

RESPUESTA EN BOVINOS A LA EXPOSICION DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA UN AÑO DESPUES DE INMUNIZADOS CON VACUNA CON ADYUVANTE OLEOSO

Ivo Gomes¹; P. Suttmöller¹; R. Casas Olascoaga¹

RESUMEN

Treinta vacas, que habían sido vacunadas 3 veces a intervalos de 6 meses con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso, fueron expuestas 13 meses después de la última vacunación al virus tipo O₁ por vía intradermolingual y al contacto con bovinos y cerdos infectados.

De acuerdo con los niveles de anticuerpos previos al desafío de virus se esperaba una elevada protección, la que fue confirmada por la prueba de desafío de virus. Sólo uno de los 30 bovinos desarrolló fiebre aftosa generalizada. De los 29 animales sólo 6 tuvieron una lesión en el punto de inoculación.

Estas observaciones confirman, en general, que en las encuestas serológicas realizadas en la población bovina a la que pertenecían esos animales, vacunados con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso, los elevados niveles de anticuerpos indican una sólida inmunidad.

INTRODUCCION

Los estudios de campo para evaluar la eficacia de las vacunas contra la fiebre aftosa (FA) se basan principalmente en los resultados de las pruebas de neutralización de anticuerpos virales. Las más comúnmente usadas en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) son: la prueba de microneutralización (MN) (8) y la de seroprotección (SP) (7). Para la prueba de SP se establecieron las relaciones entre los valores del suero de 700 bovinos vacunados y su protección a los 21-30 días postvacunación (DPV) frente a la exposición al virus por vía intradermolingual (IDL) (10). De los bovinos vacunados con vacuna inactivada, 25% de los que

presentaron un índice de seroprotección (ISP) entre 0,1-1,0 estaban protegidos. En el rango intermedio (1,0-2,0), aproximadamente 60% de los bovinos vacunados no desarrollaron lesiones en las patas después de la inoculación en la lengua. Con base en ese estudio se estableció una expectativa porcentual de protección (EPP) para los valores de ISP (10), la cual indicó que más del 90% de los animales con un $ISP \geq 2,5$ podrían estar protegidos frente al desafío de virus de la FA. La mayoría de estos datos se obtuvieron de bovinos expuestos al virus por inoculación en la lengua a los 21-30 DPV.

En un trabajo conjunto (6) realizado por el CPFA y la Dirección de Lucha contra la Fiebre Aftosa (DILFA), Uruguay, bovinos vacunados con diluciones de vacuna inactivada de adyuvante oleoso, fueron desafiados 3 meses después por inoculación en la lengua. Los bovinos de los grupos con niveles de protección $\geq 90\%$ generalmente tenían un $ISP \geq 2,5$ y un título de microneutralización (TMN) $\geq 3,0$.

En un experimento cooperativo (7) realizado por el CPFA con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina, los bovinos que fueron vacunados con vacuna de adyuvante oleoso a los 6 meses postvacunación, estaban protegidos frente al desafío por vía IDL, si el ISP o el TMN era $\geq 2,5$.

Un trabajo (12) realizado por el CPFA juntamente con el Centro de Enfermedades Animales de Plum Island (PIADC) mostró que, grupos de bovinos con un ISP promedio de 2,0-3,0 a los 6-12 meses después de la revacunación con vacuna antiaftosa inactivada con adyuvante oleoso, tenían una protección en el orden de 60-90% frente a la inoculación de virus en la lengua.

Encuestas serológicas realizadas en áreas donde se había utilizado vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso mostraron muy satisfactorios niveles de anticuerpos (4, 5), de donde se podría deducir que esas poblaciones están bien protegidas frente a la

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

exposición del virus de la FA; sin embargo, los datos experimentales para corroborar esta suposición son escasos.

La oportunidad de realizar este estudio se presentó cuando, en un establecimiento situado en un área piloto de aplicación de vacuna con adyuvante oleoso, se dispuso de 30 vacas que habían sido vacunadas tres veces con esta vacuna; la última vacunación se efectuó 13 meses antes de ser llevadas al CPFA y exponerlas al virus.

MATERIALES Y METODOS

Bovinos vacunados

Las 30 vacas eran mestizas, con más de 4 años de edad y provenían de la Fazenda Santa Mónica, Juparanã, Rio de Janeiro, perteneciente a la Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) del Ministerio de Agricultura.

