



COMPARACION DE TRES CEPAS DE VIRUS "A" USADAS EN LA ELABORACION DE VACUNA ANTIAFTOSA EN URUGUAY

¹Ing. Qco. Miguel A. Zunino
²Dr. Roberto Ferrari
²Dr. Héctor E. Rosso

RESUMEN

En el presente trabajo se hace un estudio inmunológico de tres cepas de virus A con los siguientes propósitos: a) confirmar y cuantificar las diferencias inmunológicas entre la cepa de virus de campo (A87) y la cepa corrientemente usada en la fabricación de la vacuna (A24), b) dilucidar las relaciones inmunológicas entre la cepa de virus actuante en 1981 (A81) y la reciente (A87), c) intentar una ubicación taxonómica del virus A 87.

INTRODUCCION

Entre los meses de mayo y agosto de 1987 se presentó en el Uruguay una epidemia de Fiebre Aftosa causada por un virus tipo "A" de esta enfermedad, caracterizado inicialmente como A Argentina 81 y rápidamente denominado A87. Esta onda epizootica provenía de la Provincia de Entre Ríos (Argentina) y se extendió por todo el Uruguay para luego difundirse en el Estado de Río Grande do Sul (Brasil).

A solicitud de D.I.L.F.A. los laboratorios productores prepararon vacuna monovalente para proceder a una vacunación masiva de emergencia, para lo cual se usó una cepa de virus suministrada por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (C.P.F.A.) que se denominó A87 Castellanos, y que seguiremos llamando simplemente A87.

También en el año 1981 habían aparecido algunos focos de Aftosa producidos por el virus A Argentina 81 y en ese momento se había preparado vacuna con una cepa que en el Uruguay se denominó A 158, pero que no era más que el A81 recién mencionado.

Es importante tener presente que en todas estas circunstancias se mantuvo el uso de una vacuna trivalente básica cuya composición respondía a la problemática epidémica regional y que contenía los tres tipos de virus generalmente actuantes re-

¹ Coopers Uruguay S.A., Montevideo - Uruguay.
DMV - Coopers Uruguay S.A., Montevideo - Uruguay

presentados por aquellas de sus cepas que pueden dar la mayor cobertura inmunológica. Es así que para el tipo "A" esta cepa básica recomendada por el C.P.F.A es el A24 Cruzeiro. Las alteraciones circunstanciales de esta modalidad consistieron, como ya se dijo, en la aplicación de una vacuna monovalente con el virus de campo y/o la adición de este virus a la mencionada vacuna básica.

En el presente trabajo se hace un estudio inmunológico comparativo de esas 3 cepas de virus con los siguientes propósitos: a) confirmar y cuantificar las diferencias inmunológicas entre la cepa de virus de campo (A87) y la cepa de virus corrientemente usada en la fabricación de vacuna (A24), b) dilucidar las relaciones inmunológicas entre la cepa de virus actuante en 1981 (A81) y la reciente (A87) c) intentar una ubicación taxonómica del virus A87.

MATERIALES Y METODOS

Vacunas.

El experimento se hizo con vacunas hidroxí-saponinadas en las que los antígenos habían sido producidos en células BHK21 en suspensión e inactivados con BEI. Los demás detalles de formulación de esas vacunas son los que habitualmente corresponden a vacunas comerciales corrientes. De dichas vacunas importa señalar que tenían las siguientes características:

<u>Vacuna N°</u>	<u>Cepa de A</u>	<u>Tipo de vacuna</u>
1	A 81	Trivalente
2	A 81	Monovalente
3	A 24	Trivalente
4	A 24	Monovalente
5	A 87	Monovalente
6	A 87	Monovalente

Animales y sueros

Se vacunaron bovinos de 18 a 20 meses de edad no vacunados previamente y que no habían tenido ningún contacto con el virus. La dosis fue de 5 ml. para las trivalentes y 2 ml. para las monovalentes.

Las muestras de sangre de esos animales se extrajeron a los 0 y 21 días post-vacunación (DPV). Los sueros de A24 y A87 se obtuvieron recientemente, en tanto que los de A81 provienen de nuestro banco de sueros.

Pruebas

La evaluación de anticuerpos específicos en los sueros fue hecha mediante pruebas de seroneutralización por inhibición metabólica ("micro-color-test") (1) y pruebas de micro-neutralización bidimensional (4). En todos los casos las determinaciones fueron hechas por duplicado.

Es oportuno recordar que se denomina título seroneutralizante al logaritmo decimal de la inversa de la dilución del suero capaz de neutralizar 100 dosis infectantes de virus.

