

ELABORACION Y EVALUACION EN CONEJOS DE CUATRO TIPOS DE ADYUVANTES PARA UNA VACUNA CONTRA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA ^a

Arcelia Alvarado Islas ^b

Pedro Mejía Sánchez ^b

Alvaro Aguilar Setián ^b

RESUMEN

Con objeto de elaborar y evaluar la efectividad de varios adyuvantes en su capacidad de mejorar la respuesta inmune de una vacuna nacional contra Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), se elaboraron dos lotes piloto de vacuna, uno con la cepa IBR 758 (Título viral $10^{6.0}TCID_{50}$) y otro con la cepa Texcoco (Título viral $10^{5.8}TCID_{50}$), inactivándose con β -propiolactona. Por otra parte, se elaboraron cuatro adyuvantes consistentes en mezclas de: A) aceites, B) detergentes y aceites, C) detergentes y D) sales. Estos fueron adicionados a las suspensiones virales inactivadas en cuatro diferentes proporciones, dando un total de 32 mezclas a evaluar, las cuales se distribuyeron en dosis de 2 ml. Para evaluar la antigenicidad de las vacunas, se aplicaron dos dosis por vía subcutánea (S.C.), con un intervalo de cuatro semanas, a 16 conejos por cada tipo de adyuvante (Grupos A, B, C y D), subdivididos a su vez con base a la cepa viral y las diversas proporciones vacuna/adyuvante. Los grupos control formados por 8 conejos c/u fueron; Grupo E, al que se administró la suspensión vacunal de cepa IBR 758 inactivada y sin adyuvante; Grupo F al que se inoculó con la cepa patógena IBR 758 sin inactivar; Grupo G con medio de cultivo estéril y Grupo H, con una vacuna comercial del tipo inactivada/adyuvada. Se detectó una respuesta inmunogénica efectiva con los adyuvantes B y C, con niveles promedio de anticuerpos neutralizantes de 1:2 a las 2 semanas posvacunación, con incremento a un promedio de 1:8 en la revacunación, manteniendo la seropositividad entre 98 y 105 días. Los conejos con los adyuvantes A y D, dieron una respuesta poco satisfactoria en forma efímera y débil con niveles promedio de 1:2, posterior al segundo estímulo. El grupo E produjo anticuerpos promedio de 1:2 con una duración aproximada de 7 días, posterior a la aplicación del antígeno inactivado. La respuesta del grupo F fue de un promedio de 1:8 posinoculación por un máximo de 3 semanas. El grupo G se mantuvo negativo durante el experimento y el grupo H con una respuesta débil con título promedio de 1:2, manifestado solo con el segundo estímulo. Se concluye que los adyuvantes B y C contribuyeron más eficientemente en la potenciación de la respuesta inmune.

PALABRAS CLAVE: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, IBR, Vacunas, Adyuvantes.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 33 No.3 (1995)

INTRODUCCION

La aplicación práctica de adyuvantes es muy amplia, a pesar de que su modo de acción y uso por mucho tiempo ha sido desconocido y empírico (1). Debido a su capacidad de potenciar o exacerbar tanto en cantidad como en duración la respuesta inmune (2), una gran diversidad de adyuvantes ha sido empleada en la elaboración de vacunas, tales como: sustancias biológicas (micobacterias, virus, detergentes), productos químicos,

bacterianos y hongos (polisacáridos), productos biológicos del sistema inmune (hormonas tiroideas, linfocinas, citosinas), análogos de biológicos sintéticos (homopolímeros de RNA) y preparados químicos (aluminio, fosfatos, aceites, liposomas, etc.) (1).

Para el control de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), las vacunas elaboradas con virus inactivado o muerto, fueron fabricadas desde hace mucho tiempo (3, 4) y habían sido consideradas de poca efectividad al ser de una capacidad antigénica baja (5, 6); sin embargo, algunos investigadores encontraron que las vacunas herpéticas inactivadas complementadas con adyuvantes son bastante eficaces (7, 8), presentando la ventaja de no provocar

a Recibido para su publicación el 16 de Febrero de 1994.

b Proyecto Complejos Neumónicos en Rumiantes Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. SAGAR. Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, México, D.F., C.P. 05110

excreción del virus vacunal, no originar portadores de virus vacunal, no producir posibles recombinantes con cepas patógenas y ser de más fácil manejo que las vacunas vivas (9).

