

**DIETILAMINOETIL-DEXTRANO (DEAE-D) COMO
ADYUVANTE DE LA INMUNIDAD.**

**I. INFLUENCIA DEL PESO MOLECULAR SOBRE SU
ACCION ADYUVANTE EN VACUNAS ANTIASFOSAS PARA
CERDOS**

Por P. Cármenes

INTRODUCCION

Los dextranos son polímeros de alto peso molecular (p.m.), de D-glucopiranosa, cuya fórmula empírica es $(C_6 H_{10} O_5)_n$, producidos por la acción de determinadas bacterias (principalmente del género *Leuconostoc*) sobre la sacarosa. De los filtrados de cultivo se obtienen dextranos de muy diferentes p.m. en diversas proporciones. La cepa B 512 de *L. mesenteroides* produce dextrano que, en su mayor parte, tiene un p.m. de $8 \cdot 10^7$, y la cepa B 1355 un dextrano de p.m. $4 \cdot 10^7$. Por fraccionamientos cuidadosos y repetidos pueden conseguirse fracciones de dextrano con una longitud determinada de la cadena y, consecuentemente, de un p.m. definido. El dextrano patrón tiene un p.m. medio de $5 \cdot 10^5$.

El DEAE-D es un derivado policationico del dextrano, en el que los grupos dietilaminoetil están ligados a las moléculas de glucosa que componen la cadena de dextrano, por enlaces éter. El DEAE-D de uso más frecuente es el derivado del dextrano de p.m. $5 \cdot 10^5$ y con un contenido en nitrógeno de aproximadamente el 3,2 %, lo cual supone un grupo catiónico por cada tres unidades de glucosa. Este grado de substitución confiere al DEAE-D unas propiedades totalmente distintas a las del dextrano del cual deriva.

El DEAE-D puede influir sobre muchos sistemas de interés biológico, a muy bajas concentraciones. Debido a su carácter de polication, reacciona con la superficie celular, cargada negativamente, y los efectos subsiguientes sobre la fisiología de la célula son de interés tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se ha podido comprobar que el tratamiento *in vitro* de diversas líneas de células tumorales, con DEAE-D, inhibe su desarrollo posterior *in vivo*¹⁷. El efecto inhibidor sobre el crecimiento de los tumores transplantados fue mayor

cuando se utilizó el compuesto de p.m. más alto (2.10^6) y, también, alto grado de substitución (50 %). Este efecto inhibidor fue prácticamente nulo con la sustancia de p.m. 64.000 y 13 % de substitución²⁵. Uno de los efectos más interesantes del DEAE-D sobre la fisiología celular es la estimulación de la incorporación de macromoléculas, tales como proteínas y ácidos nucléicos, por la célula. Se ha comprobado²³ que la absorción de albúmina por células del sarcoma S-180 se incrementa en 10 a 30 veces, en presencia de DEAE-D, incremento que está en relación directa con el p.m. de éste. Se supone que el mecanismo por el que este estímulo tiene lugar está ligado a una transformación de las proteínas de la pared celular, como consecuencia de su combinación con el DEAE-D, y tiene como efecto el estímulo de la pinocitosis (efecto de membrana). *In vivo*, este estímulo puede ser selectivo, es decir, que determinadas sustancias se pueden encontrar en un tipo de células en mucha mayor proporción, si van ligadas al DEAE-D, que como sustancias puras⁴³. Este mecanismo de acción podría, tal vez, ayudar a explicar la potenciación de la capacidad infectante de determinados ácidos nucléicos víricos aislados en presencia de DEAE-D.

En cuanto a la aplicación del DEAE-D *in vivo*, los distintos tipos de experiencias realizados podrían agruparse en estos tres apartados: 1) influencia sobre la patogenicidad de diversos virus; 2) influencia sobre la producción de interferón; y 3) capacidad como adyuvante de la inmunidad, punto, este último, del que vamos a ocuparnos.

