

EXPERIÊNCIAS COM VACINAS MONOVALENTES "A" CONTRA A FEBRE AFTOSA, OBTIDAS DA CULTURA DO VÍRUS PELO MÉTODO FRENKEL

MOACYR R. NILSSON e CARLOS DE MELLO BITTENCOURT FILHO

I. INTRODUÇÃO

Em 1951, Frenkel¹ iniciou a produção de vírus da febre aftosa, cultivando-o em epitélio normal de língua bovina, para a elaboração de vacina.

Essa nova técnica, que foi denominada "Método Frenkel", despertou logo grande interesse em todo o mundo, principalmente na Europa, onde diversos pesquisadores iniciaram estudos para a obtenção desta nova fonte de vírus.

No México, em 1951, Mace e cols.¹¹ produziram vacinas com vírus de cultura, conseguindo bons resultados com sua aplicação.

Fogedby e Johnson⁴, em 1952, elaboraram vacinas com diferentes horas de cultura, a fim de determinar a de melhor poder imunizante, concluindo ser a cultura de 60 horas a que melhor antígeno produziu.

Henderson e Galloway⁹, em 1953, fizeram comparações entre vacinas preparadas a partir de vírus obtido pelo método Frenkel e vacinas produzidas pelo método Waldmann, chegando à conclusão que o vírus cultivado é tão antigênico quanto o produzido pela inoculação em bovino.

Em 1953, Girard e Mackoviak⁷ produziram vacinas em escala industrial, recomendando a técnica de Frenkel, principalmente pelo baixo custo de produção e ainda pela certeza de que o vírus assim obtido permanece sempre com as mesmas características, eliminando as freqüentes misturas que ocorrem nos matadouros.

Em 1955, Ubertini e cols.¹⁵, trabalhando com vacinas produzidas a partir de vírus cultura e de vírus natural, concluíram pela superioridade do vírus natural, recomendando entretanto o uso do vírus cultura pelas suas vantagens econômicas.

Ainda em 1955, Ackermann e cols.¹ revelam resultados satisfatórios com a aplicação de vacina elaborada segundo o método Frenkel, mas em experiências de campo.

Willems e Leunen¹⁶, em 1956, produziram vacinas de vírus cultura, com a particularidade de também cultivar como semente amostras de vírus natural obtidas a partir de vírus cultura.

Rivenson¹⁸, em 1956, também efetuou estudos com vacina preparada a partir de vírus cultura.

Em nosso País, as primeiras tentativas para a produção de vacinas com o vírus cultivado pelo método Frenkel, foram efetuadas no Instituto de Biologia Animal, em 1955, não se podendo chegar a resultados conclusivos em virtude do pequeno número de animais utilizados, deixando entretanto boas perspectivas.

Em 1956 foi elaborada uma vacina com vírus "A", em colaboração com o Centro Panamericano de Febre Aftosa, que apresentou resultados satisfatórios quanto à antigenicidade, porém sem aplicação prática por ter sido a dose utilizada de 55 ml.

Em 1957, nova tentativa foi efetuada com uma amostra de vírus "C", porém desta vez a vacina não forneceu os resultados esperados, sendo atribuída a falha ao fraco poder antigênico da amostra.

A presente comunicação refere-se a resultados obtidos com duas vacinas monovalentes "A", de cultura Frenkel, comparativamente a uma vacina monovalente "A", tipo Waldmann. A diferença entre as duas vacinas de cultura consistiu somente no tempo de incubação do vírus.

II. MATERIAL E MÉTODOS

O método de cultura do vírus foi no essencial o de Frenkel, sendo as culturas preparadas em frascos Ricard de 500 ml. A incubação à temperatura de 37°C teve a duração de 24 e 64 horas. Epitélio lingual de bovino: O epitélio procedeu do Frigorífico "Anglo", localizado em Mendes, Estado do Rio. Chegando ao laboratório, o epitélio era cortado e lavado em água fisiológica (salina) por dez vezes, em seguida em solução tamponada de fosfatos (pH 7,6) contendo antibióticos (penicilina e estreptomicina) e finalmente colocado em meio Frenkel, deixando-se em geladeira a 4°C até o momento de sua utilização.