En Francia, para el control de IBR, se utilizan este tipo de vacunas con buenos resultados (10, 11). México, ha iniciado la importación de este tipo de biológicos, representando un alto costo para el ganadero y la salida de divisas del país.

El objetivo del presente trabajo fue elaborar y evaluar cuatro tipos de adyuvantes, a fin de seleccionar el de mayor capacidad en mejorar la respuesta inmune, para su posterior empleo con una vacuna nacional contra IBR.

MATERIALES Y METODOS

Elaboración de Antígeno

Se empleó la línea celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), donada por los laboratorios de Santa Ana Tecamac de la Dirección General de Salud Animal, previamente determinada como libre de Diarrea Viral Bovina (BVD) por la técnica de inmunofluorescencia y de Micoplasma por la técnica de detección directa descrita por Hay (12) y Kwapinski (13).

En monoestratos celulares 100% confluentes, replicados en un sistema de monocapas en serie, denominado comercialmente «Cell Factory» se multiplicaron las cepas virales IBR 758 (Cepa de referencia), con título viral de $10^{5.6}$ TCID_{50%} (Dosis infectantes en cultivo de tejidos 50 %) y cepa Texcoco (Cepa aislada en Texcoco, Edo. de México y previamente tipificada mediante pruebas biológicas y bioquímicas) (14) con título de $10^{5.8}$ TCID_{50%}, e incubadas a 37 C por 48-72 h, hasta obtener un 70-80% de efecto citopático. Ambas suspensiones virales fueron sometidas a tres procesos de

congelación-descongelación, se retiraron los residuos celulares por centrifugación y posteriormente se determinaron los títulos virales por la técnica de titulación en placa (15).

Inactivación

La inactivación de las cepas IBR 758 y Texcoco, se efectuó adicionando β -propiolactona en una proporción de 1:4000 manteniéndose en agitación constante en cámara fría a 4 C por 24 h, transfiriéndolas a incubación a 37 C por 2 h, con base en la metodología descrita por Koprowski (16) y almacenadas en refrigeración a 4 C durante el desarrollo de las pruebas de control de calidad, hasta su posterior mezcla con el adyuvante y envasado.

Control de Calidad

Ambas vacunas se sometieron a pruebas de control de calidad consistentes en: a) Pruebas de esterilidad por examen bacteriológico, mediante la siembra de 0.5 ml de suspensión de antígeno inactivado en caldos nutritivos enriquecidos (agar sangre, caldo de saboureaud, tioglicolato y tripticaseína y fosfato) (17), y b) Prueba de inactivación en sustitución a la de inocuidad, con la adaptación a condiciones *in vitro*, mediante la inoculación de 1 ml de antígeno inactivado en monoestratos celulares MDBK 100% confluentes, dentro de una superficie de 25 cm², observando la no replicación del virus vacunal inactivado.

Adyuvantes

Se elaboraron 4 tipos de adyuvantes: Adyuvante A, consistente en una mezcla de aceites, la cual se adicionó al antígeno inactivado (IBR 758 ó Texcoco) para obtener una emulsión en proporciones de 10, 20, 30 y 40% en volumen. Adyuvante B, consistente en una mezcla de aceites y detergentes, la cual se adicionó a los

antígenos inactivados para obtener una emulsión en proporción de 2.5, 5, 10 y 15% de detergentes más 10% de aceites en volumen. Adyuvante C, consistente en una mezcla de detergentes adicionados a los antígenos inactivados para obtener una suspensión en proporción de 2.5, 5, 10 y 15% en volumen. Adyuvante D, consistente en una mezcla de sales, adicionada a los antígenos inactivados para obtener una suspensión en proporción de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.5% en volumen (1, 2, 18, 19). Obteniéndose así, 16 diferentes adyuvantes, adicionados a 2 tipos de cepas virales, dando un total de 32 mezclas a evaluar. Se omite la composición detallada de los adyuvantes, por encontrarse en trámite de registro y patente.