Cálculos

Los valores de "r" son el cociente de la protección obtenida frente al virus heterólogo y la protección obtenida frente al virus homólogo (2,3,4,5) lo cual puede expresarse de la siguiente manera:

$$r = \frac{\text{Título frente al heterólogo}}{\text{Título frente al homólogo}}$$

Estos valores de "r" muestran la relación inmunológica entre cepas de virus y como esta relación puede ser asimétrica el cálculo se hace en ambos sentidos obte-

niéndolo así valores de r_1 y r_2 . Esta relación es la más adecuada para conocer la protección que se puede esperar de una cepa de virus de vacuna frente a otra cepa de virus de campo.

En cuanto a "R" se la define como la media geométrica de los valores de r_1 y r_2 , es decir, en los dos sentidos posibles. Se expresa porcentualmente y se calcula entonces según la siguiente ecuación:

$$R = 100\sqrt{r_1 \times r_2}$$

El valor de "R" expresa una relación de parentesco y, por lo tanto, tiene un significado meramente taxonómico.

Resultados

Aunque no se transcriben los correspondientes valores, se verificó que los títulos seroneutralizantes de los sueros obtenidos a 0 DPV eran lo suficientemente bajos como para demostrar que los animales usados no habían tenido contacto previo con el virus.

En las tablas N° 1 y 2 se pueden observar los promedios de los resultados de la seroneutralización mientras que en la tabla N° 3 están los resultados de la microneutralización bidimensional que se realizó, no individualmente, sino sobre un "pool" de sueros para cada una de las vacunas N° 1, 4 y 5. Obviamente, en todos los casos se trata de sueros obtenidos a los 21 DPV.

En la tabla N° 4 se encuentran ya calculados los valores de "r" para cada experimento y en la tabla N° 5 están los promedios de los valores de "r" de las tres pruebas.

Por último, en la tabla N° 6 se resumen los valores de "R" que, como se dijo están expresados como porcentajes.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Antes de entrar a su discusión, es necesario hacer algunas consideraciones acerca de la significación estadística de los resultados obtenidos.

Diversos autores (2, 3, 5, 6) han estudiado la influencia que el error experimental de los métodos usados tiene sobre la precisión de los resultados. Rweyamamu y colaboradores (5) sostienen que, para experimentos no más que duplicados o triplicados, sólo se pueden considerar significativamente diferentes de 1.0, al nivel 95% de probabilidad ($p < 0.05$), aquellos valores de "r" que sean menores que 0.20. Aceptando esta propuesta, se ha procedido a la siguiente discusión de los resultados consignados en las tablas N° 1 al 5.

Del examen de las tablas N° 4 y 5, surge con claridad que las cepas A81 y A87 tienen idéntico comportamiento inmunológico cuando se enfrentan entre sí por cuanto "r" es siempre prácticamente igual a 1.0. En relación con la comparación de estas cepas con el A24 los resultados son menos claros. Las vacunas hechas con A81 y con A87 muestran, frente al virus A24, unos valores de "r" (0,29 y 0,28 respectivamente) muy cercanos a los límites de significación. En otras palabras, la probabilidad de que sean diferentes es menor que el nivel generalmente aceptado (95%) pero también resulta claro que alguna diferencia inmunológica existe entre ellas en virtud de la marginalidad de los valores antes mencionados.

De cualquier manera, esta situación (vacunas A81 y A87, virus A24) tiene, para nuestras circunstancias, una vigencia menor.

Más importante es, en cambio, la relación "r" para la vacuna A24 y los virus A81 y A87. En el primer caso se observa que en dos de los tres experimentos y en el promedio, ese valor de $r = 0.19$ está indicando que la diferencia es significativa o sea que la protección del A24 frente al A81, si la hubiera, sería sólo parcial.

Curiosamente esa misma vacuna de A24 frente al virus A87 muestra un valor de "r" que en ningún caso es tan bajo como para asegurar una probabilidad del 95% de que las cepas sean completamente diferentes. Evaluar lo que representa ese valor $r = 0.35$ no

era prácticamente posible cuando se hizo este trabajo ya que el único camino a seguir para ello hubiera sido un número considerablemente mayor de experimentos para que así, menores diferencias tuvieran mayor significación estadística. Analizando estos resultados con un criterio práctico, es posible pensar que la vacuna de A24 podría dar una protección parcial en situación de primovacunación y una protección francamente buena en animales re-vacunados. Algunas experiencias prácticas que se conocieron parecerían reforzar esta posición.

Queda sin explicar porqué si los virus A81 y A87 no aparecen como significativamente diferentes entre sí, su comportamiento frente a la vacuna con A24 podría ser distinto. Seguramente, un mayor número de experimentos que redujera la influencia del error experimental dilucidaría esta cuestión.

En cuanto a la simetría de las relaciones y el subsecuente concepto de la dominancia (3), es interesante observar cómo se disponen los resultados obtenidos y resumidos en la tabla N° 5.

