

VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. I. COMPARACION ENTRE VACUNAS
PREPARADAS CON VIRUS INACTIVADO CON FORMALINA Y ADSORBIDO EN
HIDROXIDO DE ALUMINIO Y VACUNAS PREPARADAS CON VIRUS INACTIVADO CON
ACETILETILENEIMINA EMULSIFICADO CON ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND

por el

Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island*

y el

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**

INTRODUCCION

En Sudamérica las vacunas para el control de la fiebre aftosa (FA) se preparan mediante inactivación de suspensiones de virus con formaldehído o acetiletileneimina (AEI), absorbiendo el antígeno a hidróxido de aluminio y agregando saponina. La inmunidad que confiere esta vacuna es de una duración relativamente corta por lo que es práctica corriente revacunar a los animales cada 4 meses. Con este tipo de vacuna es particularmente difícil proteger a los cerdos (1, 2).

Investigadores del Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island (PIADC) comunicaron resultados favorables con vacuna contra la fiebre aftosa preparada con

antígenos inactivados con AEI y emulsificados con adyuvante incompleto de Freund (3, 4, 5). En las unidades de aislamiento del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA), en Rio de Janeiro, se realizó una serie de estudios en colaboración con el PIADC, para determinar el valor de tales vacunas para futuros experimentos de campo en Sudamérica. Bovinos, ovinos y porcinos de Brasil fueron vacunados con vacunas convencionales de fiebre aftosa con formaldehído y con adyuvante de gel de hidróxido de aluminio y saponina, o con vacunas inactivadas con AEI y con adyuvante incompleto de Freund. Se compararon el desarrollo de anticuerpos y el grado de inmunidad de los animales con uno y otro tipo de vacunas, en diferentes períodos después de la vacunación.

* McKercher, P.D.; Graves, J.H.; Cunliffe, H.; Callis, J.J. ARS, USDA, Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

** Fernandes, M.V.; Martins, I.A.; Alonso Fernández, A.; Gomes, I.; Augé de Mello, P.; Palacios, C.A. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

"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."

MATERIALES Y METODOS

1. Virus

Para la preparación de las vacunas se seleccionaron las siguientes cepas sudamericanas de virus de la fiebre aftosa: cepa Caseros del subtipo O₁, cepa Cruzeiro del subtipo A₂₄ y cepa Resende del subtipo C₃.

2. Vacunas

a) El Centro Panamericano de Fiebre Aftosa preparó una vacuna trivalente de hidróxido de aluminio y saponina con la suspensión de virus producido en cultivos Frenkel de epitelio lingual bovino e inactivado con 0,025% de formaldehído a 37° C durante 40 horas (6). En la Tabla 1 se describen las características de los antígenos antes de la inactivación.

b) El Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island preparó otra vacuna trivalente, utilizando los mismos virus emulsificados con un adyuvante oleoso. Los virus fueron multiplicados en cultivos celulares de riñón de hamster (criceto) lactante

(BHK-21, clon 13), inactivado con 0,05% de AEI a 37° C durante 48 horas y emulsificado en igual cantidad de adyuvante oleoso (1 parte de Arlacel A y 9 partes de Bayol F) (5). En la Tabla 1 figuran las características de los antígenos.

En esta publicación las vacunas se mencionaron como vacunas de gel de aluminio y de adyuvante oleoso, respectivamente.

3. Pruebas de inocuidad de los antígenos

En el PIADC se mezclaron partes iguales de cada suspensión inactivada para la preparación de vacunas de adyuvante oleoso y un total de 2 ml de la suspensión trivalente se inoculó por vía intradermolingual (IDL) en 20 puntos de cada uno de 6 novillos. Durante un período de observación de 14 días todos permanecieron negativos para signos de fiebre aftosa.

La vacuna de gel de aluminio del CPFA, diluida en 1/5, se inoculó en 100 ratones lactantes a razón de 0,05 ml por ratón. Ninguno murió durante un período de observación de 10 días.