Las pruebas de esterilidad en estos productos, consistieron en la siembra de 1 ml de cada una de ellas en los caldos nutritivos enriquecidos mencionados anteriormente.

Inmunogenicidad en Conejos

Para la evaluación preliminar de la vacuna, se emplearon conejos Nueva Zelanda blancos, recién destetados, de aproximadamente 600-800 g de peso. La prueba de inmunogenicidad en conejos (18) consistió en la aplicación de dos estímulos vacunales, con intervalo de cuatro semanas, en dosis de 2 ml por conejo, vía subcutánea (S.C.), empleando dos conejos por cada una de las 32 mezclas de vacuna/adyuvante, formando los grupos: A1) con 4 pares de conejos vacunados con cepa 758 y, A2) con 4 pares vacunados con la cepa Texcoco; ambas cepas inactivadas y adicionadas con adyuvante de aceites en 4 diferentes proporciones. Grupos B1 y B2) con igual número de conejos, vacunados con las mismas cepas más adyuvante de detergentes y aceites en 4 proporciones diferentes. Grupos C1 y C2) con igual

número de conejos, vacunados con las mismas cepas más adyuvante de detergentes en 4 proporciones. Grupos D1 y D2) con igual número de conejos, vacunados con las mismas cepas más adyuvante de sales en 4 proporciones, reuniendo un total de 64 animales (Cuadro 1).

Se formaron 4 grupos testigo, de 8 conejos c/u, a los que se administró por vía subcutánea, con intervalo de 4 semanas y en dosis de 2 ml c/u, los productos en el siguiente orden: Al grupo E) se le administró antígeno inactivado de la cepa IBR 758, con título de $10^{6.0}$ TCID_{50%} sin ningún tipo de adyuvante. El grupo F) se le administró (en una sola aplicación al día 0) la cepa patógena IBR 758, de mismo título viral y sin ningún tipo de adyuvante. Al grupo G) se le administró suspensión de medio de cultivo estéril, procedente de cultivos celulares MDBK sin infectar. Al grupo H) se le aplicó una vacuna comercial elaborada con virus muerto y adicionada con el adyuvante XTEND III (Cuadro 2).

Los animales fueron observados en sus constantes de temperatura, frecuencia respiratoria y presencia de signos o lesiones atribuibles a la vacunación (20, 21, 22, 23).

Para la detección de niveles de anticuerpos alcanzados por los conejos, se tomaron muestras sanguíneas con tubo vacutainer estéril, por punción directa al corazón, a intervalos iniciales de 7 días, continuando en las últimas tomas con intervalo de 14 días, variando el tiempo de trabajo con cada grupo, de acuerdo a la respuesta de los animales y persistencia máxima de anticuerpos.

Pruebas de Seroneutralización en Placa

La técnica empleada fue la de seroneutralización en placa descrita por Jenney *et. al.* (15), la cual consiste en la realización de diluciones dobles de los

Cuadro 1

Grupos de conejos integrados por ocho animales cada uno, a los que se aplicó las vacunas elaboradas con los antígenos inactivados IBR 758 o Texcoco, adicionadas a los cuatro diferentes adyuvantes elaborados (adyuvantes a, b, c y d) en cuatro distintas concentraciones, subdividiéndose así en subgrupos de dos conejos en base a la concentración de adyuvante.

GRUPO	NUMERO ANIMALES	CEPA VIRAL DE VACUNA	TIPO DE ADYUVANTE	CONCENTRACION ADYUVANTE SUB - GRUPOS (2 ANIMALES)			
				I	II	III	IV
A-1	8	IBR-758	ACEITES	10%	20%	30%	40%
A-2	8	TEXCOCO	ACEITES	10%	20%	30%	40%
B-1	8	IBR-758	ACEITES	10%	10%	10%	10%
			DETERGENTES	2.5%	5%	10%	15%
B-2	8	TEXCOCO	ACEITES	10%	10%	10%	10%
			DETERGENTES	2.5%	5%	10%	15%
C-1	8	IBR-758	DETERGENTES	2.5%	5%	10%	15%
C-2	8	TEXCOCO	DETERGENTES	2.5%	5%	10%	15%
D-1	8	IBR-758	SALES	0.1%	0.2%	0.4%	0.5%
D-2	8	TEXCOCO	SALES	0.1%	0.2%	0.4%	0.5%

