

VACINAS ANTIAFTOSA OLEOSAS COM E SEM ANTÍGENOS CONCENTRADOS POR HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO: RESPOSTA IMUNE DE BOVINOS PRIMOVACINADOS¹

SYLIO ALFREDO PETZHOLD², JOSÉ ANTÔNIO PIRES PRADO², PAULO ESTANISLÃO RECKZIEGEL², JOÃO CARLOS FREITAS TEIXEIRA³, VERA BEATRIZ WALD⁴

RESUMO - A resposta imune, induzida por três diferentes vacinas antiaftosa oleosas, foi comparada em bovinos primovacinados. As vacinas utilizadas foram: 1) vacina oleosa referência (VOR) sem hidróxido de alumínio; 2) VOR com hidróxido de alumínio (VOAl) e 3) vacina oleosa com antígeno 10 vezes concentrado por hidróxido de alumínio (VO10x). Cada vacina experimental foi aplicada em um grupo de 9 bovinos, recebendo cada animal a dose de 5 ml por via intramuscular. Os anticorpos neutralizantes induzidos pelas vacinas foram quantificados ao zero dia, e aos 30, 90 e 180 dias pós-vacinação através de testes de vírusneutralização (VN). Todos os animais foram testados previamente por VN e para a presença de anticorpos contra antígenos associados à infecção viral (VIA), sendo considerados sensíveis à febre aftosa e permanecendo VIA negativos por todo o período do experimento. Os resultados obtidos revelaram que, isoladamente, a concentração do antígeno 10 vezes ou a adição de hidróxido de alumínio (HAL), não foram suficientes para incrementar significativamente ($P>0,05$) os índices de anticorpos neutralizantes. A concentração do antígeno 10 vezes e a concomitante adição de HAL estimularam significativamente ($P<0,05$) os níveis de anticorpos circulantes detectados.

Palavras-chave: imunologia, vacina bovina, aftosa, hidróxido de alumínio, vacina oleosa.

FOOT-AND-MOUTH DISEASE OIL VACCINES WITH OR WITHOUT ALUMINUM HYDROXIDE CONCENTRATION OF ANTIGEN: IMMUNE RESPONSE IN VACCINATED CATTLE

ABSTRACT - The immune response of three different formulations of foot-and-mouth disease (FMD) oil vaccines in vaccinated cattle was compared. The vaccines used were: 1) standard oil vaccine (VOR) without aluminum hydroxide; 2) VOR with aluminum hydroxide (VOAl) and 3) oil vaccine containing antigen 10x concentrated by aluminum hydroxide (VO10x). Each vaccine was used in a group of 9 animals, and each animal received a 5ml dose of vaccine by intramuscular route. Neutralizing antibodies were evaluated by virus neutralization test (VN) at day 0 and at 30, 90 and 180 days post vaccination. All animals were shown previously to be free of either neutralizing or anti-VIA (viral infection associated antigen) antibodies and were considered to be susceptible to FMD. Serology for anti-VIA antibodies was carried out and the tests were negative during the experiment. The results obtained showed that concentrating antigen (10x) was not enough to increase significantly ($P>0.05$) the levels of neutralizing antibodies, and also that the aluminum hydroxide (HAL) included in VOR did not increase significantly the level of these antibodies. Antigen concentration (10x) plus the addition of HAL increased significantly ($P<0.05$) the antibody levels of vaccinated animals.

Key words: Immunology, cattle vaccines, foot-and-mouth disease, aluminum hydroxide, oil vaccines.

INTRODUÇÃO

A febre aftosa (FA) é uma enfermidade vesicular, infecto contagiosa, com grande poder de difusão, que afeta em forma natural os animais biungulados domésticos e selvagens. O agente etiológico é um vírus pertencente à família Picornaviridae, gênero *Aftovirus* ou vírus da febre aftosa (TALBOT e BROWN, 1972; COOPER et al., 1978).

É uma das mais temidas e prejudiciais enfermidades que afetam a pecuária, devido às graves perdas diretas e indiretas que causa à comunidade rural e a todos os

segmentos a ela relacionados, com conseqüente impacto político e sócio-econômico negativo. Os efeitos danosos refletem-se não só na produção animal, mas na economia de uma maneira geral, pois atingem a comercialização nacional e internacional de animais, seus produtos e subprodutos. As maiores perdas são devidas às profundas repercussões internacionais onde ocorrem as principais implicações políticas e restrições comerciais.