TABLA 1 - Títulos de infecciosidad y de fijación del complemento de las cepas de virus aftoso utilizadas para la producción de vacunas experimentales

Subtipo	Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island (Cultivo BHK-21)		Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (Cultivo Frenkel)	
	UFP/ml ^a	FC ^b /Dosis vacunal	DL ₅₀ ratón/dosis vacunal	FC ^c
O ₁	7,57	1/18,9	7,30	1/6,5
A ₂₄	6,87	1/14,7	7,70	1/3
C ₃	7,43	1/18,0	7,57	1/16

a) UFP = log₁₀ unidades formadoras de placas por ml.

b) Cowan, K.M.; Trautman, R. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. I. Complement fixation reactions of isolated antigenic components. *J. Immunol.* 99: 729-736, 1967.

c) Alonso Fernández, A.; Federer, K.E.; Gomes, I.; Vieira, A. Comparación serológica e inmunológica de dos subtipos del virus aftoso tipo C Waldmann. *Bltm Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 4: 9-20, 1971.

4. Prueba de inocuidad de la vacuna

Un volumen de 2 ml de la vacuna final envasada, con adyuvante oleoso, se inoculó en el epitelio lingual de 6 novillos en 20 puntos cada uno. A lo largo de un período de observación de 14 días todos permanecieron negativos para signos de fiebre aftosa.

5. Pruebas de potencia

En el PIADC fueron vacunados, con 2 ml de vacuna, 6 bovinos, 6 ovinos y 6 cerdos. A los bovinos y ovinos la vacuna fue aplicada por vía subcutánea en un lado del pescuezo y a los cerdos, por la misma vía, en el dorso de la oreja. Se recogieron muestras de sangre para examen de anticuerpos neutralizantes a los 7, 14, 21 y 28 días después de la vacunación.

En el CPFA se realizó una prueba de potencia para la vacuna de gel de aluminio, empleando 23 bovinos. Estos fueron expuestos al virus 21 días después de la vacunación, por inoculación IDL de 10^4 DL₅₀ ratón.

6. Animales

En el experimento se utilizaron bovinos mestizos de cebú de aproximadamente 2 años de edad y 200 kg de peso, ovinos merino/corriedale de 8 a 9 meses y 20 a 25 kg de peso, y cerdos Landrace de 3 a 4 meses y 30 a 40 kg. En todos los animales los exámenes realizados previamente para determinar la presencia de anticuerpos contra los tres subtipos usados, resultaron negativos.

7. Vacunación

Se empleó un total de 432 animales en estos experimentos:

a) 32 bovinos inoculados por vía subcutánea con 5 ml de vacuna de gel de aluminio cada uno.

b) 32 bovinos inoculados por vía subcutánea con 6 ml de vacuna de adyuvante oleoso.

c) 32 bovinos se mantuvieron sin vacunar para ser utilizados como controles en el momento de comprobación de la inmunidad de los bovinos vacunados.

d) 64 ovinos fueron inoculados por vía subcutánea con 5 ml de vacuna de gel de aluminio.

e) 48 ovinos se inocularon por vía subcutánea con 6 ml de la vacuna de adyuvante oleoso.

f) 56 ovinos se dejaron sin vacunar para ser usados como controles en la comprobación de la inmunidad de los diversos grupos.

g) 64 porcinos recibieron 5 ml de vacuna de gel de aluminio.

h) 48 porcinos recibieron 6 ml de vacuna de adyuvante oleoso.

i) 56 porcinos se dejaron sin vacunar como controles para la comprobación de la inmunidad de los diversos grupos.

8. Prueba de anticuerpos

Todos los animales fueron sangrados con intervalos de un mes. Los sueros bovinos se examinaron frente al subtipo C₃ y los de ovinos y porcinos contra el O₁, aplicando la prueba de protección en ratones de acuerdo con el método descrito (7). Los valores DP₅₀ de los sueros de los animales del PIADC se determinaron en ratones lactantes, según se describió (8), utilizando los tres tipos de virus.

9. Exposición al virus

Los bovinos fueron inoculados en el epitelio lingual con 10^4 DL₅₀ ratón del subtipo C₃ de origen bovino. Los ovinos se inocularon de igual modo con 10^5 DL₅₀ ratón del subtipo O₁, pasado 6 veces en ovinos según descrito (9). Los cerdos recibieron por vía intraplantar, en una pata, $10^{4,6}$ DL₅₀ ratón del subtipo O₁ de origen bovino. Se consideró que los animales estaban protegidos cuando no aparecían lesiones secundarias en las patas. En los cerdos se tomaban en consideración las patas no inoculadas.

