

## RESPUESTA ANAMNÉSTICA EN BOVINOS A LA REVACUNACION CON VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO

*P. Augé de Mello\* ; Ivo Gomes\**

### RESUMEN

Se compararon los resultados obtenidos con tres vacunas antiaftosas inactivadas, preparadas con los mismos antígenos: la primera adicionada de adyuvante oleoso, la segunda con hidróxido de aluminio-saponina y la tercera sin adyuvante. En todas ellas la respuesta anamnética se observó ya a los 4 días postrevacunación (DPR) alcanzando a partir del 6° DPR valores de expectativa porcentual de protección de 99%.

La vacuna de adyuvante oleoso indujo los más altos niveles de anticuerpos y la más prolongada persistencia. Además, en la vacuna oleosa, la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro presentó amplia cobertura hasta a los 180 DPR frente a 3 cepas de virus A inmunológicamente diferentes, mientras que con la vacuna de hidróxido de aluminio-saponina, a los 60 DPR presentaba bajos índices de seroprotección frente a las muestras estudiadas.

Se deduce que la vacuna de adyuvante oleoso puede ser de gran utilidad en vacunaciones perifocales estratégicas ya que induce una excelente respuesta anamnética y con amplia cobertura inmunológica a los 180 DPR.

### INTRODUCCION

Las vacunas antiaftosas con adyuvante oleoso, tanto en investigaciones de laboratorio (13) como en ensayos de campo en condiciones controladas, han demostrado poseer un alto valor inmunogénico cuando son aplicadas en bovinos jóvenes y adultos, permitiendo un esquema de vacunación con intervalos de 6 meses para los animales menores de 2 años (3) y con intervalos de 12 meses (4), a partir de esa edad.

La rapidez de la respuesta anamnética inducida

por la vacuna antiaftosa asume gran importancia en la estrategia de la lucha contra la fiebre aftosa puesto que la vacunación en anillo es una de las opciones frente a la aparición de un foco (6). Así, es interesante conocer el comportamiento de la vacuna con adyuvante oleoso en estas circunstancias, toda vez que este tipo de inmunoadyuvante tiene, entre otras propiedades, la de retardar la liberación de antígeno (12) alcanzando el punto máximo de inducción de anticuerpos después de los 60 días de la primovacuna (3).

En el presente trabajo se compara la respuesta anamnética así como la duración de la inmunidad de tres vacunas antiaftosas inactivadas: una con adyuvante oleoso; la segunda con hidróxido de aluminio-saponina y la tercera con una suspensión de virus sin ningún adyuvante. También se estudia el comportamiento inmunológico de la cepa A<sub>24</sub> frente a tres cepas de virus A serológicamente diferentes: A cepa Bagé (1976), A cepa Venceslau (1976) (9) y A cepa Macabú (1977) (14).

### MATERIALES Y METODOS

#### Antígenos

Se utilizaron los virus de la fiebre aftosa subtipos O<sub>1</sub> cepa Campos; A<sub>24</sub> cepa Cruzeiro y C<sub>3</sub> cepa Resende obtenidos a partir de células BHK<sub>21</sub> Cl<sub>13</sub> cultivadas en frascos rolantes. Las muestras fueron inactivadas por medio de 2-bromoetilamina en solución alcalina (BEI) en la concentración de 0,001 M durante 24 horas a 37° C (5). Los títulos infecciosos fueron determinados en cultivo celular y expresados en dosis infecciosas cultivo celular 50% (DICC<sub>50</sub>/dosis de vacuna). Los títulos fijadores del complemento fueron determinados al principio y al final del proceso de inactivación. Después

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

de la inactivación las suspensiones víricas fueron sometidas a prueba de inocuidad en cultivo celular con un mínimo de tres pasajes. Todas las pruebas realizadas obedecieron a los criterios para el control de las vacunas antiaftosas (7). En la tabla 1 están especificadas las características de los antígenos utilizados.

