Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones

José M. Fuentes R.*
Manuel J. Gay G.**
Marco A. Herradora L.***
Angel Retana R.****

Resumen

El ojo azul (OA) es una enfermedad de etiología viral que se caracteriza por producir encefalitis en lechones, falla reproductiva y opacidad corneal. Sin embargo, todavía no se cuenta con una vacuna para prevención y control de esta enfermedad. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta inmune y la protección conferida por una vacuna inactivada contra OA. Para la prueba de inmunogenicidad e inocuidad se usaron 10 cerdos destetados, fueron vacunados a las 6 y 8 semanas de edad. Se midió la respuesta inmune humoral por la prueba de sueroneutralización (SN) frente a 100 dosis infectantes cultivo celular 50% (DICC 50%) por ml del paramyxovirus de ojo azul cepa 1987 (POA-87). Los resultados de la prueba de SN indicaron que la media de anticuerpos fue de 1:32. No se presentaron reacciones locales o generalizadas, ni aumento en la temperatura de los cerdos vacunados y no vacunados en contacto (mezclados). Se midieron los niveles de Acs por SN cada mes y 6 meses después de la primera aplicación de la vacuna. Se realizó una prueba intradérmica (ID) observándose en la zona de inoculación una reacción de hipersensibilidad tipo IV en 3 de los 7 cerdos inoculados con POA-87 purificado. Además fueron vacunadas 6 hembras gestantes a las 4 y 2 semanas preparto, se midió la respuesta inmune humoral en el suero y calostro de las hembras y se determinó el grado de inmunidad pasiva transmitida, midiendo los niveles de Igs en el suero de los lechones a los 4, 28, y 38 días de edad. En este caso, la media de Acs por SN fue mayor a 1:16, con disminución del 85% a los 28 días y del 100% a los 38. En la prueba, de potencia se utilizaron 2 cerdas gestantes, una recibió dos aplicaciones de vacuna antes del parto. El desafío de las dos camadas se hizo a los cuatro días posparto; se observó mortalidad del 100% en los lechones de la hembra no vacunada, y protección del 71.4% en los lechones de la madre vacunada. La SARH señala como requisito mínimo un 80% de protección; sin embargo, de acuerdo con los resultados y análisis comparativos realizados se concluye que la vacuna inactivada contra el paramixovirus del ojo azul (POA) en cerdos, objeto de esta investigación, deberá ser sometida a un estudio con un mayor número de animales para comprobar que este biológico puede alcanzar una protección mayor al 80% y que es apta para el control de la enfermedad del Ojo Azul.

Introducción

La enfermedad del ojo azul (OA) es producto de la infección por un paramyxovirus, debido a la falta de métodos terapéuticos en contra de ésta y otras enfermedades virales, la prevención ha llegado a ser uno de los principales métodos de control.[2, 3, 6, 7] En un futuro, el disponer de una vacuna contra esta enfermedad será una importante medida de control, resultando imperante contar con una vacuna que permita el controlar la enfermedad. En un principio deberá ser de tipo inactivada, ya que la producción atenuada de vacunas implica llevar a cabo previamente, un gran número de complejas investigaciones de largo plazo que certifiquen su inocuidad.

Por lo tanto, se determinaron los niveles de Igs contra el POA mediante la prueba de SN en el suero de cerdos destetados y vacunados contra OA, en los calostros de cerdas vacunadas y en el suero de los lechones a los 4, 28 y 38 días de edad. Se comprobó la ausencia de signos clínicos atribuibles a la vacunación, y se evaluó la protección conferida a los lechones a través del calostro median-

Recibido para su publicación el 7 de septiembre de 1993.
* Asesoría Privada, Cantera 41 Col. Las Cruces. México, D.F. C.P. 10330
** Avimex, S.A. Maíz 18 Col. Granjas Esmeralda. México, D.F.
*** Departamento de Producción Animal: Cerdos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F.
**** Departamento de Virología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F.

te la exposición a una cepa virulenta del POA. También se efectuó un análisis comparativo con la prueba de transferencia de inmunidad pasiva en lechones.