La primera experiencia de utilización del DEAE-D como adyuvante, la realizó, en 1970, WITTMANN³⁰. Este autor pudo comprobar en cobayos que, con virus de la fiebre aftosa (FA), el DEAE-D tenía un buen efecto adyuvante, señalando, al mismo tiempo, que la eficacia máxima la proporcionaban 45-60 mg de la sustancia por ml de vacuna. Estas concentraciones de DEAE-D daban lugar a unas reacciones locales que estaban dentro de límites aceptables. Comparando este comportamiento con el de otros adyuvantes, llegaba a la conclusión de que el DEAE-D, aunque algo menos eficaz en cuanto a protección que el adyuvante de FREUND incompleto, es mucho menos agresivo para los tejidos que éste. Otros adyuvantes controlados, como el alginato o el denominado adyuvante 65, quedaban fuera de consideración, porque, aún siendo totalmente inocuos, no proporcionaban ningún tipo de protección. El tipo de DEAE-D con el que se realizaron las experiencias citadas tenía un p.m. de 2.10^6 y un grado de substitución de 0,70.

La primera comprobación del efecto adyuvante del DEAE-D en cerdos es también de WITTMANN *et al.*³⁵. Tras la inoculación subcutánea de una vacuna monovalente con virus aftoso tipo 0 inactivado con EEI y DEAE-D como adyuvante, se pudo constatar la eficaz inmunización, contra una infección experimental con virus homólogo, de, prácticamente, el 100 % de los cerdos vacunados. La eficacia adyuvante óptima se consiguió con 50 mg/ml de va-

cuna. El aumento de la concentración no conllevó ninguna ventaja desde el punto de vista inmunitario y, sin embargo, aumentó la importancia de las reacciones locales. Con la cantidad citada, las reacciones locales fueron débiles y, 11 a 14 semanas después de la vacunación, no se encontraron lesiones tisulares. Los anticuerpos neutralizantes alcanzaron títulos significativos a partir del 4.^º día postvacunación, llegando a su máximo alrededor del día 14.^º para, a partir de aquí, ir descendiendo lentamente. A las 12 semanas los anticuerpos todavía conservaban niveles aceptables. Los intentos de comprobar la presencia de interferón en los días siguientes a la vacunación resultaron infructuosos. En cuanto a la duración de la inmunidad, los resultados fueron excelentes hasta las 12 semanas, período máximo comprobado.

Este mismo grupo de investigadores ha realizado, posteriormente a los trabajos citados, una amplia serie de experiencias para estudiar el comportamiento del DEAE-D como adyuvante, concretamente con respecto a su valor en la inmunización de cerdos contra la FA^{39,40}. Algunas de las conclusiones más importantes a las que han llegado las resumimos seguidamente. Resultados similares a los conseguidos con vacunas monovalentes O, se obtienen con vacunas monovalentes A y C³⁶ y bivalentes OC⁵. La inmunidad, en todos los casos, alcanza niveles de protección suficientes contra la infección experimental a partir de los cuatro días postvacunación³². Pueden inmunizarse animales a partir de seis semanas de edad³⁸. El resultado de la vacunación es el mismo, tanto si la vacuna se aplica subcutánea como intramuscularmente⁴¹. En el cerdo, la revacunación tiene efectos aditivos y no de potenciación, como ocurre en el ganado vacuno³³. Los cerdos vacunados con vacunas a base de DEAE-D tienen altos títulos de anticuerpos en sangre, pero no se detectan anticuerpos secretores en la cavidad nasal, ni traqueobronquial. Aplicando la vacuna por vía intranasal no se obtiene ningún tipo de protección³¹, existiendo el riesgo, al aplicar la vacuna por esta vía, de producir hipersensibilidad, si la cantidad de antígeno de la vacuna no es suficientemente alta. Esta hipersensibilidad es transmisible, aunque de forma irregular, con extractos de pulmón exentos de células. La revacunación no corrige el estado de hipersensibilidad⁴.

