

## EXAMEN HISTOLOGICO EN CERDOS VACUNADOS CON VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO

C. A. Mebus<sup>1</sup> & P. Augé de Mello<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se estudiaron las reacciones tisulares macroscópicas y microscópicas producidas por vacunas de emulsión primaria (agua-en-aceite) y de emulsión doble (agua-en-aceite-en-agua), aplicadas por las vías subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intraperitoneal (IP). Las gotículas de aceite de la emulsión primaria encontradas en los puntos de inoculación vía SC o IM fueron mayores que las encontradas en los puntos de aplicación de vacuna de emulsión doble. La inoculación de vacuna de emulsión primaria por vía IP produjo granulomas en la cavidad peritoneal, lo que no ocurrió con la vacuna de emulsión doble. De las dos formulaciones y las tres vías de inoculación utilizadas, la vacuna de emulsión doble y la vía IP no causaron reacciones tisulares indeseables.

### INTRODUCCION

Las vacunas contra la fiebre aftosa de tipo agua-en-aceite (emulsión primaria - EP) inducen un alto grado de protección en cerdos (1, 5, 6, 7, 8, 9). Sin embargo, la aplicación de esta vacuna en gran escala no es recomendable debido a las reacciones indeseables que aparecen en el punto de inoculación y en la región de los ganglios linfáticos (8). Estudios macroscópicos y microscópicos en cerdos tras inoculación por vía intramuscular (IM) y subcutánea (SC) de vacuna antiaftosa de EP ya fueron publicados (10).

Las vacunas de emulsión doble (ED) de tipo agua-en-aceite-en-agua, descritas por Herbert (4),

inoculadas en cerdos por vía intraperitoneal (IP) no produjeron lesiones macroscópicas significativas. Los animales tenían un alto grado de protección hasta por lo menos 4 meses después de la primovacunación (2, 3).

Este trabajo describe los resultados de exámenes histológicos de muestras colectadas de cerdos inoculados por las vías SC, IM o IP con vacuna antiaftosa de EP o de ED.

### MATERIALES Y METODOS

#### Vacunas

Las vacunas de EP y de ED fueron preparadas como ya fue descrito (2, 3). En resumen, la vacuna de EP fue elaborada usando aceite mineral<sup>3</sup> y 10% de mono-oleato de manitol<sup>4</sup> emulsificado en partes iguales con una suspensión de antígeno trivalente de la fiebre aftosa. La ED (4) consistió en la vacuna de EP reemulsificada con un volumen igual de solución buffer fosfato (SBF), pH 7,4 y 2% de polioxietileno de mono-oleato de sorbitán<sup>5</sup>.

#### Cerdos

Se utilizaron cerdos Landrace recién destetados, con un peso aproximado de 20 kg. Los animales fueron vacunados con vacuna de EP o de ED por las vías SC, IM (músculo masetero) o IP. En el experimento 1, los cerdos fueron sacrificados 30 días posinoculación (DPI) para realizar los exámenes macroscópico e histológico. El Cuadro 1 muestra el número del cerdo, el tipo y la dosis de vacuna usada, la vía de inoculación y el promedio del tamaño mayor de la gotícula. Las vacunas de EP y de ED fueron probadas por vía SC en los mismos cerdos, inoculando una dosis de cada vacuna en cada oreja.

<sup>1</sup>Plum Island Animal Disease Laboratory - USDA, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

<sup>2</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Marcol 52 - Exxon Corporation, U.S.A.

<sup>4</sup>Arlacel A - ICI American Inc. Atlas Chemical Division.

<sup>5</sup>Tween 80 - ICI American Inc. Atlas Chemical Division.