sueros desde 1:2 hasta 1:128, en microplacas de fondo plano de 96 pozos, a las que se adicionó virus de referencia IBR 758, en dilución de 50-300 TCID_{50%}, y suspensión de células MDBK, a una concentración de 300,000 Cel/ml. La lectura fue a las 48-72 h, por la apreciación de efecto citopático, con ayuda de un microscopio invertido, considerando como positivos a los sueros con títulos desde 1:2 en adelante, con base en lo establecido por el Code of Federal Regulation (CFR) (24).

RESULTADOS

Producción del Antígeno Vacunal

En el lote de antígeno elaborado con la

cepa de referencia IBR 758, el título viral posterior a su replicación se incrementó a 10^{6.0}TCID_{50%}, mientras que en la cepa Texcoco, el título se mantuvo en 10^{5.8}TCID_{50%}. Ambos lotes de antígeno superaron las pruebas de control de calidad, al no haber desarrollo bacteriológico ni micótico durante su siembra en caldos nutritivos enriquecidos, los cuales fueron observados diariamente por un período de tres semanas. Asimismo, en la prueba de inactivación, los monoestratos celulares MDBK inoculados, permanecieron 100% confluentes durante el mismo período, iniciándose posteriormente el desprendimiento por envejecimiento celular.

El empleo del sistema «Cell Factory» para la producción de los lotes de antígeno

resultó ser efectivo, al reducir espacio, manipulación y riesgo de contaminación.

Evaluación de Capacidad Inmunogénica

En las pruebas de inmunogenicidad realizadas en conejos, no hubo diferencia significativa en cuanto al tipo de cepa viral empleada en la vacunación, cuando el adyuvante adicionado consistió en mezcla de aceites o sales (Adyuvantes A y D). Sin embargo, en los casos en que se adicionaron las mezclas de detergentes y detergentes más aceites (Adyuvantes C y B), se observó una mejor respuesta con la cepa de referencia IBR 758.

En cuanto al tipo de adyuvante adicionado, los conejos vacunados con los adyuvantes A y D en sus distintas concentraciones, no presentaron respuesta al primer estímulo, produciendo anticuerpos con título promedio de 1:2, solamente con la revacunación, manteniendo ese nivel los grupos A1 y A2 un máximo de dos semanas, e incluso algunos permanecieron seronegativos; mientras que en los grupos D1 y D2 la seropositividad se mantuvo por espacio de 2 a 5 semanas, aunque algunos animales no respondieron a la vacuna. Los conejos vacunados con los adyuvantes B y C en sus distintas concentraciones mostraron una respuesta positiva, iniciando con producción de anticuerpos en nivel promedio de 1:2 a los 14 días posvacunación (con algunas excepciones en las dosis mas bajas de adyuvantes), incrementándose en la mayoría de ellos, a niveles promedio de 1:8 con la aplicación del segundo estímulo vacunal, para después descender paulatinamente a un promedio de 1:2, manteniendo la seropositividad por espacio de 95 y 105 días.

En cuanto a concentración de adyuvantes, las mejores respuestas se lograron en los grupos en los que se emplearon las

concentraciones de 10 y 15% de detergentes y 10% de aceites.

