacunados con vacuna de fiebre aftosa con adyuvante oleoso en forma de emulsión doble (Vacuna 2 – mecánico) e inoculados con el virus O₁ Campos

Dilución de la vacuna	Suero N°	30 días postvacunación			15 días postinoculación		
		ISP	TMN	Lesiones	ISP	TMN	VIA
1/1	36	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	-
	37	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	3,5	-
	38	≥ 5,3	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	≥ 4,2	-
	39	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	-
	40	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	2,9	-
	41	≥ 5,3	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	2,7	-
	42	≥ 5,3	3,2	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	-
1/3	43	4,4	3,0	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	+
	44	≥ 5,3	3,3	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,6	+
	45	2,0	3,2	1 P	≥ 4,9	≥ 3,6	-
	46	≥ 5,3	≥ 3,5	2 P	≥ 4,9	≥ 4,5	+
	47	3,8	3,3	2 P	≥ 4,9	≥ 4,8	+
	48	≥ 5,2	≥ 3,8	Neg.	≥ 4,9	≥ 4,8	-
	49	≥ 5,2	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	2,9	-
50	1,0	3,2	Neg.	3,9	3,2	-	
1/9	51	1,5	3,0	Neg.	4,4	3,5	+
	52	≤ 0,8	3,0	Neg.	≥ 4,8	3,8	+
	53	2,9	≥ 3,6	Neg.	≥ 5,8	3,2	-
	54	0,9	2,6	Neg.	≥ 4,8	≥ 3,6	-
	55	≥ 5,2	3,2	Neg.	≥ 5,8	≥ 3,9	-
	56	1,5	2,4	1 P	≥ 5,8	2,6	+
	57	1,8	3,2	Neg.	≥ 4,8	≥ 3,6	-
58	≥ 5,2	3,3	Neg.	≥ 5,8	3,5	-	
1/27	59	3,4	2,3	2 P	≥ 5,8	3,3	+
	60	0,4	1,8	Neg.	≥ 4,8	2,9	-
	61	0,4	1,8	Neg.	≥ 4,8	3,2	-
	62	0,2	2,1	2 P	≥ 5,8	≥ 3,5	+
	63	0,9	2,4	4 P	≥ 5,8	≥ 3,6	+
64	0,6	2,6	1 P	≥ 5,8	≥ 3,5	+	

+ = Positivo.

- = Negativo.

CUADRO 5. Lesiones podales en los cerdos inoculados con la cepa de fiebre aftosa O₁ Campos a los 30 días después de vacunados con series de diluciones de vacunas con adyuvante oleoso

Pruebas	Nº de cerdos	Nº de patas afectadas				
		0	1	2	3	4
Índice de Seroprotección						
0,0 - 0,9	27	13	1	2	-	11
1,0 - 1,9	6	4	1	1	-	-
2,0 - 2,9	7	3	1	3	-	-
≥ 3,0	19	19	-	-	-	-
Total	59	39	3	6	0	11
Título de Microneutralización						
≤ 1,4	7	-	-	-	-	7
1,5 - 1,9	8	6	-	-	-	2
2,0 - 2,4	8	2	1	4	-	1
2,5	36	31	2	2	-	1
Total	59	39	3	6	0	11

DISCUSION

Ambas vacunas proporcionaron excelente protección a los cerdos comprobados por una severa prueba por contacto. Sin embargo, la vacuna preparada con el equipo de Silverson tuvo un desempeño ligeramente superior. Otras pruebas son necesarias para demostrar si las diferencias entre las dos técnicas de emulsificación son consistentes.

Es alentador comprobar que las DP₅₀ en cobayos, la seroneutralización, la seroprotección y la prueba de descarga en porcinos utilizadas para determinar la potencia de las vacunas dieron resultados semejantes.

Es importante observar la eficiencia de la exposición por contacto usada en esta experiencia. Los cerdos vacunados, los contactos no vacunados y los donadores de virus fueron mantenidos juntos. Los contactos no vacunados enfermaron severamente y la alta elevación de los niveles de anticuerpos en todos los cerdos con bajos títulos de anticuerpos antes de la comprobación, muestra que todos los animales estuvieron expuestos al virus. Todos los cerdos vacunados con un ISP ≥ 3,0 y 31 de

36 con un TMN ≥ 2,5 estaban completamente protegidos.

En varios de los cerdos con títulos elevados de anticuerpos la replicación del virus fue inhibida, ya que no se detectó la formación de anticuerpos VIA.

De los 22 cerdos que desarrollaron lesiones después de la comprobación, 20 fueron VIA positivos. Sin embargo, sólo 6 de los 38 sin lesiones desarrollaron anticuerpos VIA a los 15 días después de la comprobación. Esta observación es importante pues un alto porcentaje de bovinos que no desarrollan lesiones después de inoculados, se tornan VIA positivos (9). Esta diferencia puede indicar una presentación distinta en la infección subclínica de la fiebre aftosa en bovinos y porcinos.

Uno de los principales problemas que aún permanece sin respuesta es la clasificación de los cerdos con lesiones en una o dos patas, que por lo demás están perfectamente sanos. Gomes (8) observó que aun cerdos convalecientes pueden desarrollar lesiones locales cuando son mantenidos en un ambiente altamente contaminado. Es probable que cerdos con una o dos patas afectadas tengan lesiones locales causadas particularmente por la infección de las abrasiones de la piel y de acuerdo con el nivel de anticuerpos, corresponden más al grupo de los completamente protegidos que al de los generalizados.

REFERENCIAS

1. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. (The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 17-22, 1975.
2. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
3. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ALONSO FERNANDEZ, A.; MASCARENHAS, J.C. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. II. Vacunación

- intraperitoneal de cerdos jóvenes con emulsión doble. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 13-19, 21-27, 1978.
4. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47: 47-56, 1975.
 5. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA; DIRECCION DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. Prueba de potencia para vacunas contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso: Ensayos de DP_{50} en cobayos y en bovinos de una vacuna preparada en forma semi-industrial con una emulsión del tipo agua en aceite. (Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine: PD_{50} assays of semi-industrial water-in-oil type emulsion in guinea pigs and cattle). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 29-30: 55-59, 61-65, 1978.
 6. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr., 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 inmunológica. *Gac. Vet.*, B. Aires, 19 (110): 243-267, 1957.
 7. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
 8. GOMES, I. Fiebre aftosa: Reacción de cerdos convalecientes de la exposición de virus homólogos. (Foot-and-mouth disease: Reaction of convalescent pigs to homologous virus exposure). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 15-18, 19-22, 1977.
 9. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitation test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidem.* 92 (4): 273-278, 1970.