Cuatro de las 30 vacas sufrieron FA (virus tipo A) durante un brote ocurrido en el establecimiento, en 1976. La vacuna con adyuvante oleoso fue aplicada en enero y julio de 1977 y en enero de 1978. Las vacas llegaron al CPFA a fines de enero de 1979 y fueron expuestas al virus al principio de febrero de 1979, poco más de un año después de la última vacunación.

Bovinos y cerdos no vacunados

Cuatro bovinos y 6 cerdos sin historia de vacunación y libres de anticuerpos fueron agregados al grupo de 30 vacas vacunadas, y sirvieron como controles y donadores adicionales de virus.

Vacuna

Las vacunas de adyuvante oleoso fueron de las partidas de producción de rutina del CPFA y usadas en ensayos de campo y en áreas demostrativas (5).

Virus

Para la inoculación de los bovinos y los cerdos se usó el virus de la FA subtipo O₁, cepa Campos, de origen bovino.

Exposición al virus

Todos los animales fueron inoculados con 10⁴ DI₅₀ bovino en el epitelio lingual. Cuatro animales

no vacunados fueron inoculados de forma similar, así como 3 cerdos a los que se aplicaron 10⁴ DI₅₀ bovino en una pata. Todos los bovinos y 3 cerdos sin inocular fueron mantenidos juntos, en las mismas instalaciones, y en íntimo contacto hasta una semana después de la inoculación del virus, en que fueron separados en pequeños grupos en compartimientos abiertos, en el mismo galpón.

Examen de los bovinos

Dos días después de la inoculación los bovinos fueron examinados para observar la presencia de lesiones en la lengua y 9 días después para determinar la generalización.

Antes del desafío de virus y a los 15 y 36 días después de la exposición fueron tomadas muestras de suero y de líquido esófago-faríngeo (LEF).

Pruebas

Los anticuerpos circulantes fueron ensayados por la prueba de MN (8) frente a las cepas de virus usadas en la vacuna: O₁ Campos, A Bagé, A Veneslau y C Indaial. La cepa O₁ Campos fue usada en la prueba de SP (7).

Los anticuerpos VIA fueron ensayados por la prueba de doble difusión en agar (DDA) como fue descrita (3).

El aislamiento del virus del LEF se llevó a cabo como descrito (13), usando emulsificación en triclorotrifluoretano (TTE) y 3 series de pasajes en volúmenes de 10 ml en cultivos de células IB-RS-2 en monocapas en botellas Roux. Todos los cultivos con efecto citopático fueron examinados por la prueba de fijación del complemento para confirmar el tipo.

RESULTADOS

Los bovinos y cerdos controles desarrollaron FA generalizada. Uno de los bovinos contacto murió y lo mismo ocurrió con dos cerdos. Solamente un bovino vacunado desarrolló lesiones generalizadas en las patas. De los 29 bovinos protegidos sólo seis tuvieron una lesión en el punto de inoculación de virus.

El Cuadro 1 resume estos resultados así como los de las pruebas de los diversos anticuerpos y de aislamiento de virus.

CUADRO 1. Respuesta de bovinos expuestos al virus O₁ de la fiebre aftosa un año después de vacunados con vacuna de adyuvante oleoso

