

VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO: ESTUDIO COOPERATIVO

Argentina (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA])¹

y

Estados Unidos de América (Centro de Enfermedades Animales de Plum Island [PIADC])²

RESUMEN

Se presenta un resumen de los estudios cooperativos sobre vacunas contra la fiebre aftosa realizados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Brasil, y el Centro de Enfermedades Animales de Plum Island, Estados Unidos de América. Estos estudios se refieren a la respuesta inmunitaria obtenida en novillos con (1) vacunas de virus Frenkel preparadas con adyuvantes oleosos e hidróxido de aluminio. Cuando la inmunidad de los novillos fue comprobada a los 30 días, la vacuna Frenkel con adyuvante de hidróxido de aluminio y saponina dio una mejor protección. En el trabajo principal (11), se estudió la respuesta de novillos a las 3 vacunas producidas en BHK emulsificadas con adyuvante oleoso. Las tres vacunas fueron así preparadas: en una, la suspensión del virus fue usada en la misma concentración en que fue cultivada; y en las otras dos, fue concentrada 100 veces por la técnica de polietilenglicol y luego diluida a concentraciones de 20X y 1X, respectivamente. La respuesta de anticuerpos y la protec-

ción obtenida por las tres vacunas fue similar. Se concluye que en los tres grupos los animales tuvieron una protección similar cuando su inmunidad fue comprobada, lo que indica que estas concentraciones diferentes de antígeno no resultaron en diferencias significativas de protección.

INTRODUCCION

Se presenta un resumen de los resultados obtenidos en estudios cooperativos sobre vacunas de virus de la fiebre aftosa (FA) realizados en Argentina por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA), Brasil, y el Centro de Enfermedades Animales de Plum Island (PIADC), Estados Unidos de América, durante un período de varios años (1968-1975) (9, 11, 12). En este trabajo se evalúa la respuesta inmunitaria de vacunas de adyuvante oleoso y de hidróxido de aluminio en bovinos (parte I) y la respuesta inmunitaria después de la vacunación y revacunación con una vacuna antiaftosa emulsificada con adyuvante oleoso (parte II). En los estudios preliminares se compararon los resultados de vacunas en las cuales los virus utilizados como antígenos se cultivaron en células BHK, se inactivaron con acetiltileneimina (AEI) y se emulsificaron con adyuvante oleoso (PIADC e INTA), y vacunas en que los virus usados como antígenos se obtuvieron en cultivos de Frenkel, se inactivaron con formaldehído y se combinaron con hidróxido de aluminio y saponina. Los bovinos vacunados fueron mantenidos en una unidad de aislamiento en la Península Valdés, provincia Chubut, Argentina.

MATERIALES Y METODOS

Selección de cepas de virus de la FA

Por recomendación de representantes del CPFA, las cepas de virus de la FA subtipos O₁ Caseros,

¹S. Rivenson; O. Ibarra; O.P. Gaggino; O. Laporte; H. García Olano; J.C. Pizzi; L. Marangunich. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Servicio Nacional de Programación y Evaluación Técnica, San José 151, 2º Piso, Buenos Aires, Argentina.

²J.J. Callis; P.D. McKercher; J.H. Graves; H.L. Bachrach; K.M. Cowan; H.R. Cunliffe. USDA, Science and Education Administration, Federal Research, Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

"La mención de una marca registrada o de propiedad de un producto no constituye una certificación de garantía de ese producto por parte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América ni implica su aprobación ni la exclusión de otros productos utilizables con fines similares."

A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende, seleccionadas para la preparación de la vacuna fueron semejantes a las mencionadas previamente (9, 11).

Vacunas

Para la parte inicial (I) de estos estudios fueron preparadas cuatro vacunas trivalentes: 1) virus de la FA cultivado en Frenkel, inactivado con formaldehído y combinado con adyuvante hidróxido de aluminio y saponina; 2) virus de la FA cultivado como en el número 1) pero combinado con la fórmula oleosa del INTA; 3) virus de la FA cultivado en células BHK, inactivado con AEI y emulsificado con adyuvante oleoso del PIADC, y 4) similar al número 3) pero emulsificado con el adyuvante oleoso del INTA (1, 2, 10).