Analizando estos resultados en forma global, basándose solamente en el porcentaje de animales que respondió positivamente a los estímulos vacunales y al tipo de adyuvante empleado, sin tomar en cuenta su concentración, la respuesta con los adyuvantes A y D después del segundo estímulo vacunal, fue con un porcentaje de conejos seropositivos desde 37.5 hasta 62.5%, predominando los niveles bajos de anticuerpos y poco duraderos. Contrastando con los adyuvantes B y C, donde los porcentajes de animales positivos iniciaron con el primer estímulo vacunal desde 40 hasta 75%, incrementándose a 100% con la revacunación, llegando a alcanzar algunos de ellos, niveles de anticuerpos hasta 1:8 y con una mayor persistencia de la seropositividad (98 y 105 días) (Cuadro 3). La respuesta de los grupos control fue para los conejos del grupo E, con una seroconversión con niveles promedio de anticuerpos de 1:2, sólo después de cada uno de los estímulos aplicados con el antígeno inactivado sin adyuvante, regresando inmediatamente después (7 días) a la seronegatividad. El grupo F, que se inoculó con la cepa de referencia patógena IBR 758 sin inactivar, mostró un nivel promedio alto de respuesta (1:8) al día 7, mismo que descendió y se mantuvo por 14 días más a un promedio de 1:2, quedando negativo al cuarto muestreo sanguíneo. El grupo G, se mantuvo seronegativo durante toda la fase experimental. El grupo H administrado con una vacuna comercial adyuvada dio un nivel promedio de 1:2 a los 14 días posteriores a la aplicación del segundo estímulo vacunal, descendiendo y desapareciendo al término de 3 semanas más (Cuadro 3).

Las constantes fisiológicas permanecieron

Cuadro 2

Grupos de conejos testigo, integrados por ocho animales cada uno a los que se sometió a diversos estímulos con antígeno activo (e) y/o inactivado (f), además de una vacuna comercial siguiendo las indicaciones del productor (h) y un grupo testigo negativo al que se aplicó solamente medio de cultivo estéril (g).

GRUPO	NUMERO ANIMALES	TESTIGO	INOCULACION	NUMERO ESTIMULOS
E	8	POSITIVO	VACUNA IBR-758 SIN ADYUVANTE	2
F	8	POSITIVO	IBR-758 PATOGENO SIN ADYUVANTE	1
G	8	NEGATIVO	MEDIO DE CULTIVO ESTERIL	2
H	8	POSITIVO	VACUNA COMERCIAL ADYUVADA	2

en la normalidad tanto en los grupos experimentales como en los testigo, (temperatura dentro de un rango de 38.5 a 39.5 C y frecuencia respiratoria de 50 a 60/minuto) (23) y no hubo presencia de signos o lesiones sugestivas al virus de IBR, tales como exudados nasales y/o oculares, problemas reproductivos o abortos. A la observación de tráqueas durante la necropsia, no se observó ningún tipo de exudado, eritema o formación de vesículas. Sólo en 2 conejos del grupo A en su concentración más alta de adyuvante (mezcla de aceite), hubo la formación de un absceso en el área de inoculación, posterior al segundo estímulo vacunal, con presencia de células polimorfonucleares, debido a un proceso inflamatorio supurativo y detectado por frotis, teñidos con Giemsa y observación directa al microscopio.

DISCUSION

Las primeras vacunas del tipo inactivado empleadas para el control de IBR fueron consideradas poco efectivas,

principalmente por su pobreza antigénica (9). Sin embargo, en el presente estudio y trabajos precedentes realizados con bovinos y conejos (datos no publicados), y concordando con lo mencionado por diversos autores, se observó que cuando las vacunas son elaboradas con una carga antigénica alta (25, 26) y las cepas virales son mantenidas con títulos superiores a $10^{5.0} \text{TCID}_{50\%}$, además de adicionadas con adyuvantes que estimulan la respuesta inmune, se logra obtener una vacuna inmunogénica, con alto nivel de protección tanto local como general (1, 9).

La efectividad de una vacuna del tipo inactivada podría deberse principalmente a dos factores: la cepa viral empleada y el adyuvante adicionado. Lo anterior se desprende de las observaciones realizadas en este trabajo y estudios precedentes (datos no publicados), donde se apreció que cuando las vacunas eran elaboradas con cepas de títulos virales entre $10^{3.0} \text{TCID}_{50\%}$ y $10^{5.0} \text{TCID}_{50\%}$ y adicionadas con adyuvante, resultaban ser poco efectivas. Por otra parte, en el presente trabajo se dieron casos en los que, a pesar de contar con cepas con alto título viral

Cuadro 3

Respuesta a la aplicación de las vacunas elaboradas con las cepas IBR 758 o Texcoco inactivadas y adicionadas con los adyuvantes a, b, c y d, en base al porcentaje de animales que respondió a la vacunación, sin importar la concentración del adyuvante y considerando el máximo nivel y persistencia de anticuerpos obtenidos, en comparación con los grupos testigo (E,F,G,H).