Suero A24 / Virus A81 (r1) : 0.19

Suero A81 / Virus A24 (r2) : 0.29

Suero A24 / Virus A87 (r1) : 0.35

Suero A87 / Virus A24 (r2) : 0.28

Considerando el error experimental implícito en las condiciones de éste trabajo (sólo duplicados), estas relaciones son prácticamente simétricas lo cual excluiría la posibilidad de alguna dominancia.

Finalmente, y a través del examen de la tabla N° 6, se puede pensar que los virus A87 y A81, especialmente éste último estarían cerca de constituir un sub-tipo diferente del A24. Este concepto estaría más firmemente avalado, aún, por los valores de "r" en ambas direcciones (3).

SUMMARY : COMPARISON OF THREE STRAINS OF VIRUS USED IN THE PRODUCTION OF FOOT AND MOUTH VACCINES IN URUGUAY.

In this paper an immunologic study of three strains of virus A with the following purposes is presented: a) the immunological differences between field strain of the virus (A87) and the strain used in the production of the vaccine (A24) is confirmed and quantified, b) the immunologic relationships between the virus strain acting in 1981 (A81) and the recent one (A87) are elucidated, c) a taxonomic ubiquation of virus A87 is intended.

BIBLIOGRAFIA

1. MARTIN W.B. and CHAPMAN W.G. "The tissue colour test for assaying the virus and neutralizing antibody of foot and mouth disease and its application to the measurement of immunity in cattle". Res. Vet.Sci (1961), 2, 53-61.
2. MOREAU Y., STELLMAN C., BRUN A., LOMBARD M., and MOUSSA A. "Classification des souches de virus aphteux selon un modele parenté dominance pour une meilleure compréhension du concept de sous-type sérologique et immunologique". Develop. Biol. Standard, (1977), 35, 195-203.
3. PEREIRA H.G. "Subtyping of foot-and-mouth disease virus". Develop. Biol. Standard., (1977), 35, 168-174.
4. RWEYEMAMU M.M., BOOTH J.C., HEAD M. and PAY T.W.F.. "Microneutralization test of serological typing and subtyping of foot andmouth disease virus strains. J. Hyg., Camb. (1978), 81, 107, -123
5. RWEYEMAMU M.M. and PAY T.W.F. "Studies on foot andmouth disease virus strain A Morocco 5/77". Bull, Off. Int. Epiz., (1978), 89 (11-12) 861-875.
6. RWEYEMAMU M.M., PAY T.W.F. and PARKER M.J. "Serological differentiation of foot and mouth disease virus strains in relation to selection of suitable vaccine viruses". Develop. Biol. Standard., (1977), 35, 205-214.

TABLA N° 1

Primer experimento

Títulos sero neutralizantes. Medias grupales.

Vacuna N° (cepa de virus "A")	n	Virus de descarga		
		A ₂₄	A ₈₁	A ₈₇
3 (A24)	4	1.88	1.26	1.50
1 (A81)	11	1.24	1.80	1.88
5 (A87)	4	1.26	1.79	1.76

n = número de animales usados en cada caso.

TABLA N° 2

Segundo experimento

Títulos sero neutralizantes. Medias grupales.

Vacuna N°. (cepa de virus "A")	n	Virus de descarga		
		A ₂₄	A ₈₁	A ₈₇
4 (A24)	5	2.12	1.41	1.62
2 (A81)	5	1.14	1.64	1.92
6 (A87)	4	1.11	1.63	1.71

n = número de animales usados en cada caso.

TABLA N° 3

Tercer experimento

Seroneutralización bidimensional

Vacuna N° (cepa)	Virus de descarga		
	A ₂₄	A ₈₁	A ₈₇
4 (A24)	1.72	0.87	1.19
1 (A81)	1.35	1.92	1.73
5 (A87)	1.23	1.72	1.80

TABLA N° 4

Valores de "r"

Primer experimento

Suero/Virus	A ₂₄	A ₈₁	A ₈₇
A24	1.0	0.24	0.42
A81	0.28	1.0	>1.0
A87	0.32	>1.0	1.0

Segundo Experimento

Suero/Virus	A ₂₄	A ₈₁	A ₈₇
A24	1.0	0.19	0.30
A81	0.32	1.0	>1.0
A87	0.25	0.83	1.0

Tercer Experimento

Suero/Virus	A ₂₄	A ₈₁	A ₈₇
A24	1.0	0.14	0.30
A81	0.27	1.0	0.65
A87	0.27	0.83	1.0

TABLA N° 5

Media de los valores de "r" de las tres pruebas

Suero / Virus	A ₂₄	A ₈₁	A ₈₇
A 24	1.0	0.19	0.35
A 81	0.29	1.0	>1.0
A 87	0.28	0.91	1.0

TABLA N° 6

Relaciones de parentesco

Valores porcentuales de "R"

Suero / Virus	A ₂₄	A ₈₁	A ₈₇
A 24	100	-	-
A 81	23	100	-
A 87	31	88	100