A FA há mais de 450 anos ameaça a saúde da pecuária (HYSLOP, 1972), deixando sob risco todas as áreas do planeta (BROWN, 1981). É considerada como

01. Parte da tese apresentada pelo autor no 1º CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, 1994.

02. Méd. Vet., M.Sc. - FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, BR 116 (Sul) km 291, 92990-000 Eldorado do Sul - RS/BRASIL.

03. Biol. - FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor.

04. Méd. Vet., M.Sc. - Prof. da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000 Porto Alegre - RS/BRASIL.

Recebido para publicação em 26/01/1996.

a mais importante das afecções transmissíveis dos animais (HYSLOP, 1972; BROWN, 1981).

As vacinas tiveram extraordinário sucesso e constituem-se em uma das grandes estratégias para o controle e erradicação de enfermidades infecciosas como a FA (BROWN, 1984; CASAS OLASCOAGA et al., 1988), principalmente quando associadas a medidas sanitárias adequadas.

Desde o início de sua utilização, as vacinas antiaftosa oleosas (CUNLIFFE e GRAVES 1963) mostraram-se superiores às vacinas aquosas constituídas por adjuvante a base de hidróxido de alumínio (HAL) associado ou não à saponina (RIVENSON et al., 1972; AUGÉ DE MELLO et al., 1975; BARTELING e VREESWIJK, 1991). Esta diferença torna-se ainda mais evidente, em bovinos jovens (AUGÉ DE MELLO et al., 1975).

O HAL é um gel com poder adsorvente e de fácil sedimentação, o que permite por simples eliminação do sobrenadante, manter no sedimento o gel com o antígeno desejado (ABARACÓN, 1974; ABARACÓN et al., 1982,a). Por estas propriedades o HAL foi utilizado para concentrar antígenos destinados a vacinas oleosas (VO). Desta associação entre veículo oleoso e HAL surgiram vacinas antiaftosa oleosas que foram avaliadas em diferentes espécies animais e analisadas sob diversos aspectos como: diferentes proporções entre fase oleosa e fase aquosa; distintas concentrações de antígeno ou ainda com doses reduzidas (SÓLIOM et al., 1977; RIVENSON et al., 1982,a; ABARACÓN et al., 1982,a; ABARACÓN et al., 1982,b; MARCOVECCHIO et al., 1983). Assim, o uso concomitante de veículos oleosos e HAL deu origem a VO visando principalmente o incremento de sua potência, a obtenção de formulações que produziram uma melhor imunidade, ou ainda a redução de sua dose.

Os experimentos supra citados tiveram por objetivos: comparar adjuvantes, concentrar vírus, reduzir a dose da vacina e avaliar a melhor proporção entre fases aquosa e oleosa, havendo em algumas conclusões a "sugestão" de efeito sinérgico entre o HAL e o veículo oleoso, não sendo suficientemente esclarecido se a concentração do antígeno por HAL influi na eficácia da vacina antiaftosa oleosa para bovinos quando utilizada a dose usual de 5 ml.

Observou-se que, em animais primovacinados com vacinas antiaftosa, concentrações antigênicas de até 20 vezes não modificam significativamente a resposta imune (INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA e CENTRO DE ENFERMIDADES ANIMALES DE PLUM ISLAND, 1978), a qual só é aumentada quando as concentrações antigênicas oscilam entre 25 e 47000 vezes (PAY, 1973; RWEYEMAMU et al., 1984).

O presente experimento dá seqüência aos anteriormente citados, adicionando mais informações a respeito da utilização do HAL concomitantemente ao adjuvante oleoso, tendo como objetivos: 1) testar a eficácia da concentração antigênica (10 vezes) por HAL, em bovinos primovacinados com vacina antiaftosa oleosa; 2) verificar se há efeito aditivo adjuvante entre o veículo oleoso e o HAL e 3) verificar se a concentração antigênica (10 vezes) mais a adição de HAL incrementa o nível de anticorpos neutralizantes de bovinos primovacinados.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

Os experimentos a campo e provas laboratoriais foram executados no Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF) - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) - Secretaria da Ciência e Tecnologia - RS/Brasil.

Animais

Utilizaram-se bovinos, oriundos do rebanho do CPVDF, com 15 a 24 meses de idade, sem contato prévio com os antígenos do vírus da FA, segundo o descrito em CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA (1980) e por VIANNA FILHO et al. (1993). Antes do início do experimento, não se detectou no soro desses animais, anticorpos anti VIA (ALONSO FERNÁNDEZ et al., 1984) ou anticorpos neutralizantes para o vírus da FA (FERREIRA, 1976).

