

## VACUNAS ANTIAFTOSAS HIDROXIDO-SAPONINADAS INACTIVADAS POR EL FORMOL

Técnica de elaboración utilizada por el  
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

I. de Abreu Martins

### INTRODUCCION

Uno de los recursos de mayor utilidad en el control de la fiebre aftosa es la vacunación de los animales susceptibles a esta enfermedad. No obstante, debido a las condiciones inherentes al virus en si, como a los procesos fisicoquímicos a que es sometido durante la elaboración de las vacunas, hasta el presente, no se ha logrado un antígeno específico capaz de conferir a los animales una inmunidad sólida y de larga duración.

Además de la investigación de nuevos tipos de vacunas, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa viene estudiando con gran interés el mejoramiento de las vacunas inactivadas que constituyen aproximadamente 96% del total de las utilizadas en Sudamérica. Entre ellas, la más investigada, no sólo en lo que se refiere a su poder inmunizante sino también a su producción más económica, es la vacuna elaborada con suspensión de virus obtenida por el método de Frenkel, adsorbida en hidróxido de aluminio, tratada por la saponina e inactivada por el formol.

En vista de la experiencia acumulada en el CPFA durante muchos años, en innúmeras pruebas de laboratorio y de campo, pasamos a describir la técnica que utilizamos para la preparación de la referida vacuna y los resultados obtenidos con ella.

#### 1. PRODUCCION DE ANTIGENO

La preparación del antígeno se realiza siguiendo el método de Frenkel (1), que se basa en la multiplicación de los virus *in vitro* en presencia de células de epitelio lingual de bovinos normales, suspendidas en medio nutritivo adecuado, capaz de mantenerlas vivas durante un determinado tiempo.

##### *Célula viva*

Los trabajos de recolección son ejecutados en un pequeño laboratorio especialmente construido para ese fin junto a la sala de matanza en un establecimiento de faena distante 4 km del CPFA.

Las lenguas, obtenidas inmediatamente después del sacrificio de los animales, son extendidas en soportes metálicos especiales, lavadas y cepilladas cuidadosamente con agua y jabón neutro y cepillos de pelo duro, enjuagadas en abundante agua corriente. A continuación se vuelca alcohol

70° sobre la superficie de las mismas. En nuestros trabajos no hemos utilizado la aplicación de rayos ultravioleta después del tratamiento con alcohol por considerarla innecesaria.

De las capas celulares que constituyen el epitelio lingual, las más profundas son las preferidas por el virus para su multiplicación, especialmente el estrato espinoso y el estrato germinativo; la capa externa, papilar, es despreciada por su posible contaminación bacteriana.

Con el auxilio de una máquina cortadora de fiambres, convenientemente desinfectada por flameado, se retira la capa superficial queratinizada, no aprovechable y luego las demás hasta el tejido conjuntivo, evitándose el corte de las fibras musculares. Para mayor rapidez se aconseja usar 2 máquinas, una para retirar la capa superficial y otra para las más profundas. En los animales sacrificados en el establecimiento de faena mencionado, obtuvimos un promedio de 20 g de epitelio aprovechable por lengua.

Los pequeños fragmentos de epitelio son colocados en frascos de boca ancha que contienen un medio conservador con antibióticos (fórmulas 1 más 2), mantenidos continuamente en baño de hielo. Una vez transportados al laboratorio se procede a una nueva selección del epitelio, removiéndose los pedazos de músculos todavía existentes. En seguida, con una tijera se corta todo el tejido en pequeños fragmentos; este detalle es muy importante para los cultivos de los virus en fase de adaptación. En los pasajes más avanzados, cuando el virus es capaz de multiplicarse con regularidad, los tejidos son usados tal como son colectados, esto es, sin ninguna fragmentación.

Luego de pesados y distribuidos en los respectivos frascos de cultivos, los tejidos son lavados 3 veces con un medio conservador por decantación. Después del último lavado se adicionan a la solución los antibióticos, en las concentraciones indicadas, conservándose refrigerados a 4° C hasta el momento de su incubación.

Las células se usan lo más rápidamente posible, de preferencia en el mismo día de su recolección. Sin embargo, debido a la irregularidad de los horarios de las matanzas en los frigoríficos es necesario frecuentemente mantenerlas por más tiempo en el laboratorio. En los trabajos de rutina no ultrapasamos de 24 horas, cuidando de renovar por más 2-3 veces el líquido conservador y mantener el recipiente en cámara fría a 4° C.

No es indispensable que los tejidos epiteliales provengan de animales totalmente sensibles a la fiebre aftosa. Es posible utilizar también lenguas de bovinos vacunados.

### *Semilla*

Para que determinada cepa de virus pueda proporcionar antígenos para la elaboración de vacunas, es indispensable que esté adaptada a las nuevas condiciones de vida artificial, en este caso, de acuerdo con las indicaciones de Frenkel (3).

En general las muestras de epitelio que se reciben en el laboratorio y que servirán de semilla para la adaptación del virus son mínimas. Para obtener mayor volumen de material es necesario hacer pasajes previos, ya sea en animales sensibles (bovinos, cobayos, ratones lactantes, etc.) o en cultivos celulares (riñón de bovino, o de porcino, o de hamster,

etc.). El material que constituirá la semilla, procedente de bovinos (aftas linguales o podales), de cobayos (aftas plantares), o de ratones lactantes (canales), es triturado y suspendido en solución medio conservador en la proporción de 1:5. Las suspensiones obtenidas de esta forma, así como las resultantes de los cultivos celulares no son filtradas en placas de Seitz, por cuanto éstas retienen cantidades considerables de virus, y deberán ser tratadas por cloroformo (8) "pro analisis" al 2%, agitadas en cámara fría durante media hora y centrifugadas a frío a 2.000 rpm, durante 10 minutos.

La semilla así obtenida, siempre conservada en cámara fría, es titulada en ratones lactantes y tipificada e identificada serológicamente con determinación del título fijador del complemento.

En los trabajos de rutina no poseemos hasta ahora un criterio que oriente la selección de las cepas de mayor poder antigénico; el título infeccioso para ratones lactantes y el poder fijador del complemento son los únicos medios adoptados para su selección. Sin duda el recurso más acertado sería la preparación de una vacuna con el virus en cuestión y someterla a una prueba de eficacia en animales sensibles.

La vacuna trivalente preparada por el CPFA contiene los siguientes elementos: virus O Vallée, subtipo O<sub>1</sub> cepa Campos, virus A Vallée, subtipo A<sub>24</sub> cepa Cruzeiro, y virus C Waldmann, subtipo C<sub>3</sub> cepa Resende. Estas cepas ya se encuentran convenientemente adaptadas a los cultivos artificiales, conservadas a baja temperatura (-20° C) y en condiciones de reproducirse en el momento que se desee.

Con el fin de evitar posibles modificaciones del tipo del virus con que se inició la línea de cultivos no es conveniente hacer un número muy alto de pasajes. Por esta razón se debe retomar material de pasajes anteriores, o, en muchos casos, el epitelio original. En el cuadro 6 donde figuran los resultados de las pruebas de eficacia se puede observar que nunca sobrepasamos el número de 30 pasajes.