TABLA 1. Características de los antígenos utilizados

Antígenos de la fiebre aftosa	Títulos	
	DICC <sub>50</sub> /dosis	FC
O <sub>1</sub> Campos	7,5	1/14
A <sub>24</sub> Cruzeiro	7,5	1/14
C <sub>3</sub> Resende	7,3	1/15

DICC<sub>50</sub> = Dosis infecciosas cultivo celular 50%.

FC = Fijadores del complemento con 4 unidades de complemento y 90 minutos de incubación a 37° C.

#### Preparación de las vacunas

A partir de las suspensiones de virus monovalentes inactivadas se preparó una suspensión trivalente mezclando los antígenos en partes iguales. La suspensión trivalente fue dividida en tres partes y con cada una se preparó una vacuna con el mismo contenido inmunogénico:

##### *Vacuna con adyuvante oleoso*

Una mezcla de monooleato de mannide\* y de aceite mineral\*\* en la proporción de 1:10, fue emulsionada con igual cantidad de suspensión trivalente (3).

##### *Vacuna con adyuvante de hidróxido de aluminio-saponina*

Una suspensión coloidal de Al(OH)<sub>3</sub> (concentración mínima de 2% de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) fue mezclada en

partes iguales con la suspensión del antígeno. Después de perfecta homogeneización de la suspensión se adicionó la saponina en cantidad suficiente para que contenga 5 mg por dosis de vacuna.

##### *Suspensión de virus sin adyuvante*

La suspensión trivalente fue mezclada en partes iguales con tampón fosfatado 0,04 M en 50% de glicerina.

#### Bovinos

Se utilizaron treinta bovinos con características predominantes de cebú entre 4 y 6 meses de edad, sin historia de vacunación ni de exposición previa a la fiebre aftosa y sin anticuerpos circulantes específicos en el momento en que fueron primovacunados con una vacuna inactivada con hidróxido de aluminio-saponina elaborada en la planta de producción de vacunas del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, conteniendo el equivalente a 7 ml de suspensión vírica trivalente O<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> y C<sub>3</sub>, e inoculada por vía subcutánea en la dosis de 5 ml.

#### Vacunación

Cinco meses después de la primovacunación los bovinos fueron sangrados y divididos en tres grupos al azar. Un grupo fue revacunado con la vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso; el segundo grupo con vacuna de hidróxido de aluminio-saponina, y el tercer grupo con la suspensión de virus sin adyuvante. Todas las vacunas fueron aplicadas en dosis de 5 ml: la vacuna de hidróxido de aluminio-saponina por vía subcutánea y las otras dos por vía intramuscular.

#### Estudio de anticuerpos

Los bovinos fueron sangrados a los 2, 4, 6 y 10 días postrevacunación (DPR) y luego cada 30 días hasta completar 180 días para los revacunados con vacuna oleosa y 120 días para los demás grupos. Los niveles de anticuerpos circulantes fueron determinados por los índices de seroprotección (ISP) en ratones lactantes (8).

\* Arlacel A - ICI America Inc, Atlas Chemicals Division.

\*\* Marcol 52 - Exxon Corporation, U.S.A.

## RESULTADOS

Los ISP para los tres tipos de virus de la fiebre aftosa y para los tres grupos experimentales están representados en la tabla 2. La respuesta anamnésica fue detectada ya a los 4 DPR alcanzando a partir del 6° DPR valores de expectativa porcentual de protección (EPP) de 99% (10) en todos los casos.

Los gráficos 1, 2 y 3 muestran las curvas de anticuerpos detectados para los tres tipos de virus con los diferentes tratamientos. Fue bastante evidente el efecto del inmunoadyuvante en la persistencia de los anticuerpos circulantes. La vacuna oleosa indujo anticuerpos circulantes que persistieron por un período superior a 6 meses para los tres tipos de virus, hecho ése que no se observó para la vacuna de hidróxido de aluminio-saponina que presentó el punto máximo de anticuerpos a los 30 DPR cayendo enseguida en forma acentuada.

Los niveles de anticuerpos del grupo de bovinos que recibió la suspensión de virus sin adyuvante declinaron rápidamente aun cuando en los tres grupos se haya observado la misma respuesta anamnésica.