En la segunda parte (II) que constituye la principal del estudio informado (9), fueron usadas tres vacunas trivalentes, como sigue: 1) Vacuna 1 - virus cultivado en células BHK, inactivado con AEI y emulsificado con adyuvante oleoso (fórmula de INTA) (2); 2) Vacuna 2 - virus cultivado como en 1), concentrado 100 veces por la técnica de polietilenglicol (13) y después reconstituido para contener aproximadamente la misma masa antigénica de la Vacuna 1; y 3) Vacuna 3 - virus procesado como la Vacuna 2, pero ajustado para contener 20 veces la masa antigénica de las Vacunas 1 y 2.

Pruebas de inocuidad

La infectividad de cada antígeno preparado en el PIADC fue probada inoculando la lengua de 6 novillos en 20 puntos con 0,1 ml del virus inactivado (8). Todos los antígenos y los productos finales fueron posteriormente probados en forma similar en Argentina antes de usar en la parte I y en el PIADC antes de usar en la parte II.

Pruebas de potencia

Los antígenos BHK preparados en el PIADC para la parte I fueron probados como vacunas monovalentes y trivalentes antes de su envío a la Argentina. Las vacunas monovalentes fueron inoculadas en 6 novillos y su inmunidad fue comprobada con virus homólogos a los 30 días postvacunación (DPV). Los mismos antígenos fueron usados

en la vacuna trivalente y una dosis de 5 ml de esta vacuna fue inoculada en cada uno de los 6 novillos y la inmunidad fue comprobada a los 30 DPV.

En Argentina se realizó una prueba de potencia a los 30 días con las vacunas 1, 2, 3 y 4. Con cada vacuna se inocularon 27 novillos y estos animales, totalizando 108, y los controles fueron mantenidos en una estación de aislamiento en Puesto Larralde en la Península Valdés.

En la prueba de potencia de la parte II, 12 novillos fueron inoculados por vía subcutánea, con una dosis de 5 ml, utilizando 4 novillos para cada vacuna - 1, 2 y 3. Fue determinada la dosis protectora 50% bovino para el virus O de las vacunas 1 y 2 (9).

Vacunación

Para el estudio (II) fueron seleccionados 371 novillos entre 1 y 2 años de edad procedentes de Chubut, provincia meridional de Argentina, ubicada en el área libre de FA de la Patagonia, los cuales fueron transferidos para la estación de mantenimiento de bovinos en la Península Valdés. Los sueros de los novillos seleccionados fueron examinados en el INTA para comprobar la presencia de anticuerpos de la FA por la prueba de seroprotección (5). Fueron seleccionados para usar en este estudio aquellos con un índice de seroneutralización menor que uno. Se formaron 4 grupos de 52 animales cada uno, un grupo para cada una de las 3 vacunas y un grupo de controles sin vacunar. Cada grupo de 52 animales fue escogido de 371 animales por el método de selección al azar en un computador (9).

Serología

Se extrajeron muestras de sangre de los animales vacunados y los controles a 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 365, 455 y 545 DPV. Los sueros fueron examinados en el PIADC para comprobar anticuerpos contra los tipos O, A y C del virus de la FA de acuerdo con varias técnicas serológicas, incluyendo la inmunodifusión radial (4), microneutralización (14), reducción de placas (3), DP₅₀ ratón (6) y prueba de seroprotección en ratón lactante (5).

Los valores obtenidos para las 5 pruebas frente al virus de FA (9), se analizaron junto con los resultados de comprobación de inmunidad. De

acuerdo con este análisis, las pruebas que indicaron con más efectividad cuales eran los animales protegidos y los no protegidos fueron la seroprotección y la DP_{50} en ratón lactante.

