

ARTÍCULO ORIGINAL

Respuesta humoral a dos inmunógenos contra la Peste Porcina Clásica en condiciones de campo

O. Fonseca^I, Patricia Domínguez^{II}, E. Ferrer^I, O. Fernández^I, Sara Castell^I, María Teresa Frías^I, Marisela Suárez^{II}, María Pilar Rodríguez^{II}, C. Montero^{II}, María Irian Percedo^I

^ICentro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Correo electrónico: osvaldo@censa.edu.cu; ^{II}Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Habana, Cuba.

RESUMEN: La Peste Porcina Clásica (PPC) es una enfermedad altamente contagiosa, presente en Cuba de forma endémica, por lo que está sujeta a un programa de control que incluye la vacunación con la vacuna viva atenuada de la cepa China lapinizada (LABIOFAM, S.A.), de probada seguridad y efectividad. Por las bondades que brinda el uso de una vacuna marcadora en fases avanzadas del control, fue aplicado en condiciones de campo un candidato vacunal de subunidad, basado en la glicoproteína E2 (CVE2) del virus de la peste porcina clásica. Se comparó la respuesta serológica inducida por el nuevo candidato vacunal con la inducida por la vacuna cepa China (VCC) en un mismo escenario epidemiológico, una granja porcina con antecedentes de manifestación clínica de la enfermedad y sujeta a vacunación sistemática con la VCC. Se evaluó la respuesta inmune humoral de animales vacunados con ambos productos mediante el ensayo de neutralización ligado a la peroxidasa (NPLA). Para ello se investigaron muestras de sangre obtenidas en diferentes fases del ciclo tecnológico. Se encontró en los sueros evaluados de animales vacunados con el CVE2 que estos mantuvieron altos títulos ($\geq 1:100$) hasta el final de la ceba, a diferencia de los vacunados con la VCC. También se comprobó que animales vacunados con la VCC tuvieron un riesgo relativo 12,2 veces mayor de tener títulos de anticuerpos $<1:50$ que los vacunados con el CVE2.

Palabras clave: peste porcina clásica, vacuna viva atenuada, vacuna de subunidad, anticuerpos.

Humoral response to two immunogens against Classical Swine Fever under field conditions

ABSTRACT: Classical Swine Fever is a highly contagious disease; it is endemic in Cuba and under control by a program that includes vaccination with the live attenuated vaccine of the lapinized Chinese strain (LABIOFAM, S.A.) of proven safety and effectiveness. For the advantages provided by the use of a marker vaccine in advanced stages of the disease control, a subunit vaccine candidate based on virus E2 glycoprotein of the Classical Swine Fever was evaluated in the field. The serological response induced by the new vaccine candidate was compared with that induced by the Chinese strain in the same epidemiological scenario. The selected pig farm had a history of clinical manifestation of the disease and was subjected to a routine vaccination with the Chinese strain. The humoral immune response in animals vaccinated with both products was evaluated by the neutralization peroxidase-linked assay (NPLA). For this purpose, blood samples were examined at different phases of the technological cycle. The sera of the animals tested with the vaccine candidate showed that they remained with high titers ($\geq 1:100$) until the end of the fattening period, differing from those animals vaccinated with the live attenuated vaccine of the Chinese strain. It was also found that the Relative Risk of having antibody titers $<1:50$ was 12.2 times higher in the animals vaccinated with the Chinese strains than in those vaccinated with the vaccine candidate.

Key words: Classical Swine Fever, live attenuated vaccine, subunit vaccine, antibody.

INTRODUCCIÓN

La Peste Porcina Clásica (PPC), conocida también como cólera porcino o fiebre porcina clásica, es una enfermedad altamente contagiosa. Los signos clínicos y hallazgos anatómopatológicos son diversos y muchas veces se dificulta su reconocimiento inmediato (1). Puesto que la propagación del virus puede ser muy rápida, los brotes que se producen causan importantes pérdidas económicas (2), siendo numerosos los reportados en casi todo el mundo (3).

En muchas regiones geográficas se han tenido avances significativos en el control y erradicación de la PPC, como es el caso de Norteamérica, América Central y Europa, sin embargo aún persisten amplias regiones donde la enfermedad se mantiene de forma endémica, lo que además de constituir una amenaza permanente para los países libres, sigue ocasionando graves consecuencias sanitarias, económicas y sociales en las áreas afectadas, con un efecto desfavorable en su desarrollo (4).