Material y métodos

Vacuna. Se utilizó una vacuna inactivada con paramixovirus de ojo azul cepa 1987 (POA-87) en cultivos celulares de origen porcino con un título de $10^{6.5}$ dosis infectante cultivo celular 50% (DICC 50%) por mililitro con beta propiolactona estabilizada y adsorbida con gel de hidróxido de aluminio como adyuvante.*

Virus de ojo azul para la prueba de intradermo (ID) reacción. Para esta prueba se usó el purificador, con un título de $10^{6.5}$ DICC 50% por mililitro.*

Cepa de desafío. Se empleó paramixovirus de ojo azul de la cepa Producción Animal: Cerdos 1992 (PACLVI-92) con un título de $10^{4.5}$ DICC 50% por mililitro.**

Animales. Cerdos. Se emplearon 10 cerdos destetados de 6 semanas de edad, provenientes de una granja localizada en el estado de Querétaro, libre al POA serológicamente, de raza híbrida, con un peso aproximado de 6.5 kg y no se utilizó ningún criterio de selección.

Cerdas. Se usaron 2 cerdas gestantes de segundo y tercer parto de raza híbrida, provenientes de una granja comercial ubicada en el estado de Querétaro, libre al POA serológicamente, y no se empleó ningún criterio de selección.

Se contó también con 6 cerdas gestantes, 2 de segundo parto y 4 más de tercer parto de las cuales una era landrace y las 5 restantes de raza híbrida. Estas hembras fueron proporcionadas por la granja experimental porcina de la FMVZ de la UNAM, libre al POA serológicamente, no aplicándose criterio de selección alguno.

Prueba de inmunogenicidad e inocuidad. Para realizarlas se usó la vacuna inactivada, 10 cerdos destetados y 6 cerdas gestantes.

Los 10 cerdos destetados alojados en una unidad de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPA:C), de la FMVZ de la UNAM, las 6 cerdas gestantes permanecieron en la granja experimental porcina de la FMVZ de la UNAM.

De los cerdos destetados, 5 fueron inmunizados a las 6 semanas de edad, con 3 ml de vacuna inactivada por vía subcutánea posauricular. Después de 15 días se realizó de nuevo la vacunación siguiéndose el mismo esquema en cuanto a dosis y vía de inoculación, tanto en los cerdos vacunados como en los no vacunados se mantuvieron en contacto (mezclados) durante el tiempo de estudio. Se registraron las temperaturas de los 10 cerdos dando inicio 3 h antes de la primera vacunación, 3 h después y diariamente durante 10 días; se siguió el mismo procedimiento cuando se aplicó la segunda dosis de vacuna. La observación clínica se hizo durante los 10 días posteriores a la primera y segunda inmunización. Estos animales fueron sangrados antes de la primera vacunación (para comprobar que eran libres a OA), antes de la segunda inmunización y 15 días después; posteriormente cada mes hasta que alcanzaron su peso para el abasto. Con los sueros se midieron los niveles de anticuerpos contra OA mediante la prueba de SN frente a 100 DICC 50% de POA-87. Finalmente, se realizó una prueba intradérmica (ID) 6 meses después de la primera vacunación, aplicando 0.3 ml de POA-87 purificado en el pliegue posterior de la oreja; la lectura se efectuó a las 48 y 72 horas posinoculación.

Por otra parte las 6 cerdas gestantes fueron vacunadas a las 4 y 2 semanas antes del parto con 5.0 ml de la vacuna inactivada por vía subcutánea posauricular. Se tomaron muestras séricas antes de la primera inmunización (para comprobar que eran libres a OA), antes de la segunda vacunación, y al momento del parto se tomó una muestra de calostro; además se analizaron los parámetros reproductivos de las cerdas antes y después de las vacunaciones. Los lechones de estas hembras fueron muestreados a los 4, 28 y 38 días de edad. Todas las muestras de suero y calostro se trabajaron mediante la prueba de SN frente A 100 DICC 50% del POA-87.