Suspensões Víricas

Elaboraram-se suspensões monovalentes, replicando-se o vírus em células BHK 21 Clone 13 cultivadas em monocamadas (ABARACÓN et al., 1979; OPS, 1987; ALONSO et al., 1994). Utilizaram-se os vírus: O₁ Campos-Br/58, A₂₄ Cruzeiro-Br/55, A Venceslau-Br/76 e C₃ Indaial-Br/71 (ALONSO FERNÁNDEZ et al., 1981), do cepário do laboratório de produção de vacinas antiaftosa do CPVDF.

Inativação

As suspensões víricas foram inativadas com 3 mM de etilenoimina binária (BEI), a 26 °C por 24 horas. A BEI foi obtida a partir de uma solução a 0,1 M de bromohidrato de bromoetilamina (BEA) em hidróxido de sódio a 0,2 N, mantida a 37 °C por uma hora (BAHNEMANN et al., 1974; BAHNEMANN, 1975; GIRARD et al., 1977).

Avaliação e Controles das Etapas de Produção

Com as suspensões destinadas à produção das vacinas foram realizados testes de esterilidade, titulação de infectividade, provas sorológicas de fixação do

complemento (tipificação, subtipificação e titulação), controles de inativação ou não infecciosidade (OPS, 1987), bem como determinação da concentração da partícula 146 S por densidade em gradiente de cloreto de cério⁵ (CENTENO e OBIAGA, 1982; OPS, 1987) e integridade da partícula VP1⁶ (OPS, 1987).

Formulação das Vacinas Oleosas

Produziram-se três vacinas oleosas em forma de emulsão primária (AUGÉ DE MELLO et al., 1975; AUGÉ DE MELLO et al., 1980; OPS, 1987; BAHNEMANN e MESQUITA, 1987), utilizando-se o

Montanide 888^{®7} como emulsificante (ABARACÓN et al., 1982,b). Todas as vacinas oleosas experimentais estavam constituídas por 50% de fase oleosa e 50% de fase aquosa.

a) Fase Aquosa:

As suspensões víricas monovalentes foram mescladas, homogeneizadas e, após, divididas em três alíquotas que deram origem às diferentes fases aquosas das vacinas experimentais. As características e proporções dos antígenos utilizados na elaboração das vacinas constam na Tabela 1.

TABELA 1 – Composição e características da mescla de antígenos que deu origem às diferentes fases aquosas das vacinas antiaftosa oleosas experimentais, aplicadas em bovinos

Vírus ^a	MONOVALENTES					Vírus	MESCLA FINAL		
	ml	TFC	TI	MAg ^d	I ^e		ml	TFC	MAg/dose ^f
O ₁	2900	1/25	6,71	5902	ND	O1	5700	1/11	5,094
O ₁	850	1/51	6,50	4986	ND				
O ₁	1950	1/19	6,38	3679	ND				
A ₂₄	2500	1/25	7,68	4783	CC	A24	2500	1/6	2,135
A _v	2700	1/16	6,89	4198	MR	AV	3200	1/6	2,283
A _v	500	1/19	7,67	2900	CC				
C ₃ I	2600	1/59	6,71	8021	MR	C3I	2600	1/7	3,724

^a - Vírus: O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro, A Venceslau e C₃ Indaial.

^b - Título fixador de complemento 50% - 4 unidades hemolíticas - 90 minutos.

^c - Título infeccioso 50%. Índices em log. base 10.

^d - Massa antigênica em ug por ml.

^e - Integridade da partícula VP1: ND = não determinado; CC = 100% clivado e MR = 75% clivado.

^f - Massa antigênica em ug, estimada a partir das monovalentes, contida em 2,5 ml da mescla antigênica.

b) Fase Oleosa

Composta por 90% de óleo branco refinado (Marcol 52^{®8}) e 10% de emulsificante (Montanide 888).

Características das Vacinas Oleosas Experimentais

Estas vacinas diferenciaram-se apenas na constituição da fase aquosa.

1 - Vacina Oleosa Referência (VOR)

Fase aquosa = mescla das suspensões monovalentes.

2 - VOR com Hidróxido de Alumínio⁹ (VOAI)

Fase aquosa adicionada de HAI a 2,5% de óxido de alumínio. Proporções: 100 partes de fase aquosa e 50 partes de HAI. Após suave agitação por 2 h e repouso por 24 h a 4°C, retirou-se 50 partes de sobrenadante, para manter-se a mesma massa antigênica da VOR.

3 - Vacina Oleosa com Antígeno 10 Vezes Concentrado (VO10x)

A partir de uma alíquota do mesmo HAI utilizado em 1 e procedendo-se da mesma maneira, concentrou-

05. Provas executadas no CPFA.

06. Provas executadas no CPFA.

07. Octadecenoato de anidromanitol - HLB = 5,0, SEPPIC, Paris, França.

08. EXXON CORPORATION, USA. Produto aprovado pelo CODEX Europeu, Farmacopéia e Food and Dug Administration dos Estados Unidos.