Meio: Em tôdas as culturas só usamos o meio de Frenkel (Baker modificado) com pH 7,6, filtrado em Seitz E.K.

Vírus: Amostra do tipo "A", denominada A-São Paulo, fornecida pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa com 56 passagens em cultura. Em nosso laboratório foi inoculada em bovinos sensíveis para a "reanimalização". Sofreu em seguida mais três passagens em cultura.

Constituição das culturas:

Meio Frenkel	75 ml
Epitélio fragmentado	12 g
Vírus diluído a 1/10	9 ml
Penicilina	50 000 unidades
Estreptomicina	50 mg
Vermelho Fenol	0,125 g/litro

Camundongos: suíços brancos, oriundos de nossa criação.

Bovinos: Mestiços, de 12 a 18 meses de idade, pesando em média 120 quilos, provenientes de Marquês de Valença, Estado do Rio.

Titulação das culturas: O crescimento do vírus foi controlado pela inoculação em camundongos de 7 a 9 dias, segundo o método de Skinner¹⁴, sendo o título calculado de acôrdo com Reed e Muench¹².

Tipificação: As culturas foram tipificadas pelo teste de fixação do complemento preconizado por Cunha e cols.².

III. RESULTADOS — CONCLUSÕES

Foram elaboradas vacinas com vírus de 24 e 64 horas de incubação. Calculou-se a quantidade de vírus de acôrdo com a técnica recomendada por Henderson¹⁰, que é baseada no conteúdo de vírus por dose vacinante, constando a mesma de uma concentração de $10^{-6.8}$ DI₅₀ para 50% de proteção e $10^{-7.3}$ DI₅₀ para 80-90% de proteção. Foi empregado o hidróxido de alumínio para a adsorção das vacinas.

Para servir de comparação às vacinas de cultura foi utilizada uma vacina do tipo Waldmann, elaborada com esta finalidade.

Os bovinos utilizados na comprovação foram previamente selecionados pela prova de sôro-proteção em camundongos³, assim como pesquisada pela mesma técnica a evolução da taxa de anticorpos aos 7, 14 e 24 dias após a vacinação. No quadro I estão descritos os resultados referentes às provas de sôro-proteção.

A vacinação foi realizada pela via subcutânea, nas doses de 3 e 10 ml, respectivamente para 50 e 80-90% de proteção, sendo os bovinos observados diariamente até o dia da comprovação.

Aos 24 dias de vacinados foram todos os bovinos inoculados em 4 a 6 pontos pela via intra-dermo-lingual com 10 000 DL₅₀ de uma amostra do vírus "A" (A-470) isolada de um foco de febre aftosa, no Município de Barra Mansa, Estado do Rio.

Durante a leitura, que se prolongou por 15 dias, não foram consideradas as lesões linguais. O quadro II sintetiza o teste da comprovação.

IV. DISCUSSÃO

De acordo com o quadro I podemos observar que:

1) Entre os bovinos que tiveram febre aftosa generalizada, nenhum apresentou diferença superior a 1 log entre a sangria anterior à vacinação e a realizada 24 dias após.