Prueba de potencia. Se utilizaron 2 cerdas híbridas que fueron alojadas en 2 unidades de aislamiento del DPA: C una fue inmunizada a las 4 y 2 semanas antes del parto aplicando 5.0 ml de la vacuna inactivada por vía subcutánea posauricular. Se obtuvieron muestras sanguíneas antes de la primera vacunación (para comprobar que eran libres a OA), antes de la segunda y un día antes del parto. Al momento del parto se tomó una muestra de calostro y una muestra sanguínea de los lechones antes de que éstos mamaran (para verificar la ausencia de Acs contra OA).

Al cuarto día de nacidos, los lechones de las dos camadas fueron desafiados con la aplicación de 0.5 ml por vía intratraqueal y 1.5 ml por vía intranasal del POA de la cepa PACLVI-92, con un título de $10^{4.5}$ DICC 50% por mililitro. La observación clínica fue durante los 10 días posteriores al desafío. Los lechones que manifestaron signos fueron sacrificados; de la necropsia se obtuvieron muestras de encéfalo, pulmón y tonsilas para realizar estudios de histopatología, aislamiento viral e inmunofluorescencia. Con todos los sueros y calostros se realizó la prueba de SN en microplacas de 96 pozos para cultivo celular, de acuerdo con las técnicas descritas por Gay, Hsiung y Henderson.[4,5]

Técnica de sueroneutralización. Se realizaron diluciones dobles del suero problema con solución de Hank, se agregó 0.05 ml de virus, se incubó una hora a 37°C y se usaron 100 microlitros de una suspensión de células de riñón de cerdo (PK 15). Se emplearon 100 DICC 50% ml de antígeno.

*Proporcionado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) SARH.

**Proporcionado por el Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la FMVZ de la UNAM.

Resultados

La prueba de inmunogenicidad e inocuidad en los 10 cerdos destetados, señaló la presencia de Igs contra POA después de la primera y segunda inmunización, y posteriormente en los muestreos mensuales. Hubo un decremento progresivo y los títulos variaron de 1:8 hasta 1:64 (Cuadro 1). Los cerdos en contacto no vacunados no presentaron Acs en ningún muestreo y el registro de temperatura de los cerdos no señaló una variación significativa. Los resultados de la prueba intradérmica indicaron que 3 de los 7 cerdos vacunados manifestaron inflamación en la zona de inoculación del POA-87 purificado (Cuadro 2).

Cuadro 1
PRUEBA DE INMUNOGENICIDAD E INOCUIDAD. TITULO DE ANTICUERPOS EN EL SUERO DE CERDOS DESTETADOS Y VACUNADOS CONTRA EL PARAMIXOVIRUS OJO AZUL

Número de cerdo	*Número de muestreos y títulos de anticuerpos*								
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*X*	*ON-1*
1	1:4	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:4	10.1	5.5
4	1:8	1:32	1:32	1:16	1:16	1:8	1:8	17.1	10.7
5	1:4	1:8	1:8	1:8	1:4	1:4	—	6.0	2.1
7	1:1	1:32	1:32	1:32	1:16	1:8	1:4	20.0	12.0
9	1:1	1:64	1:64	1:32	1:32	1:16	1:16	34.2	21.5

NOTA: Los cerdos 2, 3, 6, 8 y 10 que no fueron inmunizados y que se mantuvieron en contacto (mezclados) con los cerdos vacunados, en ninguno de los muestreos manifestaron niveles de Igs.

La prueba de SN realizada con los sueros y calostros de las 6 hembras, señaló una respuesta inmune debido a la presencia de títulos de anticuerpos en el suero en un rango de 1:4 hasta 1:16, después de la primera aplicación, y en el calostro, de 1:16 a 1:64, posterior a la segunda (Cuadro 3).

Los resultados de la prueba de SN, realizada a los sueros de los lechones hijos de las 6 cerdas gestantes vacunadas se resumen en el Cuadro 4.