#### *Medio de cultivo*

La fórmula original del medio de cultivo de Frenkel (3) ha sufrido grandes alteraciones. La simplificación para la producción económica de virus (1), en que el número de aminoácidos es reducido, ha sido muy usada no sólo en la elaboración de las vacunas preparadas en el CPFA, sino también por laboratorios de otros países donde con el asesoramiento del CPFA se inició la elaboración con el método de Frenkel (fórmula 3).

En general el medio de cultivo es de preparación reciente, esto es, que no se utilizan medios conservados por más de siete días en cámara fría.

#### *Incubación*

Dado el reducido volumen de la semilla, la adaptación del virus se hace en frascos Erlenmeyer de 1 a 6 litros de capacidad. A medida que las cantidades aumentan se utilizan recipientes mayores (balones de 20 litros).

Los tres componentes anteriormente mencionados, células, semilla y medio entran en los cultivos en las siguientes proporciones: 1 g de epitelio normal, 1 ml de semilla, y 4 ml de medio de cultivo.

Durante la adaptación de la cepa, esto es, en sus primeros pasajes, las células vivas y el virus permanecen en contacto directo, en temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado ese tiempo se adiciona el medio de cultivo (fórmula 3) con antibióticos (fórmula 2), manteniéndose el pH ajustado a 7,6 con solución de bicarbonato de sodio al 7,5%. En este momento se coloca a cada frasco un tapón de goma con una doble tubuladura que permite la circulación de  $O_2$  (de uso comercial) durante todo el tiempo de incubación. Un agitador especialmente construido para ese fin, instalado dentro de un cuarto-estufa proporciona al contenido de los frascos un movimiento constante y, consecuentemente, mejor oxigenación de las células.

La temperatura aconsejada varía entre  $36^\circ$  y  $37^\circ$  C y el tiempo de incubación de 18 a 24 horas. El tiempo óptimo es variable para cada cepa dependiendo de su capacidad de adaptación y deberá ser determinado individualmente por titulaciones en ratón lactante (RL) y por prueba de fijación del complemento (FC).

En nuestra experiencia los tiempos óptimos determinados fueron, para la cepa  $O_1$  Campos: 18 horas, para la cepa  $A_{24}$  Cruzeiro: 19 horas, y para la cepa  $C_3$  Resende: 21 horas.

Las muestras ya adaptadas, en condiciones de producir vacunas en mayor escala, pueden ser cultivadas en grandes tanques de acero inoxidable de hasta 1.000 litros de capacidad. El CPFA cuenta con una unidad compuesta de 2 tanques de 80 litros cada uno, de industria brasileña, cuya construcción, con ligeras modificaciones, está basada en los diseños originales de Frenkel (4).

#### *Pasajes*

Terminado el tiempo de incubación el frasco es retirado del cuarto-estufa y ajustado el pH de su contenido a 7,6, con bicarbonato de sodio. Todo el material, epitelio y cultivo líquido, es triturado en morteros cuando se trata de pequeñas cantidades, o en molino coloidal cuando son cantidades mayores.

Pequeña parte de la suspensión obtenida es congelada ( $-20^\circ$  C) en frascos de boca ancha para stock y la otra parte es centrifugada a 2.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante es titulado en RL y por prueba de FC', reservándose determinada cantidad para ser usada como semilla para el pasaje siguiente.

Como ya fue descrito, la semilla (sobrenadante) tratada por el cloroformo al 2% es sembrada en nuevas células epiteliales normales bajo los mismos cuidados mencionados.

Volúmenes mayores de suspensiones virulentas que ya son utilizadas para la elaboración de vacunas, después de centrifugados y tratados por el cloroformo a 0,5%, podrán ser conservados hasta diez días en cámara fría. De ese modo transcurre el tiempo necesario para la determinación de sus títulos, tarea que demanda normalmente entre 5 y 7 días.

La adaptación de las cepas a los cultivos artificiales no siempre se desarrolla bajo el mismo esquema. Algunas describen curvas ascendentes

en los primeros pasajes, mientras que otras, más exigentes, necesitan un número bastante elevado de operaciones para alcanzar títulos razonables, aun en pasajes en que los títulos de FC' fueron completamente negativos.

Del mismo modo proceden las muestras ya adaptadas sometidas por mucho tiempo a congelación a  $-20^{\circ}$  C (gráficos 1 a 6).

#### *Titulaciones de las suspensiones virulentas*

En el cuadro 6 se puede observar que las vacunas elaboradas en el CPFA contienen una concentración mínima de virus de  $10^{7,3}$ /ml RL por dosis. El poder fijador de complemento nunca es inferior a 1:3 ó 1:6 dependiendo del método serológico utilizado.

## 2. PREPARACION DE LA VACUNA

La vacuna inactivada, elaborada en el CPFA, está constituida de una suspensión de virus tratada por la saponina, inactivada por el formol y adsorbida al hidróxido de aluminio (2, 6 y 9). La técnica de su preparación consta de las siguientes etapas:

#### *Tratamiento por la saponina*

A la suspensión de virus titulada, mantenida en cámara fría adicionada de cloroformo y nuevamente centrifugada, se agrega saponina a 0,5g%. Se pesa la cantidad deseada de saponina para determinado volumen de suspensión de virus y se disuelve en la proporción de 1 g en 5 ml de agua destilada a  $50^{\circ}$  C. La preparación de esta solución exige cierto cuidado por cuanto el pH de la misma debe ajustarse a 8,0 con una solución normal de hidróxido de sodio. Es aconsejable que la saponina sea disuelta en la mitad del volumen calculado de agua destilada para entonces ser adicionado el restante convenientemente alcalinizado. Cada gramo de saponina deberá estar disuelto en un volumen final no superior a 5,6 ml. En estas condiciones la suspensión de virus permanecerá 24 horas en cámara fría.

Durante muchos años el CPFA utilizó la Saponina S.P.L. ABRAC de fabricación inglesa; actualmente, por dificultades de obtención de dicho producto, pasamos a usar la Saponina P3. Food Industries Ltd., del mismo origen, con resultados similares a la anterior. Es aconsejable mantener en cámara fría el recipiente bien cerrado conteniendo la saponina. La preparación de la solución deberá ser hecha en el momento de ser usada y en las cantidades necesarias.

#### *Inactivación por el formol*

La inactivación del virus se hace por el formol (Formalina comercial, HCHO = 37,2%) en la cantidad de 0,025%. Este deberá ser previamente diluido en agua destilada a 1:10 y adicionado, gota a gota, a la suspensión de virus agitando siempre, a temperatura ambiente, para lo cual deberá ser retirada de la cámara fría aproximadamente con 4-6 horas de antecedencia. Una vez agregado el formol se lleva a  $37^{\circ}$  C, durante 40 horas, agitándolo de 3 en 3 horas, incluso durante la noche.