Comprobación de inmunidad

En los estudios de potencia realizados en la Argentina (inicial, parte I), los novillos se transportaron en camión desde la Península Valdés a Buenos Aires, donde fueron divididos en 3 grupos y colocados en establos aislados, distribuidos de acuerdo con el tipo de virus (O, A y C) para ser usados en la prueba de inmunidad. Cada grupo, incluyendo los controles, consistió de 9 animales seleccionados al azar de los diferentes grupos de vacuna. La descarga de virus se hizo con epitelio lingual bovino refrescado en bovino dentro de un período de 60 días y recientemente titulado en ratones. La dosis de virus de descarga fue de 10.000 DL_{50} ratón contenida en 1 ml e inoculada por vía intradermolingual en 4 puntos de la lengua infectando 0,25 ml por punto. A las 48 horas de la descarga, los animales control de cada grupo fueron examinados, para comprobar si la dosis de virus de descarga era efectiva, colectándose tejidos para tipificación por fijación del complemento (FC) para comprobar si la infección fue causada por el virus de descarga. Todos los animales fueron examinados a los 5 y 10 días después de la

descarga y los resultados finales fueron resumidos.

En el estudio principal (II), cada grupo de novillos vacunados se dividió en 3 grupos de 16 animales cada uno, por selección al azar en un computador. Cuatro animales sobrantes en cada grupo de 52 constituyeron los reemplazantes de los animales que morían o eran lesionados. La inmunidad de todos los grupos fue comprobada por exposición al virus A de la FA, de la siguiente manera: un grupo a los 6 meses, un grupo a los 12 meses, y un grupo revacunado a los 6 meses y comprobado 12 meses después.

RESULTADOS

Prueba de protección

Todos los antígenos y muestras de vacuna del estudio inicial (I) y del estudio principal (II) demostraron ser inocuas para los novillos inoculados.

Pruebas de potencia

Los resultados de la comprobación de inmunidad obtenidos en el estudio I se presentan en la Tabla 1.

En el estudio II, 1 de 4 novillos inoculados con la Vacuna 1 desarrolló una lesión secundaria en la encía; los novillos inoculados con las Vacunas 2 y 3 fueron más resistentes a la infección.

TABLA 1. Resultados del estudio inicial, cantidad de animales protegidos con la descarga, infectados con virus O, A y C de la FA a los 30 días postvacunación

Descarga Tipo virus FA	Vacunas				Controles
	Frenkel, Al(OH) ₃ y saponina	Frenkel, INTA aceite	BHK, PIADC aceite	BHK, INTA aceite	
O	9/9 ^a	1/9	6/9	3/8	0/9
A	9/9	3/9	5/9	5/9	0/9
C	9/9	7/9	8/9	9/9	1/9

^aCódigo: Numerador, número de animales protegidos; denominador, número de animales descargados.

Serología

Los análisis de anticuerpos de los sueros de los novillos (parte I) fueron realizados por la prueba de seroneutralización en cultivo celular y presentados como índices de neutralización (Tabla 2).

TABLA 2. Índices de neutralización de sueros bovinos del estudio I frente a los virus A₂₄, A₂₄₋₂₅ y A₂₅ de la FA

Vacunas	Índices con virus de la FA ^a		
	A ₂₄	A ₂₄₋₂₅	A ₂₅
Frenkel, AI (OH)3 y saponina	3,32	2,02	1,73
Frenkel, INTA aceite	1,01	1,78	1,27
BHK, PIADC aceite	3,86	0,62	0,73
BHK, INTA aceite	4,04	1,42	0,45

^aA₂₄ = virus cultivado en células BHK; A₂₄₋₂₅ = virus cultivados en cultivos Frenkel.

Los títulos de los sueros frente al virus A obtenidos por las 5 técnicas (parte II), así como los resultados de comprobación de la inmunidad, se estudiaron por análisis discriminador.

Los resultados del análisis y de los datos para los 3 grupos de comprobación de inmunidad por descarga a los 180, 365 y 545 DPV indicaron que la prueba de seroprotección fue la más efectiva para determinar los animales protegidos y los no protegidos.

Con los mismos datos, examinados por las 5 técnicas serológicas pero que incluían un adicional de 34 animales que no fueron analizados por radioinmunodifusión, la prueba DP₅₀ en ratones lactantes pareció ser la más efectiva.

