

RELACION DE TITULOS DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES Y LA PROTECCION DE BOVINOS FRENTE AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

P. Suttmöller¹; A. Vieira¹

RESUMEN

Mediante la prueba de seroneutralización en tubo, en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) se examinaron sueros sanguíneos de 791 bovinos vacunados y expuestos al virus de la fiebre aftosa (FA). Como sistema para detectar virus no neutralizado se aplicó la técnica de virus estándar-suero variable en monocamadas de células BHK₂₁. La infección de los bovinos con el virus de la FA se hizo por vía intradermolingual, en tres laboratorios diferentes. Hubo diferencias significativas en la relación título de anticuerpos y protección frente al desafío entre los tres laboratorios y entre los distintos tipos de virus. Puesto que todos los sueros fueron examinados en el CPFA, estas diferencias señalan la dificultad de la estandarización de pruebas relacionadas con la infección de bovinos. Los títulos de neutralización sobre 1:64 indicaron un alto grado de protección. Es difícil interpretar el rango de 1:8 a 1:32, en términos de protección al desafío.

INTRODUCCION

Para el estudio de anticuerpos neutralizantes del virus de la fiebre aftosa (FA) en suero bovino, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) viene usando desde hace varios años la técnica de virus estándar-suero variable (1).

El sistema indicador para el virus no neutralizado está constituido por monocamadas de células de riñón de hamster lactante (BHK₂₁ clon 13) (4), cultivadas en tubos. Este trabajo analiza los títulos de neutralización obtenidos por esta técnica frente a la protección de bovinos vacunados y expuestos a virus virulento.

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

MATERIALES Y METODOS

Bovinos

CPFA. Se emplearon 273 novillos mestizos cebú originarios de haciendas libres de FA durante varios años. Antes de la aplicación de vacuna antiaftosa inactivada con hidróxido de aluminio o con adyuvante oleoso, los bovinos fueron examinados para verificar la ausencia de anticuerpos protectores o neutralizantes. Las vacunas fueron elaboradas en el CPFA con las siguientes cepas de virus: O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende. El desafío de los animales se efectuó entre 21 y 28 días después, con cepas homólogas de virus.

UCV². Se vacunaron 179 bovinos no inmunizados con vacuna antiaftosa inactivada, con hidróxido de aluminio y formalina. Los bovinos fueron infectados 21 días más tarde. La vacuna, la infección y las pruebas de neutralización se hicieron con los mismos virus mencionados.

SELAB³. Se vacunaron 339 bovinos procedentes de una región libre de fiebre aftosa, con vacuna inactivada con hidróxido de aluminio y saponina, infectándolos 21 días después. Las vacunas contenían cepas de laboratorios comerciales. La infección fue hecha con la cepa A₂₄ Argentina/68 (8345) y la prueba de seroneutralización con la cepa A₂₄ Cruzeiro. La cepa O₁ Caseros se usó para la infección y la cepa O₁ Campos para la seroneutralización. El virus C₃ Resende se usó tanto para la infección de los bovinos como para las pruebas de neutralización.

²Unidade de Controle de Vacinas (UCV), Grupo Executivo de Combate à Febre Aftosa (GECOFA), Rio Grande do Sul, Brasil.

³Servicio de Laboratorios (SELAB), SENASA, Chorroarín 134, Buenos Aires, Argentina.

Protección de los bovinos

Cada bovino recibió, por vía intradermolingual, 10^4 DI₅₀ de virus virulento. Se consideraron protegidos los que no desarrollaron lesiones podales.

Sueros

Antes de la infección se extrajo suero sanguíneo, que se guardó a -20°C hasta el respectivo examen.

Neutralización del virus

Todas las pruebas de neutralización fueron hechas en el CPFA, según descrito (7). El método puede resumirse así:

Inactivación del suero a 60°C durante 20 minutos. Dilución de 1:2 a 1:256 en medio Eagle modificado (MEM). Preparación de una suspensión de 10^3 DI₅₀/ml de virus en MEM. Agregado de 1 ml de esta suspensión a 1 ml de cada una de las diluciones de suero y mantenimiento de la

mezcla a 37°C por 1 hora, seguido durante 30 minutos a 4°C .