Bov. N ^o	Antes desafío							Desafío Lesiones	15 DDV ^a			36 DDV	
	Microneutralización				ISP		Aisl. virus		ISP	VIA	Aisl. virus	VIA	Aisl. virus
	C Ind.	A Bagé	A Venc.	O ₁	O ₁	VIA							
651	≥3,2	3,2	≥3,5	≥3,6	3,7	-	-	Neg. ^b	>5,0	-	+1 ^o	-	+1 ^o
652	≥3,6	≥3,5	2,9	3,3	2,2	-	-	L ^c	>5,0	+	+2 ^o	+	Neg.
653	≥3,6	≥3,5	3,3	3,2	4,9	-	-	Neg.	>5,2	-	+2 ^o	-	+3 ^o
654	≥3,6	≥3,5	≥3,6	≥3,6	>4,5	-	-	Neg.	>5,0	-	+2 ^o	+	+2 ^o
655	3,3	≥3,6	3,0	≥3,5	2,1	-	-	Neg.	>5,0	-	Neg.	-	+1 ^o
656	≥3,6	≥3,6	3,2	≥3,5	4,8	+	-	Neg.	>5,0	+	+1 ^o	-	+1 ^o
657	≥3,5	3,2	3,2	2,7	4,8	-	-	Neg.	>5,0	+	+2 ^o	+	Neg.
658	3,3	≥3,5	2,7	3,2	2,8	+	-	L	4,9	+	+2 ^o	+	+1 ^o
659	≥3,6	3,3	3,2	≥3,5	3,0	-	-	Neg.	4,2	+	+1 ^o	-	+1 ^o
660	≥3,6	2,9	2,9	3,3	>4,5	-	-	Neg.	>5,2	+	+2 ^o	+	+1 ^o
661	≥3,5	≥3,6	3,0	3,3	2,5	-	-	L	5,2	+	+2 ^o	+	+1 ^o
662	≥3,6	≥3,6	≥3,5	≥3,6	4,0	-	-	Neg.	5,0	-	+2 ^o	-	+2 ^o
663	≥3,6	≥3,6	≥3,6	≥3,6	>4,5	-	-	Neg.	5,0	-	+2 ^o	-	+2 ^o
664	≥3,6	≥3,6	≥3,5	≥3,6	>4,5	+	-	Neg.	>5,0	+	+2 ^o	+	Neg.
665	≥3,5	3,3	≥3,5	2,9	2,0	-	-	Neg.	>5,0	+	+2 ^o	-	+1 ^o
666	≥3,6	≥3,6	≥3,6	≥3,6	4,7	+	-	Neg.	>5,0	-	+2 ^o	+	Neg.
667	2,7	2,7	2,3	2,6	1,0	-	-	L4P ^d	>5,0	+	+2 ^o	+	+1 ^o
668	≥3,6	≥3,6	2,9	≥3,5	>4,3	+	-	Neg.	>5,0	+	+2 ^o	+	+2 ^o
669	≥3,6	≥3,5	2,9	≥3,5	>4,3	+	-	Neg.	>5,0	+	+2 ^o	+	+2 ^o
670	≥3,6	≥3,5	≥3,6	≥3,5	>4,3	+	-	Neg.	>5,0	+	+2 ^o	+	+2 ^o
671	3,3	2,9	3,2	3,0	3,3	+	-	Neg.	>5,0	+	+2 ^o	+	+1 ^o
672	≥3,6	≥3,5	≥3,6	3,3	>4,3	-	-	Neg.	>5,0	-	Neg.	-	+3 ^o
673	≥3,6	≥3,5	3,0	3,3	3,6	-	-	Neg.	>5,0	+	+2 ^o	+	+1 ^o
674	≥3,5	≥3,5	2,7	3,3	2,7	-	-	L	>5,0	+	Neg.	+	+2 ^o
675	≥3,6	≥3,5	3,0	≥3,5	4,7	-	-	Neg.	>5,0	-	Neg.	-	+3 ^o
676	3,3	2,9	2,4	2,6	1,5	-	-	L	5,0	+	+1 ^o	+	Neg.
677	≥3,6	3,3	2,4	3,0	1,5	-	-	L	>5,0	+	+2 ^o	+	Neg.
678	≥3,6	3,3	≥3,5	≥3,6	>4,3	-	-	Neg.	>5,0	-	+2 ^o	-	+3 ^o
679	3,3	≥3,6	3,3	3,2	3,0	+	-	Neg.	>5,0	+	+1 ^o	+	+1 ^o
680	≥3,5	≥3,5	≥3,5	3,3	1,9	+	-	Neg.	5,0	+	+2 ^o	+	+1 ^o

^aDías después del desafío de virus.

^bNegativos lengua y patas.

^cL = lengua.

^dP = patas.

En la prueba de MN la mayoría de los títulos fue $\geq 3,0$. Para el tipo C, solamente un animal estuvo por debajo de este valor. Para las cepas A Bagé y A Venceslau hubieron 4 y 9 bovinos, respectivamente, con valores menores que 3,0. Para la cepa O₁ Campos, 4 bovinos estuvieron por debajo de 3,0.

Los valores para la prueba de SP presentaron variación en una gama más amplia que los de la prueba de MN. La EPP del grupo basado en la prueba de SP fue de $92,3 \pm 4,4$. El único animal no protegido (N^o 667) tuvo valores de 2,6 y 1,0 para las pruebas de MN y SP, respectivamente. En la prueba de SP los animales con lesiones en la lengua en el punto de inoculación tuvieron valores que variaban de 1,5 a 2,8. Los animales con valores más altos no presentaron ningún tipo de lesión. Sin embargo, algunos bovinos con un ISP en el rango intermedio también fueron totalmente negativos. Esta relación probable entre lesiones primarias en la lengua y el ISP no fue aparente con la prueba de MN. Todos los ISP aumentaron a valores de convaleciente (7, 9) después de la exposición al virus. Diez de las 30 vacas tenían anticuerpos VIA antes de la inoculación del virus, probablemente debido al brote de virus tipo A de 1976. A los 15 días después del desafío, 20 de 30 fueron positivas; a los 36 días, 3 de las vacas positivas dieron resultados negativos y dos de las negativas pasaron a ser positivas.

