

**PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA
DE ADYUVANTE OLEOSO:
ENSAYOS DE DP₅₀ EN COBAYOS Y EN BOVINOS DE UNA VACUNA
PREPARADA EN FORMA SEMI-INDUSTRIAL CON UNA
EMULSION DEL TIPO AGUA EN ACEITE**

*Centro Panamericano de Fiebre Aftosa¹
Dirección de Lucha Contra la Fiebre Aftosa²*

RESUMEN

Una vacuna contra la fiebre aftosa preparada en forma semi-industrial fue ensayada mediante pruebas de potencia en cobayos y bovinos a los 1, 2 y 3 meses postvacunación. En los cobayos, los valores de DP₅₀ a los 30 días fueron ligeramente más bajos que a los 60 ó 90 días. No hubo diferencia significativa entre los valores de DP₅₀ en bovinos a los 30, 60 ó 90 días. Los números de DP₅₀ en bovinos después de la exposición por contacto fueron significativamente más bajos que después de la descarga en la lengua.

INTRODUCCION

En un trabajo anterior la calidad de las vacunas antiaftosas de adyuvante oleoso se estimó mediante pruebas de potencia basadas en el estudio de anticuerpos en bovinos y cobayos vacunados (2). Se determinó que para una prueba de dosis protectora 50% (DP₅₀), la vacuna debía ser diluida en una emulsión sin antígeno del tipo agua en aceite. También se demostró que el cobayo podía ser un animal de laboratorio útil para las pruebas de potencia de las vacunas de adyuvante oleoso (2).

En el presente trabajo una vacuna preparada en escala semi-industrial fue probada en bovinos y en cobayos. La inmunidad de los bovinos vacunados fue determinada por inoculación de virus en la

lengua o por contacto con animales afectados. Tanto las pruebas con los cobayos como con los bovinos se hicieron a los 1, 2 y 3 meses después de la vacunación para determinar la variación de los resultados de las pruebas y para establecer el número de DP₅₀ cobayo y DP₅₀ bovino.

MATERIALES Y METODOS

Vacuna

Producción de los antígenos

Los antígenos para la vacuna se prepararon con cepas del virus de la fiebre aftosa (FA) O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende cultivados en células BHK en suspensión en un tanque de 200 litros en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (1). Sus características se pueden observar en la Tabla 1. Los antígenos fueron conservados a 4° C por uno o dos meses después de la inoculación. La vacuna terminada fue conservada en las mismas condiciones por otros 3-4 meses antes de ser usada en las pruebas de cobayos y 7-9 meses antes de la vacunación de los bovinos.

Formulación de la vacuna

La vacuna era una emulsión de agua en aceite de una suspensión trivalente de antígenos y de una parte igual de la fase oleosa que consistía en aceite mineral³ con 10% de monooleato de mannide⁴. La emulsión se preparó en un tanque emulsificador de 50 litros (4). La vacuna fue diluida en una

¹P. Augé de Mello; A. Alonso Fernández; I. Gomes; M.S. Söndahl. Caixa Postal 589 - ZC-00 - Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²A.R. Pollak; H. Tórtora; A. Millán; D. Pintos; W. Moreno. Ruta 8 "Brig. Gral. Juan Antonio Lavalleja" - KIm 29, Pando, Uruguay.

³Marcol 52, Exxon Corporation USA.

⁴Arlacel A, ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

TABLA 1. Características de los antígenos

Virus	Cepa	Títulos		Almacenamiento a 4°C en meses		
		Infectividad ^a	FC ^b	Antígeno inactivado	Vacuna	
					Cobayos	Bovinos
O ₁	Campos	8.0	1/20	2	3	7-9
A ₂₄	Cruzeiro	7.3	1/18	1	3	7-9
C ₃	Resende	7.8	1/18	2	4	7-9

^a Log₁₀ DICC₅₀/ml.

^b FC, prueba de fijación del complemento (4 unidades hemolíticas de complemento₅₀ a 90 min).

emulsión similar sin antígeno (2) para las pruebas de potencia en cobayos y en bovinos.

Cobayos

Se utilizaron cobayos albinos, machos, de 5 meses de edad y con un peso aproximado de 550 g.

Fueron inoculados por vía intramuscular grupos de 16 cobayos con 0,25 ml en 4 series de dilución de la vacuna por cada tipo de virus y por cada período de descarga. Las pruebas de potencia para los virus de los subtipos O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende fueron hechas a los 30, 60 y 90 días postvacunación.

La inmunidad de los cobayos fue comprobada inoculando en la almohadilla plantar de cada uno de ellos, no menos de 500 dosis generalizantes para el cobayo.

Bovinos

En este experimento se utilizaron novillos de 2 años de edad, de raza Hereford, de 200 kg de peso aproximadamente, criados en una isla del Río Negro, Uruguay.

Nueve grupos de 8 bovinos cada uno, no vacunados previamente, fueron inoculados por vía intramuscular con 5 ml de vacuna diluida 1:10, 1:40 y 1:160, respectivamente, 3 grupos el primer día, 3 a los 30 días y 3 a los 60 días. Treinta días después que los últimos grupos habían sido vacunados, todos los bovinos fueron expuestos simultáneamente a la FA. Por tanto, el estudio de su inmuni-

dad se hizo a los 90, 60 y 30 días postvacunación.