CUADRO 1. Resumen del tipo de vacuna, vía de inoculación y promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite en el punto de inoculación y en los ganglios linfáticos regionales en los animales del experimento 1

Animal	Tipo de vacuna	Vía	Dosis (ml)	Tejido	Promedio del tamaño mayor de la gotícula ( $\mu$ )	
					EP	ED
533	EP	SC <sup>a</sup>	1,5	Sitio	610	
				GL	450	
533	ED	SC <sup>b</sup>	3	Sitio		130
				GL		270
535	EP	SC <sup>a</sup>	1,5	Sitio	500	
				GL	150	
535	ED	SC <sup>b</sup>	3	Sitio		160
				GL		180
538	EP	IM	1,5	Sitio	120	
				GL	70	
539	ED	IM	1,5	Sitio	180	
				GL	130	
536	EP	IP	1,5	Varios	300	
534	ED	IP	3	Varios		40

<sup>a</sup>Oreja izquierda.

<sup>b</sup>Oreja derecha.

EP Emulsión primaria

ED Emulsión doble

IM Intramuscular

IP Intraperitoneal

SC Subcutánea

GL Ganglio linfático regional

Sitio Sitio de inoculación

En el experimento 2, los cerdos fueron divididos en cuatro grupos de 10 animales cada uno. Cada grupo fue vacunado por vía SC con vacuna de EP o por vía SC, IM o IP con vacuna de ED respectivamente. La resistencia al virus de la fiebre aftosa fue comprobada a los 110 DPI por exposición por contacto en 4 cerdos sin vacunar, inoculados por vía intraplantar con  $10^{4,6}$  DL<sub>50</sub>% ratón lactante de virus O<sub>1</sub> Campos y fueron sacrificados a los 140 DPI. Todos los cerdos fueron examinados en el sitio de inoculación para constatar la existencia de macrolesiones. De cada grupo se seleccionaron dos cerdos al azar y se tomaron muestras para realizar estudios aná-

tomo-patológicos. El Cuadro 2 resume el tipo y la dosis de vacuna e incluye el número del cerdo, la vía de inoculación y el promedio del tamaño mayor de la gotícula. Las pruebas serológicas y de desafío se informaron en otro trabajo (2).

#### Colecta de muestras y examen histológico

En ambos experimentos se colectaron muestras en los puntos de inoculación y de los ganglios linfáticos regionales de los cerdos inoculados por vía SC o IM. En el experimento 1, de los cerdos inoculados por vía IP fueron colectadas todas las lesiones y varios ganglios linfáticos de la cavidad

CUADRO 2. Resumen del tipo de vacuna, vía de inoculación y promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite en el punto de inoculación y en los ganglios linfáticos regionales de animales seleccionados en el experimento 2 para evaluación histológica

Animal	Tipo de vacuna	Vía	Dosis (ml)	Tejido	Promedio del tamaño mayor de la gotícula ( $\mu$ )	
					EP	ED
1	EP	SC	1,5	Sitio	ND	
				GL	80	
2	EP	SC	1,5	Sitio	430	
				GL	350	
11	ED	SC	3	Sitio		134
				GL		39
12	ED	SC	3	Sitio		90
				GL		40
28	ED	IM	3	Sitio		220
				GL		68
29	ED	IM	3	Sitio		120
				GL		46
37	ED	IP	3	Varios		0
38	ED	IP	3	Varios		0

EP Emulsión primaria  
 ED Emulsión doble  
 IM Intramuscular  
 IP Intraperitoneal  
 SC Subcutánea  
 GL Ganglio linfático regional  
 ND No disponible  
 Sitio Sitio de inoculación

peritoneal y del bazo. En el experimento 2, de los cerdos inoculados por vía IP se tomaron muestras de los ganglios linfáticos mesentéricos, bazo, páncreas, riñón e hígado. Previa fijación en solución buffer de formalina al 10% e inclusión en parafina, los tejidos fueron cortados en secciones de  $6\mu$  y coloreados con solución Mayer de hematoxilina-eosina phylloxine B.

Las lesiones en cortes de los tejidos fueron fotografiadas y en cada foto se midieron los 5 espacios claros correspondientes a las gotículas de aceite. Si se tomó más de una diapositiva o foto de una muestra, el promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite de todas las fotografías fue considerado.