### *Adsorción al hidróxido de aluminio*

Tratándose de una vacuna saponinada, el hidróxido de aluminio debe ser adicionado en menores cantidades (6), esto es, en la proporción de 40% y no 50% como en las vacunas sin saponina.

El hidróxido de aluminio, previamente esterilizado en autoclave, es adicionado al virus lentamente, agitando siempre el frasco donde se procesa la mezcla, cuyo pH final deberá ser 8,0.

Hasta el presente el hidróxido de aluminio usado en el CPFA para la fabricación de vacunas ha sido gentilmente cedido por el Ministerio de Agricultura de Brasil, en uno de cuyos servicios es preparado. Sus características, que figuran en los protocolos que acompañan el producto, se refieren al extracto seco, pH, presencia de amonio y de sulfatos. El CPFA se limita a realizar la prueba biológica del poder adsorbente del hidróxido por medio de la inoculación de ratones lactantes con el líquido sobrenadante de la reacción. Todas las partidas de hidróxido que nos fueron proporcionadas se comportaron como un producto de muy buena calidad (cuadro 1).

### *Esterilidad*

Para impedir la contaminación bacteriana se utiliza el mertiolato (Thimerosal Lilly) en la concentración de 1:10.000, referido al volumen final de la vacuna. Esta sustancia deberá ser previamente disuelta en agua destilada a 1:20.

### *Indicador del pH*

La elaboración de la vacuna finaliza con el ajuste del pH a 8,0. En las vacunas elaboradas en el CPFA se incorpora un indicador de pH (fórmula 4) capaz de evidenciar a simple vista cualquier modificación del medio. Las modificaciones por la acción del tiempo de una vacuna C<sub>3</sub> Resende muestran a 4 meses un pH 8,0, a 18 meses 7,2 y a 22 meses 7,0 (cuadro 2).

## 3. CONTROLES

### *Esterilidad*

La vacuna no debe contener gérmenes patógenos ni proteolíticos. Para verificar la esterilidad se siembra la vacuna en 5 tubos conteniendo un medio con tioglicolato en cantidades crecientes de vacuna, de 0,1 a 0,5 ml y se incuban durante una semana. Con el uso del mertiolato al 1:10.000 hemos logrado mantener la vacuna libre de gérmenes.

### *Inocuidad*

La prueba de inocuidad ideal para las vacunas contra la fiebre aftosa es la inoculación en la lengua de bovinos sensibles. Dado su elevado costo se está utilizando la inoculación en ratones lactantes.

Con las vacunas que no contienen saponina no hay grandes problemas. Pero, siendo la saponina un elemento de alto poder irritante y hasta necrosante de los tejidos, la utilización del ratón lactante para la prueba de inocuidad exige ciertos cuidados. La vacuna saponinada no puede inocularse por vía intraperitoneal y debe hacerse por vía intramuscular. Además debe ser diluída en forma de hacerla más tolerable para los tejidos. Generalmente se utiliza la dilución 1:5 en solución "buffer" y se inocular en la musculatura de la parte posterior del muslo. Los ratones lactantes deben ser de 6 días de edad y la cantidad de inóculo 0,05 ml por animal (cuadro 3).

Aunque no está precisada la cantidad de ratones a inocular para evidenciar la inocuidad de la vacuna nosotros utilizamos 100 ratones para cada 10 litros de vacuna elaborada.

Hasta el presente, en el CPFA, las vacunas son probadas también en bovinos sensibles utilizando 2 animales a los que se inocular la dosis total aconsejada para la vacunación en el campo, distribuída en 20 a 25 puntos por vía intradermolingual, juntamente con doble dosis de la vacuna por vía subcutánea. Los resultados obtenidos concuerdan con los de las pruebas en ratones lactantes. Estas pruebas comparativas tienen por finalidad acumular suficiente experiencia que nos permita prescindir de la prueba en bovinos que resulta más costosa.

Conviene destacar aquí la posible interferencia entre ambas vacunaciones en un mismo animal, ya que la inoculación de una vacuna puede provocar una aparición temprana de anticuerpos que invaliden la detección de virus en la otra. Aun cuando hasta ahora continuamos haciendo ambas inoculaciones, la experiencia nos indica la conveniencia de abandonar la inoculación subcutánea (cuadro 4).

### *Eficacia*

El método que más se ha utilizado en el CPFA (cuadro 5) es el de Henderson y Galloway (5). En los últimos años se está prestando particular atención a los métodos de Lucam (7), especialmente al denominado Índice "C" por su bajo costo ya que utiliza el cobayo como animal de prueba.

En el cuadro 6 se observan los resultados obtenidos en distintas partidas de vacunas monovalentes y trivalentes elaboradas en el CPFA así como otros detalles importantes como ser: títulos de los antígenos, tiempos de conservación, cantidades de virus de descarga, etc.

## 4. CONSERVACION Y APLICACION

Las vacunas elaboradas en el CPFA se conservan en balones en su forma monovalente, de 2° a 7° C. Cuando se necesitan vacunas bivalentes o trivalentes, se mezclan sus componentes previamente a su envase, el que se realiza en frascos de vidrio neutro color ámbar de 200 ml.

Cada dosis de vacuna monovalente está constituída por 1 ml de suspensión virulenta más 0,7 ml de los demás componentes (inactivante, adyuvante, etc.). En la práctica la aplicación fue ajustada a 2 ml por dosis monovalente; 4 ml la bivalente y 5 ml la trivalente. En todos los casos se aplica por vía subcutánea.

## 5. FORMULAS

*Fórmula 1 - Medio conservador del epitelio*

Sol. A:	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,9 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Agua destilada	800 ml
Sol. B:	CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1 g
	Agua destilada	200 ml

Mezclar la Sol. A + Sol. B, agitando siempre; ajustar el pH a 7,6 con una solución de bicarbonato de sodio al 7,5%; filtrar por filtro Seitz.

*Fórmula 2 - Antibióticos (para 1 litro de medio)*

Penicilina G potásica Squibb	100.000 unidades
Cloranfenicol	50 mg
Polimixina B, sulfato	40.000 unidades

*Fórmula 3 - Medio de cultivo*

Sol. A:	DL Metionina	0,2 g
	L Leucina	0,13 g
	DL Fenilalanina	0,05 g
	DL Triptofano	0,1 g
	L Histidina	0,038g
	Agua destilada a 50° C	20 ml
Sol. B:	NaCl	7,2 g
	CaCl <sub>2</sub>	0,18 g
	KCl	0,18 g
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,09 g
	Agua destilada	200 ml
Sol. C:	NaHCO <sub>3</sub>	1,0 g
	Peptona	3,0 g
	Glucosa	1,0 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0,417g
	Agua destilada	780 ml

Mezclar Sol. A + Sol. C agitando bien y después juntar Sol. B; ajustar el pH a 7,6 con solución de bicarbonato de sodio a 7,5%. Filtrar por filtro Seitz.

*Fórmula 4 - Indicador del pH*

Rojo fenol	0,5 g
NaOH N/20	35 ml
Agua destilada	180 ml

Filtrar por filtro Seitz. Usar 5 ml para cada litro de vacuna.