QUADRO I

Índices de proteção para o vírus "A" dos soros de animais vacinados e relação com a imunidade conferida após a infecção

Número do animal	Vacina	Dose	ÍNDICES DE PROTEÇÃO					Resultados da inoculação
			I	II	III	IV	V	
141	Frenkel	3 ml	∞ 0,3	∞ 0,5	∞ 0,1	0,8	∞ 0,5	Sem reação
142	Cultura de		∞ 0,3	∞ 0,5	0,6	1,2	∞ 0,9	> >
143	24 horas		∞ 0,3	∞ 0,7	0,6	0,8	∞ 0,5	> >
145			∞ 0,3	∞ 0,5	∞ 1,0	0,5	∞ 0,2	Generalização
147			∞ 0,8	∞ 0,7	1,1	1,5	∞ 0,7	Sem reação
148			∞ 0,8	1,0	0,5	0,3	0	Reação local
163	Frenkel		3 ml	0	∞ 4,0	∞ 3,0	∞ 3,3	∞ 3,3
164	Cultura de	0,4		∞ 0,5	1,5	1,8	1,4	Reação local
165	64 horas	0		∞ 0,5	0,5	0,3	0,3	Generalização
166		0		∞ 0,5	0,7	0,7	0,7	>
167		0,5		∞ 1,0	0,4	1,3	0,8	>
168		0		∞ 0,5	0	0,8	0,8	>
146	Frenkel	10 ml		1,4	1,7	1,3	1,2	0
150	Cultura de		∞ 0,8	1,0	0,6	0,3	0	Reação local
151	24 horas		∞ 0,8	∞ 0,5	∞ 3,0	∞ 2,6	∞ 1,8	Sem reação
152			∞ 0,8	1,5	1,1	2,1	∞ 1,3	Reação local
154			∞ 0,8	1,4	2,1	1,7	∞ 0,9	> >
156			∞ 0,8	0,7	0,5	0,8	0	Sem reação
157			∞ 0,8	1,0	0,4	0,7	0	Reação local
158			∞ 0,8	2,4	1,4	2,1	∞ 1,3	> >
159			∞ 0,8	∞ 0,5	0	0,3	0	Generalização
161			0,5	∞ 3,3	∞ 3,0	∞ 3,3	∞ 2,8	Sem reação
153	Frenkel		64 horas	1,0	2,0	2,0	1,4	0,4
160	Cultura de	1,0		∞ 4,0	∞ 3,0	∞ 3,3	∞ 2,3	> >
169		0		∞ 1,5	∞ 3,6	2,3	2,3	> >
172		0		∞ 0,5	0,2	1,0	1,0	Reação local
173		0		∞ 1,0	1,2	1,7	1,7	Sem reação
174		0		∞ 0,5	∞ 3,5	∞ 3,3	∞ 3,3	Reação local
175		0		∞ 0,7	1,6	1,5	1,5	> >
177		0,5		∞ 0,1	1,6	1,5	1,0	> >
178		0,5		∞ 1,1	0,9	1,5	1,0	Sem reação
179		0,5		∞ 0,1	0,2	1,0	0,5	Reação local
181	Waldamann	5 ml		0	∞ 3,6	∞ 3,5	∞ 3,3	∞ 3,3
182			0	0,3	0,9	0,8	0,8	Generalização
183			0,4	0,3	0,5	1,3	0,9	Sem reação
184			0,5	1,3	1,3	1,3	0,8	Reação local
185			0	0,6	1,3	1,0	1,0	> >
186			0	0,1	< 0,3	0,8	0,8	Generalização

- I — Sangria antes da vacinação.
 II — Sangria 7 dias após a vacinação.
 III — Sangria 14 dias após a vacinação.
 IV — Sangria 24 dias após a vacinação.
 V — Diferença entre I e IV.

- 2) Os que evidenciaram as maiores taxas de anticorpos encontram-se entre os animais que não tiveram nem reação local, com exceção do bovino n.º 174.
- 3) Alguns bovinos não apresentaram elevação da taxa de anticorpos e mostraram-se protegidos, inclusive o n.º 156 que nem reação local teve.
- 4) De um modo geral, verificamos que os animais protegidos mostraram um aumento de anticorpos.

Segundo nossos resultados, observamos que a prova de sôro-proteção tem um valor relativo, pois se todos os animais que evidenciaram sensível aumento de anticorpos se mostraram imunizados, alguns dos protegidos não revelaram aumento de anticorpos. Este fato nos traz alguma insegurança na seleção prévia de animais a serem utilizados em provas de eficiência com vacinas contra a febre aftosa.