En la prueba de potencia, 2 de los lechones de la hembra número 190 que recibió 2 aplicaciones de la vacuna inactivada contra OA, tuvieron un título de anticuerpos de 1:4, los cuales murieron con signos clínicos característicos de OA a los 10 días posdesafío; otros 2 lechones con título de 1:8 y 3 con títulos de 1:16 sobrevivieron a la infección con POA de la cepa PACLVI-92 lo que dio como resultado una protección de 71.4% (Cuadro 5). La cerda número 190 que fue inmunizada, tuvo un título en el calostro por SN de 1:16. El resultado del registro de las temperaturas de los lechones de las 2 camadas empleadas en la prueba de desafío, mostró que la camada que obtuvo anticuerpos maternos no manifestó variación fuera de los rangos normales; por el contrario, los lechones que no recibieron inmunidad pasiva mostraron elevación de la temperatura corporal.

Por último, los estudios de histopatología se presentan en el Cuadro 6. La inmunofluorescencia y el aislamiento viral sólo fueron positivos en los animales que presentaron signos de la enfermedad del ojo azul.

Cuadro 2
PRUEBA DE INMUNOGENICIDAD E INOCUIDAD. PRUEBA INTRADERMICA 6 MESES DESPUES DE LA 1A. APLICACION DE LA VACUNA CONTRA EL PARAMIXOVIRUS OJO AZUL

Número de cerdo	*Grosor de la piel antes de la inoculación*	*Grosor de la piel a las 48 horas*	*Grosor de la piel a las 72 horas*
4	1.5	2.0	2.0
7	1.5	2.5	2.0
9	2.0	2.5	2.5

Los cerdos Núms. 1 y 5 no presentaron relación
El grosor de la piel está dado en milímetros

Cuadro 3
PRUEBA DE INMUNOGENICIDAD E INOCUIDAD TITULOS DE Igs EN SUERO Y CALOSTRO DE CERDAS INMUNIZADAS CONTRA EL PARAMIXOVIRUS OJO AZUL

Número de cerdas	*Títulos de Igs*	
	Suero	*Calostro*
23 Lan.	1:4	1:32
77 F2	1:4	1:16
91 F4	1:4	1:32
102 F4	1:4	1:16
111 F2	1:8	1:64
113 F3	1:16	1:64

Cuadro 4
PRUEBA DE INMUNOGENICIDAD E INOCUIDAD TITULOS DE Igs EN EL SUERO DE LOS LECHONES DE LAS HEMBRAS INMUNIZADAS CONTRA EL PARAMIXOVIRUS OJO AZUL DESPUES DE HABER INGERIDO DS CALOSTRO

Identificación de la camada	*Títulos X de anticuerpos a los*		
	4	*28*	*38*
23 Lan.	12.6		—
77 F2	8.0	6.0	—
91 F2	17.6	4.6	—
102 F4	9.4	4.0	—
111 F2	26.6	3.3	—
113 F3	40.8	4.8	2.8
Total X	18.7	4.3	2.8
Gn-1	14.1	1.5	1.0

DS = Desviación estándar

Discusión

La prueba de potencia indicó que la vacuna inactivada contra el POA confirió una protección de 71.4% que, conforme a lo establecido por la SARH, queda por debajo de los límites establecidos para el uso de vacunas con virus inactivado. Sin embargo, es importante tomar en cuenta algunos puntos que pudieron afectar para que no alcanzara el 80% de protección: el número de animales en la

Cuadro 5
PRUEBA DE POTENCIA
TITULOS DE Igs EN EL SUERO DE LOS LECHONES DE LA CERDA VACUNADA CON PARAMIXOVIRUS OJO AZUL DESPUES DE INGERIR CALOSTRO Y ANTES DEL DESAFIO

	No. de lechón	*Títulos de Anticuerpos* *Antes de la toma de calostro*	*Día No. 4 de nacidos*
	2	—	1:8
Cerda	4	—	1:16
vacunada	5	—	1:4
	6	—	1:8
	7	—	1:16
	8	—	1:4
	9	—	1:16
Cerda no	1	—	—
vacunada	2	—	—

prueba fue muy reducido, la cepa de desafío utilizada es altamente virulenta, y se desconoce la dosis letal 50% cerdo, las instalaciones fueron inapropiadas y la toma de temperatura 3 veces al día después del desafío causó estrés en los lechones y en la madre, lo que pudo causar inmunodepresión.[1] También es relevante hacer notar que 2 lechones de la hembra vacunada con títulos de Igs de 1:4, murieron 10 días después del desafío, mientras otros dos con títulos de 1:8 y 3 con títulos de 1:16, sobrevivieron; los testigos de la hembra no vacunada murieron a los 3 y 6 días posdesafío.