CUADRO 1

*Pruebas biológicas para medir el poder de adsorción del hidróxido de aluminio*

Hidróxido de aluminio Procedencia y fecha	Subtipo de virus	Tit./0,05 ml en RL	
		Suspensión de virus	Sobrenadante después adsorción
Perú - 1964	O <sub>1</sub>	5,66	2,00
Bolivia - 1965	O <sub>1</sub>	6,00	1,66
Brasil - 1965	O <sub>1</sub>	6,00	1,66
Brasil - 1966	O <sub>1</sub>	5,50	<2,00
Brasil - 1969	A <sub>24</sub>	5,40	<1,00
Brasil - 1970	C <sub>3</sub>	6,66	2,56

CUADRO 2

*Tiempo de validez de vacunas monovalentes hidróxido-saponinadas*

Vacuna	13 días*		4 meses*		7 meses*		18 meses*	
	Vac.	Test.	Vac.	Test.	Vac.	Test.	Vac.	Test.
A <sub>24</sub> Cruzeiro	7/8	0/4	-	-	7/7	1/4	-	-
C <sub>3</sub> Resende**	-	-	8/8	0/4	-	-	7/8	1/8

bovinos protegidos/total bovinos

\* tiempo a partir de la fecha de elaboración

\*\* 4 meses - pH 8,0; 18 meses - pH 7,2; 42 meses - pH 7,0

CUADRO 3

*Tolerancia para la vacuna hidróxido-saponinada inoculada por vía intramuscular en dosis de 0,05 ml/RL a diversas concentraciones de saponina*

Vacuna vol.	Diluyente* vol.	Dilución	Animales muertos/total
1	0	no diluída	28/40
1	1	1:2	19/40
1	2	1:3	13/40
1	3	1:4	0/40
1	4	1:5	0/40

\* solución "buffer"

CUADRO 4

*Pruebas de inocuidad de vacunas hidróxido-saponinadas inóculadas por diversas vías en bovinos*

Vacuna	Lote	Nº animal	Indices de anticuerpos en RL			
			0 días*	6 días*	9 días*	11 días**
O <sub>1</sub> Campos	266	1	0,00	-	0,00	>5,40
		2	0,25	-	0,00	2,00
C Paraguay	265	3	0,55	-	2,31	>6,15
		4	0,28	-	0,95	>6,15
O <sub>1</sub> Campos	267	5	0,00	0,40	-	4,80
		6	0,00	2,15	-	>5,40
C <sub>3</sub> Resende	268	7	1,00	3,65	-	>6,50
		8	1,00	2,74	-	>6,50
	271	9	0,70	1,34	-	>5,70
		10	0,20	3,70	-	>5,70

\* días postinoculación intradermolingual con 5 ml de vacuna

\*\* " " " " subcutánea " 10 ml " "

CUADRO 5

Pruebas de potencia de tres vacunas monovalentes inoculadas en bovinos en dosis de 2 ml, frente a la descarga de virus homólogos 10.000 DI<sub>50</sub>/RL por vía intradermolingual

VACUNA	BOVINOS	I S P				Reacciones 48 h. post descarga	ISP 35 DPV	
		0 DPV	7 DPV	14 DPV	21 a) DPV			
O <sub>1</sub> Caseros	Experimentales	0,5	0,2	3,0	2,2	L	>5,5	
		0,5	<1,0	5,2	5,3	N <sup>b)</sup>	-	
		0,5	<1,0	>5,5	>5,5	N	>5,5	
		0,2	<1,0	>5,5	>5,5	N	>5,5	
		0,0	0,7	>5,0	>5,0	N	>5,0	
		0,0	3,5	>5,0	>5,0	N	>5,0	
		0,0	<0,5	>5,0	>5,0	N	>5,0	
		0,2	>4,7	>5,7	>5,7	N	>5,7	
	Testigos	-	-	-	0,7	L4P	>5,7	
		-	-	-	0,2	L4P	>5,7	
		-	-	-	1,0	L4P	>5,7	
		-	-	-	0,0	L4P	>5,7	
	A <sub>24</sub> Cruzeiro	Experimentales	0,3	>4,8	>4,7	>4,7	N	>4,7
			1,1	3,3	>4,7	4,0	L	>4,7
0,2			1,5	>4,7	>4,7	N	>4,7	
0,8			1,7	>4,0	>4,0	N	>4,0	
0,0			2,0	>4,0	>4,0	L	>4,0	
0,5			3,1	>4,0	>4,0	N	>4,0	
0,5			0,8	>3,8	0,5	L4P <sup>c)</sup>	-	
0,0			3,3	>3,5	>3,5	N	>3,5	
Testigos		-	-	-	0,3	L4P	>3,5	
		-	-	-	0,8	L4P	>3,5	
		-	-	-	0,3	L4P	>3,5	
		-	-	-	0,0	4P	>3,5	
C <sub>3</sub> Resende		Experimentales	0,0	1,0	>5,5	>5,5	N	>6,0
			0,0	0,7	>5,5	4,8	L	>6,0
	0,0		1,0	>5,5	5,3	L	>6,0	
	0,0		0,0	4,3	2,3	N	>6,0	
	0,7		1,7	>6,2	>6,2	N	>6,0	
	0,7		2,0	>6,2	>6,2	L	>6,0	
	0,8		2,5	>6,2	>6,2	N	>6,0	
	0,7		1,7	5,0	4,2	N	>6,0	
	Testigos	-	-	-	0,8	L4P	>6,0	
		-	-	-	1,0	L4P	>6,0	
		-	-	-	0,7	L4P	>6,0	
		-	-	-	0,8	L4P	>6,0	

N - negativo      L - lesión lingual      P - lesión podal

a) Momento de la descarga.

b) Murió 3 días después de la inoculación de descarga de virus, sin síntomas aparentes de fiebre aftosa.

c) Murió 12 días después de descarga en profundo estado de desnutrición.

CUADRO 6

Pruebas de eficacia en bovinos de vacunas monovalentes  
y trivalentes hidróxido-saponinadas  
elaboradas en el CPFA