Con la aplicación de VCC (LABIOFAM, S.A) como parte de un programa de control de la PPC, en Cuba dejaron de presentarse focos de la enfermedad durante más de 25 años, hasta que en 1993 reemergió en el occidente del país debido, al crecimiento de la población porcina de traspatio y la no disponibilidad de suficiente vacuna, coincidentemente con una epidemia de la enfermedad hemorrágica viral del conejo que también incidió en la falta de estos animales para su producción, entre otros muchos factores (5) También se reportó que el brote pudo estar ocasionado por *i)* el escape de la cepa de confrontación Margarita, *ii)* la reemergencia de virus circulantes, previamente inadvertidas (6). En Cuba se mantiene el uso de la VCC desde 1962 y actualmente está establecida la vacunación de las reproductoras y sus crías al momento del destete y los sementales cada 6 meses, y en granjas con antecedentes de la enfermedad, se revacuna la descendencia a los 35 días, en la categoría preceba (7).

En los programas de control y erradicación de la PPC, la vacunación con virus vivos atenuados desempeña un importante papel, pues estas protegen a los cerdos contra los signos clínicos y la diseminación viral, e inducen inmunidad estéril (8). Las vacunas vivas atenuadas inducen una respuesta de anticuerpos similar al de los animales infectados con el virus de la peste porcina clásica (VPPC), sin embargo, mediante métodos serológicos no se puede distinguir entre animales vacunados e infectados naturalmente con cepas salvajes de virus (9). Esta facultad es muy deseada en las nuevas vacunas en desarrollo, pues si además de inducir una protección temprana, existe la posibilidad de diferenciar animales vacunados de infecta-

dos (principio DIVA por sus siglas en inglés), serían elegibles para su empleo en situaciones de emergencia ante los problemas éticos y económicos que se confrontan por el sacrificio preventivo de animales sanos en gran escala (9, 10).

Una vez disponible en nuestro país el CVE2 con resultados satisfactorios en las pruebas clínicas en condiciones controladas (11-13), se procedió a su evaluación en condiciones de campo, por lo que este trabajo tiene como objetivo comparar la respuesta serológica inducida por el CVE2 con la inducida por la VCC en un mismo escenario epidemiológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la evaluación del CVE2 se seleccionó una granja porcina de ciclo cerrado y con historia de endemismo de PPC, sometida a vacunación sistemática con la VCC. Los animales vacunados con la VCC recibieron dos dosis, en la primovacuna al destete (33 días de nacidos) y 35 días después (7). Esta práctica se suspendió a partir del momento en que se comenzó a aplicar el CVE2, el que se administró también en dos dosis, a los 21 y 42 días de edad de los animales (14).

Se extrajeron muestras de sangre por punción del seno orbital a 140 animales vacunados con VCC y 252 vacunados con CVE2, en diferentes fases del ciclo tecnológico (Tabla 1).

TABLA 1. Edad de los animales en los muestreos realizados./ *Age of animals in each sampling.*

Muestreos	T0	T1	T2	T3
Edad Promedio (± 3 días)	63	105	147	189

La presencia de anticuerpos neutralizantes contra el VPPC se determinó mediante la técnica, ensayo de neutralización ligado a la peroxidasa (NPLA) (15).

Se consideraron títulos de anticuerpos iguales o mayores a 1:50 como suficientes para brindar protección contra la presentación de signos clínicos tanto para VCC (16) como para el CVE2 (17). Los resultados serológicos de los animales vacunados con ambos productos vacunales se contrastaron mediante una comparación de proporciones mediante el test Chi-Cuadrado, cuyas diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$, en este caso se calculó el Riesgo Relativo (18). Para el procesamiento estadístico se utilizó el software Epidat 3.1.