Inoculación de 0,2 ml de la dilución virus-suero en monocamadas de células BHK cultivadas 48 horas en tubos pyrex (de 16 x 150 mm), con un cambio reciente de 0,8 ml de MEM. Empleo de 6 tubos por dilución. Lectura de todos los tubos 72 horas después de una incubación a 37°C y cálculo de los puntos finales según el método de Reed y Muench (5). El título de neutralización se expresa como el recíproco del \log_{10} de la dilución que protege el 50% de los cultivos celulares contra 100 DIC₅₀ de virus. A menudo se menciona este valor como el índice "S" (7).

RESULTADOS

Los sueros fueron clasificados de acuerdo con su título de neutralización "S", por su origen (CPFA, UCV, SELAB) y el tipo de virus utilizado (Cuadros 1 y 2).

CUADRO 1. *Bovinos clasificados de acuerdo con el título de seroneutralización, la protección al desafío, el tipo de virus usado y el laboratorio donde se realizaron las pruebas*

	CPFA ^a				SELAB ^b				UCV ^c			
	O	A	C	Total	O	A	C	Total	O	A	C	Total
≤0.5	0/20 ^d	1/23	0/25	1/68	2/27	3/32	2/23	7/82	0/17	2/18	0/22	2/57
0.6-1.0	5/20	6/14	5/16	16/50	6/28	16/28	32/44	54/100	1/24	3/10	4/17	8/51
1.1-1.5	9/12	10/16	10/11	29/39	17/32	14/21	30/33	61/86	3/10	4/10	6/8	13/28
1.6-2.0	15/15	15/15	15/15	45/45	25/37	2/5	7/7	34/39	3/5	8/8	7/7	18/20
2.1-2.5	12/12	11/11	15/15	38/38	18/18	3/3		30/30	0/1	10/10	2/2	12/13
2.5-3.0	5/5	12/12		17/17	2/2			2/2	2/2	4/4	3/3	9/9
>3.0	8/8	8/8		16/16							1/1	
Totales	54/92	63/99	45/82	162/273	70/134	38/89	80/116	188/339	9/59	32/61	22/59	63/179

^aCentro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro, Brasil.

^bServicio de Laboratorios-Servicio Nacional de Sanidad Animal (SELAB-SENASA), Buenos Aires, Argentina.

^cUnidade de Controle de Vacinas, Grupo Executivo de Combate à Febre Aftosa (UCV-GEFOFA), Rio Grande do Sul, Brasil.

^dNúmero de protegidos/Número de expuestos.

CUADRO 2. Bovinos clasificados de acuerdo con el título de seroneutralización, la protección al desafío y el tipo de virus usado

Título neutralizante	Virus			Total
	O	A	C	
≤0.5	2/64 ^a	6/73	2/70	10/207
0.6-1.0	12/72	25/52	41/77	78/201
1.1-1.5	29/54	28/47	46/52	91/173
1.6-2.0	43/47	25/28	29/29	98/102
2.1-2.5	30/31	24/24	26/26	77/78
2.6-3.0	9/9	16/16	3/3	28/28
>3.0	8/8	9/9		17/17
Total	133/285	133/249	147/257	413/791

^a Número de protegidos/Número de expuestos.

Se construyeron curvas de respuesta a la dosis siguiendo el método empleado por Gomes y Astudillo para la prueba de seroprotección (3). En resumen, los porcentajes de protección de cada dosis se transformaron en probits. La línea de regresión de estos probits y los puntos medios del título de anticuerpos fueron calculados por computador⁴ según el método del cuadrado menor ponderado (2). Con esta relación entre porcentaje de protección y dilución del suero se establecieron curvas de respuesta para los sueros colectados en el CPFA, en la UCV y en el SELAB (Fig. 1).

Curvas de relación entre el porcentaje de protección y los títulos de neutralización para los 3 tipos de virus aparecen en la Fig. 2.

Las Figs. 3, 4 y 5 muestran la respuesta de cada uno de los tipos de virus en relación con el origen de los sueros.

⁴PDP11/34 computador (DIGITAL). El programa en BASIC se obtiene mediante solicitud.