RESULTADOS

En la Tabla 2 aparecen los resultados de los exámenes de anticuerpos séricos (media de los puntos finales de DP_{50}) de los animales empleados en las pruebas de potencia del PIADC. Estos resultados indican que la vacuna estaba en el límite de calidad, lo que se confirmó en la exposición de los bovinos al virus: 4 de 12 desarrollaron fiebre aftosa (Tabla 3).

En el CPFA las pruebas de potencia de las vacunas de gel de aluminio, llevadas a cabo en bovinos en la descarga realizada a los 21 días postvacunación, mostraron que 7 de 7 bovinos estaban protegidos contra el virus tipo O; 7 de 8 contra el virus de tipo A, y 8 de 8 contra el virus tipo C.

Los resultados de los estudios de anticuerpos y de la inoculación del virus para las tres especies se ven en la Tabla 4 y Fig. 1.

Bovinos

En la Fig. 1 se observa que la respues-

ta primaria de anticuerpos contra el subtipo C_3 , tanto de la vacuna de gel de aluminio como de la de adyuvante oleoso, fue muy pobre y de corta duración; siendo la protección conferida a los tres meses de la vacunación muy baja. Sin embargo, la revacunación con ambos tipos de vacuna aumentó considerablemente la respuesta de anticuerpos, reflejado en el grado de resistencia ante la exposición al subtipo C_3 , 3 y 7 meses después de la revacunación (Tabla 4).

Ovinos

La respuesta primaria de los ovinos fue diferente según la vacuna (Fig. 1). Con la vacuna de gel de aluminio la curva de anticuerpos para el subtipo O_1 alcanzó su pico al mes, pero con la vacuna de adyuvante oleoso la curva continuó subiendo hasta los tres meses, seguido por una meseta alta y prolongada. Con la vacuna oleosa se obtuvo un excelente grado de protección hasta 9 meses después de la vacunación contra el virus de la fiebre aftosa subtipo O_1 .

TABLA 2 - Media del punto final DP_{50} ^{a)} en pruebas de potencia, en seis animales, por especie

Virus tipo	DPV ^{b)}	Bovinos	Ovinos	Porcinos
O_1	28	1,57	1,71	1,77
A_{24}	28	1,89	1,50	1,88
C_3	28	1,20	2,24	0,94

a) DP_{50} = \log_{10} de la recíproca de la dilución de suero que protege el 50% de los ratones contra 100 DL_{50} de virus.

b) DPV = Días postvacunación.

TABLA 3 - Prueba de potencia en bovinos - Respuesta a la descarga del subtipo O₁ en relación con el nivel de la DP₅₀

Nivel de DP ₅₀	Número de bovinos	Lesiones		
		Ninguna	En el sitio de inoculación	Fiebre aftosa generalizada
0 (Control)	3	0	3	3
0,0 - 0,49	1	0	1	1
0,50 - 0,99	1	0	1	1
1,00 - 1,49	1	0	1	1
1,50 - 1,99	2	0	2	1
2,00 - 2,49	4	2	2	0
2,50 - 2,99	2	1	1	0
3,00 - 3,49	1	1	0	0

TABLA 4 - Pruebas de inmunidad - Número de animales protegidos

Especie	Meses	Vacuna	
		Gel de aluminio	Adyuvante oleoso
Bovinos	3	4/15	5/15
	3a)	8/8	8/8
	7a)	4/8	6/8
Ovinos	1	16/16	-
	3	16/16	14/16
	6	15/16	13/16
	9	13/13	13/14
Porcinos	3	0/16	0/16
	1a)	0/12	4/12
	3a)	-	2/9

a) Meses después de la revacunación.

Porcinos

Ambas vacunas sólo produjeron una respuesta mínima de anticuerpos después de la vacunación, y a los tres meses ninguno de los cerdos expuestos estaba protegido contra el subtipo O₁ (Tabla 4 y Fig. 1). La revacunación con la vacuna de gel de

aluminio aumentó un poco el nivel de anticuerpos, sin que protegiera a los cerdos a la exposición del virus un mes más tarde. La respuesta de la revacunación con vacuna de adyuvante oleoso fue un poco mejor, en cuanto al desarrollo de anticuerpos y a la protección frente al virus.