09. Hidróxido de alumínio gentilmente cedido pelo Laboratório Bayer S.A. - Porto Alegre.

se o antígeno contido na fase aquosa por eliminação do sobrenadante, após sedimentação do complexo antígeno - HAI (ABARACÓN, 1974).

Proporções: 1000 partes de fase aquosa e 50 partes de HAI com a retirada de 950 partes de sobrenadante. Assim obteve-se uma fase aquosa com a mesma concentração de HAI que a VOAI, porém com 10 vezes mais massa antigênica (MAg).

Os líquidos sobrenadantes oriundos das preparações 2 e 3 foram submetidos a provas sorológicas de tipificação por fixação do complemento (OPS, 1987), apresentando resultados negativos. O HAI utilizado foi submetido a provas biológicas do poder adsorvente (ABREU MARTINS, 1971; ABARACÓN, 1974), na proporção utilizada em 3 (5%), mantendo um índice de adsorção de 2,0 log. 10.

Para a preparação das vacinas oleosas experimentais, utilizou-se um emulsificador de mesa Silverson¹⁰.

Controles do Produto Final

Com as VO finais, realizaram-se testes de pureza bacteriológica, não infectividade, tipo de emulsão, condutividade e estabilidade, cujos resultados foram normais e dentro dos padrões estabelecidos (OPS, 1987).

Vacinações

Ao acaso, separaram-se os animais em três grupos de nove, reservando-se um tipo de vacina para cada grupo; cada bovino recebeu individualmente a dose de 5 ml por via intramuscular profunda no terço cranial do pescoço.

Colheitas de Sangue

Ao dia zero e aos 30, 90 e 180 dias pós-vacinação (DPV), os animais foram sangrados. Em todos estes tempos de sangria, foi pesquisada a presença de anticorpos anti VIA (proteína associada à infecção viral) nos soros dos bovinos, não sendo detectada a sua presença (ALONSO FERNÁNDEZ et al., 1984).

Imunidade Conferida

Acompanhou-se a indução, duração e queda dos níveis de anticorpos circulantes estimulados pelas três vacinas experimentais. Quantificaram-se estes anticorpos frente aos vírus utilizados na produção das vacinas, por vírusneutralização (VN), através da prova de microneutralização (FERREIRA, 1976), calculando-se seus índices pelo método de SPEARMANN - KÄRBER apud OPS (1987).

Delineamento Experimental

Para cada vacina (VO; VOAI; VO10x) foram sorteados 9 animais. Os soros de cada animal foram avaliados quanto a níveis de anticorpos circulantes, frente aos quatro vírus já citados.

Utilizou-se o delineamento em parcela subdividida, sendo consideradas como parcela principal as vacinas e subparcelas os tempos de sangria.

Análise Estatística

Os índices de VN obtidos são apresentados através da média aritmética e desvio padrão. Para fins de análise estatística, foram transformados em $1/\sqrt{y}$, com o objetivo de diminuir a heterogeneidade da variância e assimetria da distribuição dos dados.

A análise dos índices de VN foi feita empregando-se o Modelo Linear Generalizado de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_i = \mu + V_i + B_j(i) + \delta_{ij} + T_k + VT_{ik} + e_{ijk}$$

onde:

Y = índice de VN.

μ = média geral da característica na população.

V_i = efeito das vacinas.

$B_j(i)$ = efeito dos bovinos dentro de cada vacina.

δ_{ij} = erro pela variação dos bovinos dentro das vacinas.

T_k = efeito dos dias.

VT_{ik} = efeito da interação das vacinas com os dias.

e_{ijk} = erro experimental (aleatório).

No dia zero atribuiu-se o valor de 0,9 para o índice de VN de todos os animais.