En todos los tratamientos, las cepas O<sub>1</sub> Campos y C<sub>3</sub> Resende demostraron ser inmunogénicamente inferiores a la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro. En la tabla 3 se observa la respuesta inmunológica de la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro frente a las cepas A Bagé, A Venceslau y A Macabú cuando se utiliza hidróxido de aluminio-saponina o emulsión oleosa como inmunoadyuvante. La cobertura inmunológica inducida por la vacuna preparada con hidróxido de aluminio-saponina no fue satisfactoria a partir de los 60 DPR mientras que la vacuna oleosa mostró un alto nivel de cobertura frente a las cepas en estudio por un período superior a los 180 DPR.

## DISCUSION

Aun en animales primovacunados con la vacuna contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso, en que el nivel más elevado de anticuerpos se observa después de los 60 días (3), Graves *et al.* encontraron, tanto en bovinos como en suinos vacunados con vacuna oleosa monovalente A, un alto nivel de protección entre 3 y 14 días de la primovacunación (11). En animales revacunados encontramos que

TABLA 2. Respuesta anamnésica en bovinos inducida por la vacuna antiaftosa

Vacuna	Virus de la fiebre aftosa	Días postrevacunación				
		0*	2	4	6	10
Con adyuvante oleoso	O <sub>1</sub>	1,8 ± 1,2**	1,9 ± 1,1	2,4 ± 1,1	4,3 ± 0,5	5,0
	A <sub>24</sub>	2,5 ± 1,2	2,8 ± 0,9	3,4 ± 0,6	4,4 ± 0,6	5,0
	C <sub>3</sub>	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,6	1,8 ± 0,8	4,5 ± 0,5	5,0
Con hidróxido de aluminio-saponina	O <sub>1</sub>	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,6	3,0 ± 0,8	4,0 ± 0,5	5,0
	A <sub>24</sub>	2,2 ± 0,8	2,6 ± 1,0	3,3 ± 0,6	4,3 ± 0,8	5,0
	C <sub>3</sub>	1,1 ± 0,6	1,4 ± 0,4	2,0 ± 0,6	4,6 ± 0,5	5,0
Sin adyuvante	O <sub>1</sub>	1,8 ± 0,9	1,7 ± 0,7	2,5 ± 1,1	4,4 ± 0,5	4,7 ± 0,7
	A <sub>24</sub>	2,7 ± 1,0	3,0 ± 0,8	3,5 ± 0,8	4,5 ± 0,9	4,9 ± 0,2
	C <sub>3</sub>	1,7 ± 0,7	1,6 ± 0,5	2,0 ± 0,9	3,8 ± 1,1	4,2 ± 1,2

\* Después de la primovacunación con una vacuna inactivada con hidróxido de aluminio-saponina.

\*\* Media de los índices de seroprotección y desviación standard. Los valores > 3,6 representan una expectativa porcentual de protección (EPP) de 99% (10).

GRAFICO 1. *Media del índice de seroprotección del virus tipo O<sub>1</sub> de bovinos revacunados con vacunas con adyuvante oleoso, con hidróxido de aluminio-saponina o antígeno sin adyuvante.*

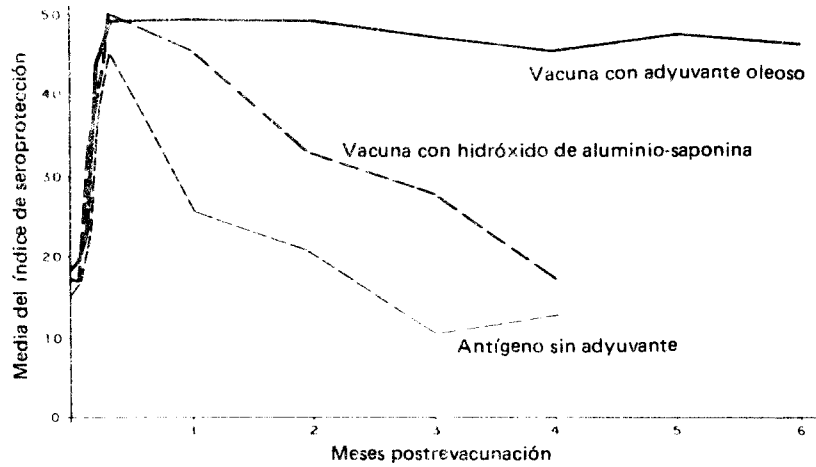


GRAFICO 2. *Media del índice de seroprotección del virus tipo A<sub>24</sub> de bovinos revacunados con vacunas con adyuvante oleoso, con hidróxido de aluminio-saponina o antígeno sin adyuvante.*