Com relação aos resultados do quadro II, verificamos:

QUADRO II
Resultados da comprovação

VACINA	Dose	Número de bovinos	Reação local	Sem reação	Generalização	% de proteção contra generalização
Frenkel	3 ml	6	2	4	1	83%
Cultura de 24 horas	10 ml	10	7	3	2	80%
Frenkel	3 ml	6	5	1	4	33%
Cultura de 64 horas	10 ml	10	5	5	0	100%
Waldmann	5 ml	6	4	2	2	66%
Testemunhas	—	6	6	0	6	—

- 1) As vacinas de cultura evidenciaram superioridade antigênica sobre a vacina Waldmann tomada como comparação.
- 2) A vacina de cultura de 64 horas de incubação revelou-se superior à de 24 horas na dose de 10 ml, que foi estabelecida por nós para ser utilizada na prática, o que vem confirmar as observações de Fogedby e col.⁴, Henderson⁵, Ubertini e cols.¹⁵ e Frenkel⁶.
- 3) Apesar dos melhores resultados obtidos com a vacina de 64 horas (100%), achamos que na prática não é vantajosa a produção de antígeno com este período de incubação, porque:
 - a) há maiores possibilidades de contaminação bacteriana;
 - b) há maior dispêndio de tempo;
 - c) há encarecimento do produto pelo consumo de energia, de "carbogeno", assim como pelo desgaste do material;
 - d) A vacina de 24 horas de incubação também forneceu uma boa proteção (80%), que, segundo Henderson, é perfeitamente satisfatória para aplicação no campo.
- 4) Na dose de 10 ml, calculada segundo Henderson para 80-90% de proteção, ambas as vacinas confirmaram o que era esperado. Entretanto, na dose de 3 ml, que deveria fornecer uma proteção em tórno de 50%, a vacina de 24 horas apresentou um resultado acima do previsto, sendo mesmo paradoxal, em comparação com a dose de 10 ml da mesma vacina. Embora de difícil esclarecimento, este fato poderia encontrar sua justificação no pequeno número de animais utilizados na dose de 3 ml.

V. RESUMO

Os AA. realizaram experiências com vacinas monovalentes "A" contra a febre aftosa, elaboradas pelo método Frenkel, com culturas de 24 a 64 horas de incubação.

A quantidade de vírus utilizada por dose vacinante, foi de $10^{-7.8}$ DI_{50} para a obtenção de 80-90% de proteção, de acordo com Henderson.

Os testes de eficiência das vacinas foram realizados pela pesquisa da taxa de anticorpos neutralizantes e pela inoculação de vírus em bovinos.

As duas vacinas usadas demonstraram boa antigenicidade, havendo ligeira superioridade da preparada a partir do vírus de cultura de 64 horas de incubação.

EXPERIMENTS WITH MONOVALENT TYPE "A" VACCINES AGAINST FOOT AND MOUTH DISEASE, OBTAINED FROM CULTURING THE VIRUS BY FRENKEL'S METHOD

Abstract

The authors performed experiments with monovalent type "A" vaccines against foot and mouth disease, made by Frenkel's method, by incubating the virus for 24 and 64 hours.

The quantity of virus used for each dose of vaccine, was $10^{-7.3}$ DI_{50} in order to obtain 80-90% protection; this is in accordance with Henderson's work.

The efficiency test of the vaccines were performed by titrating the neutralizing antibodies and by inoculating the virus into cattle.

Both vaccines used had good antigenicity. The one which was made from the virus incubated for 64 hours was slightly superior.