Inmunidad

Los resultados de la comprobación de inmunidad por descarga de los animales (parte II) se presentan en la Tabla 3.

En general, aunque todos los grupos tenían una

protección considerable cuando su inmunidad fue comprobada frente al virus A de la FA, hubo poca diferencia entre las vacunas, tiempo de exposición y los resultados de revacunación.

Los resultados de los datos de la descarga fueron examinados por la técnica de Chi cuadrado para comparar las vacunas, la duración de la inmunidad y el posible comportamiento diferencial de las vacunas durante el tiempo estipulado o los períodos de protección bajo diferentes vacunas. No hubo valores Chi cuadrado significativos. En animales primovacunados la inmunidad a los 12 meses fue igual que a los 6 meses. En animales revacunados a los 6 meses, la inmunidad a los 12 meses también fue igual que a los 12 meses en animales primovacunados. La respuesta de las vacunas no cambió durante el tiempo de observación, así como tampoco la inmunidad de las vacunas varió a diferentes tiempos. Las vacunas protegieron contra el virus de la FA por lo menos 1 año, a cerca de tres-cuartas partes de los novillos vacunados.

TABLA 3. Resultados de la comprobación de inmunidad con el virus A de la FA

Vacuna N° ^a	Días postvacunación			Total
	180	365	545 ^b	
1	13/16 ^c	11/16	9/16	33/48
2 (1X)	12/16	10/16	13/16	35/48
3 (20X)	15/16	13/16	11/16	39/48
Total	40/48	34/48	33/48	107/144

^aVacuna N° 1, virus cultivado en células BHK (no concentrada); vacuna N° 2, virus cultivado en células BHK, concentrada 100 veces y reconstituida para contener la misma masa antigénica que la N° 1; vacuna N° 3, virus igual a la N° 2, pero ajustada para contener 20 veces la masa antigénica de la N° 1 y N° 2.

^bRevacunados a los 180 días después de la vacunación inicial.

^cCódigo: Numerador, número de animales protegidos; denominador, número de animales descargados.

DISCUSION

En el estudio I, los mejores resultados se obtuvieron con vacuna producida en cultivos Frenkel y combinada con hidróxido de aluminio y adyuvante de saponina (Tablas 1 y 2). Todos los novillos vacunados con esta vacuna estaban protegidos cuando su inmunidad fue comprobada a los 30 DPV. Bajo las condiciones del estudio, todos los animales estaban completamente protegidos frente a los virus O, A y C de la FA.

Las vacunas preparadas de antígenos cultivados en cultivos BHK, inactivados con AEI y emulsificados con adyuvantes oleosos (fórmulas PIADC e INTA) protegieron 67% y 63% respectivamente de los animales en prueba.

La vacuna preparada de los antígenos de cultivos Frenkel, inactivados con formaldehído y emulsificados con aceite (INTA), protegieron sólo 42% de los novillos y produjeron la respuesta más pobre de las cuatro vacunas.

Antes de la comprobación de inmunidad del estudio I, pruebas de FC llevadas a cabo en el CPFA e INTA indicaron que el virus de la FA usado para el antígeno A en las vacunas de Frenkel incluían 2 cepas del virus A, el A₂₄ y el A₂₅. La información del CPFA indicó que el antígeno A en ambas vacunas BHK fue el A₂₄ y que no incluía el A₂₅ como en las vacunas preparadas con los antígenos Frenkel. La media de los índices de neutralización para las 4 vacunas, obtenida con cada uno de los 3 tipos de virus, aparece en la Tabla 2. Para el virus tipo A₂₄, la media de los índices de protección de las dos vacunas BHK (que fueron uniformemente altos y muy similares) fue significativamente más alta que aquella presentada por las 2 vacunas Frenkel.

El efecto real de la descarga con virus A₂₄ de la FA que contenía A₂₅ es bastante difícil de determinar. Sin embargo, Graves *et al.* (7) informaron que la inmunidad depende mucho del parentesco del subtipo de virus usado para la exposición, con el usado en la preparación de la vacuna. Posiblemente, la protección más pobre dada por los antígenos BHK, que contenían sólo virus A₂₄ de la FA, estuvo relacionada con la descarga de virus que contenía los subtipos A₂₄₋₂₅ de la FA.