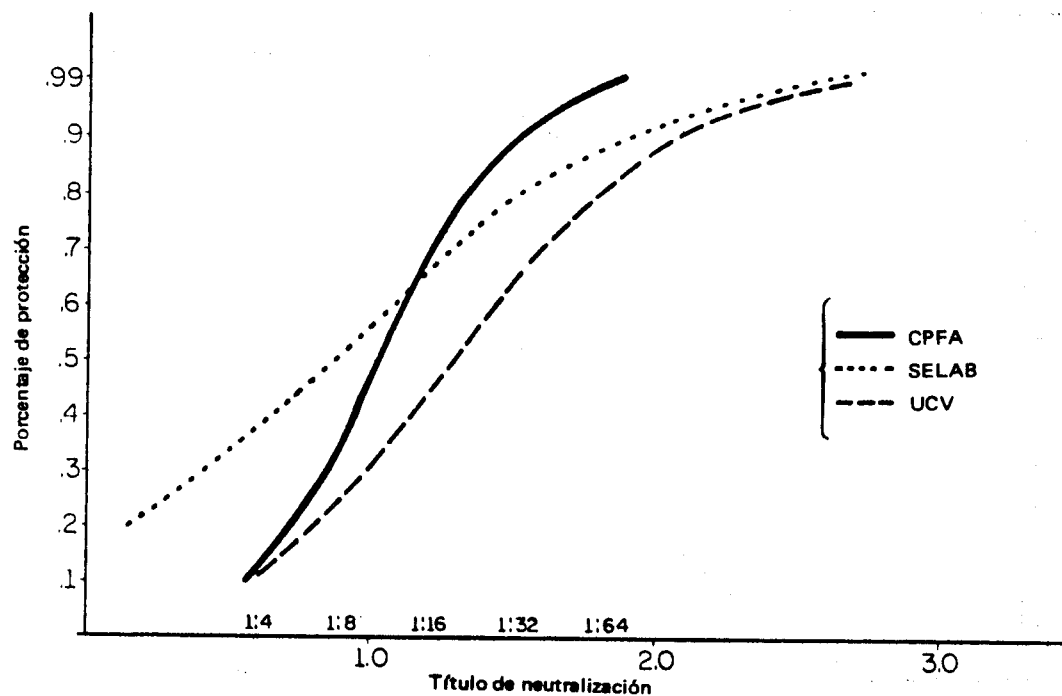


FIGURA 1. Relación entre los títulos de neutralización y el porcentaje de protección de bovinos vacunados con vacuna anti-ftosa inactivada, en 3 lugares diferentes (CPFA, Rio de Janeiro, Brasil; SELAB, Buenos Aires, Argentina; UCV, Rio Grande do Sul, Brasil).