Exposición al virus

La exposición al virus de la FA se hizo con la cepa subtipo O₁ Campos. Cuatro bovinos de cada grupo fueron inoculados en el epitelio de la lengua en 4 puntos con un total de aproximadamente de 10.000 DI₅₀. Cuatro bovinos no vacunados sirvieron como control y recibieron una inoculación similar de virus.

Los 4 animales restantes de cada grupo, así como los 4 no vacunados como control, permanecieron en contacto con los animales inoculados. Todos los animales estuvieron juntos en las mismas instalaciones y en íntimo contacto. Los animales fueron examinados individualmente a los 5 y a los 10 días después de la exposición para determinar la presencia de lesiones en la boca y en el espacio interdígital.

Pruebas de anticuerpos

Antes de la vacunación de los bovinos y antes de la exposición al virus fueron tomadas muestras de sangre para pruebas de anticuerpos. Los sueros fueron examinados por las pruebas de seroprotección (6) y sus resultados expresados como la media de la expectativa porcentual de protección (EPP) de acuerdo con Gomes y Astudillo (9).

Los sueros también fueron sometidos a pruebas de microneutralización como está descrito por Ferreira (7).

RESULTADOS

Los valores de DP_{50} cobayos para cada uno de los antígenos se muestran en la Tabla 2. Los valores aumentaron ligeramente entre los 30 y los 60 días postvacunación y permanecieron prácticamente constantes hasta los 90 días.

TABLA 2. DP_{50} cobayo en 0,25 ml de vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso

Cepas de virus	Días postvacunación		
	30	60	90
O ₁	48 ^a	108	74
A ₂₄	58	110	102
C ₃	56	77	69

^a Recíproca de la dilución de la vacuna (0,25 ml) que protege 50% cobayo contra no menos de 500 dosis generalizantes.

La Tabla 3 resume los resultados de las pruebas de microneutralización de los sueros con los antígenos O y A a diferentes períodos después de la vacunación. Se puede apreciar que de los 30 a los 90 días postvacunación el nivel se matuvo estable.

La dilución de la vacuna en una emulsión libre de antígenos dio apenas una relativa y pequeña reducción en el promedio de los títulos de anticuerpos. Resultados similares se obtuvieron con las pruebas de seroprotección (Tabla 4).

Recién a los 3 meses después de la vacunación, el nivel de protección decayó en forma apreciable para la vacuna diluida 1:160.

Los resultados de la exposición al virus del subtipo O₁ se muestran en la Tabla 5. En esta tabla, protección significa la ausencia de cualquier lesión en la lengua del animal inoculado excepto aquellas de los puntos de inoculación y en los animales de contacto, la ausencia de cualquier lesión. De acuerdo con estos criterios se clasificó "no protegido" un número mayor de animales en el grupo de animales de contacto que en el grupo de los animales inoculados en la lengua. En el grupo inoculado en la lengua, hubo solamente 2 animales con lesiones generalizadas, mientras que los animales de control no vacunados e inoculados en la lengua generalizaron en 48 horas. Sin embargo, la mayoría de las lesiones de los animales vacunados se desarrollaron entre los 5 y los 10 días después de la descarga.

No hubo diferencia significativa en los valores de las DP_{50} en los bovinos a los 30, 60 ó 90 días (Tabla 5). Sin embargo, los valores de la DP_{50} en los grupos de animales de contacto fueron significativamente más bajos que los del grupo inoculado por vía intradermolingual.

TABLA 3. Medias de los títulos de neutralización en bovinos^a vacunados con diluciones^b de vacuna de adyuvante oleoso

Dilución de la vacuna	Tipo de virus							
	O				A			
	Días postvacunación				Días postvacunación			
	0	30	60	90	0	30	60	90
1/10	<1,0	3,1	2,8	3,2	<1,0	3,0	2,8	3,3
1/40	<1,0	2,6	2,8	2,9	<1,0	2,7	2,7	2,8
1/160	<1,0	2,6	2,5	2,4	<1,0	2,7	2,5	2,4

^a 8 bovinos por grupo.

^b Diluciones en emulsión libre de antígeno.

TABLA 4. Expectativa porcentual de protección^a frente al virus tipo O de la fiebre aftosa en bovinos vacunados con antígeno en varias diluciones y en diferentes períodos postvacunación (Prueba de seroprotección)

Dilución de la vacuna ^b	Días postvacunación		
	30	60	90
1/10	92	89	96
1/40	97	91	93
1/160	99	87	73

^a Gomes y Astudillo. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18*: 9-16, 1975.

^b Diluciones en emulsión libre de antígeno.