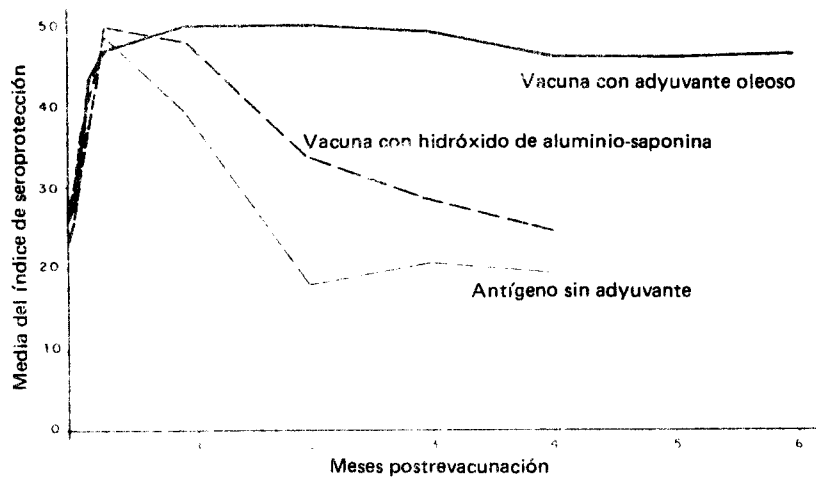


GRAFICO 3. *Media del índice de seroprotección del virus tipo C<sub>3</sub> de bovinos revacunados con vacunas con adyuvante oleoso, con hidróxido de aluminio-saponina o antígeno sin adyuvante.*

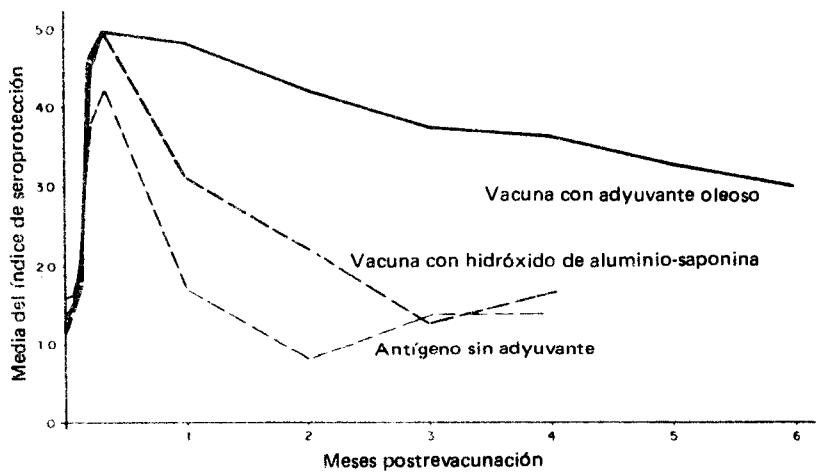


TABLA 3. Respuesta inmunológica de la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro frente a 3 cepas de virus A inmunológicamente diferentes

Vacunas	Días después de la revacunación	Cepas de virus A			
		Cruzeiro	Bagé	Venceslau	Macabú
Adyuvante oleoso	60	5,0*	3,4 ± 0,9	2,9 ± 1,2	3,6 ± 0,9
	120	4,6 ± 0,4	4,3 ± 1,2	3,4 ± 1,0	3,3 ± 0,8
	180	4,7 ± 0,5	3,8 ± 0,9	2,8 ± 1,2	3,1 ± 1,1
Hidróxido de aluminio-saponina	60	3,4 ± 1,1	1,8 ± 0,9	0,4 ± 0,5	1,5 ± 0,4
	120	2,4 ± 0,6	1,2 ± 0,9	1,1 ± 0,9	1,4 ± 0,3