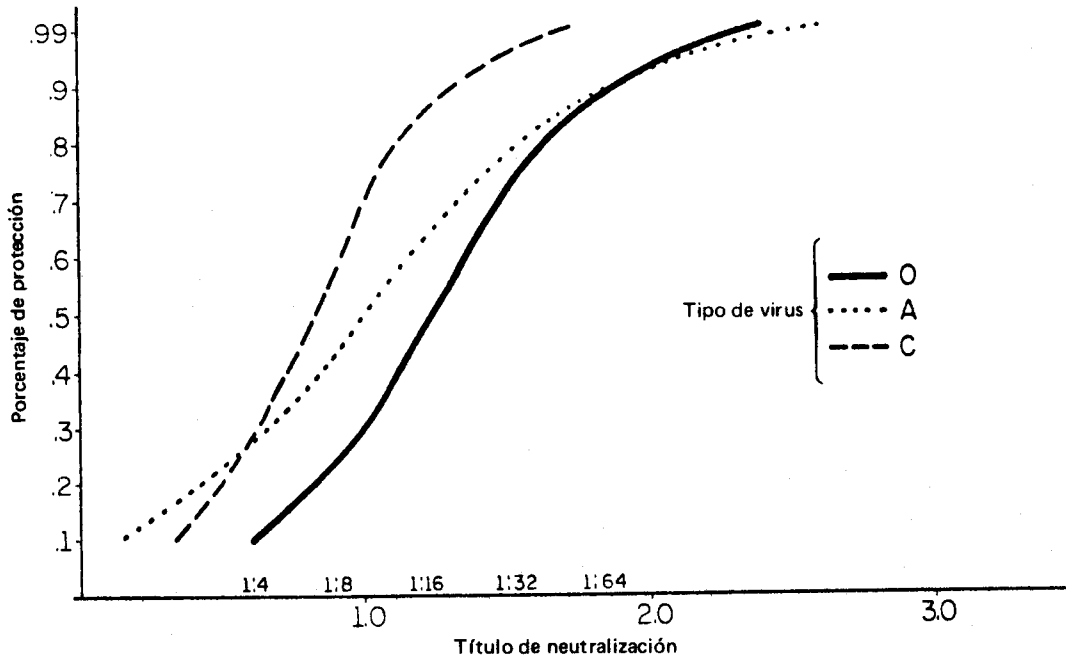


FIGURA 2. Relación entre los títulos de neutralización de diferentes cepas de virus aftoso y la protección de bovinos vacunados con vacuna antiaftosa inactivada.

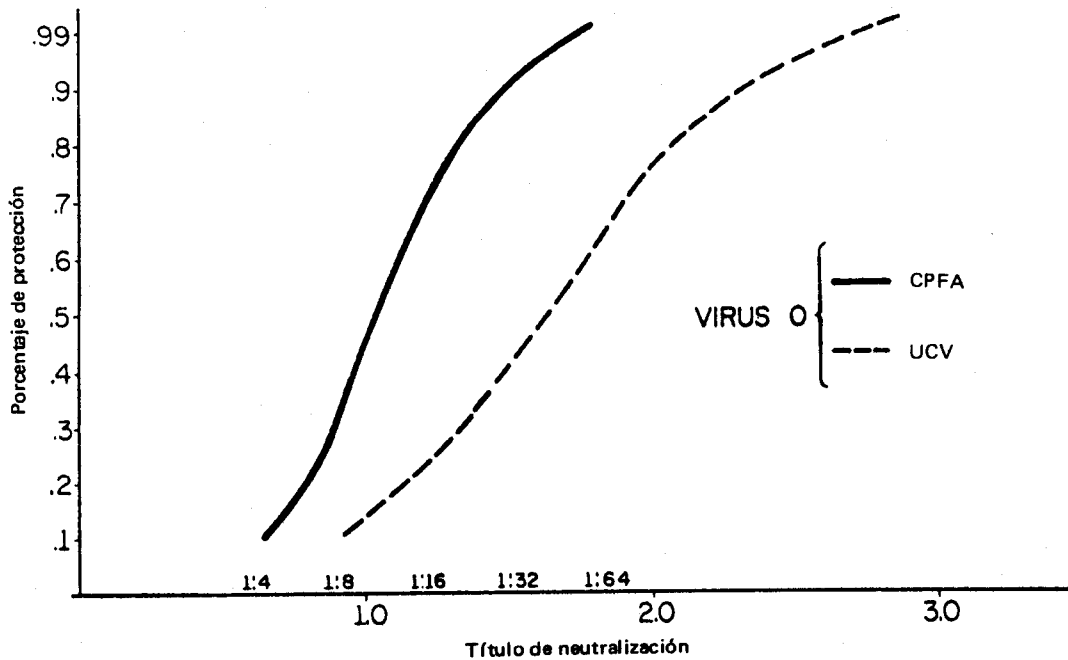


FIGURA 3. Relación entre los títulos de neutralización del virus aftoso tipo O y la protección de bovinos vacunados en dos lugares diferentes (CPFA, Rio de Janeiro, Brasil; UCV, Rio Grande do Sul, Brasil).

