

APLICACION EN EL CAMPO DE VACUNA ANTIAFTOSA OLEOSA E INACTIVADA:
VACUNACION Y REVACUNACION DE BOVINOS JOVENES

P. Augé de Mello*; Vicente Astudillo*; Ivo Gomes*;
J.T. Campos Garcia**

INTRODUCCION

Estudios realizados en el Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island (PIADC) y en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) demostraron, en condiciones de laboratorio, que los bovinos pueden ser protegidos contra la fiebre aftosa (FA) con vacunas preparadas con virus inactivado con N-acetiletileneimina (AEI) y con aceite mineral como adyuvante (12-13). En vista de estos resultados favorables, se programó una investigación de largo plazo para estudiar el uso de estas vacunas en el campo bajo condiciones controladas.

Este trabajo presenta los resultados comparativos de la evaluación de anticuerpos en 2 grupos de bovinos jóvenes vacunados y revacunados, un grupo con vacuna oleosa y el otro con vacuna preparada con el mismo antígeno pero con adyuvante de hidróxido de aluminio. Se presenta también la respuesta de una población de terneros vacunados con vacuna oleosa.

MATERIALES Y METODOS

Estación experimental

La estación experimental "Cinco Cruces" del Ministerio de Agricultura del Brasil, ubicada en Bagé, estado de Rio Grande do Sul, fue el lugar elegido para estos estudios. El

establecimiento tiene una extensión de aproximadamente 2.800 hectáreas. La población bovina se compone de un rebaño de carne, cruce de 5/8 Aberdeen-Angus y 3/8 Nelore y de un rebaño de leche de 250 vacas Jersey y Red Dane. La cantidad total de bovinos de carne oscila, en forma estacional, entre 1.600 y 2.500 cabezas. Los terneros nacen en septiembre y octubre y son destetados 6 a 7 meses después. Los animales son pesados con intervalos mensuales hasta que llegan a los 2 años y medio, cuando se los envía al matadero.

Los animales se hallan sometidos a un activo programa de control sanitario que incluye exámenes regulares y tratamiento de ecto y endoparasitosis y, además de las vacunaciones contra la fiebre aftosa, brucelosis, carbunclo bacteriano y carbunclo sintomático.

Esquema de vacunación

Teniendo en cuenta el manejo del ganado, las condiciones climáticas y las experiencias de laboratorio anteriores (13) se resolvió vacunar a los bovinos con las vacunas en estudio, en intervalos de 6 meses en los períodos abril/mayo y septiembre/octubre de cada año.

Todos los bovinos que estaban en el establecimiento, que no fueron incluidos en este trabajo, continuaron siendo vacunados cada 3 meses con vacunas comerciales inactivadas con AEI y adyuvante de hidróxido de aluminio.

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

** Ministerio de Agricultura de Brasil - EMBRAPA-UEPAE, Cinco Cruces, Bagé, RS, Brasil.

Grupos experimentales

Al comenzar la experiencia un grupo homogéneo de 353 terneros nacidos en 1971 tenían entre 5 y 7 meses de edad. Estos animales fueron mantenidos en las mismas condiciones durante todo el tiempo que duró la experiencia.

1. Comparación de los adyuvantes

Para comparar la respuesta inmunitaria de la vacuna oleosa y de hidróxido de aluminio, se eligieron al azar 30 terneros machos y 30 hembras que se dividieron, también al azar, en tres grupos. El primer grupo recibió la vacuna oleosa, el segundo la de hidróxido de aluminio y el tercero quedó sin vacunar, sirviendo como testigo. Seis meses más tarde los dos primeros grupos fueron revacunados (Tabla 1). Con intervalos de un mes se tomaron muestras de sangre de todos los terneros para la investigación de anticuerpos circulantes.

2. Inmunidad de la población

Se estudió la respuesta inmunitaria a la vacuna oleosa en toda la población de 293 terneros restantes. Estos animales fueron vacunados al comienzo de la experiencia y 277 revacunados seis meses después. Cada dos meses se tomaron muestras de sangre al azar de 40-50 terneros, teniendo en cuenta la distribución por sexo.