LEUNEN¹⁸ califica como ideal una vacuna a base de antígeno inactivado por formol y con 250 mg de DEAE-D por dosis de 5 ml. Los resultados que consigue son mejores que los proporcionados por las vacunas oleosas. Otros autores^{26, 27} han conseguido también buena protección con 500 mg aunque observan fiebre 24-48 horas después de aplicada la vacuna. Por el contrario, ANDERSON *et al.*^{1,2} consideran a las vacunas oleosas superiores en eficacia a las de DEAE-D y a las de saponina. Ha de tenerse en cuenta, sin embargo, que utilizan, solamente, 100 mg de DEAE-D por dosis de 2 ml. Estos mismos autores, con la revacunación, obtienen una buena respuesta anamnésica de mayor duración que la primera. También KIHM¹⁵ encuentra más eficaces las vacunas oleosas, pero considera que el DEAE-D es menos agresivo para los tejidos que los aceites minerales, aunque estén en doble emulsión.

La estabilidad en el tiempo, a temperaturas de conservación de 4°C, es alta, puesto que las vacunas con DEAE-D pueden conservar su eficacia un año, con virus inactivado por el formol¹⁹, y hasta dos años, con virus inactivado con EEI²¹.

La primera confirmación de las posibilidades de aplicación de una vacuna con DEAE-D como adyuvante en condiciones de campo fue realizada por nosotros en 1971⁸, tanto desde un punto de vista preventivo, como en vacunaciones de «urgencia» (cuando la FA se había diagnosticado ya en la granja). Estos resultados han sido corroborados por otros autores en distintos países: Austria⁷, Hungría¹⁶, Alemania^{10,22} y España²⁰.

El DEAE-D ha demostrado su capacidad adyuvante con otros antígenos y en otras especies distintas de la porcina. En bovinos se ha mostrado eficaz tanto con antígeno aftoso³⁷, como con virus inactivado de la enfermedad de Aujeszky¹². En monos (*Macaca mulatta*) a dosis de 1 a 5 mg/kg de peso vivo, el DEAE-D produjo un efecto adyuvante significativo en la respuesta inmune a virus inactivado por el formol de la encefalomielitis equina de Venezuela, reduciéndose, además, el tiempo requerido para alcanzar el máximo en la síntesis de inmunoglobulina G¹¹. Cantidades considerablemente inferiores (100 µg/ml) fueron suficientes para aumentar significativamente la respuesta en anticuerpos de terneros inoculados con virus de la rabia atenuado, en comparación con el virus sólo⁶.

En cerdos se ha demostrado que el DEAE-D ejerce su efecto adyuvante de manera óptima cuando se inyecta conjuntamente con virus inactivado de la FA. Pero, además, se ha podido obtener un buen efecto adyuvante aunque el DEAE-D se inyecte separadamente del antígeno, tanto local como temporalmente. Este hecho parece demostrar que la adsorción del antígeno vírico no es la responsable del efecto adyuvante del DEAE-D⁴².

Es hoy opinión generalizada, que la utilización de una sustancia adyuvante adecuada es la clave en la obtención de una vacuna antiaftosa eficaz para el ganado porcino. Del estudio de los datos anteriormente reseñados se deduce que el DEAE-D es una sustancia con una interesante actividad adyuvante, demostrada sobre todo con antígeno aftoso. Sin embargo, para su empleo generalizado en el futuro, sería necesario puntualizar dos aspectos, a nuestro parecer, fundamentales, e insuficientemente aclarados, para poder llegar a concretar el tipo de DEAE-D más idóneo como adyuvante: 1) sus características químicas precisas (principalmente en lo concerniente a p.m. y grado de substitución); y 2) cantidades mínimas y óptimas necesarias de la sustancia por dosis de vacuna.

En este trabajo y sucesivos vamos a tratar de aclarar estos puntos, y ello bajo tres ángulos: inocuidad, rapidez en la instauración de la protección y duración de la inmunidad. En este primer trabajo se trata de conocer cuál es la influencia del p.m. del DEAE-D sobre su actividad adyuvante utilizando como antígeno virus aftoso inactivado.