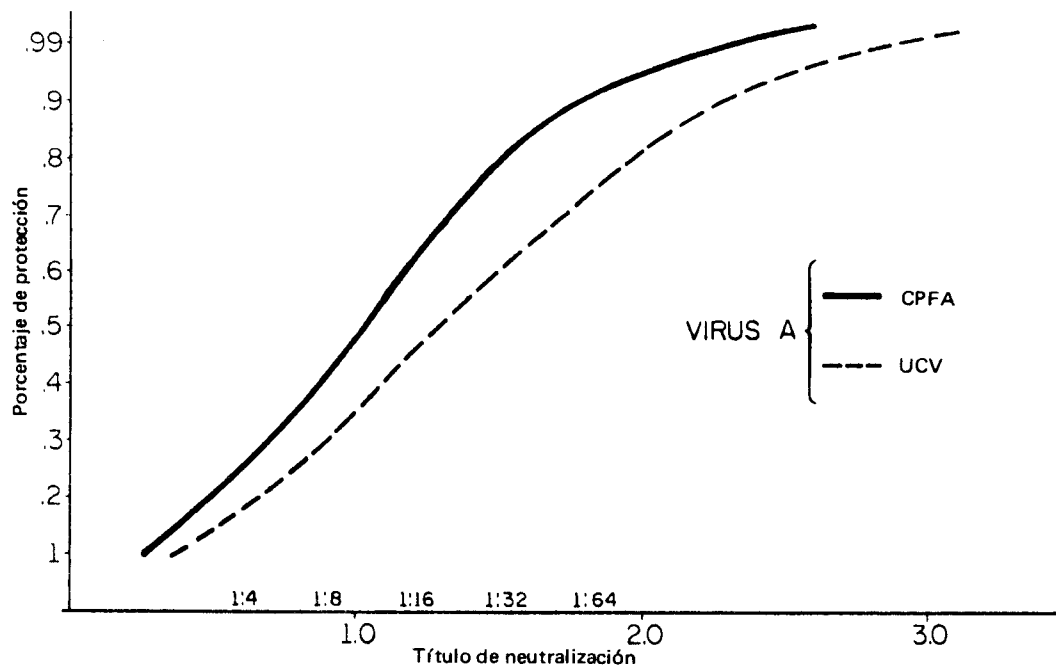


FIGURA 4. Relación entre los títulos de neutralización del virus aftoso tipo A y la protección de bovinos vacunados en dos lugares diferentes (CPFA, Rio de Janeiro, Brasil; UCV, Rio Grande do Sul, Brasil).

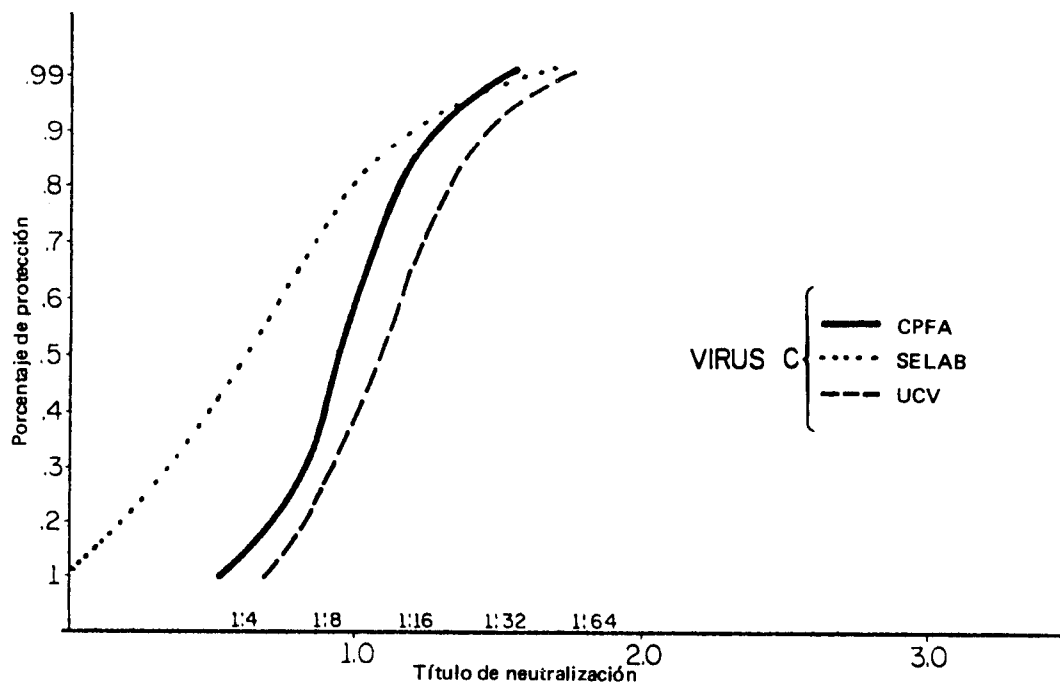


FIGURA 5. Relación entre los títulos de neutralización del virus aftoso tipo C y la protección de bovinos vacunados en tres lugares diferentes (CPFA, Rio de Janeiro, Brasil; SELAB, Buenos Aires, Argentina, UCV, Rio Grande do Sul, Brasil).