## RESULTADOS

### Experimento 1

#### *Pruebas preliminares de vacunas oleosas de EP o de ED para cerdos*

El Cuadro 1 resume los resultados. Los resultados histológicos en el cerdo 533 en los sitios de inoculación vía SC de 1,5 ml de vacuna de EP o de 3 ml de ED, y en los respectivos ganglios linfáticos fueron similares, con excepción del tamaño de las gotículas de aceite. El promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite de la vacuna de EP fue cuatro veces mayor que el promedio de las gotículas de vacuna de ED. El punto de inoculación de vacuna de EP estaba formado por granulomas separados por tabiques de tejido conjuntivo. Los

granulomas menores tenían una gotícula de aceite en el centro rodeada de células gigantes, después macrófagos y luego una capa de fibroblastos. Los granulomas mayores tenían un área de linfocitos entre los macrófagos y el tejido conjuntivo. Las lesiones en los ganglios linfáticos correspondientes a los sitios de inoculación de vacunas de EP y de ED tenían numerosas figuras mitóticas. Las áreas subcapsular y paratrabecular de los nódulos tenían una gran reacción granulomatosa -macrófagos y células gigantes- y numerosas gotículas de aceite. Las gotículas mayores en los nódulos linfáticos correspondientes al punto de inoculación de vacuna de EP estaban rodeadas de células gigantes y algunos leucocitos neutrófilos.

En el cerdo 535, los resultados de los estudios histológicos de los puntos de inoculación por vía SC de 1,5 ml y de 3 ml de vacunas de EP y de ED, respectivamente, fueron diferentes del animal anterior. En el cerdo 535 los puntos de inoculación estaban rodeados por tejido conjuntivo denso en el cual se encontraban pequeños granulomas. El centro de ambos puntos contenía tejido granulomatoso necrosado y gotículas de aceite. El punto de inoculación de vacuna de ED también presentaba 2 pequeñas rosetas. El tamaño medio de las gotículas mayores de aceite en el punto de EP fue cerca de 3 veces mayor que en el punto de ED. El aspecto histopatológico de las lesiones de los ganglios linfáticos fue similar al del cerdo 533.

Estudios histológicos del punto de inoculación vía IM de 1,5 ml de vacuna de EP en el cerdo 538 revelaron numerosos granulomas pequeños, muchos de los cuales contenían una pequeña gotícula de aceite. En el ganglio linfático regional de este animal, las células reticulares en las áreas subcapsular y paratrabecular eran hiperplásticas y estas áreas contenían numerosos granulomas diseminados y pequeñas gotículas de aceite. En el cerdo 539, el punto de inoculación de 1,5 ml de vacuna de EP consistió de una masa de tejido conjuntivo granulomatoso encapsulado y gotículas de aceite. Las 5 gotículas de aceite mayores en el punto de inoculación tenían un promedio de 180  $\mu$ . Los ganglios linfáticos regionales de este cerdo presentaban granulomas, 3 de los cuales tenían leucocitos neutrófilos alrededor de las gotículas de aceite y varios granulomas tenían centros necróticos.

El cerdo 536 inoculado por vía IP con 1,5 ml de vacuna de EP tenía granulomas bien desarrollados en la cápsula del bazo y mesenterio del intestino delgado y colon. Histológicamente los granulomas del bazo fueron típicos a los encontrados en otras superficies serosas. De afuera hacia adentro, los granulomas tenían una cápsula de tejido conjuntivo; una capa de células epitelioideas en la cual habían algunos policariocitos pequeños y gotículas de aceite; una capa de células inflamatorias, siendo la mayoría leucocitos neutrófilos, muchos de los cuales eran necróticos, y el centro estaba formado por células epitelioideas azuladas-purpúreo (necróticas) y gotículas de aceite (Fig. 1). El promedio del tamaño de las gotículas mayores en los granulomas de la cavidad peritoneal fue de 300  $\mu$ .

El cerdo 534 inoculado por vía IP con 3 ml de vacuna de ED tenía una pequeña área granulomatosa en el mesenterio colónico que contenía pequeñas gotículas de aceite. El promedio del tamaño de las gotículas mayores fue de 40  $\mu$ .