3. Duración de la inmunidad después de una vacunación

Un grupo de 16 terneros seleccionados al azar no fue revacunado. Estos animales fueron sangrados mensualmente a partir de los 6 meses hasta los 12 meses de la primovacuna-ción.

Antígenos

Las cepas de virus de la fiebre aftosa utilizadas fueron O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende, todas de origen sudamericana. Estas cepas fueron adaptadas a cultivos de células BHK-21 (5). Los cultivos celulares en frascos de Roux fueron inoculados con virus

en 50 ml de medio Eagle modificado sin suero. Después de 20 horas de incubación a 37° C se retiraron las suspensiones y fueron mezcladas con 10% (v/v) de trifluortricloroetano. Durante 10 minutos fueron agitadas, clarificadas por centrifugación a 800 x g durante 30 minutos y conservadas a 4° C hasta la inactivación. La infecciosidad fue determinada por titulación en placas y expresada como UFP/dosis de vacuna.

Las pruebas de fijación de complemento realizadas al principio y al final del proceso de inactivación se efectuaron de acuerdo con el método descrito por el CPFA (10), con 4 unidades de complemento, 90 minutos de incubación a 37° C y determinando el 50% de hemólisis en el espectrofotómetro* (Tabla 1).

Proceso de inactivación

Cada suspensión de virus fue inactivada con 0,05% de N-acetiltileneimina (AEI) durante 24 horas, en agitación continua en bañomaría a 37° C. Terminada la inactivación el AEI fue neutralizado agregando tiosulfato de sodio en la concentración final de 2% (p/v). Las tasas de inactivación fueron determinadas por el método descrito por Graves (3).

Pruebas de inocuidad

Después de la inactivación, cada suspensión de antígeno fue inoculada por vía intraperitoneal en dosis de 0,1 ml a 120 ratones lactantes de 7 días de edad. Los ratones inoculados fueron observados durante 10 días. Las suspensiones se consideraron inocuas si ninguno de los ratones moría de infección por fiebre aftosa durante ese período.

Preparación de la vacuna

Se prepararon dos partidas de vacuna para la vacunación y la revacunación, respectivamente. Se mezclaron los tres antígenos en partes iguales y el total fue dividido en dos partes, agregándose a cada una un adyuvante diferente:

*Coleman Jr. Mod. 6 A.

1. Aceite

Una mezcla de monooleato de manide* y de aceite mineral** en la proporción de 1:10 fue emulsificada con una cantidad igual de suspensión trivalente de virus en un homogeneizador*** para formar una emulsión agua en aceite.

2. Hidróxido de aluminio

Suspensiones de $Al(OH)_3$ (concentración al 2% de Al_2O_3) y de antígeno trivalente se adicionaron en partes iguales mezclando lentamente durante 10 minutos.

Pruebas de potencia

La prueba de potencia de las vacunas a los 21 días se hizo usando el índice C en cobayos y el índice K modificado en bovinos. Las vacunas fueron aprobadas con valores para el índice C $> 2,0$ y para el índice K $> 1,5$.

Control antigénico

Después de preparada la vacuna y antes de ser usada, se "quebró" la emulsión agregando aceite de soya (4 partes de aceite + 1 de vacuna), mezclando y centrifugando por 30 minutos (J.H. Graves, comunicación personal). La fase acuosa resultante de la centrifugación fue sometida a la prueba de fijación de complemento.

Pruebas de anticuerpos

Los niveles de anticuerpos fueron determinados por el índice de seroprotección (1). Se calculó la media de la expectativa porcentual de protección (EPP) de acuerdo con el procedimiento propuesto por Gomes y Astudillo (2). Estos autores consideran protección en bovinos a la ausencia de lesiones en las patas, consecutivas a la inoculación del virus en la lengua.

RESULTADOS

Comparación de la vacuna de adyuvante oleoso con la de hidróxido de aluminio

La figura 1 muestra la expectativa porcentual de protección (EPP), para los 3 tipos de virus, en los tres grupos experimentales.

A los 30 días de la vacunación, los animales inoculados con la vacuna con hidróxido de aluminio presentaban una EPP de aproximadamente 60-70%. A los 60 días este valor cayó por debajo de 50% y a los 90 días ya estaba en el mismo nivel de los testigos.