MATERIAL Y METODOS

Preparación del antígeno aftoso:

Cultivo del virus. Las cepas de virus utilizadas han sido el O, España y una cepa de virus tipo C aislada de un brote de FA en cerdos. Ambas cepas se emplearon entre los pases 5.^o y 10.^o en cultivos de células KH (línea celular procedente de testículo de ternero) crecidas sobre frascos en rotación tipo Baxter. Dieciocho a 24 horas después de la infección (dependiendo del efecto citopático y cuando éste era del 80-100 %) se recogieron los líquidos de cultivo. Los líquidos cosechados, con, normalmente, un pH de 7,5, se centrifugaron a baja velocidad para eliminar los restos celulares. Inmediatamente después se ajustó el pH a 8,0 con NaOH 1 M.

Inactivación. El virus cosechado se inactivó mediante tratamiento con etilenimina (EI), siguiendo la técnica de BAUER *et al.*⁵.

Concentración y purificación. Después de terminada la inactivación se sometió a la suspensión vírica a un proceso de purificación, es decir, eliminación de proteínas no víricas, y concentración, o sea, reducción del volumen inicial de la suspensión vírica, manteniendo el contenido total de virus. Este proceso se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por WAGNER *et al.*²⁸, FAYET⁹ y KAADEN *et al.*¹³ que, en líneas generales, se basa en la capacidad de precipitación selectiva de proteínas que tiene el polietilenglicol (PEG).

Control. El virus cosechado en los cultivos y el concentrado final se sometieron a una serie de pruebas destinadas a comprobar la ausencia de contaminación bacteriana, la identidad del virus infectante, la inocuidad tras la inactivación y la cantidad de proteína y el contenido en 140 S después de la concentración. La esterilidad se comprobó por siembra en los medios habituales, bien por la técnica de filtración, en el caso de los líquidos de cultivo, bien por siembra directa, cuando se trataba del concentrado de virus. La actividad fijadora del complemento se tituló siguiendo el micrométodo de la técnica de Kolmer. El título infectante del virus virulento se calculó por inoculación a ratón lactante, por formación de placas según la técnica de la suspensión celular en agar³ o por la prueba del color según la modificación de WAGNER y McVICAR²⁹, llegándose al punto final 50 % por el método de KAERBER¹⁴. La inocuidad se comprobó en cultivos celulares (3 pases) y por inoculación a ratón lactante (7 por muestra). La proteína, tanto total como soluble, se determinó por el método del biuret. El contenido en 140 S se valoró por precipitación en gel de agar y por ultrafiltración según la técnica de STTROBE *et al.*²⁴.

Todas las vacunas se elaboraron partiendo de una mezcla de antígenos conseguidos en diversos cultivos, con las características medias, valoradas según los métodos citados, que se reseñan a continuación:

a) del virus virulento:

- 1) fijación del complemento: positivo a la dilución 1 : 16 (media),
- 2) título infectante: en ratón lactante $10^{7.5}$
prueba del color $10^{7.0}$
formación de placas $10^{7.7}$
- 3) contenido en proteína total: 0,20 mg/ml,
- 4) bacteriológicamente estéril,

b) del concentrado de antígeno:

- 1) inocuidad: en ratón lactante - 7/0 (inoculados/muertos),
en cultivo celular - 3 pases sin efecto citopático;
- 2) contenido en proteína: total 10 mg/ml
soluble 3 mg/ml
- 3) contenido en 140 S: 80-100 γ/gr
- 4) bacteriológicamente estéril.

Elaboración de las vacunas:

Se ha seguido, en líneas generales, la técnica de WITTMANN *et al.*³⁵, con las variaciones que implica el empleo de antígeno concentrado. Las vacunas experimentales fueron bivalentes OC y se elaboraron todas de idéntica forma y con el mismo contenido en antígeno (0,02 gr/ml por tipo de virus) y la misma cantidad de DEAE-D (100 mg/ml), la diferencia estribó exclusivamente en el tipo de DEAE-D y, consecuentemente, la cantidad de Tris necesaria para ajustar el pH en cada caso. Las características químicas de los DEAE-D utilizados se reflejan en el Cuadro 1.