## Experimento 2

### *Comparación de las vacunas de EP y de ED para cerdos*

La dosis de 1,5 ml de vacuna de EP inoculada por vía SC en el cerdo N° 1 aparentemente se depositó en el ganglio linfático, y por esta razón fue el único punto que presentó reacción. El estudio histopatológico reveló que el ganglio linfático regional contenía una gran área necrosada, nódulos granulomatosos, algunos de los cuales tenían un centro necrótico, y moderada hiperplasia subcapsular y paratrabecular de células reticulares. El promedio del tamaño de la gotícula mayor de aceite en el ganglio linfático fue de 80  $\mu$ .

El punto de inoculación del cerdo N° 2, que recibió 1,5 ml de vacuna de EP por vía SC presentaba el siguiente resultado histológico de afuera hacia adentro: una cápsula de tejido conjuntivo, tejido granulomatoso, y un centro necrótico que contenía gotículas grandes de aceite. El promedio del tamaño de las gotículas mayores fue de 430  $\mu$  (Fig. 2). Un corte del tejido del ganglio linfático regional presentaba granulomas en el cortex. Un nódulo granulomatoso contenía una gotícula grande de aceite y otros , pequeñas gotículas. El

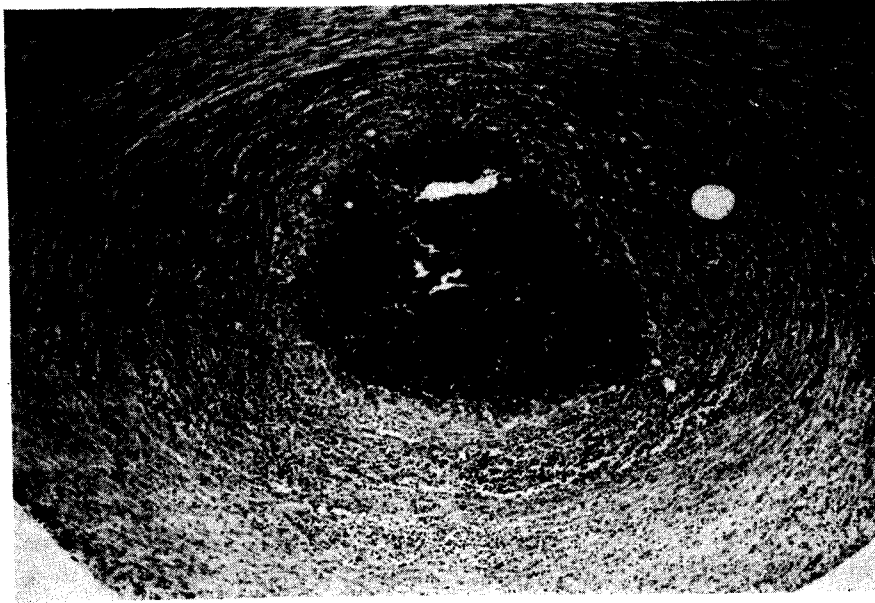


FIGURA 1. Granuloma en la cápsula del bazo del cerdo 536 inoculado por vía intraperitoneal con 1,5 ml de vacuna de emulsión primaria. H + E aumentado 70 veces.