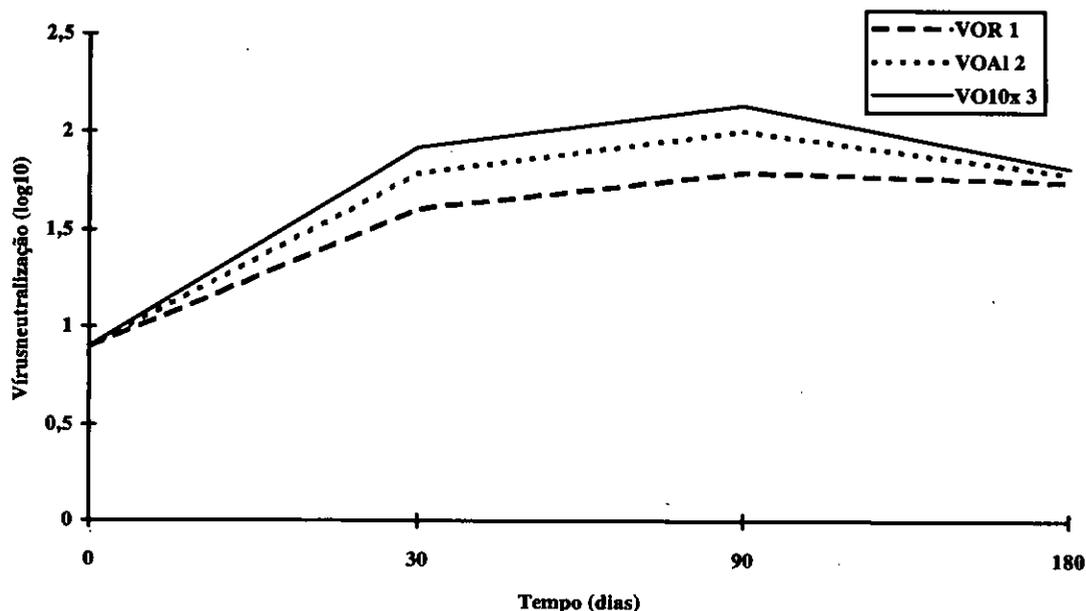
RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações das diferentes vacinas foram efetuadas levando-se em conta os índices de VN dos soros frente a todas as amostras de vírus (O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro, A Venceslau e C₃ Indaial), em todos os tempos de sangria, ou seja, aos 30, 90 e 180 DPV.

Os resultados evidenciaram uma superioridade ($P < 0,05$) da VO10x em relação à VOR, não se observando esta diferença comparativamente à VOAI. Embora aparente, não houve superioridade da VOAI em relação à VOR, pois não caracterizou-se diferença significativa ($P > 0,05$) entre ambas.

Através da Figura 1 visualiza-se o resultado das vacinações ao longo do tempo.

10. Silverson Machines Ltda. Waterside, Chesham, Bucks, Machine Serial n°18827 England.



¹ VOR = vacina oleosa referência.

² VOAI = vacina oleosa com hidróxido de alumínio.

³ VO10x = vacina oleosa com antígeno 10 vezes concentrado por hidróxido de alumínio.

FIGURA 1 – Índices de virusneutralização de bovinos primovacinados com vacinas antiaftosa oleosas experimentais, contendo os vírus O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro, A Venceslau e C₃ Indaial

O Anexo I fornece os valores referentes às vacinas e suas respectivas significâncias.

Analisando a Figura 1, verifica-se aos 90 DPV uma superioridade nos índices de anticorpos neutralizantes de todas as VO, em relação àqueles encontrados aos 30 DPV. Estes resultados coincidem com os dados da primeira publicação sobre vacinas antiaftosa oleosas (CUNLIFFE e GRAVES, 1963) e com os resultados de algumas publicações posteriores (CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA e DIRECCIÓN DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA, 1978; RIVENSON et al., 1982,a; RIVENSON et al., 1982,b; ROCHA et al., 1983), indicando que em bovinos primovacinados com VO antiaftosa, os níveis de anticorpos continuam subindo após os 30 dias de aplicação da vacina.

Inúmeras variáveis podem influenciar a qualidade das vacinas. O presente trabalho concentrou-se no exame de duas destas variáveis: a massa antigênica e a ação adjuvante. Em vacinas contra a FA estas influências vêm sendo estudadas desde que se observou a necessidade de aumentar o poder imunogênico de tais imunobiológicos.

A ação simultânea de dois adjuvantes foi aqui testada. Um deles, o HAI, vem sendo utilizado desde 1937, quando surgiu a primeira vacina eficaz contra a FA

(WALDMANN et al., 1937), tornando-se desde então o principal e mais utilizado adjuvante destas vacinas. O outro, o adjuvante oleoso, só começou a ser utilizado em FA a partir de 1963 (CUNLIFFE e GRAVES, 1963).

No presente estudo, comparando-se as três VO experimentais produzidas, foi possível avaliar, em vacinas antiaftosa oleosas, a influência das variáveis presença de HAI, concentração antigênica ou ação simultânea destes dois fatores na indução da resposta imune de bovinos primovacinados.

Em animais submetidos a primovacinação, não foi constatada diferença significativa entre a resposta induzida pela VOAI e a resposta induzida pelas demais vacinas testadas (VOR e VO10x). Entretanto observou-se diferença significativa entre as respostas induzidas pela VOR e VO10x.