Atendiendo a que en las pruebas clínicas en condiciones de laboratorio los animales vacunados con el CVE2 mostraron altos títulos de anticuerpos (11), la NPLA se realizó solo con diluciones de suero 1:50 y 1:100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La frecuencia de animales vacunados con VCC y títulos de anticuerpos $\geq 1:50$ tuvo una tendencia marcadamente decreciente en el transcurso del período evaluado, y ya a los 105 (± 3) días de edad el 40% de los animales tenían títulos $< 1:50$, disminuyendo a menos del 50% en las etapas más avanzadas del ciclo tecnológico. Esta condición puede incrementar la circulación viral y constituir un riesgo para todo el rebaño, aun cuando puedan no llegar a evidenciar signos clínicos de enfermedad. Sin embargo, en los animales vacunados con CVE2 no se constataron diferencias entre las diferentes fases del ciclo tecnológico, excepto entre el primer muestreo a los 63 (± 3) días y el último a los 189 (± 3) días, al momento del sacrificio de los animales en matadero (Figura 1).

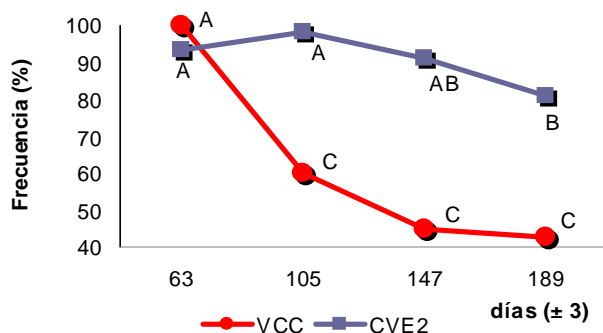


FIGURA 1. Porcentaje de animales vacunados con el CVE2 ($\geq 1:100$) y VCC ($\geq 1:50$) en diferentes fases del ciclo tecnológico (Letras diferentes $p < 0.05$). / *Percentage of animals vaccinated with CVE2 ($\geq 1:100$) and VCC ($\geq 1:50$) in different phases of the technological cycle.*

También se debe destacar que en los animales vacunados con CVE2 el porcentaje de animales con títulos $\geq 1:100$ fue siempre superior al 80%, clásicamente considerado como suficiente para una buena inmunidad en un rebaño, en tanto para los vacunados con la VCC ya a los 105 (± 3) y 189 (± 3) días de edad, fue del 60% y 42,5%, respectivamente.

En sentido general, se constató un mayor porcentaje de animales muestreados con títulos $\geq 1:50$ en los vacunados con CVE2 representan el 96,4%, en comparación con los que recibieron la VCC (56,4%) (Figura 2).

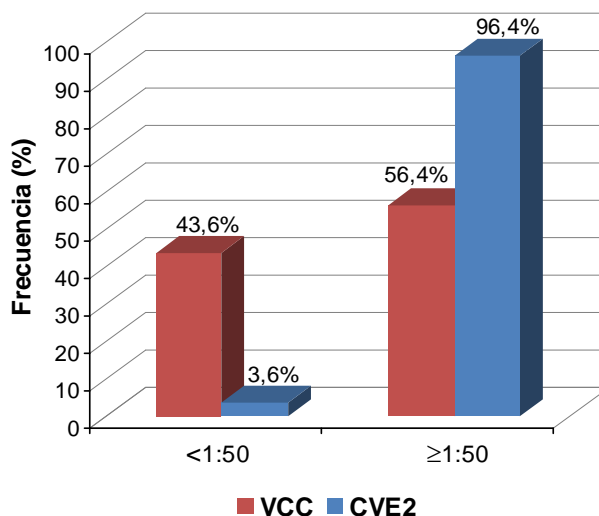


FIGURA 2. Comportamiento general de la respuesta serológica en animales vacunados con CVE2 y VCC. / *General performance of the serological response in animals vaccinated with CVE2 and VCC.*

El Riesgo Relativo obtenido al comparar la respuesta serológica entre animales vacunados con ambos inmunógenos fue de 12,2; con un rango variable entre 6,25 y 23,81, con un Intervalo de Confianza (IC) del 95%, para $p < 0,0001$. Así, los animales vacunados con el CVE2 tuvieron mayor probabilidad de tener títulos de anticuerpos $\geq 1:50$ que los vacunados con la VCC.