Valencia	Virus de vacuna y número de partida	Nº de pasajes Frenkel	Título /ml R.L.	F.C'	Días de conservación a 4° C	DPV	Virus de descarga 10.000 unid. R.L.	Bovinos protegidos / total	
								Vac.	Test.
MONOVALENTES	O <sub>1</sub> a) Urubamba 266	11	7,63	1:10*	56	21	O <sub>1</sub> Urubamba	8/8	0/2
	O <sub>1</sub> Caseros 239	9 10	7,30	1:6* 1:7*	10	21	O <sub>1</sub> Caseros	7/7	0/4
	O <sub>1</sub> Campos 258, 259, 260	29 27 28	7,72 7,50 7,89	1,7*	300	14	O <sub>1</sub> Guyana	5/8	0/4
	A <sub>24</sub> Cruzeiro 228	13	7,70	1:3*	13 210 210	21	A <sub>24</sub> Cruzeiro A <sub>27</sub>	7/8 7/7 7/8	0/4 1/4 1/4
	C <sub>3</sub> Resende 230	24	7,87	1:16*	120 540	21 26	C <sub>3</sub> Resende	8/8 7/8	0/4 1/8
	C <sub>3</sub> Resende 254	30	7,80	1:4*	44	26	C <sub>3</sub> Resende C <sub>4</sub> Tierra del Fuego	6/8 6/8	1/8 1/8
	C Paraguay 265	3-4-5	7,30	1:12**	21	21	C Paraguay 40.000 u.	7/7	0/2
TRIVALENTES	O <sub>1</sub> Caseros 263	7	7,30	1:7*	73		O <sub>1</sub> Caseros	9/9	0/9
	A <sub>24</sub> Cruzeiro 262	7	7,80	1:4*	73	30	A <sub>24</sub> Cruzeiro	9/9	0/9
	C <sub>3</sub> Resende 264	28	8,30	1:7*	68		C <sub>3</sub> Resende	9/9	1/9
	O <sub>1</sub> Campos 267	7-9 10-11	7,58	1:20**	210		O <sub>1</sub> Campos	4/8	1/4
	A <sub>24</sub> Cruzeiro 269	18 19	7,40	1:13**	49	21	A <sub>24</sub> Cruz. 100.000 u.	8/8	*** 2/4
	C <sub>3</sub> Resende 268	6-8 9-10	7,96	1:8**	210		C <sub>3</sub> Res. 40.000 u.	8/8	1/4

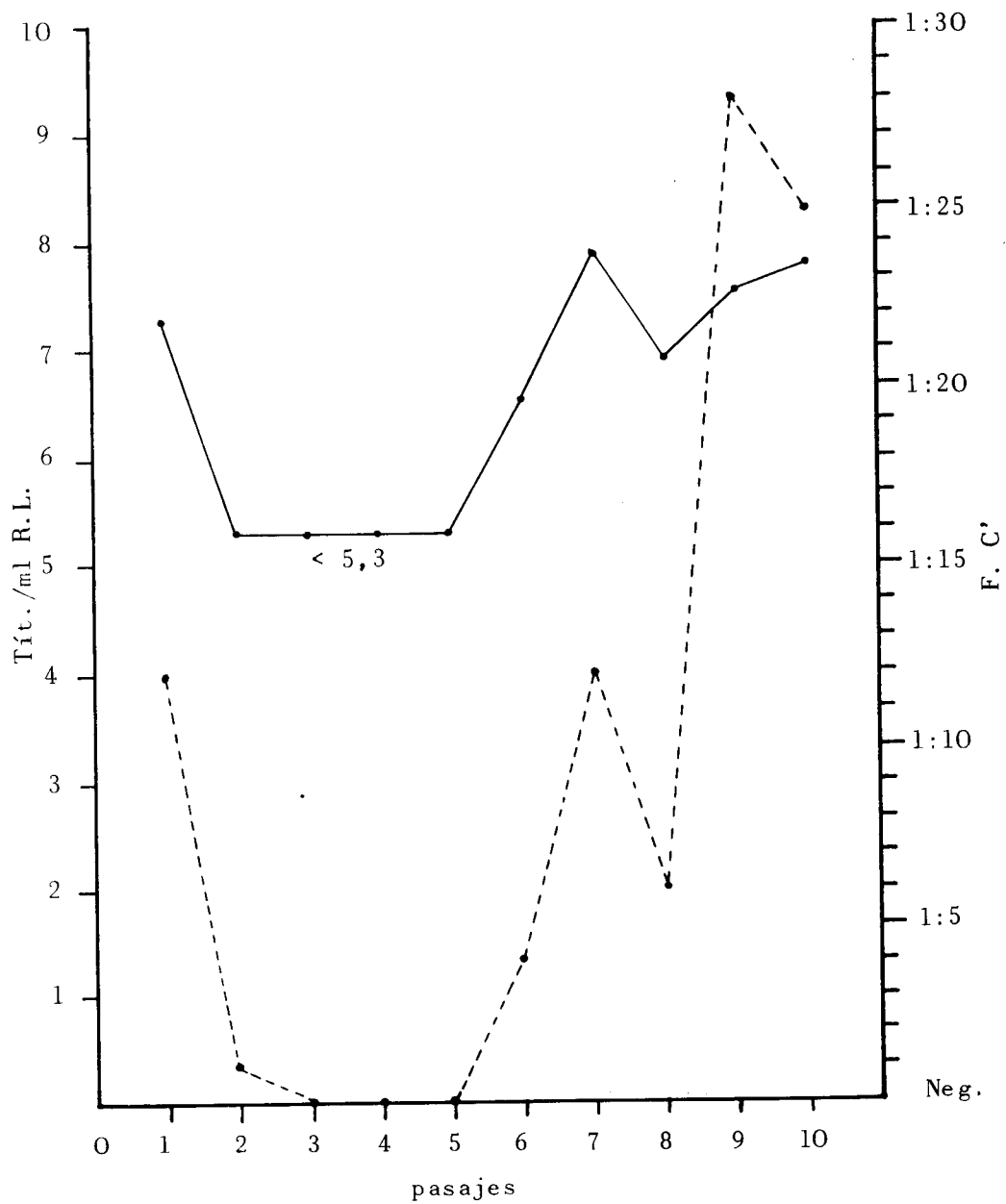
a) Vacuna preparada sólo con hidróxido de aluminio sin saponina.

\* 3HC<sub>50</sub> (unidades hemolíticas de complemento) incubación 30 minutos.

\*\* " ( " " " " " ) " 90 " (títulos 2 veces más altos).