DISCUSION

El Manual del CPFA de Control de Vacuna Antiaftosa (7) dice: "Una serie de vacuna es aprobada cuando todas sus valencias proporcionan un TN_{50} igual o superior a 1,5 en seis o más bovinos de los ocho utilizados". Este valor tiene por base datos acumulados en el CPFA. En la *Fig. 1* se muestra que a la dilución 1:32 corresponde un nivel de protección de 90% en bovinos en el CPFA.

Sin embargo, se observaron grandes diferencias entre sueros de distintos orígenes (*Fig. 1*). Por ejemplo, los bovinos infectados en la UCV y en el SELAB, con un título de neutralización 1:32 tenían un nivel de protección de sólo 65 y 80%, respectivamente. Hay que tener en cuenta que las valencias probadas estuvieron distribuidas con bastante uniformidad en los tres lugares y que todas las pruebas de neutralización fueron hechas en el CPFA. De este modo, las diferencias de las respuestas de los tres lugares deberían atribuirse más bien a diferencia de factores como la edad y condiciones de los bovinos y a su manejo durante las pruebas o bien, a la técnica de infección. En el caso del suero de Argentina (SELAB), puede haber influido el uso de cepas O y A heterólogas.

Las curvas de los tres tipos de virus son bien diferentes. En la dilución 1:32 están protegidos 70 y 75% de los bovinos infectados con los tipos O y A, respectivamente (*Fig. 2*). La curva para el virus C se desplaza hacia la izquierda, habiendo una relación mayor entre títulos bajos y un porcentaje alto de bovinos protegidos contra el virus de tipo C. Las diferentes respuestas para los virus en cada lugar aparecen en las *Figs. 3, 4 y 5*, pudiéndose ver que son aún más acentuadas. En el SELAB, con los tipos O y A, parte de las diferencias podría deberse a las distintas cepas utilizadas en el desafío y en las pruebas de neutralización. Los resultados señalan que los bovinos de la UCV necesitaron para todos los virus mayores títulos de anticuerpos para estar protegidos. No está bien claro si las diferencias de la curva de respuesta para los tipos de virus son consecuencia de un comportamiento distinto de los virus en cultivos celulares y en los bovinos o por ambas razones. Estas observaciones indican la necesidad de uniformar los procedimientos de los laboratorios, aun cuando sea más fácil estandarizar

técnicas como la prueba de neutralización que aquellas vinculadas a la infección de bovinos.

En el caso de los virus utilizados en este trabajo parece que un título 1:32 para los tipos O y A de las vacunas resulta bajo, mientras que el mismo es suficiente para el virus C. De este modo, es probable que sea necesario establecer un padrón más bien arbitrario para garantizar vacunas de potencia adecuada, con base en la cepa de virus que requiera los títulos más altos de anticuerpos. Con 1:64 puede esperarse un elevado nivel de protección, por lo menos en lo que se refiere a las cepas empleadas.

Al evaluar la protección de bovinos, hay que ser cauteloso con los títulos de sueros en la parte aguda de la curva, entre 1:8 y 1:32. Pequeñas diferencias de título, atribuibles a variaciones normales de la prueba, podrían dar una gran diferencia en el cálculo de la protección.

AGRADECIMIENTOS

Los sueros usados en la prueba de neutralización fueron extraídos durante los años 1970-74. Los autores agradecen al personal de la Unidad de Control de Vacunas (UCV) de Porto Alegre, RS, Brasil; del Servicio de Laboratorios-Servicio Nacional de Sanidad Animal (SELAB-SENASA), Argentina, así como también al personal del CPFA por haber proporcionado los sueros para realizar este estudio.

REFERENCIAS

1. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa. *Ser. Man. Téc.* 2, 1980.
2. FINNEY, D.J. Statistical method in biological assay. Griffin & Co. Ltd., London 1952 (page. 524).
3. GOMES, I.; ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Boln Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1976.
4. MACPHERSON, I.; STOKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones-an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16: 147-151, 1962.
5. REED, L.J.; MUENCH, H.A. Simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497, 1938.