Os resultados indicaram que a simples adição do HAI, apesar de sugerir, não alterou significativamente os índices de anticorpos neutralizantes detectados em bovinos primovacinados. A concentração de antígeno 10 vezes também não foi suficiente para alterar significativamente os títulos dos anticorpos induzidos pelas vacinas.

Em relação à concentração antigênica, os resultados aqui obtidos foram similares às observações de outros autores. Estes, em outros experimentos, constata-

ram que VO antiaftosa concentradas 20 vezes (INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA e CENTRO DE ENFERMEDADES ANIMALES DE PLUM ISLAND, 1978) não induziram em bovinos primovacinados e revacinados resposta imune significativamente diferente de vacinas oleosas não concentradas. Igualmente os estudos do CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA e DIRECCIÓN DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA (1978) são coerentes com os resultados aqui obtidos. Seus experimentos constataram que a diluição de VO antiaftosa oscilando entre 1/10 e 1/160 ocasionou apenas uma "relativa e pequena redução" na média dos títulos de anticorpos em bovinos, evidenciando que alterações de até 16 vezes na concentração do antígeno não modificam significativamente a resposta induzida em bovinos. PAY (1973); RWEYEMAMU et al.(1982); RWEYEMAMU et al.(1984); BLACK et al.(1984) e PAY e HINGLEY (1987) constataram em FA que a relação entre a dose de antígeno aplicada e a resposta imune caracterizou-se por intervalos entre doses de antígeno que oscilaram entre 25 e cerca de 47.000 vezes. Com base nestas conclusões, são necessárias diferenças antigênicas entre vacinas, similares ou superiores a 25 vezes, para que se obtenha diferença significativa na indução da resposta imune de bovinos primovacinados.

As observações do presente estudo dão suporte às conclusões dos pesquisadores anteriormente citados,

pois as vacinas com MAg 10 vezes diferentes não induziram níveis significativamente diferentes de anticorpos circulantes detectáveis.

Como a simples inclusão do HAI na VO, também não foi suficiente para implementar significativamente os títulos de anticorpos circulantes, é bastante sugestivo que a razão da diferença significativa entre a VO10x e a VOR tenha ocorrido devido a um efeito somatório entre os adjuvantes, complementado pela concentração antigênica, como sugerido por RIVENSON et al. (1982,a) e MARCOVECCHIO et al. (1983).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que, em bovinos primovacinados:

1) A concentração do antígeno (10 vezes) não foi suficiente para incrementar significativamente os níveis de anticorpos neutralizantes detectados.

2) A adição do hidróxido de alumínio na VO não incrementou significativamente os índices de anticorpos neutralizantes detectados, embora houvesse a indicação sugestiva de efeito somatório entre este gel e o adjuvante oleoso.

3) A concentração do antígeno (10 vezes) e a concomitante adição de hidróxido de alumínio, incrementaram significativamente o título de anticorpos neutralizantes detectados.

ANEXO I

Índices de virusneutralização (log₁₀) de bovinos primovacinados obtidos a partir de vacinas oleosas experimentais elaboradas com os vírus O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro, A Venceslau e C₃ Indaial

VACINA	n	30 DPV ¹		90 DPV		180 DPV		TOTAL	
		\bar{y}^5	s	\bar{y}	s ⁶	\bar{y}	s	\bar{y}	s
VOR ²	36	1,61	0,26	1,80	0,34	1,75	0,36	1,72 ^a	0,33
VOAI ³	36	1,79	0,60	2,01	0,49	1,79	0,40	1,86 ^{ab}	0,51
VO 10x ⁴	36	1,92	0,44	2,14	0,49	1,82	0,29	1,96 ^b	0,43

Letras minúsculas desiguais indicam diferença significativa (P < 0,05).

¹ DPV = dias pós vacinação.

² VOR = vacina oleosa.

³ VOAI = vacina oleosa com hidróxido de alumínio.

⁴ VO10x = vacina oleosa com antígeno 10 vezes concentrado por hidróxido de alumínio.

⁵ Média geral dos índices de virusneutralização dos quatro vírus utilizados.