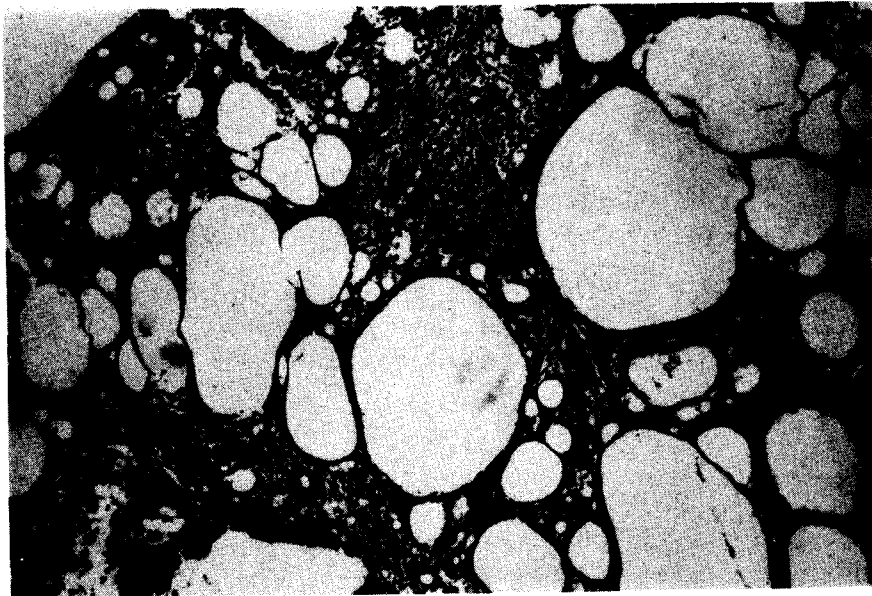


FIGURA 2. Gotículas grandes de aceite en el punto de inoculación vía subcutánea de 1,5 ml de vacuna de emulsión primaria en el cerdo 2. H + E aumentado 58 veces.

promedio del tamaño de las gotículas mayores fue de 350  $\mu$ .

Los puntos de inoculación de los cerdos 11 y 12, inoculados por vía SC con 3 ml de vacuna de ED tenían numerosos nódulos granulomatosos separados por tejido conjuntivo. Los nódulos granulomatosos tenían pequeñas gotículas de aceite (Fig. 3). Los promedios de los tamaños de las gotículas mayores fueron de 134 y 90  $\mu$ , respectivamente. El ganglio linfático regional en el cerdo 11 tenía hiperplasia subcapsular y paratrabeccular de células reticulares, pequeñas gotículas de aceite y un nódulo granulomatoso subcapsular. El promedio de las gotículas mayores fue de 39  $\mu$ . En el cerdo 12, el ganglio linfático regional tenía hiperplasia subcapsular y paratrabeccular de células reticulares y en el corte fueron encontradas 2 gotículas de aceite.

El cerdo 28 tenía en el punto de inoculación, vía IM de 3 ml de vacuna de ED, una gran área granulomatosa conteniendo varias gotículas de aceite en el tejido conjuntivo adyacente al músculo. El perimisiso fue infiltrado por tejido conjuntivo difu-

fuso y tejido nodular granulomatoso que contenía varias gotículas pequeñas de aceite (Fig. 4). El promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite fue de 220  $\mu$ . El punto de inoculación vía IM de 3 ml de vacuna de ED en el cerdo 29 tenía el perimisiso infiltrado por tejido conjuntivo difuso y tejido nodular granulomatoso que contenía numerosas gotículas de aceite. El centro de una gran área granulomatosa estaba necrosado. El promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite fue de 120  $\mu$ . El ganglio linfático regional en ambos cerdos tenía hiperplasia subcapsular y paratrabeccular de células reticulares, nódulos granulomatosos diseminados, y gotículas de aceite (Fig. 5). El promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite en el ganglio linfático regional de los dos cerdos fue de 60 y 46  $\mu$ , respectivamente.

Los cerdos 37 y 38 inoculados por vía IP con 3 ml de vacuna de ED tenían en la cápsula del bazo algunas pequeñas saliencias de tejido conjuntivo con apariencia vellosa. Un corte del ganglio linfático mesentérico del cerdo 38 mostró hiperplasia en las células reticulares.