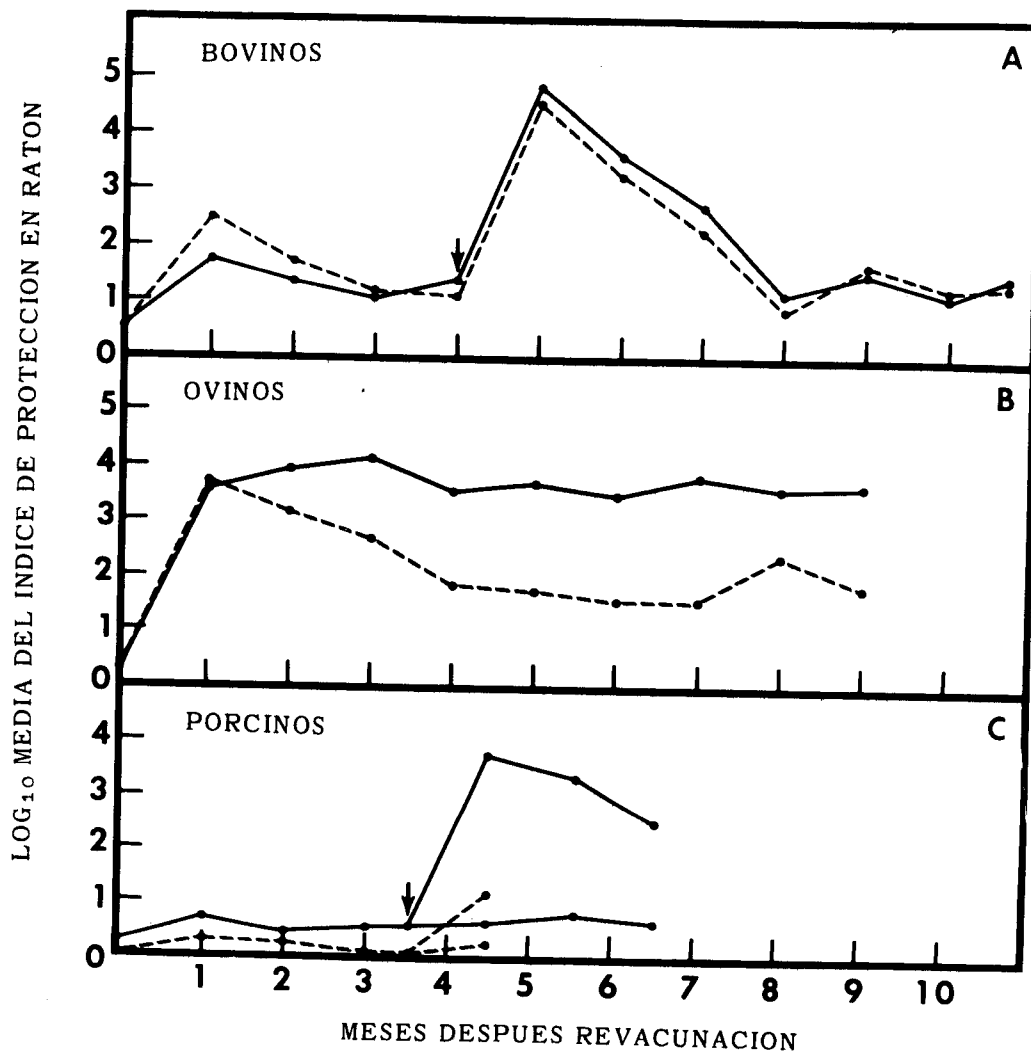


FIGURA 1 - Media del índice de protección en ratón en especies vacunadas con vacunas anti-aftosas inactivadas con formalina y con adyuvante de hidróxido de aluminio-saponina (-----) y con vacuna inactivada con acetiltileneimina y emulsificada con adyuvante incompleto de Freund (—): A, respuesta en bovinos al virus aftoso C₃, revacunados a los 120 días; B, respuesta en ovinos al virus aftoso O₁; C, respuesta en cerdos al virus O₁, revacunados a los 105 días.

↓ = Revacunación.