GRUPO	ADYUVANTE	CEPA VIRAL DE VACUNA	% POSITIVOS		MAXIMO TITULO ANTICUERPOS c	MAXIMA PERSISTENCIA DE ANTICUERPOS d
			a	b		
A-1	ACEITES	IBR-758	0	50	1:2	42
A-2	ACEITES	TEXCOCO	0	37.5	1:2	42
B-1	DETERG.					
	ACEITES	IBR-758	50	100	1:8	105
B-2	DETERG.					
	ACEITES	TEXCOCO	75	100	1:8	98
C-1	DETERG.	IBR-758	40	100	1:8	105
C-2	DETERG.	TEXCOCO	62.5	100	1:8	98
D-1	SALES	IBR-758	0	37.5	1:2	49
D-2	SALES	TEXCOCO	0	62.5	1:2	63
E	-----	IBR-758				
		INACTIVADO	50	50	1:2	7 ^a
F	-----	IBR-758				
		PATOGENO	100	----	1:8	21
G	-----	MEDIO DE				
		CULTIVO	0	0	0	0
H	XTEND III	VACUNA				
		COMERCIAL	0	100	1:2	14 ^b

a = Posterior al primer estímulo antigénico al día 0

b = Posterior al segundo estímulo antigénico al día 28

c = Detectado por la técnica de seroneutralización

d = Duración en días

e = Después de cada estímulo antigénico

(Superior a $10^{5.0} \text{TCID}_{50\%}$) y alta carga antigénica, estas resultaron ser inefectivas si no eran adicionadas con un buen adyuvante, como sucedió con los adyuvantes A y D, ó simplemente cuando no fueron adicionadas con algún adyuvante, como ocurrió con el grupo E. Además de haberse detectado una mejor respuesta inmunogénica en los conejos vacunados con la cepa de referencia IBR

758, la cual poseía un título viral ligeramente superior a la cepa Texcoco. Este efecto de mejor respuesta a la aplicación de un antígeno con carga antigénica alta, se comprueba también en los resultados obtenidos con el grupo F, el cual manifestó una rápida y elevada respuesta inmune posterior a la inoculación de la cepa patógena; sin embargo, la brevedad de la permanencia de los

anticuerpos constata la necesidad del empleo de un potenciador de la respuesta inmune en vacunas.

En el análisis de efectividad de las vacunas empleadas en los grupos C1, C2, B1 y B2 (adyuvadas con detergentes y mezcla de detergentes y aceites), su superioridad se manifiesta al compararlas con el grupo control H (vacuna comercial), tanto en respuesta al primer estímulo vacunal, como en el nivel máximo y persistencia de anticuerpos. Sin embargo, en este caso, la inferioridad en la efectividad de la vacuna comercial, no puede atribuirse a factores de cepa vacunal o tipo de adyuvante, ya que se desconocen los títulos virales y componentes del adyuvante empleados por el productor, además de que se deben considerar otros factores externos de importancia, como el manejo de la cadena fría en el proceso de importación.

Los adyuvantes en general, empleados como potenciadores de la respuesta inmune, tienen algunas desventajas como son la inducción de granulomas, abscesos locales, etc. (1), tal y como sucedió en el caso del adyuvante A (mezcla de aceites). Sin embargo, realizando una buena selección del tipo y dosis de adyuvante, se logran obtener resultados satisfactorios, tanto en capacidad inmunogénica como en la no presentación de efectos indeseables. Por otra parte, diversos autores señalan al conejo como un buen modelo de laboratorio para la replicación de la enfermedad de IBR, obteniendo los signos y lesiones clásicos como alteraciones respiratorias, incrementos de temperatura, abortos, úlceras en vías respiratorias, etc. (20, 21, 22). Tanto en el grupo F del presente trabajo, así como lo observado en estudios precedentes (datos no publicados), se realizaron inoculaciones con cepas patógenas de IBR a conejos adultos y gazapos por diversas vías de inoculación, sin que estos sufrieran

alteración alguna en sus constantes fisiológicas, signos o lesiones, obteniendo únicamente replicación viral, cuando la inoculación fue por vía intracerebral, y respuesta inmune sin importar la vía de inoculación. En el presente trabajo, y concordando con lo indicado por otros autores (25, 27), se observa que el conejo resulta ser adecuado para la evaluación de vacunas, tanto experimentales como comerciales en cuanto a su capacidad inmunogénica específicamente y debido a su capacidad de respuesta en producción de anticuerpos a los estímulos vacunales. El inconveniente está en la realización del desafío con cepas patógenas, ya que éste no manifestaría diferencia alguna entre animales vacunados y no vacunados en cuanto a signología se refiere.