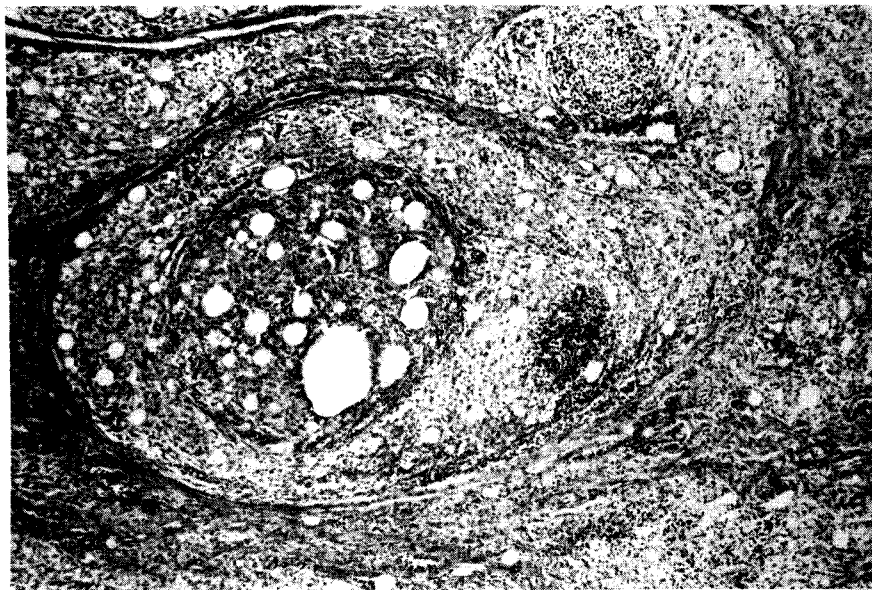


FIGURA 3. Nódulos granulomatosos y pequeñas gotículas de aceite en el punto de inoculación vía subcutánea de 3 ml de vacuna de emulsión doble en el cerdo 11. H + E aumentado 70 veces.



FIGURA 4. *Reacción granulomatosa y pequeñas gotículas de aceite en el punto de inoculación vía intramuscular de 3 ml de vacuna de emulsión doble en el cerdo 28. H + E aumentado 80 veces.*

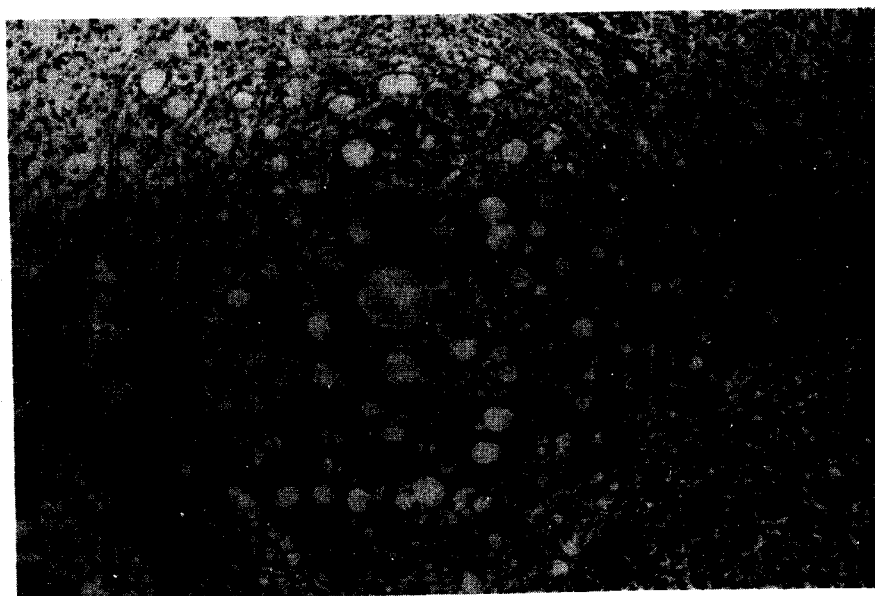


FIGURA 5. *Reacción granulomatosa y pequeñas gotículas de aceite en el ganglio linfático regional del cerdo 28 inoculado por vía intramuscular con 3 ml de vacuna de emulsión doble. H + E aumentado 158 veces.*