CUADRO 1
Características químicas de los diferentes tipos de DEAE-D

Tipo de DEAE-D	Peso molecular	Grado de substitución
T - 500	$5 \cdot 10^5$	0,580
T - 110	$1,1 \cdot 10^5$	0,600
T - 10	$1 \cdot 10^4$	0,630

Una vez elaboradas, las vacunas se controlaron en cuanto a su esterilidad (siembras en los medios de cultivo habituales) y su inocuidad (inoculación de tres lechones de 12-15 kg por vía intramuscular con 20 ml de vacuna -10 ml en cada lado del cuello- por vacuna experimental).

Animales experimentales:

Se utilizaron cerdos de 20-25 kg de peso vivo, cruzados Large White-Landrace, que se habían mantenido previamente en observación durante 2-3

semanas, período durante el cual se desparasitaron. En el período de observación y desde la vacunación hasta el momento de la infección experimental, se mantuvieron en cuadras de tipo convencional. La infección experimental se realizó en cuadras aisladas del exterior y entre sí, de forma que no hubo posibilidad de infecciones cruzadas.

Los animales utilizados para la comprobación de reacciones postvacunales pertenecían a cinco granjas distintas (explotaciones de cebo) y tuvieron pesos comprendidos entre 20 y 35 kg.

Aplicación de las vacunas:

Se ha empleado la vía intramuscular profunda en la masa muscular del cuello, por haber comprobado previamente⁸ que, por este método, cuatro semanas después de la vacunación, no pueden detectarse lesiones histológicas en el punto de inoculación. La dosis fue siempre de 10 ml, repartidos en los dos lados del cuello.

Infección experimental:

Se realizó por contacto de los animales experimentales con otros inoculados masivamente y destinados a la difusión del virus. Se usaron tres animales de 20-22 kg por grupo de animales experimentales, que se inocularon intrádermicamente, en el rolete coronario de las dos extremidades anteriores, con 0,1 ml en cada punto de inoculación, e i.m. con 2 ml, con una suspensión al 10 % de material de aftas de bovino en solución salina fosfatada. Estos animales no se hacen figurar en los cuadros de resultados.

Observación de las reacciones postvacunales:

Los animales vacunados se observaron durante una hora después de la aplicación de la vacuna para comprobar la presentación de reacciones generales inmediatas. Se consideró reacción general inmediata aquella en la que el animal, inmediatamente después de la vacunación, presentaba todos o varios de los síntomas siguientes: vómitos, sialorrea, cianosis, incoordinación de movimientos y espasmo respiratorio. El dolor local se apreció por palpación, comprobándose al mismo tiempo la existencia o no de tumefacción y calor en el punto de inoculación. Para valorar la pérdida de apetito se observaron los animales en el momento de la administración del pienso (dos veces al día) durante tres días. Se anotaron los animales que, o bien no se levantaban a comer, o se retiraban del comedero mucho antes que los testigos no vacunados.

Lectura de los resultados:

Los resultados se consideraron definitivos 12 días después de haberse realizado la inoculación del virus a los animales destinados a difundirlo. Para la valoración final, se observó detenidamente cada animal, anotándose las extremidades en que presentaban aftas. El afta de la jeta no se contabilizó, por no ser de aparición constante y, según nuestra experiencia, no estar correlacionada con la gravedad de la infección. Por otro lado nunca hemos observado que un animal enferme presentando aftas en la jeta y no en las extremidades. Teniendo en cuenta que los animales inoculados presentaron regularmente aftas abiertas en los puntos de inoculación, unas 36 horas después de la infección, realmente el período de observación tras la infección fue de unos 10 días. Los resultados se han expresado según la proporción «protegidos/total» y su correspondiente porcentaje, por ser éste el método más generalmente utilizado.

RESULTADOS

Reacciones postvacunales:

Se vacunaron en total 804 cerdos de un peso comprendido entre 20 y 35 kg, de los cuales 551 tenían un peso de 20-25 kg. En las cinco granjas donde se efectuaron las experiencias quedó siempre más de un 30 % de animales sin vacunar que actuaron como testigos. Las reacciones postvacunales que pudieron observarse se reflejan en el Cuadro 2.