\* Media de los índices de seroprotección y desviación standard.

la respuesta inmediata inducida por los antígenos de fiebre aftosa parece no depender de la presencia de un inmunoadyuvante. La respuesta anamnésica en bovinos alcanza valores de EPP de 99% (10) a partir del 6° DPR con o sin la presencia de un inmunoadyuvante incorporado al antígeno, mientras que la persistencia de anticuerpos depende del tipo de adyuvante utilizado y en ese aspecto el adyuvante oleoso es el que induce un nivel más elevado de anticuerpos y con mayor duración lo que confirma resultados anteriores (3, 4, 13).

Una observación de gran importancia fue la diferencia de cobertura inmunológica inducida por los diferentes inmunoadyuvantes. Así, la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro, en la vacuna con adyuvante oleoso,

presentó amplia cobertura hasta a los 180 DPR frente a las 3 cepas de virus A inmunológicamente diferentes mientras que la vacuna preparada con hidróxido de aluminio-saponina, a los 60 DPR presentaba bajos ISP frente a las muestras estudiadas. Se evidencia así, confirmando trabajos anteriores (1, 2, 9), que las vacunas oleosas aumentan marcadamente la cobertura inmunológica de los antígenos de la fiebre aftosa.

Los resultados obtenidos por Graves *et al.* (11) en animales primovacunados y la excelente respuesta anamnésica con amplia cobertura inmunológica a los 180 DPR indican que ese tipo de vacuna antiaftosa podrá ser utilizada en vacunaciones perifocales estratégicas.

#### REFERENCIAS

- ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDAHL, M.S.; GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P. Inmunidad cruzada en bovinos entre varias cepas del virus de la fiebre aftosa tipo C. (Cross immunity of cattle with type C strains of foot-and-mouth disease virus). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 23-24*: 33-35, 1976.
- ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDAHL, M.S.; GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P. Vacuna oleosa: cobertura inmunológica de las cepas del virus de la fiebre aftosa, tipo A, representativas de Sudamérica. (Oil adjuvanted vaccine: immunological coverage of representative strains of foot-and-mouth disease type A virus in South America). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 26*: 49-50, 51-52, 1977.
- 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). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 31-38, 39-47, 1975.
- AUGÉ DE MELLO, P.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; CAMPOS GARCIA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa

- con vacuna oleosa. (Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 23-25, 27-29, 1977.
5. BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABA-RACON, D.; GOMES, I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethyleneimine. *Bull. Off. int. Epiz.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
  6. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para la atención de un predio donde ocurre fiebre aftosa. *Ser. Man. Técn.* 1, 45 pp., 1974.
  7. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Técn.* 2, 33 pp., 1974.
  8. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRAO, 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.* 19 (110): 243-267, 1957.
  9. GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A. Relaciones serológicas e inmunológicas entre algunas cepas de subtipos del virus de la fiebre aftosa. (Serological and immunological relationship of some strains of foot-and-mouth disease virus subtypes). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 23-24: 11-15, 1976.
  10. GOMES, I.; ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1976.
  11. GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.; FARRIS Jr., H.E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Res. vet. Sci.* 9: 35-40, 1968.
  12. HILLEMANN, M.R. Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccines. *Progr. med. Virol.* 8: 131-182. Karger Basel/New York, 1966.
  13. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Vacunas contra la fiebre aftosa. I. Comparación entre vacunas preparadas con virus inactivado con formalina y adsorbido en hidróxido de aluminio y vacunas preparadas con virus inactivado con acetil-etileneimina emulsificado con adyuvante incompleto de Freund. (Foot-and-mouth disease vaccines. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetylathyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 1-8, 9-16, 1975.
  14. SÖNDAHL, M.S.; GOMES, I.; GIACOMETTI, H.; ROSENBERG, F.J. Actuación del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa frente a un brote de virus A de la fiebre aftosa en el municipio de Conceição de Macabú, Rio de Janeiro. *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* (en prensa).