Con la vacuna oleosa, a los 30 días, la EPP fue superior al 70%, continuó subiendo hasta 60 días después de la vacunación cuando alcanzó 80-90%. Estos picos se mantuvieron por casi dos meses y comenzaron a declinar lentamente. A los 6 meses, aún había una EPP considerable (56-54% para O_1 y C_3 , respectivamente y 73 para A_{24}).

La revacunación produjo una respuesta anamnésica con ambas vacunas, aun cuando los niveles de protección con la vacuna de hidróxido de aluminio decayeron rápidamente. Con respecto a los virus O_1 y C_3 , a los 4 meses de la revacunación, los niveles de protección de los animales vacunados y de los testigos eran similares. Las EPP alcanzadas por la vacuna oleosa fueron altas y persistieron mucho tiempo. En ambos tipos de vacuna la persistencia de la protección frente al subtipo C_3 fue la menos satisfactoria.

Inmunidad de la población

La tabla 2 presenta los límites de confianza del 95% para las EPP de los terneros vacunados y revacunados con la vacuna de adyuvante oleoso.

Puede observarse que se ha logrado una excelente inmunidad de masa con vacunaciones aplicadas cada seis meses. Estos resultados confirman también que el subtipo A_{24} es el mejor antígeno, seguido por el O_1 y que el subtipo C_3 es el antígeno menos eficiente.

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

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

*** Silverson - Machines (Sales) Ltd. London.

Duración de la inmunidad después de una sola vacunación

La tabla 3 muestra la duración de la inmunidad en los 16 bovinos vacunados una sola vez con vacuna oleosa. La protección contra

los subtipos O₁ y C₃ alrededor del 70% de los bovinos persistió por lo menos 9 meses después de la vacunación. La respuesta al subtipo A₂₄ fue superior al 70% de protección a los 12 meses de vacunados.

TABLA 1 - Características de dos partidas de antígenos de virus de la fiebre aftosa usados para la preparación de vacuna para vacunación y revacunación respectivamente

Virus de la fiebre aftosa	Partida					
	I			II		
	Títulos UFP	FC	Tasa de inactivación UFP/min	Títulos UFP	FC	Tasa de inactivación UFP/min
O ₁	7,57	1/25	-0,038*	7,29	1/30	-0,038
A ₂₄	7,54	1/20	-0,017	7,69	1/15	-0,038
C ₃	7,44	1/25	-0,017	7,92	1/25	-0,027

UFP = log₁₀ unidades formadoras de placa/dosis de vacuna.

FC = Dilución sérica determinando el 50% de hemólisis antes y después de la inactivación (ver texto).

* = Disminución de la infecciosidad viral en log₁₀ UFP por minuto.

TABLA 2 - Inmunidad de la población bovina después de la vacunación y revacunación con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso.

Edad media de los bovinos (meses)	Meses después de la revacunación		Expectativa porcentual de protección para el virus de la fiebre aftosa		
	1a.	2a.	O ₁	A ₂₄	C ₃
	6	0		22 ± 12	21 ± 12
8	2		94 ± 7	97 ± 5	85 ± 10
10	4		86 ± 10	90 ± 8	82 ± 11
12	6	0	84 ± 10	94 ± 7	74 ± 12
14	8	2	96 ± 10	100 ± 0	95 ± 6
16	10	4	87 ± 10	97 ± 5	83 ± 11
18	12	6	78 ± 12	91 ± 8	70 ± 13

TABLA 3 - Duración de la inmunidad de bovinos vacunados una sola vez con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso

Edad media de los bovinos (meses)	Meses después de la revacunación	Expectativa porcentual de protección para el virus de la fiebre aftosa		
		O ₁	A ₂₄	C ₃
		12	6	84
13	7	68	79	64
14	8	76	89	53
15	9	68	84	70
16	10	58	79	64
17	11	33	77	49
18	12	49	72	41