CUADRO 2
Observación de reacciones postvacunales tras la aplicación de vacunas a base de DEAE-D de diferentes pesos moleculares

Tipo de vacuna	Número de animales	REACCIONES			
		General inmediata n. ^o	%	Dolor local	Apetito
T - 500	279	4	(1,4)	Evidente	Reducido 12 horas
T - 110	243	4	(1,6)	Ligero	Reducido 12 horas
T - 10	282	-	-	Inapreciable	Normal

Protección inmediata:

Cinco lechones por cada una de las vacunas experimentales, se alojaron juntos en una cuadra aislada con ocho lechones de las mismas características, sin vacunar, como testigos. Dos días después de realizada la vacunación, tres de los animales controles se inocularon en el rodete coronario e intramuscularmente, con virus tipo C, del modo descrito. De 24 a 36 horas después de la

inoculación, los animales testigos inoculados mostraban aftas en el punto de inoculación. Los resultados se consideraron definitivos a los 12 días de la infección y se indican en el Cuadro 3.

CUADRO 3
Protección inmediata de vacunas con DEAE-D de diferentes pesos moleculares

Tipo de vacuna	Número de animales	Número de enfermos (extrem. con aftas)	Proteg./total	%
T - 500	5	0	5/5	100
T - 110	5	1 (2)	4/5	80
T - 10	5	2 (2, 4)	3/5	60
Testigos	5	4 (3, 4, 4, 4)	1/5	20

Duración de la inmunidad:

Prueba de eficacia a las ocho semanas. Diez animales por tipo de vacuna, excepto en el caso de la T-110, en que solamente fue posible utilizar nueve, por haber muerto uno accidentalmente, junto con 10 animales testigos, se pusieron en contacto con tres cerdos experimentalmente infectados con virus aftoso tipo O. Los resultados se consideraron definitivos a los 12 días de la infección (Cuadro 4).

CUADRO 4
Vacunas con DEAE-D de diferentes pesos moleculares. Resultados de la infección con virus tipo O; 8 semanas p.v.

Tipo de vacuna	Número de animales	Número de enfermos (extrem. con aftas)	Proteg./total	%
T - 500	10	2 (2, 3)	8/10	80
T - 110	9	3 (3, 4, 4)	6/9	67
T - 10	10	7 (2, 2, 2, 2, 3, 4, 4)	3/10	30
Testigos	10	10 (2, 3, resto 4)	0/10	-

Prueba de eficacia a las 12 semanas. Como en la experiencia anterior, se utilizaron 10 animales por tipo de vacuna, excepto en el caso de la vacuna T-10, de la que sólo se utilizaron nueve. La infección experimental se efectuó con virus tipo C del modo habitual (Cuadro 5).

CUADRO 5
Vacunas con DEAE-D de diferentes pesos moleculares. Resultados de la infección con virus tipo C; 12 semanas p.v.

Tipo de vacuna	Número de animales	Número de enfermos (extrem. con aftas)	Proteg./total	%
T - 500	10	2 (4, 4)	8/10	80
T - 110	10	3 (1, 4, 4)	7/10	70
T - 10	9	7 (2, resto 4)	2/9	22
Testigos	10	10 (2, 3, resto 4)	0/10	-

DISCUSION

Siguiendo el criterio expresado al plantear estas experiencias, consideramos que se debe discutir el valor de una vacuna desde tres ángulos: inocuidad local y general (reacciones postvacunales), rapidez en la instauración de la inmunidad (protección inmediata) y duración de la misma.

Reacciones postvacunales:

WITTMANN *et al.*³⁵ observaron reacciones postvacunales de tipo local y general como consecuencia de la aplicación por vía subcutánea en cerdos de vacunas antiaftosas conteniendo DEAE-D. Posteriormente, reacciones similares fueron descritas por nosotros⁸ en la aplicación del mismo tipo de vacuna por vía intramuscular. El DEAE-D empleado en estas vacunas tenía un peso molecular de 2.10^6 y 5.10^5 respectivamente, y un grado de substitución de, aproximadamente, 0,70 en ambos casos.