La pobreza antigénica de las primeras vacunas inactivadas no adyuvadas, debida principalmente a que en su elaboración no se recurría a procesos de concentración por resultar antieconómicas (9), actualmente no constituye un problema, pues con el empleo del sistema de producción en monocapas, denominado comercialmente «Cell factory», se producen lotes vacunales en forma efectiva y económica, ya que con él se obtuvieron suspensiones virales concentradas, además de brindar una alta reducción en los riesgos de contaminación, tan frecuentes en los procesos de producción convencionales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo manifiestan que en la elaboración de vacunas del tipo inactivada/adyuvadas, es importante contar con cepas de alto título viral y carga antigénica, las cuales podrían resultar inefectivas si no son adicionadas a un buen adyuvante.

PREPARATION AND EVALUATION IN RABBITS OF FOUR ADJUVANTS FOR INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS.

SUMMARY

Two inactivated vaccine batches against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) were made; one with «758» strain (titre $10^{6.0}$ TCID_{50%}) and another with «Texcoco» strain (Titre $10^{5.6}$ TCID_{50%}). Four different adjuvants were elaborated: A) oils mixture; B) detergents and oil mixture; C) detergents mixture and D) mixture of leaves. The different adjuvants were mixed with vaccines in four different proportions and were distributed in 2 ml doses. For adjuvant (A, B, C and D), two subcutaneous stimuli (4 weeks interval) were applied to groups of 16 rabbits. These four groups were subdivided based on the vaccine strain (758 IBR or Texcoco) and on the various used adjuvant proportions (%). Control groups (formed by 8 rabbits each) were: Group E injected with inactivated vaccine (strain 758 IBR) without adjuvant; Group F inoculated with live 758 IBR pathogenic strain; Group G inoculated with sterile cell culture media and Group H inoculated with a commercial inactivated adjuvant containing vaccine. An affective response was obtained with adjuvants B and C with Virus neutralising (VN) antibodies levels of 1:2 two weeks after the first vaccination. In these group VN titers were increased to 1:8 with the second vaccination and the animals remained positive during 98-105 days. Adjuvants A and D gave an ephemeral (7 days) and weak (VN titer 1:2) responses only after the second vaccination. Animals of group F inoculated with live virus (IBR 758 strain) VN titres of 1:8 that disappeared three weeks later. Group G remained negative and in group H low levels of VN antibodies (1:2) were detected only after the second vaccination. We concluded that adjuvants A and B are more efficient.