⁶ Desvio padrão.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ABARACÓN, D. Algunos ensayos sobre producción de vacunas antiaftosas inactivadas a partir de virus multiplicado en conejos neonatos. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v.13-16, p.30-49, 1974.
- ABARACÓN, D.; GIACOMETTI, H.; MESQUITA, J. A. El uso de la etilenimina binaria (BEI) como inactivante de virus de la fiebre aftosa producido por diferentes técnicas semi-industriales. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v.33-34, p.1-5, 1979.
- ABARACÓN, D.; MESQUITA, J.A.; GIACOMETTI, H.; SALLÚA, S.; PÉREZ RAMA, R. Preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso usando antígenos adsorbidos sobre hidróxido de aluminio. *Boletín Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v.45-46, p.43-46, 1982,a.
- ABARACÓN, D.; MESQUITA, J.A.; SALLÚA, S.; PÉREZ RAMA, R. Emulsificante montanide 888 para preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v.45-46, p.51-53, 1982,b.
- ABREU MARTINS, I. Vacunas antiaftosas hidróxido saponinadas inactivadas por el formol. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v.1, p.1-19, 1971.
- ALONSO, A.; DARSIE, G.C.; TEIXEIRA A.C.; REIS, J.L.; MESQUITA, J.A. Application of monoclonal antibodies to quality control of foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, Surrey, v.12, n.8, p.682-686, 1994.
- ALONSO FERNÁNDEZ, A.; VIANNA FILHO, Y.L.; DURINI, L.A.E.; SUTMÖLLER, P. Los virus de fiebre aftosa usados en la producción y control de vacunas en América del Sur. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v.43-44, p.21-28, 1981.
- ALONSO FERNÁNDEZ, A.; SÖNDAHL, M.S.; GIACOMETTI, H.; FERREIRA, M.E.V. *Identification of foot-and-mouth disease via antibodies*. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1984. 31 p. (Manuales Tecnicos, 6).
- AUGÉ DE MELLO, P.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa e inactivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v.19-20, p.31-38, 1975.
- AUGÉ DE MELLO, P.; FREITAS COSTA, K.; ALONSO FERNÁNDEZ, A.; SUTMÖLLER, P.; POLLAK, A.; MILLÁN, A. Influencia del grado de dispersión en la fase acuosa sobre la inmunogenicidad de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v. 37-38, p. 5-9, 1980.
- BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Archives of Virology*, New York, v. 47, p. 47-56, 1975.
- BAHNEMANN, H.G.; MESQUITA, J.A. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v.53, p.19-24, 1987.
- BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABARACÓN, D.; GOMES, I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bulletin Office International des Epizooties*, Paris, v.81, n.11-12, p.1335-1343, 1974.
- BARTELING, S.J.; VREESWIJK, J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, Surrey, v. 9, p. 75-88, 1991.
- BLACK, L.; RWEYEMAMU, M.; BOGE, A. Revaccination response of cattle as a function of the 140 S foot-and-mouth disease antigen dose. *Journal of Comparative Pathology*, Edinburgh, v. 94, n. 3, p. 417-424, 1984.
- BROWN, F. Foot-and-mouth disease virus. *Biochemical Sciences*, v. 6, n. 12, p. 325-327, 1981.
- BROWN, F. Synthetic viral vaccines. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 3, p. 221-235, 1984.
- CASAS OLASCOGA, R.; AUGÉ DE MELLO, P.; BERGMANN, I. Perspectivas para nuevas vacunas en América Latina y en el Caribe. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v. 54, p. 7-20, 1988.
- CENTENO, E.R.; OBIAGA, J.A. Determination of antigenic mass in vaccines prepared with foot-and-mouth disease virus. A comparative study using sepharose 4 B chromatographic columns and isodensity centrifugation in a gradient of cesium chloride. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE O IMPACTO DAS DOENÇAS VIRAIS NO DESENVOLVIMENTO DOS PAÍSES LATINO-AMERICANOS E DA REGIÃO DO CARIBE, 1982, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1982. v. 2.
- CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA. (CPFA) *Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa*. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1980. 47p. (Manuales Tecnicos, 2).
- CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA; DIRECCIÓN DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. Prueba de potencia para vacunas contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso: ensayos de DP₅₀ en cobayos y en bovinos de una vacuna preparada en forma semi-industrial con una emulsion del tipo agua en aceite. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v. 29-30, p. 55-59, 1978.
- COOPER, P.D.; AGOL, V.I.; BACHRACH, H.L.; BROWN, F.; GHENDON, Y.; GIBBS, A.J.; GILLESPIE, J.H.; LONBERG-HOLM, K.; MANDEL, B.; MELNICK, J.L.; MOHANTY, S.B.; POVEY, R.C.; RUECKERT, R.R.; SCHAFFER, F.L.; TYRREL, D.A.J. *Picornaviridae*. *Intervirology*, Basel, v. 10, p. 165-180, 1978.
- CUNLIFFE, H.R.; GRAVES, J.H. Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: comparison of two adjuvants in cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, Ottawa, v. 27, p. 193-197, 1963.
- FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, Rio de Janeiro, v. 21-22, p. 17-29, 1976.
- GIRARD, H.C.; BAYRAMOGLU, O.; EROL, N.; BURGUT, A. Inactivation of O₁ FMD virus by the Binary Ethylene Imine (BEI). *Bulletin Office International des Epizooties*, Paris, v. 87, n. 3-4, p. 201-217, 1977.