VI. AGRADECIMENTOS

Apresentamos os nossos agradecimentos ao Dr. Jayme Lins de Almeida, Diretor do Instituto de Biologia Animal, pela ajuda e assistência que nos proporcionou; ao Dr. Alberto Ferreira Faria pela realização dos testes de fixação do complemento e pelo auxílio prestado na leitura do teste de comprovação; ao Dr. Joaquim Monteiro de Carvalho pelo fornecimento da vacina do tipo Waldmann, que serviu como termo de comparação e ao Centro Panamericano de Febre Aftosa por nos ter cedido a amostra do vírus A-São Paulo.

VII. REFERÊNCIAS

- 1) ACKERMANN, L.F.; BLANC, R.A.; LUCAS, G.C. & DEL PINO, M.A. (1955).—Contribucion al cultivo del virus aftoso por el metodo de Frenkel. *Gac. Vet.*, 17: 3-8.
- 2) CUNHA, R.; ABREU MARTINS, I.; CARVALHO J.M. & PASSOS, W. (1951).—Tipificação pela prova de fixação do complemento de amostras de vírus da febre aftosa coletadas no Brasil. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 19: 91-102.
- 3) CUNHA, R.G.; BATISTA Jr., J.A.; SERRÃO, U.M. & TORTURELLA, I. (1957).—El uso de los ratones lactantes en la evaluacion de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significacion inmunologica. *Gac. Vet.* 19: 3-27.
- 4) FOGEBY, E. & JOHNSON, M.L. (1952).—Expériences faites avec la méthode de Frenkel. *Bull. Off. Inter. Epiz.*, 37: 473.
- 5) FRENKEL, H.S. (1951).—Research on foot-and-mouth disease. III. The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. *Am. J. Vet. Res.*, 12: 187-190.
- 6) FRENKEL, H.S. & RIBELIN, W.E. (1956).—Cultivation of Foot-and-Mouth disease virus in explanted epithelium of the bovine tongue. IX. Growth characteristics of the virus in large scale tissue culture. *Am. J. Vet. Res.*, 17: 40.

- 7) GIRARD, H. & MACKOWIAK, C. (1953).—La culture du virus aphteux au state industriel. *Rev. Immun.*, 17: 224.
- 8) HENDERSON, W.M. (1953).—The use of irus culture in foot-and-mouth disease research. *Proc. XVth Int. Vet. Congr., Part. 1, Vol. 1*: 191.
- 9) HENDERSON, W.M. & GALLOWAY, I.A. (1953).—The use of culture virus in the preparation of foot-and-mouth vaccine. *J. Hyg.*, 51: 546-558.
- 10) HENDERSON, W.M. (1958).—Comunicação pessoal.
- 11) MACE, D.L.; DUNNE, H.W.; ETCHORN, E.A. & CAMARGO, F. (1951).—In vitro cultivation of the Mexican strain (Vallée "A" type) of Foot-and-mouth disease virus. *J. Inf. Dis.*, 88: 212-223.
- 12) REED L.J. & MUENCH, R. (1938).—A simple method of estimating 50 per cent end points. *Am. J. Hyg.*, 27: 493-497.
- 13) RIVENSON, S. (1956).—Cultivo del virus aftoso por la tecnica de Frenkel y su utilizacion en la produccion de vacunas. *Rev. Med. Veterinaria, B. Aires*, 38: 97-110.
- 14) SKINNER, H.H. (1951).—Propagation of strains of foot-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proc. Royal Society of Med.*, 44: 1041-1044.
- 15) UBERTINI, B.; NARDELLI, L.; BAREI, S. & SANTERO, G. (1955).—Observations et études sur le virus de la fièvre aphteuse cultivé "in vitro" suivant la méthode de Frenkel. *Bull. Off. Inter. Epiz.*, 43: 559-574.
- 16) WILLEMS, R. & LEUNEN, J. (1956).—Application de la méthode de culture du virus aphteux selon H. Frenkel. Résultats obtenus au laboratoire de Recherches vétérinaires de l'État, Uccles Bruxelles. *Bull. Off. Inter. Epiz.*, 45: 298-308.