En el estudio II, las reacciones que aparecieron

en los sitios de vacunación, particularmente cuando los animales eran revacunados, fueron severas pero desaparecieron alrededor de los 30 días. La inmunidad de los novillos fue comprobada frente al virus A; sin embargo, de acuerdo con la cantidad de anticuerpos detectados por los diferentes métodos, se puede suponer que la prueba tuvo un éxito razonable para 2 de los 3 tipos de virus ensayados (A y C). La respuesta de anticuerpos obtenida con el virus O, con excepción de la prueba de potencia, fue decepcionante (9). Se puede especular que este virus es más sensible y frágil que los tipos A y C y de esta forma no permanece estable en la vacuna emulsificada.

Los resultados de la descarga a los 6 meses después de la vacunación, 12 meses después de la vacunación, y 12 meses después de la revacunación (a los 6 meses) fueron ligeramente diferentes, indicando que es necesario realizar otros estudios para determinar el tiempo óptimo de revacunación con tales productos.

La respuesta obtenida con las 3 vacunas en el estudio II fue muy similar. La vacuna concentrada 20 veces no produjo una mayor respuesta de anticuerpos ni un mayor grado de protección que la vacuna cruda o la de concentración 1X.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica del personal del INTA y del PIADC. También agradecen a E. Fred Schultz, Jr., Estadístico, Equipo de Análisis de Programas y Coordinación, y a John G. Phillips, Consultor en Estadística, Investigación Federal, Administración de Ciencia y Educación, USDA, por el análisis de los datos serológicos e inmunológicos.

REFERENCIAS

1. ABREU MARTINS, I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltn Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 1: 1-19, 1971.

2. ADLER, E.; MURILLO, P.A.; RIVENSON, S. Vacunas oleosas. Preparación de una emulsión estable tipo "agua en aceite". *Revta Invest. Agrop.*; INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina. Serie 4 Patología Animal, 3: 1-14, 1966.
3. BACHRACH, H.L.; CALLIS, J.J.; HESS, W.R.; PATTY, R.E. A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction. *Virology* 4: 224-236, 1957.
4. COWAN, K.M.; WAGNER, G.G. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VIII. Detection and quantitation of antibodies by radial immunodiffusion. *J. Immun.* 105: 557-566, 1970.
5. 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.
6. CUNLIFFE, H.R.; GRAVES, J.H. Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: Comparison of two adjuvants in cattle. *Can. J. comp. Med. vet. Sci.* 27: 193-196, 1963.
7. GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.; CALLIS, J.J. Foot-and-mouth disease vaccine: Influence of the vaccine virus subtype on neutralizing antibody and resistance to disease. *Am. J. Vet. Res.* 33: 765-768, 1972.
8. HENDERSON, W.M. Significance of tests for non-infectivity of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. (Camb.)* 50: 182-194, 1952.
9. INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA; PLUM ISLAND ANIMAL DISEASE CENTER. Foot-and-mouth disease: A vaccine study. Int. Symp. on Foot-and-Mouth Disease, Lyon 1976. *Develop. Biol. Standard.* 35: 123-133, 1977.
10. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Immune response of steers inoculated with chemically-treated foot-and-mouth disease virus preparations previously studied in swine. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 190-197, 1967.
11. PLUM ISLAND ANIMALS DISEASE CENTER; PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER. Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 24-30, 1975.
12. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O. P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARANGUNICH, L. Oily vaccines in immunity to foot-and-mouth disease. Presented at the World Meat Congress held in Buenos Aires, Argentina, August 3-6, 1976.
13. WAGNER, G.G.; CARD, J.L.; COWAN, K.M. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. ges. Virusforsch.* 30: 343-352, 1970.
14. WAGNER, G.G.; McVICAR, J.W. Foot-and-mouth disease virus antibodies: Comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice. *Appl. Microbiol.* 20: 995-997, 1970.