GRAFICO 1

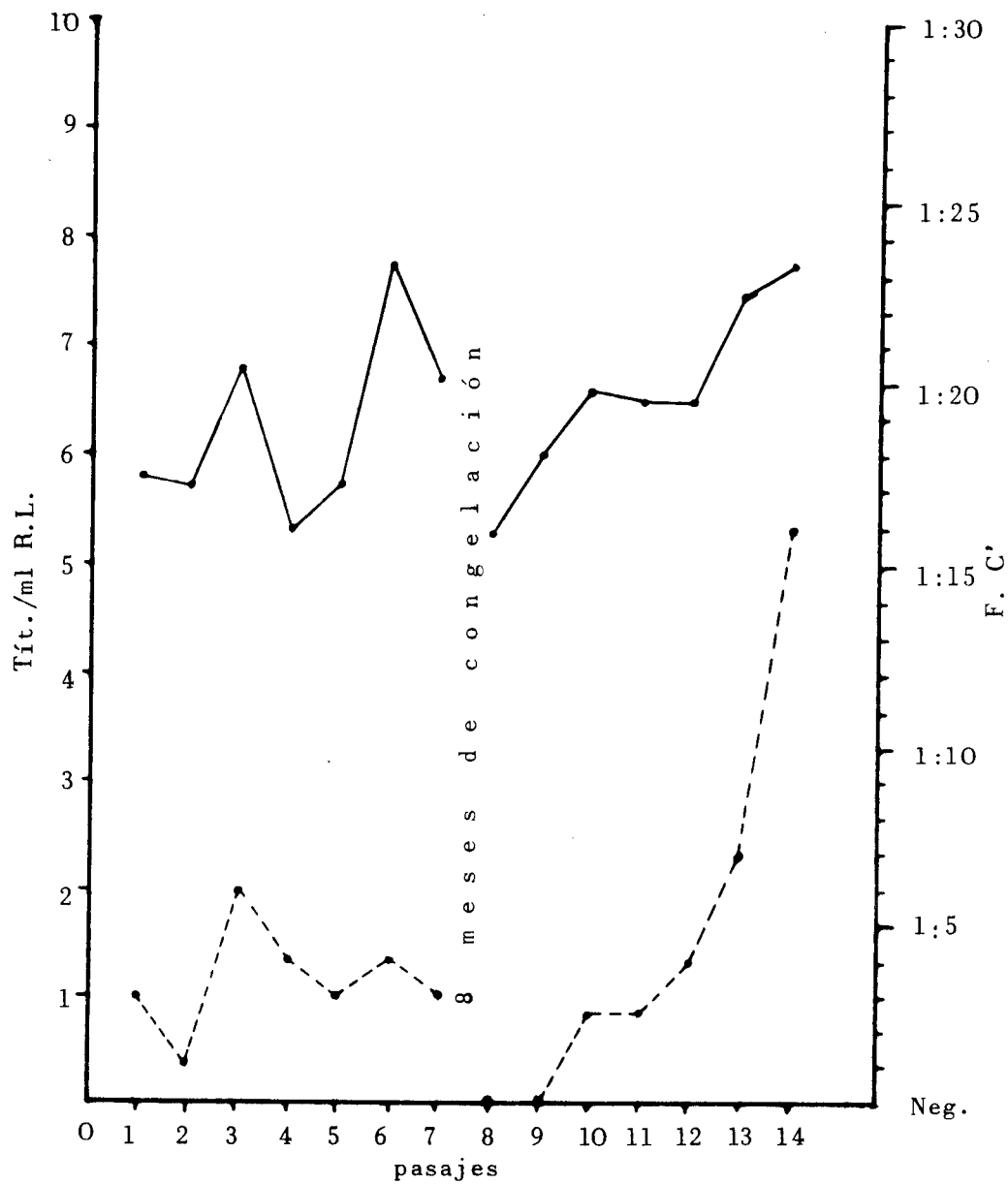
*Adaptación de la cepa O<sub>1</sub> Campos\* al método Frenkel*



— Título infeccioso  
 - - - Título fijación complemento  
 \* Semilla - 2 pasajes BHK

GRAFICO 2

Adaptación de la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro\* al método Frenkel