El uso de la vacuna VCC en Cuba implica algunos riesgos para el control de la PPC tales como: *i*) la limitación del sistema productivo debido a la inestabilidad en el suministro de conejos certificados (en ocasiones a causa de brotes de enfermedad hemorrágica del conejo), *ii*) la ruptura de la cadena de frío a causa de problemas de transporte, fallos eléctricos o malas prácticas veterinarias y *iii*) la imposibilidad de diferenciar los cerdos vacunados de los infectados, lo que dificulta la vigilancia epidemiológica (13).

Los títulos de anticuerpos $< 1:12,5$ en cerdos vacunados son insuficientes para prevenir la enfermedad y muerte, mientras que títulos entre 1:12,5 y 1:30 por una parte parecen ofrecer una protección adecuada para sobrevivir a un desafío, por otra parte, son insuficientes para proteger contra la excreción viral. Así, cuando al aplicar una vacuna viva atenuada, los títulos de anticuerpos inducidos entre 1:25 y 1:49, el cerdo es considerado individualmente protegido contra la enfermedad. Pero cuando el título resulta $\geq 1:50$ evita además la excreción viral y por tanto la transmisión horizontal produciendo una adecuada protección poblacional (16).

Resultados similares se obtuvieron al evaluar vacunas marcadoras basadas en la glicoproteína E2, pues títulos de anticuerpos neutralizantes $\geq 1:50$ son capaces de prevenir la propagación de la PPC en animales vacunados al brindar protección contra el virus (17).

En la granja, objeto de estudio, los resultados desfavorables para la vacuna VCC pueden tener relación con la mayor susceptibilidad de las vacunas de virus vivos atenuados a la inactivación, específicamente por los cambios de temperatura durante el almacenamiento, transporte, manejo y los procedimientos de inoculación (19, 20). Por otra parte, después de la reconstitución, las vacunas liofilizadas se pueden inactivar rápidamente a altas temperaturas ambientales, lo que conlleva a la administración de dosis insuficientes y el consiguiente riesgo de una protección incompleta frente a la infección viral (21).

En este sentido, una ventaja que ha demostrado tener el CVE2 es la estabilidad y capacidad protectora, luego de mantenerse tanto a 4 como a 37°C durante 7 días (22).

Una vacuna ideal contra el VPPC, debería inducir respuestas tanto humorales como celulares. Además de los anticuerpos neutralizantes, otras armas de la respuesta inmune, tales como la inducción de respuesta T CD4 + específica pueden desempeñar un papel en la protección contra el VPPC (23). En cerdos vacunados con la vacuna viva atenuada de la cepa China pueden detectarse interferón gamma específico contra el VPPC tan temprano como 6 días y hasta 140 días después de la vacunación. A los 6 días post-vacunación los cerdos están protegidos contra el desafío, aunque no se detecten anticuerpos neutralizantes (24). La población de linfocitos T CD4⁺ CD8⁺ se encontró como la mayor productora de interferón gamma durante la semana siguiente a la vacunación y esta marcada respuesta celular es uno de los mecanismos inmunológicos protectivos inducidos por las vacunas vivas atenuadas de la cepa China, particularmente durante las etapas tempranas de la inmunidad (25).

Como las vacunas marcadoras tienen similar eficacia que las clásicas vacunas vivas modificadas contra el VPPC, lo que las coloca en posición ventajosa es la posibilidad que brindan para diferenciar animales vacunados de infectados mediante el uso de pruebas diagnósticas complementarias (26).

A esta cualidad se suma la capacidad del nuevo CVE2 para producir elevados títulos de anticuerpos neutralizantes en más del 80% de los animales hasta el final de su ciclo tecnológico, contribuyendo así al mantenimiento de una adecuada inmunidad poblacional en los rebaños vacunados.

Finalmente se debe señalar la importancia de los estudios aún pendientes, en cuanto a la caracterización del componente de la inmunidad celular en la respuesta a este nuevo producto vacunal, además de la evaluación de su capacidad para evitar la transmisión vertical del VPPC.