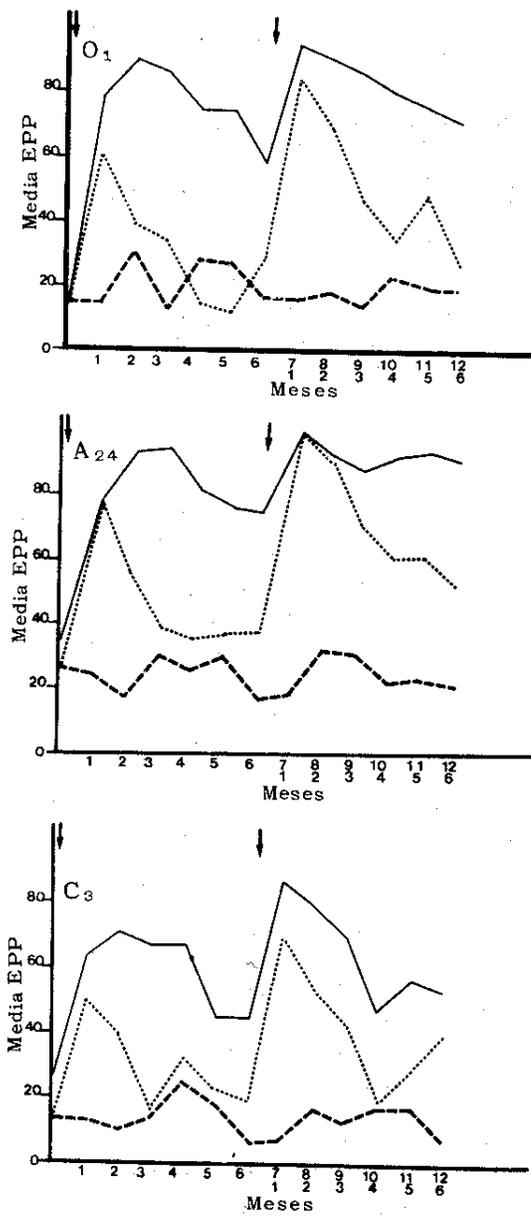


FIGURA 1 - Media de la expectativa porcentual de protección (EPP) de bovinos para los subtipos O₁, A₂₄ y C₃ del virus de la fiebre aftosa, después de la vacunación con vacuna de hidróxido de aluminio o vacuna con adyuvante oleoso y los testigos.

- vacuna con adyuvante oleoso.
- vacuna con hidróxido de aluminio.
- - - - - testigos.
- ↓ ↓ vacunación/revacunación.

DISCUSION

Desde hace mucho tiempo se admite que es difícil proteger adecuadamente a los terneros con vacuna inactivada con formalina y adicionada con hidróxido de aluminio, pero que se puede lograr una inmunidad más duradera con repetidas vacunaciones (4, 6, 7, 8, 9). Los resultados de este trabajo confirman esa observación. Los resultados obtenidos con las vacunas de adyuvante oleoso demuestran que estas vacunas en condiciones de campo producen una respuesta inmunitaria de mayor intensidad y de más larga duración que las vacunas con hidróxido de aluminio, preparadas con los mismo antígenos inactivados.

Estas experiencias demuestran las diferencias inmunogénicas entre las cepas de virus empleadas en la preparación de las vacunas. La aptitud de los antígenos para inducir protección en los bovinos varió en gran medida aun cuando los títulos de infecciosidad y de fijación de complemento eran similares. En otros estudios de vacunas con adyuvante oleoso, el subtipo O1 cepa Caseros fue el más pobre de los inmunógenos (12, 13). Por consiguiente, la selección de la cepa más inmunogénica es de capital importancia para la preparación de una vacuna satisfactoria.

Otras investigaciones han mostrado que las vacunas oleosas pueden inducir un alto grado de protección en bovinos adultos (11). Este estudio demuestra que las vacunaciones practicadas con 6 meses de intervalo protegen un alto porcentaje de animales jóvenes. Por tanto, parece factible que puede vacunarse dos veces al año con vacunas de adyuvante oleoso en lugar de las tres vacunaciones anuales que se hacen con las vacunas convencionales. El efecto de refuerzo a los 6 meses

fue satisfactorio aun cuando se requieren nuevos estudios para determinar el intervalo óptimo entre vacunaciones.

La vacunación se llevó a cabo en condiciones de campo bajo control, por lo cual en las próximas etapas, los estudios se extenderán a mayores poblaciones expuestas al riesgo.