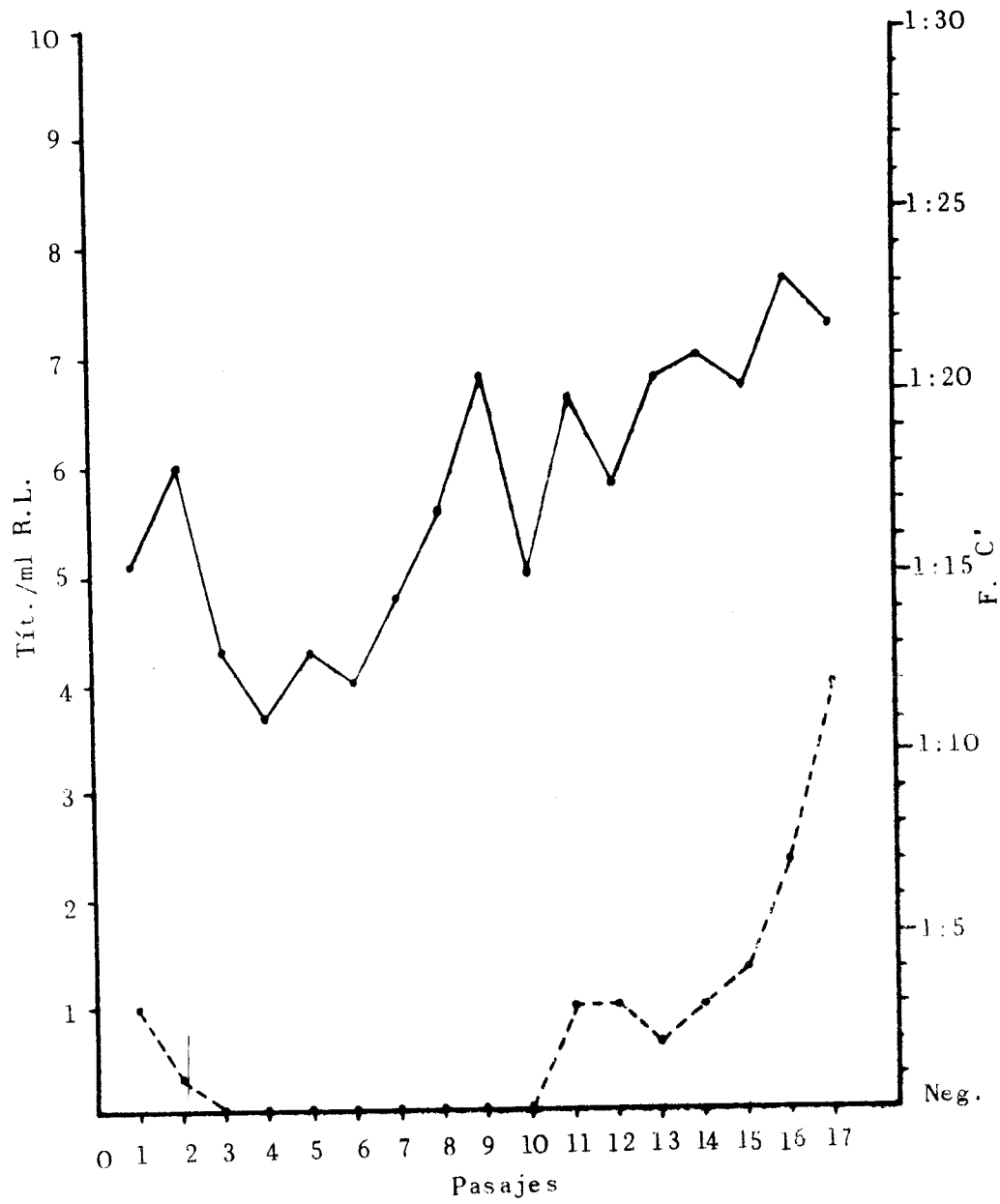


— Título infeccioso  
 - - - Título fijación complemento

\* Semilla de 6 pasajes en BHK

## GRAFICO 3

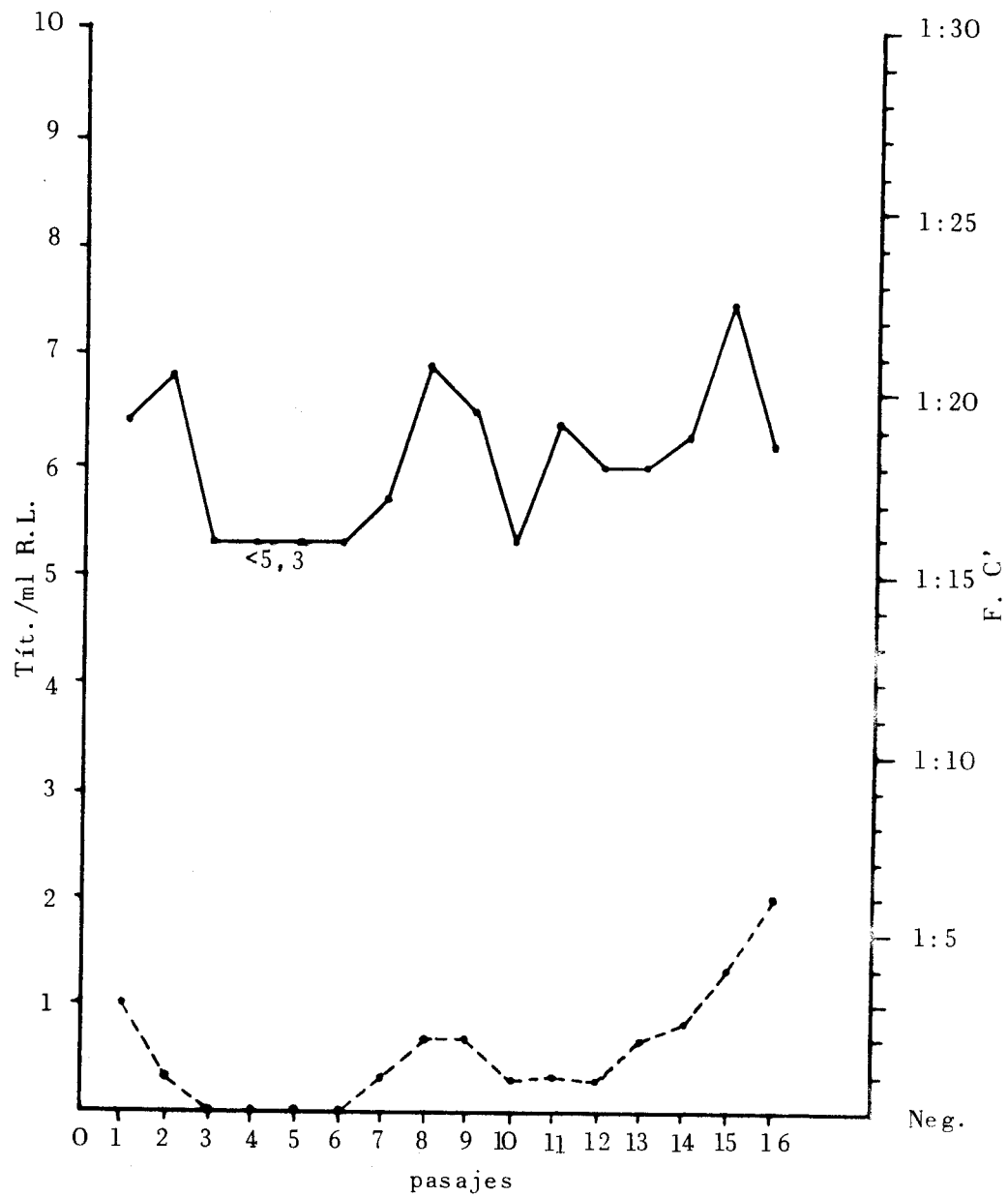
Adaptación de la cepa A Brasil 68\* al método Frenkel



— Título infeccioso  
 - - - Título fijación complemento  
 \* Semilla - 2 pasajes en BHK

GRAFICO 4

Adaptación de la cepa A Colombia 69\* al método Frenkel

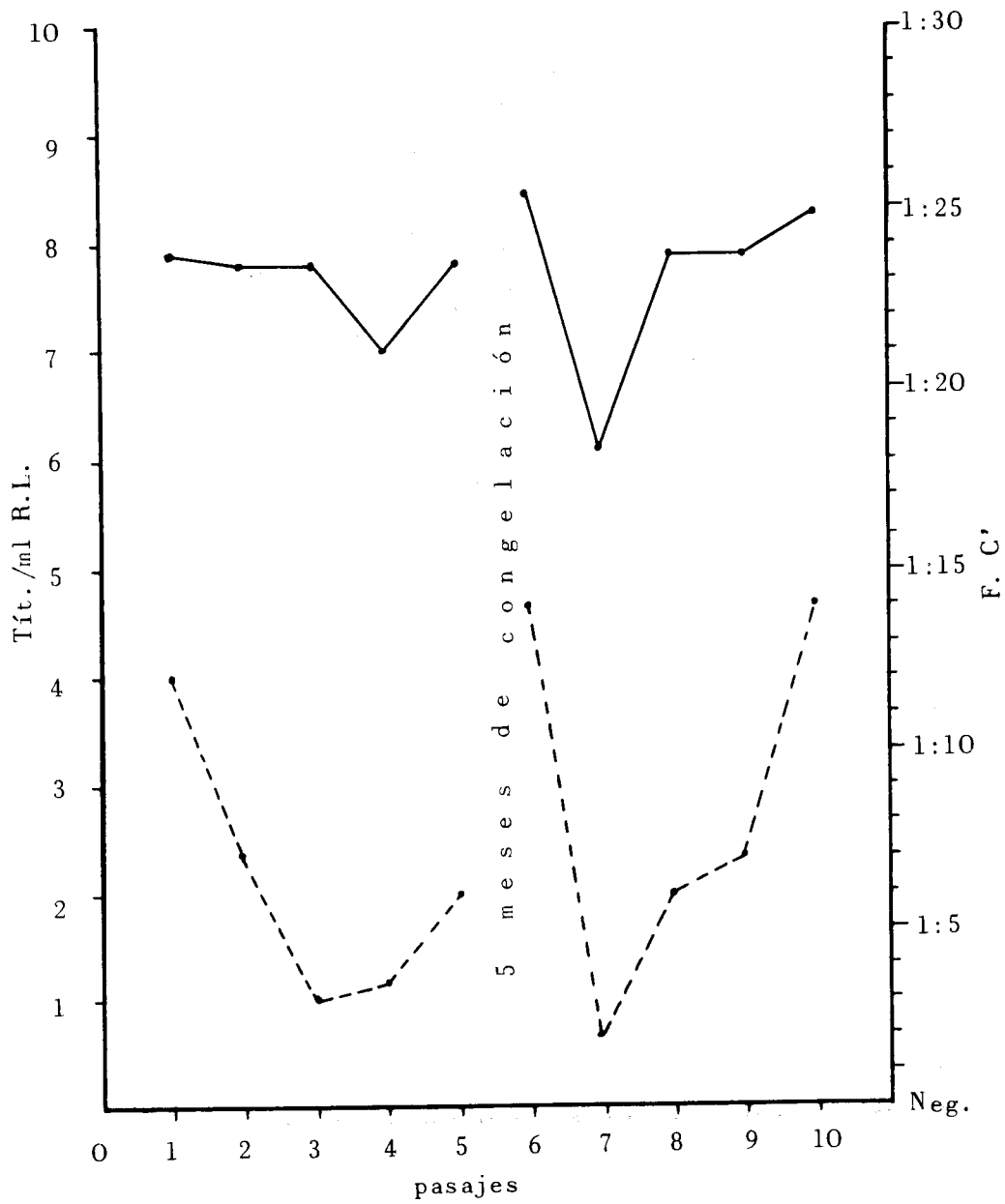


— Título infeccioso  
 - - - Título fijación complemento  
 \* Semilla - 3 pasajes BHK