El diagnóstico histopatológico. Las pruebas de inmunofluorescencia y los aislamientos virales confirman que los lechones murieron a causa de la infección con el POA. Este estudio indica que los lechones con títulos de anticuerpos iguales o mayores a 1:16 tienen

Cuadro 6
PRUEBA DE POTENCIA
RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS

	No. de lechón	*Histopatología de encéfalo*
Cerda vacunada	5	Encefalitis no supurativa Multifocal moderada
	8	Meningoencefalitis no supurativa grave multifocal
Cerda no Vacunada	1	Edema en el espacio perivascular y hemorragias
	2	Meningoencefalitis no supurativa focal discreta

una protección cercana al 100%; por tanto, al relacionar la prueba de potencia con la transferencia de inmunidad pasiva, se observó que el título promedio de anticuerpos contra el POA fue mayor a 1:16 (1:18.7, a 4.6 log base 2). Tales resultados indican que esta vacuna es capaz de conferir una protección mayor al 80% en lechones que reciben inmunidad a través del calostro de madres vacunadas. En cuanto al análisis de la duración de la inmunidad pasiva en lechones, éste señaló que los niveles de Igs disminuyen en 85% a los 28 días, y desaparecen del todo a los 38. Sería recomendable aplicar la vacuna a la hembra a los 4 y 2 semanas antes del parto y a los lechones al destete.

La prueba realizada a los 10 cerdos destetados demuestra que la vacuna inactivada contra el POA resultó totalmente inocua y produjo una respuesta inmune equiparable a lo observado en las hembras gestantes con una media de anticuerpos mayor a 1:16, que, de acuerdo con lo discutido antes, son niveles de Igs adecuados para inducir una protección mayor al 80%. La inocuidad de la vacuna se confirmó con el análisis de los parámetros productivos realizado a las 6 hembras gestantes, pues no se observó cambio atribuible a la aplicación de la vacuna.

Por lo anterior, se considera que la vacuna inactivada contra el POA en cerdos, deberá ser probada con un número mayor de animales para confirmar que es apta para el control de la enfermedad del ojo azul.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the protection induced by inactivaded Blue Eye disease virus vaccine. One pregnant sow was vaccinated intramuscularly twice. Its 4 day old suckling piglets were challenged and hardly developed any signs of the disease. Protective immunity confered to the litter was 71.4% in the experimental group and 0% in unvaccinated control suckling piglets. Further ten postweaning pigs were vaccinated to evaluate the immunogenicity of the vaccine each month for six times after vaccination using the seroneutralization test. Antibody titrers were 1:32 and there were no clinical signs, periods of fever nor growth arrest. This vaccine proved to be innocuous and confered immunity.

Literatura citada

1. Barbosa, H.: El cerdo en la investigación biomédica: Inmunidad intestinal pasiva y producción de antisueros. En: Avances en Enfermedades del Cerdo. Editado por: Stephano, H.A., 59-61. *Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos*, México, D.F., 1985.
2. Carreón, N.R.: Más sobre la Enfermedad del Ojo Azul I. *Síntesis Porcina, 9* (1): 60-62 (1990).
3. Carreón, N.R.: Más sobre la Enfermedad del Ojo Azul II. *Síntesis Porcina, 9* (2): 34-36 (1990).
4. Gay, G.H.: Implementación de la prueba de ELISA, para el serodiagnóstico de Ojo Azul en cerdos. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
5. Hsiung, G.D. and Henderson, J.R.: Diagnostic Virology. *New Haven and London Yale University Press*, London, 1964.
6. Mohanty, B.S. and Dutta, R.S.: Virología Veterinaria. *Interamericana*, México, D.F., 1983.
7. Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Síntesis Porcina, 5* (12): 14-24 (1986).