No fue aislado virus de ninguno de los bovinos antes del desafío. A los 15 días del desafío se aisló virus tipo O₁ de 26 animales. Cinco de los bovinos fueron positivos al primer pasaje en cultivo de células IB-RS-2 y los 21 restantes al segundo pasaje.

A los 36 días, 13 bovinos fueron positivos al virus al primer pasaje y 11 lo fueron al segundo o al tercer pasaje, totalizando 24 bovinos de los cuales fue aislado el virus tipo O₁.

Los 4 bovinos de control fueron positivos al VIA y se aisló virus del LEF de cada uno de ellos. Como se esperaba, los anticuerpos alcanzaron niveles de convaleciente.

DISCUSION

De acuerdo con los niveles de anticuerpos antes del desafío de virus, se esperaba que los bovi-

nos usados en esta prueba estuviesen bien protegidos contra la FA. Esta presunción fue confirmada ya que todos los animales, menos uno, resistieron a una descarga severa de virus O₁, como son: la inoculación de 10^4 unidades virales en el epitelio lingual; el íntimo contacto con 4 bovinos sin vacunar e inoculados de forma similar; la exposición a 3 cerdos donadores inoculados y a 3 cerdos contacto, todos los cuales presentaron generalización. Todos los animales fueron infectados como lo evidenció la respuesta de anticuerpos y el aislamiento de virus. Cabe destacar que no todos los animales fueron positivos al VIA (DDA) aunque el virus se replicó en la región faríngea. Observaciones similares fueron hechas por otros autores (2, 11).

Este experimento confirma la suposición de que una población bovina con una EPP ≥ 90 está bien protegida contra la FA, aun cuando la última vacunación se hubiese realizado un año antes, o más. Lo mismo se infiere cuando un alto porcentaje tiene un TMN $\geq 3,0$. Un desafío más severo de la inmunidad que el efectuado en este experimento sería difícil de realizar en condiciones de campo o aun en ferias o exposiciones ganaderas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la cooperación del personal de la Hacienda Santa Mónica, Juparanã, Rio de Janeiro y del Centro Nacional de Ganado Lechero de EMBRAPA por haber facilitado los bovinos para este experimento.

Asimismo, agradecen al personal del Laboratorio de Diagnóstico y Referencia del CPFA por la realización de las pruebas VIA y de tipificación de virus. Las pruebas de microneutralización se efectuaron bajo la supervisión de la Dra. Kleise de Freitas Costa.

REFERENCIAS

1. ABARACON, D.; MAGALLANES, N.; CHARLES, E.G.; DURINI, L.A.; FRICK, E.; ALBARRACIN, G. F. de; BURGHI, E.D. de; RADISICH, T. Vida útil de una vacuna antiaftosa inactivada con adyuvante oleoso. (Shelf life of inactivated oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 37-38: 17-20, 21-24, 1980.

2. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. (The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 17-22, 1975.
3. ALONSO FERNANDEZ, A.; SONDAHL, M.S. Preparación y concentración de los antígenos 140S, 12S y VIA del virus de la fiebre aftosa. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 1-8, 1975.
4. 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). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 23-25, 27-29, 1977.
5. CASAS OLASCOAGA, R. Summary of current research of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center on oil adjuvanted vaccines. *Bull. Off. int. Épizoot.* 89 (11-12): 1015-1054, 1978.
6. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA; DIRECCION DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. Prueba de potencia para vacunas contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso: ensayos de DP_{50} en cobayos y en bovinos de una vacuna preparada en forma semi-industrial con una emulsión del tipo agua en aceite. (Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine: PD_{50} assays of a semi-industrial water-in-oil type emulsion in guinea pigs and cattle). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 29-30: 55-59, 61-65, 1978.
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.*, B. Aires, 19 (110): 243-267, 1957.
8. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización 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.
9. GOMES, I.; ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P. Foot-and-mouth disease circulating antibodies in convalescent cattle. *Bull. Off. int. Épizoot.* 77 (5-6): 731-741, 1972.
10. 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, 1976.
11. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidem.* 92 (4): 273-278, 1970.
12. PLUM ISLAND ANIMAL DISEASE CENTER; PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER. Vacunas contra la fiebre aftosa. II. Estudios sobre la duración de la inmunidad en bovinos y porcinos. (Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 17-23, 24-30, 1975.
13. SUTMÖLLER, P.; COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 21: 170-177, 1967.