## DISCUSION

En el experimento preliminar, el promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite en los puntos de inoculación de vacuna de EP fue mayor que en los puntos de inoculación de vacuna de ED. La necrosis en los puntos de inoculación vía SC de vacuna de EP y de ED en el cerdo 535 podría haber resultado tanto por el acúmulo de gotículas de aceite en las áreas de inoculación vía SC como por una reacción desfavorable del animal. La reacción granulomatosa en los puntos de inoculación vía IM de vacuna de EP, aunque satisfactoria desde el punto de vista de producción de antígeno fue estéticamente indeseable en animales destinados al consumo, y probablemente podría ser confundida con un granuloma resultante de una infección. La diferencia más pronunciada en la reacción de vacuna de EP y de ED ocurrió con la vía de inoculación IP. Los grandes granulomas en la cavidad peritoneal de los cerdos inoculados con vacuna de EP fueron estéticamente indeseables y podrían ser confundidos con infecciones. Al contrario, la vacuna de ED provocó un pequeño granuloma en uno o dos cerdos inoculados por vía IP.

La reacción tisular estéticamente más aceptable de la vacuna de ED en el experimento preliminar resultó de estudios más extensos que consistieron en un mayor número de cerdos, comparación de los títulos de seroneutralización, eficacia de protección y examen histológico de los puntos de inoculación. Como se informó previamente, los títulos de seroneutralización y los resultados a la protección de las vacunas de EP y de ED y las vías de inoculación fueron similares. La mayoría de los animales vacunados desarrolló lesiones vesiculares, pero muchas de ellas fueron leves, y los animales no aparentaron sufrir y se movían con facilidad. Cualquier pérdida económica podría haber sido mínima (2). La necrosis también apareció en los puntos de inoculación vía SC de vacuna de EP pero no de vacuna de ED. Puesto que hubo una diferencia significativa en el promedio del tamaño de la gotícula mayor de aceite entre las dos vacunas, se sospechó que gotículas mayores de aceite en el punto de inoculación vía SC podrían ocasionar necrosis. En el experimento 2, la ausencia total de reacciones macro o microscópicas en los cerdos

inoculados por vía IP fue similar a la observada en el experimento preliminar.

De las dos formulaciones y de las tres vías de inoculación ensayadas, la inoculación vía IP de vacuna de ED probó ser más satisfactoria porque indujo protección y produjo lesiones macro y microscópicamente insignificantes. Estudios posteriores de este método de vacunación confirmaron estos resultados (3). Por tanto, la vacuna de ED aplicada por vía IP demostró ser el mejor método para inmunizar cerdos contra la fiebre aftosa.

## REFERENCIAS

1. ANDERSON, E.C. Some observations on the serological response of pigs to emulsified foot-and-mouth disease vaccine. Report of the meeting of the Research Group on the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Brescia, Italy, Sep. 24-26, 177-190, 1969.
2. AUGE DE MELLO, P. & GOMES, I. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
3. AUGE DE MELLO, P., GOMES, I., ALONSO FERNANDEZ, A., MASCARENHAS, J.C. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. II. Vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con emulsión doble. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 31-32: 13-19, 21-28, 1978.
4. HERBERT, W.J. Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet* (2): 771, 1965. *Foot-and-mouth Dis. Bull.* 8 (3): 1969.
5. McKERCHER, P.D. & GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and nontreated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 39-53, 1967.
6. McKERCHER, P.D. & GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: 165-176, 1969.
7. McKERCHER, P.D. & MORGAN, D.O. Immune



- 
- response of swine to revaccination with an oil adjuvant foot-and-mouth disease virus vaccine. Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee held at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italy, 1969.
8. McKERCHER, P.D., GRAVES, J.H. *et al.* Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 19-20: 24-30, 1975.
  9. McKERCHER, P.D. & BACHRACH, H.L. A foot-and-mouth disease vaccine for swine. *Can. J. comp. Med.* 40 (1): 67-74, 1976.
  10. McKERCHER, P.D., GAILIUNAS, P., BURROWS, R., CAPSTICK, P.B. Reaction of swine to oil-adjuvanted inactivated foot-and-mouth disease virus vaccine inoculated by intramuscular and subcutaneous routes. *Arch. ges. Virusforsch.* 35, 364-377, 1971.