KEY WORDS: Infectious Bovine Rhinotracheitis, IBR, Vaccines, Adjuvants

REFERENCIAS

1. Vanselow B A. The Application of adjuvants to veterinary medicine. Vet. Bull. 1987; 57 (11) 881.
2. Herbert W J. Veterinary immunology. 1ª ed. Blackwell scientific publications, Oxford London Edinburgh Melbourne. 1974; 197.
3. Kolar J R, Shechmeister I L, Kammkade W G. Use in cattle of formalin killed polyvalent vaccine with adjuvant against infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhoea and parainfluenza 3 Viruses. Am. J. Vet. Res. 1972; (33) 1415.
4. Matsuoka T, Folkerst T M, Gale C. Evaluation in calves of an inactivated bovine rhinotracheitis and parainfluenza-3 vaccine combined with *Pasteurella bacterin*. J.A.V.M.A. 1972; (160) 333.
5. Schipper I A, Kelling C L. Evaluation of inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. Can. J. Comp. Med. 1975; (39) 402.
6. Straub O C. Les possibilités de mise en oeuvre de vaccins anti IBR/IPV. Bull. Off Int Epiz. 1975; (84) 83.
7. Toma B. Immunisation du porc contre la maladie d'Aujeszky. Rec. Med. Vet. 1976; (152) 189.
8. Wittmann G, Jakubir J. Ein Aujeszky-Impostoff aus inaktiviertem virus. Fortschritte Der Veterinarmedizin. 1978; (28) 188.
9. Aguilar S A. Recomendaciones para la prevención contra pinotraqueitis infecciosa bovina (Bovid Herpesvirus 1, BHV-1). V Curso internacional de reproducción bovina, FMVZ-UNAM. 1993; 253.
10. Brun A, Guillemin F, Precausta P, Soulebot J P, Terré J. Innocuite et activité d'un vaccin inactif en adjuvant huileux contre la rhinotracheite infectieuse bovine. 11^{ème} Congrès international sur les maladies du bétail. Tel Aviv. 1980; 20 (30) 110.80.
11. Soulebot S P, Quillemin F, Brun A, Terre J. Prophylaxie leedicale contre les affections respiratoires des bovins. Les methodes d'immunisation. Conference prononcee par le Dr. Soulebot le 25 novembre 1979 a la Journée G.T.V. du pas-de-Calais. France.
12. Hay R J. Cell Line Preservation and Characterization. In: Animal Cell Culture. Freshney R.I. Ed. Girt Press New York U.S.A. 1992; 95-148.
13. Kwapinski J B J. Methodology of Immunochemical and Immunological Research. Wiley-Interscience, Inc. 1972; 599.
14. Alvarado I A, Aguilar S A, Mejía S P, De Paz V O, Vilchis M C. Aislamiento y tipificación de una cepa de herpes virus bovino 1, del tipo vulvovaginitis pustular infecciosa. Tec Pecu. Mex. 1993; 31 (2) 72.
15. Jenney E W, Wessman S J, Spinka F L. Microtitration serology methods for bovine virology. serologic microtitration techniques. U. S. Department of agriculture, animal and plant health inspection service veterinary services, national veterinary services laboratory, Ames Iowa 1978; 16.
16. Koprowski, H. Laboratory techniques in rabies. 3a. ed. Ed. W.H.O. Monogr. Ser. n23 1973; 256-260.
17. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos. Requerimientos minimos de calidad que deberan llenar los productos biológicos para uso veterinario. Dirección General de Sanidad Animal México 1977.
18. Barrera M, Noda J, Pedroso M. Respuesta serológica en conejos a preparados vacunales de herpesvirus bovino 1. Rev. Salud Anim. La Habana, Cuba. 1985; (7) 363.
19. Sureau P, Reculard P. Potency and stability of various modern rabies vaccines for Veterinary use. World Health Organization. Organization Mondiale de la Sante. WHO/Rab. Res./88.28.
20. Lupton H W, Reed D E. Experimental infections of eastern cotton tail rabbits (*Sylvilagus Floridanus*) with Infectious bovine rhinotracheitis virus. Am. J. Vet. Res. 1979; (40) 1329.
21. Lupton H W, Barnes H J, Reed D E. Evaluation of rabbits as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. Cornell Vet. 1980; (70) 77.
22. Rock D L, Reed D. Persistent infection with bovine herpesvirus type 1: rabbit Model. Infec. Immun. 1982; (35) 371.
23. Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico. Dirección General de Sanidad Animal. Recolección y envío de Muestras al laboratorio de diagnóstico de patología animal. Boletín 1976. México
24. Code Of Federal Regulations. Animals and animal

- products cytology section. biologics virology laboratory (1992) 9; 584.
25. Correa G P. Rinotraqueítis infecciosa de los bovinos. En Ciencia Veterinaria. 1ª ed. México: UNAM, 1976: 131.
26. Mohanty S B, Sukanta K D. Vacunas y drogas antivirales. Virología Veterinaria 1ª ed. México: Interamericana, 1983:81.
27. Correa G P. Enfermedades virales más comunes del ganado lechero. En Manual Sobre Ganado Productor de Leche. Marcelo Pérez Domínguez. México. Ed. Diana 1982: 560.