REFERENCIAS

1. Moennig V. Clinical Signs and Epidemiology of Classical Swine Fever: A Review of New Knowledge. *Vet J.* 2003;165(1):11-20.
2. Elbers A. Local and global impact of disease outbreaks. *Adv Pork Prod.* 2002;13:17-27.
3. Paton D, Greiser-Wilke I. Classical swine fever-an update. *Res Vet Sci.* 2003;75(3):169-178.
4. Ferrer E, Fonseca O, Percedo M, Abeledo M. La peste porcina clásica en las américas y el caribe. actualidad y perspectivas de control y erradicación. *Rev Salud Anim.* 2010;32(1):11-21.
5. Frías M. Reemergence of Classical Swine Fever in Cuba 1993-1997. *Rev Salud Anim.* 2003;25(1):1-4.
6. Díaz de Arce H, Núñez JI, Ganges L, Barreras M, Teresa Frías M, Sobrino F. Molecular epidemiology of classical swine fever in Cuba. *Virus Res.* 1999;64(1):61-67.
7. Instituto de Medicina Veterinaria-IMV. Programa de Prevención y Control de la peste porcina clásica en la República de Cuba. Imprenta Ministerio de la Agricultura. 2005.
8. Van Oirschot J. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol.* 2003;96(4):367-384.
9. Greiser-Wilke I, Moennig V. Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies. *Anim Health Res Rev.* 2004;5(02):223-226.
10. Beer M, Reimann I, Hoffmann B, Depner K. Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine.* 2007;25(30):5665-5670.
11. Vega E. Respuesta inmune humoral de un candidato vacunal de subunidad proteica E2 contra el virus de la peste porcina clásica. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Cuba. 2011.

12. Barrera M, Sánchez O, Farnós O, Rodríguez MP, Domínguez P, Tait H, et al. Early onset and long lasting protection in pigs provided by a classical swine fever E2-vaccine candidate produced in the milk of goats. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;133(1):25-32.
13. Toledo J, Sanchez O, Montesino R, Farnos O, Rodriguez M, Alfonso P, et al. Highly protective E2-CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. *J Biotech.* 2008;133(3):370-376.
14. CENSA-CIGB. Indicaciones de uso de la vacuna por subunidad E2 en rebaños porcinos. Protocolo de evaluación en campo. Centro Nac. de Sanidad Agropecuaria y Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Documento de trabajo. 2009.
15. OIE. Chapter 2.8.3. Classical Swine Fever (hog cholera). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.08.03_CSF.pdf (Consultado: 12/12/2011).
16. Terpstra C, Wensvoort G. The protective value of vaccine-induced neutralising antibody titres in swine fever. *Vet Microbiol.* 1988;16(2):123-128.
17. Bouma A, De Smit A, De Kluijver E, Terpstra C, Moormann R. Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. *Vet Microbiol.* 1999;66(2):101-114.
18. Thrusfield M, Hernández JAC, Sánchez JG. *Epidemiología veterinaria: Acribia Zaragoza;* 1990.
19. Rutili D, Frescura T, Titoli F. Peste suina classica: Prove di vaccinazione per via orale con l'impiego di esche. *Atti Soc Ital Sci Vet.* 1988;42:789-791.
20. Yilma T. Prospects for the total eradication of rinderpest. *Vaccine.* 1989;7(6):484-485.
21. Chenut G, Saintilan A, Burger C, Rosenthal F, Cruciere C, Picard M, et al. Oral immunisation of swine with a classical swine fever vaccine (Chinese strain) and transmission studies in rabbits and sheep. *Vet Microbiol.* 1999;64(4):265-276.
22. Barrera M, Sanchez O, Prieto Y, Castell S, Naranjo P, Rodriguez M, et al. Thermal stress treatment does not affect the stability and protective capacity of goat milk derived E2-marker vaccine formulation against CSFV. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;127(3-4):325-331.
23. Ganges L, Núñez JI, Sobrino F, Borrego B, Fernández-Borges N, Frías-Lepoureau MT, et al. Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: Cellular responses also play a role in protection. *Vet J.* 2008;177(2):169-177.
24. Suradhat S, Intrakamhaeng M, Damrongwatanapokin S. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;83(3-4):177-189.
25. Suradhat S, Damrongwatanapokin S, Thanawongnuwech R. Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. *Vet Microbiol.* 2007;119(1):1-9.
26. Van Oirschot J. Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotech.* 1999;73(2-3):195-205.

Recibido: 2-8-2012 .

Aceptado: 13-11-2012.