DISCUSION

La respuesta a la vacuna de adyuvante oleoso fue menos favorable que la informada anteriormente (10, 11, 12), tanto en las pruebas de potencia (Tabla 2) como en la aplicación en el CPFA (Tabla 4). Se puede especular sobre la insuficiente cantidad de antígeno contenido en la vacuna o sobre la pobreza de los subtipos usados como antígenos. Graves (13) señaló que en la descarga de virus puede esperarse algún indicio de enfermedad cuando el promedio de DP_{50} es inferior a 2. En el caso del virus C_3 se observó poca diferencia en la respuesta de los bovinos vacunados o revacunados con vacunas con gel de aluminio o con adyuvante oleoso. En los ovinos se consiguió un resultado más prometedor con la vacuna oleosa. En esta especie la vacuna de gel de aluminio produjo una defensa adecuada contra el subtipo O_1 , pero los niveles correspondientes de anticuerpos fueron considerablemente menores que los obtenidos con la vacuna de adyuvante oleoso. En los cerdos se obtuvieron resultados pobres con estos subtipos, con ambos tipos de vacuna, pero, la revacunación fue algo mejor en el caso de la vacuna oleosa. Los síntomas clínicos a la exposición al virus de los cerdos inoculados con vacuna oleosa eran menos graves que los de los controles, observándose cierto grado de protección.

La estabilidad de la vacuna se reveló muy satisfactoria. Después de la prueba de potencia en el PIADC y la prueba de revacunación en el CPFA, la vacuna se devolvió al PIADC para exámenes de fijación del complemento e inoculación en animales. Los

resultados fueron similares a los obtenidos originalmente. No obstante, será necesario mejorar la preparación de la vacuna antes de considerar su aplicación en el campo. El mejoramiento podría incluir un aumento de la cantidad y de la estabilidad de los antígenos y extender la posibilidad de su almacenamiento por más de seis meses para que se mantenga un buen estado de emulsificación.

RESUMEN

La respuesta de anticuerpos en bovinos frente al virus C_3 , sea con vacunas de hidróxido de aluminio o de adyuvante oleoso, fue bastante escasa y de corta duración. La revacunación con los dos tipos de vacuna aumentó considerablemente la respuesta.

En ovinos, los niveles de anticuerpos contra el virus O_1 después de la vacunación con vacuna de hidróxido de aluminio alcanzó su máximo al mes. La vacuna oleosa produjo una excelente protección contra el virus O_1 por no menos de 9 meses.

Ambas vacunas indujeron una mínima respuesta de anticuerpos en cerdos, pero en los animales inoculados con la vacuna oleosa los signos clínicos fueron menos severos que en los testigos.

Los resultados obtenidos con la vacuna oleosa fueron menos favorables de lo que se esperaba. Es probable que la cantidad de antígeno contenida en la vacuna fuera insuficiente o que los subtipos utilizados fueron antígenos pobres.

REFERENCIAS

1. VAN BEKKUM, J.G.; FRENKEL, S.; NATHANS, I. De enting van varkens tegen mond- en klauwzeer. *Tijdschr. v. Diergeneesk.* 25: 1936-1944, 1963.

2. LUCAM, F.; FEDIDA, M.; DANNACHER, G.; PERRAUD, J. What may be expected concerning foot-and-mouth disease vaccination in pigs. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Pirbright, England, September 14-16, 1966.
3. MCKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Pirbright, England, September 14-16, 1966.
4. 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.
5. 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.
6. ABREU, MARTINS I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltm Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 1: 1-19, 1971.
7. 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.* 19: 243-267, 1957.
8. 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.
9. ALONSO FERNANDEZ, A.; FERNANDES, M.V. Experimental inoculation of sheep with foot-and-mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.* 73: 507-520, 1970.
10. MCKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: 165-176, 1969.
11. MORGAN, D.O.; MCKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 70: 770-774, 1970.
12. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O.P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARANGUNICH, L. Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa en bovinos. *Revta Invest. Agrop.*, INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina. Serie 4 Patología Animal, IX (2), 1972.
13. GRAVES, J.H. Immune response of cattle to different serotype antigens in monovalent foot-and-mouth disease vaccines. *J. Immun.* 102: 58-62, 1969.