- HYSLOP, N. St. G. La epizootiología y epidemiología de la fiebre aftosa. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, v.5, p.1-48,1972.
- INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA ; CENTRO DE ENFERMEDADES ANIMALES DE PLUM ISLAND. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso: estudio cooperativo. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, v. 31-32, p. 29-34, 1978.
- MARCOVECCHIO, F.E.; RIVENSON, S.; BORCA, M.V.; GAGGINO, O. Selección de emulsiones por su poder inmunogénico contra la fiebre aftosa en cobayos. **Revista de Medicina Veterinaria**, Santiago do Chile, v.64, n.5/6, p.337-339, 1983.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD; ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD; BANCO INTERAMERICANO DE DESARROLLO. **Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa**. Washington D.C.: Terra Nova, 1987. 260p.
- PAY, T.W.F. The effect of the antigen dose on the immune responses following primary and secondary foot and mouth disease vaccination of cattle. **Foot and Mouth Disease Bulletin**, Surrey, v.12, p.3, 1973.
- PAY, T.W.F.; HINGLEY, P.J. Correlation of 140 S antigen dose with the serum neutralizing antibody response and the level of protection induced in cattle by foot-and-mouth disease vaccines. **Vaccine**, Surrey, v.5, p.60-64,1987.
- RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O.P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARANGUNICH, L. Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa en bovinos. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, Buenos Aires, Série 4, v.9, n.2, p.53-80, 1972.
- RIVENSON, S.; MARCOVECCHIO, F.E.; ZABAL, O.; SADIR, A.M.; BORCA, M.V.; LAPORTE, O. Ensayos comparativos en cobayos y bovinos de una vacuna antiaftosa emulsionada con adyuvante oleoso sintético y hidróxido de aluminio. **Gaceta Veterinaria**, Buenos Aires, v. 44, n.367, p.74-83, 1982,a.
- RIVENSON, S.; SADIR, A.M.; GAGGINO, O.P.; MARCOVECCHIO, F.E.; ZABAL, O.P.; LAPORTE, O. Estudio comparativo en bovinos de vacunas antiaftosas: oleosa e hidroxidosaponinada. **Revista Médica**, Buenos Aires, v.63, n.5, p.364-370, 1982,b.
- ROCHA, J. R.; BARRERA, J. D. C.; BUSTOS, M. Q. Respuesta inmunitaria inducida por vacuna antiaftosa oleosa en bovinos de áreas tropicales de Colombia. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, v.47-48, p.35-44, 1983.
- RWEYEMAMU, M.M.; BLACK, L.; NICHOLLES, M.J.; BSARAB, O.; O'REILLY, K. J. The reponse of cattle to FMD vaccination. In: COFERENCE OF THE FOOT AND MOUTH DISEASE COMISSION, 16., 1982, Paris. **Proceedings...** Paris: O.I.E.,1982. p.383-396.
- RWEYEMAMU, M.M.; BLACK, L.; BOGE, A.; THORNE, A.C.; TERRY, G.M. The relationship between the 140 S antigen dose in aqueous foot-and-mouth disease vaccines and the serum antibody response of cattle. **Journal of Biological Standardization**, London, v.12, p.111-120, 1984.
- SÓLYOM, F.; FAZEKAS, A.; CZELLENG, F.; MAKAR, A.; ROITH, J. Efficiency testing of foot-and-mouth disease vaccines prepared from strain "C" with different adjuvants. **Developments in Biological Standardization**, London, v.35, p.113-115, 1977.
- TALBOT, P.; BROWN, F. A model for foot-and-mouth disease virus. **Journal of General Virology**, London, v.15, p.163-170, 1972.
- VIANNA FILHO, Y.L.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; FERNÁNDEZ, G.; ROZAS, C.E.E.; RAVISON, J. A.; ALONSO, A. Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle: comparison of the 50% protective dose and protection against generalization. **Vaccine**, Surrey, v.11, n.14, p.1424-1428, 1993.
- WALDMANN, O. ; KOBE, Z.; PYL, G. Die aktive immunisierung des rindes gegen maul-und-klauseuche mittels formolimpfstoff. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten**, Stuttgart, v.138, p.401-412, 1937.