## GRAFICO 5

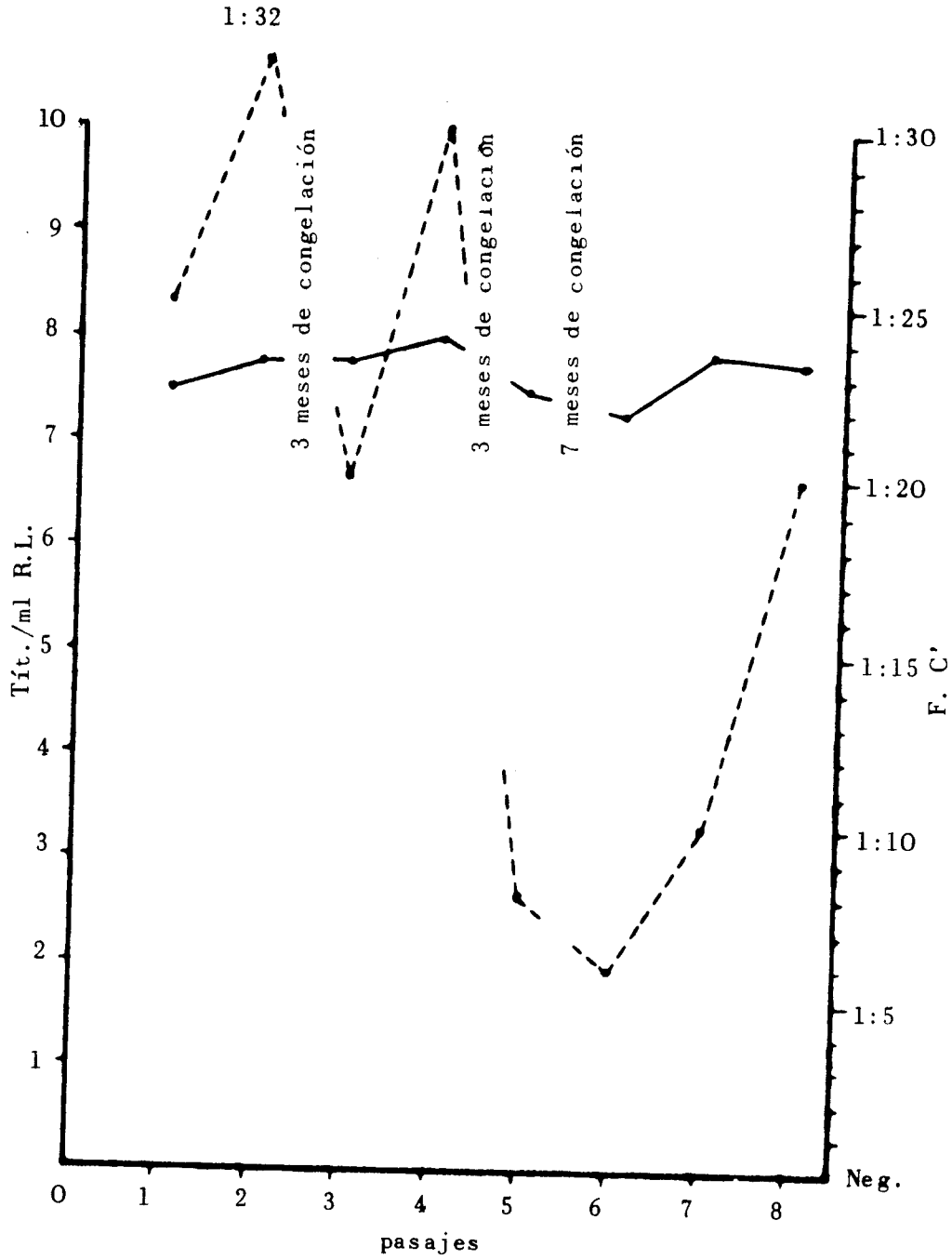
Adaptación de la cepa C<sub>3</sub> Resende\* al método Frenkel



— Título infeccioso  
 - - - Título fijación complemento  
 \* Semilla - 5 pasajes BHK

GRAFICO 6

Adaptación de la cepa C Paraguay\* al método Frenkel



— Título infeccioso

- - - Título fijación complemento

\* Semilla - 3 pasajes BHK

## 6. BIBLIOGRAFIA

- (1) ABREU MARTINS, I. de. Producción económica de virus aftoso para fabricación de vacunas por el método Frenkel. *Ciencs vet.*, México 5 (6): 489-496, 1960.
- (2) ESPINET, Roger G. Nuevo tipo de vacuna antiaftosa a complejo glucovírico. *Gac. vet.*, B. Aires 13 (74): 265-277, 1951.
- (3) FRENKEL, H.S. La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithelium de la langue des bovidés. *Bull. Off. int. Epizoot.* 28: 155-162, 1947.
- (4) FRENKEL, H.S. Research on foot-and-mouth disease. III. The cultivation of the virus on a practical scale in explantation of bovine tongue epithelium. *Am. J. vet. Res.* 12 (44): 187-190, 1951.
- (5) HENDERSON, W.M., GALLOWAY, I.A. The use of culture virus in the preparation of foot-and-mouth disease vaccine. *J. Hyg.* 51 (4): 546-558, 1953.
- (6) LEANIZ, R. y col. Nueva vacuna antiaftosa a hidróxido de aluminio-saponina. *II Congreso Nacional de Veterinaria* 2: 1-26, 1957.
- (7) LUCAM, F. y col. Le contrôle officiel français des vaccines antiaphteux. *Bull. Off. int. Epizoot.* 65 (3-4): 385-418, 1966.
- (8) PYL, G., ROEHRER, H. Methodes d'extraction et de concentration du virus aphteux. *Bull. Off. int. Epizoot.* 43: 597-605, 1955.
- (9) WALDMANN, O., KOEBE, K. Die aktive Immunisierung des Rindes gegen Maul-und- Klauenseuche. *Dt. Tierärztl.* 5 (16): 318-320, 1938.

Las pruebas de fijación de complemento y de seroprotección fueron realizadas en las secciones del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa a cargo de los Drs. K. E. Federer e Ivo Gomes, respectivamente, a quienes el autor expresa su reconocimiento.