Las reacciones de tipo local descritas se manifestaron por la aparición de una tumefacción en el punto de inoculación, con calor y dolor. Esta reacción fue ya evidente a las 6-8 horas postinoculación y alcanzó su máximo a las 20 horas, desapareciendo a partir de las 36 horas⁸. La intensidad de la reacción fue directamente proporcional a la cantidad de DEAE-D inoculada³⁵. Histológicamente, 15 días después de la vacunación, las reacciones debidas a la vacuna son muy marcadas, haciéndose inapreciables entre la 4.^a y la 8.^a semana^{8,15}. En este aspecto, el DEAE-D es menos agresivo para los tejidos que los adyuvantes oleosos, que provocan modificaciones tisulares intensas³⁴, persistentes hasta 15 semanas después de la vacunación¹⁵ y que, en casos aislados, pueden ser causa de la formación de granulomas del tamaño de un huevo de gallina. Estas reacciones locales deben ser siempre tenidas en cuenta por la considerable importancia que tienen en una especie destinada a la producción cárnicia. La presentación de abscesos tras la aplicación de vacunas con DEAE-D es rara y frecuentemente, al menos según nuestra experiencia, va asociada con inoculación defectuosa. Sin embargo, el empleo de mertiolato como conservador puede elevar la proporción de animales con abscesos hasta el 50 %⁴⁰.

La reacción general se manifiesta por fiebre, anorexia y malestar general. La fiebre puede alcanzar hasta $41,5^{\circ}\text{C}$ y su elevación es independiente de la cantidad de DEAE-D inoculada, aunque puede depender de ésta la persistencia del estado febril³⁵. Cuando la cantidad inoculada es de 0,5 a 1 gr, las tomas de temperatura a las 48 horas postinoculación dan valores normales^{8,15}. Este tipo de reacción general se presenta en el 80 % de los animales, pero hay diferencias considerables de unos grupos de animales a otros, hasta llegar, en algunos casos, a no ser observable ningún tipo de alteración. De hecho, algunos autores^{2,18} no citan en sus trabajos el haber observado reacciones, tanto locales como generales.

En las presentes experiencias hemos comprobado que el p.m. del DEAE-D es un factor fundamental en la provocación de reacciones postvacunales. La reacción local, apreciada por el dolor en el punto de inoculación, varía en intensidad con el p.m. y en relación directamente proporcional con él. La reacción general, deducida de la normalidad o alteración del apetito, sigue la misma tendencia que la local, aunque tal vez no de forma tan evidente (Cuadro 2).

En una publicación anterior⁸ hemos señalado la presentación en algunos animales, e inmediatamente después de la aplicación de la vacuna, de una reacción que se manifiesta con sialorrea, vómitos y cianosis. Posteriormente, solamente ROEDDER y SCHIEREN²² han hecho referencia a reacciones generales inmediatas semejantes, que califican como colapsos circulatorios, observadas en el 0,054 % de los animales vacunados. De los resultados obtenidos en las presentes experiencias se desprende que este tipo de reacción no es excesivamente elevado (1,4-1,6 %) y su presentación no parece influenciada de forma decisiva por el p.m. del DEAE-D, aunque, cuando este es muy bajo, no se ha podido comprobar que se presentara en ningún animal.

Efecto adyuvante del DEAE-D:

Se estima que solamente cuando el 75 % de los individuos están inmunizados se puede considerar a una población animal protegida contra la difusión de una epizootia de FA. Por otra parte, las normas de control de diversos países exigen, para las vacunas antiaftosas destinadas al cerdo, que a las tres semanas postvacunación estén protegidos el 80 % de los animales vacunados, al mismo tiempo que resultan afectados, por lo menos, el 80 % de los testigos no vacunados. Por estas razones, hemos considerado que el 80 % de protección debería ser la frontera para determinar si una vacuna es suficientemente eficaz o no.