RESUMEN

Se comparó la inmunidad evaluada a través de la prueba de seroprotección, de un grupo de bovinos jóvenes de 5 a 7 meses de edad, mantenidos en condiciones de campo bajo control, vacunados y revacunados con vacuna de adyuvante oleoso con los resultados obtenidos con la vacuna de hidróxido de aluminio. En ambas vacunas se utilizaron los mismos antígenos inactivados con acetilfetileneimina (AEI). La expectativa porcentual de protección mostró que la vacuna con adyuvante oleoso, indujo una protección mayor y más duradera que la de hidróxido de aluminio. La revacunación realizada con la vacuna oleosa a los 6 meses produjo una buena respuesta anamnésica con altos niveles de protección y que persistieron por mucho tiempo.

El estudio de un muestreo serológico efectuado cada dos meses en una población de 293 terneros, vacunados cada 6 meses con vacuna oleosa, mostró que, en condiciones de campo, este tipo de vacuna confiere una elevada y duradera protección. Seis meses después de la aplicación de la vacuna oleosa, alrededor del 70% de los animales jóvenes debían estar protegidos. Estos niveles de protección persistieron hasta 9 meses para los tipos O y C y 12 meses para el tipo A.

La elección de la cepa que se utiliza en la preparación de la vacuna mostró ser importante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Drs. Luiz Ernani Anadon Cardozo, Cláudio Alano da Silveira e Victor Hugo Conde del Grupo Ejecutivo de Combate a la Fiebre Aftosa (GECOFA) de Rio Grande do Sul, Brasil, por su valiosa asistencia.

REFERENCIAS

1. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRÃO, U.; 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.
2. GOMES, I.; ASTUDILLO, V.
Foot-and-mouth disease: Evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18*: 9-16, 1975.
3. GRAVES, J.H.; ARLINGHAUS, R.B.
Acetyleneimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Proc. Seventy-first ann. meet. U.S. livestock sanit. Ass.*: 296-403, 1967.
4. HONIGMAN, M.N.; GOMES, I.; ABREU M., I. de; LOMBARDO, R.A.
Persistencia en terneros de la inmunidad postvacunal contra el virus aftoso. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 2*: 12-20, 1971.
5. MACPHERSON, I.; STOKER, M.
Polyoma transformation of hamster cell clones: an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16 (2): 147-151, 1962.
6. MACKOWIAK, C.; FONTAINE, J.; LANG, R.; CAMAND, R.; PETERMANN, H.G.
Étude de la durée de l'immunité conférée par le vaccin antiaphteux aux jeunes bovins. Conférence de la Commission Permanente de la Fièvre Aphteuse de l'Office International des Epizooties, X, Paris Rapport n° 44, 1962. *Bull. Off. int. Épizoot.* 57 (5-6): 937-948, 1962.
7. MUNTIU, N.; DOHOTARU, V.; BERCAN, A.; MIRCESCU, G.; TOMESCU, A.; STIRBU, C.
PD₅₀ quantitative determinations of the booster effect in foot-and-mouth disease vaccination in cattle. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Research Group of the Standing Technical Committee at the Instituto Zooprofilattico Sperimentale. Brescia, Italy, 24-26 September 1969. FAO. Rome: 135-138, 1970.
8. MUNTIU, N.; DOHOTARU, V.; BERCAN, A.; MIRCESCU, G.; STIRBU, C.; TOMESCU, A.
Duration of foot-and-mouth disease immunity in one year old cattle after the first vaccination with 10 PD₅₀. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, Federal Republic of Germany: 75-80, 1971.
9. MUNTIU, N.; DUMITRESCU, A.; DOHOTARU, V.; NEGRUTIU, T.
Durée de l'immunité post-vaccinale contre la fièvre aphteuse par rapport à l'âge des animaux, à la dose de vaccin et à la répétition de la vaccination (effet de rappel). *Bull. Off. int. Épizoot.* 77 (5-6): 771-787, 1972.
10. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc.* 2, pp. 33, 1974.
11. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O.P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARAUGUNICH, L.
Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa en bovinos. *Revta Investnes Agropec.* 9 (2): 53-80, 1972.

2. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION

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 acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Collaborative research Plum Island Animal Disease Center and Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 9-16, 1975.

1. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION

Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. Collaborative research Plum Island Animal Disease Center and Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 24-30, 1975.