TABLA 5. Protección de bovinos^a a la exposición con virus tipo O₁ de la fiebre aftosa

Dilución de la vacuna ^b	Vía de exposición	Días postvacunación			Total
		30	60	90	
1/10	IDL	4/4	4/4	4/4	12/12
	CONT	3/4	3/4	3/4	9/12
1/40	IDL	4/4	3/4	4/4	11/12
	CONT	1/4	2/4	3/4	6/12
1/160	IDL	2/4	3/4	1/4	6/12
	CONT	2/4	1/4	1/4	4/12
Controles	IDL	0/4	0/4	0/4	0/12
	CONT	0/4	0/4	0/4	0/12
DP ₅₀ Bovino	IDL	160	160	115	
	CONT	40	40	56	

^a Protegidos = ausencia de lesiones en las patas de bovinos inoculados por vía intradermolingual y ausencia de lesiones en los bovinos controles.

^b Diluciones en emulsión libre de antígeno.

DISCUSION

Las pruebas de potencia que se realizaban con las vacunas tradicionales con antígenos adsorbidos con hidróxido de aluminio se hacían por descarga

a los 21 días postvacunación, tanto en los cobayos como en los bovinos (5). Sin embargo, los niveles de anticuerpos en bovinos vacunados con vacunas de adyuvante oleoso pueden continuar subiendo hasta 90 días después de la vacunación mientras que los niveles en los bovinos vacunados con vacunas de hidróxido de aluminio alcanzan su pico a 30 días aproximadamente (3). Por lo tanto es importante determinar el momento óptimo de la exposición en las pruebas de potencia de las vacunas de adyuvante oleoso.

En este trabajo, la inmunidad de los cobayos y de los bovinos fue estudiada mediante exposición a los 30, 60 y 90 días postvacunación. Los valores de la DP₅₀ cobayos, que se ven en la Tabla 2, para esos períodos, no indican la necesidad de hacer la descarga más allá de los 30 días postvacunación aun cuando hubo un ligero aumento en los valores DP₅₀ hasta los 60 días postvacunación. Los títulos de anticuerpos de los bovinos (Tabla 3) y los resultados de la exposición al virus (Tabla 5) también muestran que con fines prácticos, las estimaciones obtenidas en los bovinos a los 30 días resultan útiles.

En un trabajo anterior, se exploraron diferentes formas de dilución de antígenos para las pruebas de DP₅₀ (2). En este experimento se muestra una desventaja al diluir la vacuna en una emulsión libre de antígeno. La curva de la respuesta por dosis fue muy baja, tanto para los cobayos como para los bovinos, y la vacuna debe ser diluida en altas diluciones a fin de alcanzar el punto final en la titulación. Esta misma observación fue señalada por Stellmann *et al.* (10) para vacunas de hidróxido de aluminio diluidas en un diluyente con adyuvante. Ellos prefirieron diluir la vacuna en un diluyente inmunológicamente neutro en vez de dosis decrecientes de vacuna o bien, diluir la vacuna con diluyente que contenía adyuvante. También indicaron que una curva más baja de respuesta por dosis significa un más alto error standard y una menor sensibilidad del sistema de prueba. Sin embargo, con una vacuna de emulsión de agua en aceite, la dilución en una sustancia inerte es difícil de realizar (2). En las pruebas de cobayos el uso de dosis decreciente parece ser impracticable, pero sería conveniente hacer experiencias utilizando el método de dosis decreciente en bovinos.

Como se indica en la Tabla 5 la protección de los bovinos parece ser menos favorable que lo que podía esperarse de acuerdo con las pruebas de anticuerpos en el suero. Sin embargo, en los animales inoculados en la lengua, todos aquellos que presentaron alguna lesión en la pata y todos los animales expuestos por contacto con alguna lesión oral o podal fueron clasificados como "no protegidos". Por tanto, esta categoría incluye varios animales con solamente una o dos lesiones en las patas y los del grupo de contacto que solamente tuvieron una pequeña lesión oral al 10° día después de iniciada la exposición. La mayoría de los animales inoculados en la lengua y de contacto tenían altos niveles de anticuerpos.

Es muy probable que el elevado nivel de virus en el medio ambiente y el prolijo examen de los bovinos a los 5 días haya contribuido al desarrollo de varias lesiones primarias. Observaciones similares fueron hechas por Gomes en los cerdos (8).

REFERENCIAS

1. ABARACON, D.; GIACOMETTI, H.; MESQUITA, J. Etileneimina binaria (BEI) como inactivante de virus de la fiebre aftosa producida por diferentes técnicas semi-industriales. (En prep.).
2. AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A.; GOMES, I. Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. (En prep.).
3. AUGÉ DE MELLO, P.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa e inactivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes. (Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and-mouth disease virus vaccine: vaccination and revaccination of young cattle). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 31-38, 39-47, 1975.
4. AUGÉ DE MELLO, P.; MESQUITA, J. Preparation of water-in-oil emulsion foot-and-mouth disease vaccine in a semi-industrial scale at the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. (En prep.).
5. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man Téc.* No. 2, 1974.
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, MARIA ELMA V. Prueba de micro-neutralización 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 a 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. 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.
10. STELLMANN, C.; TERRÉ, J.; FAVRE, H.; BRUN, A.; FONTAINE, J. Comparison of foot-and-mouth disease vaccine potency testing on cattle in terms of the nature of the diluent. *Arch. of Virology 54*: 61-74, 1977.