Protección inmediata:

WITTMANN *et al.*³⁵ encontraron que los anticuerpos neutralizantes empezan a alcanzar valores significativos a partir del 4.^º día postvacunación. La primera comprobación del efecto precoz de una vacuna con DEAE-D para proteger a los cerdos contra la infección experimental fue realizada por nosotros⁸, en cerdos que habían sido vacunados una semana antes. Más tarde, WITTMANN³² y KIHM¹⁵ confirmaron estos resultados, con la infección experimental al 4.^º y 5.^º día postvacunación respectivamente. En las experiencias descritas en el presente trabajo, se ha comprobado que vacunas con DEAE-D de p.m. 500.000 protegen al tercer día postvacunación al 100 % de los animales. Sin embargo es evidente que, a medida que disminuye el peso molecular, la eficacia también disminuye, aunque conservando niveles aceptables hasta con el DEAE-D de p.m. 10.000.

Duración de la inmunidad:

Las experiencias realizadas por diferentes investigadores para comprobar la duración de la inmunidad inducida por vacunas con DEAE-D no siempre son coincidentes en sus resultados. En varios años de experiencias, WITTMANN *et al.*³⁹ consiguen protecciones medias del 76 % entre la 6.^a y la 8.^a semana y del 72 % entre la 10.^a y la 12.^a. LEUNEN¹⁸ encuentra el 89 % de los animales protegidos a la 9.^a semana. CORDERO *et al.*⁸, con vacunas bivalentes, consiguen proteger, contra el tipo O, hasta las 12 semanas, totalmente al 60 % y parcialmente al 20 % y contra el tipo C, 70 % y 20 %, respectivamente. ANDERSON *et al.*² y KIHM¹⁵ hallan porcentajes significativamente inferiores. Sin embargo, estos resultados no son fácilmente comparables entre sí, porque en cada caso el tipo y/o la cantidad de DEAE-D por dosis no son idénticos. De nuestros resultados se desprende que el tipo de DEAE-D influye decisivamente sobre la eficacia de este producto como adyuvante. Solamente el DEAE-D de p.m. 5.10⁵ consigue alcanzar el 80 % de protección a las 8 y 12 semanas. El resto de los DEAE-D probados muestran un evidente efecto adyuvante, pero ninguno de ellos alcanza el mínimo considerado como útil.

RESUMEN

Para comprobar experimentalmente la influencia del peso molecular del DEAE-dextrano sobre la capacidad adyuvante de esta sustancia en vacunas antiaftosas destinadas al cerdo, se han realizado una serie de experiencias, valorando los resultados según las reacciones postvacunales, la rapidez en la instauración de la inmunidad y la duración de la misma. En cuanto a las reacciones postvacunales local y general, se comprueba su aparición en la práctica totalidad de los animales vacunados, con mayor intensidad a medida que el peso molecular aumenta. Se considera, también, que la actividad adyuvante del DEAE-dextrano es directamente proporcional al peso molecular. Solamente con DEAE-dextranos de peso molecular 500.000 o superior se consigue que la protección iguale o supere el 80 % a las 12 semanas postvacunación.

SUMMARY

Several experiments have been carried out to study the influence of the DEAE-dextran molecular weight on its adjuvant effect in swine antiaphthous vaccines, considering the postvaccination reactions, the speed of the establishment of the immunity and its duration. We have observed that practically all the vaccinated animals showed both local and general postvaccination reactions, which were more intense as the molecular weight increased. We have also observed that the DEAE-dextran adjuvant activity is proportional to

its molecular weight. DEAE-dextran with a molecular weight of 500.000 or higher have to be used to obtain a protection equal to or greater than 80 % at 12 weeks post-vaccination.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDERSON, E. C., MASTERS, R. C. y MOWAT, G. N. (1971).—Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. Response to emulsion vaccines. *Res. Vet. Sci.*, **12**: 342-350.
- 2) —, — y — (1971).—Immune response of pigs inactivated foot-and-mouth disease vaccines. Response to DEAE-Dextran and Saponin adjuvanted vaccines. *Res. Vet. Sci.*, **12**: 351-357.
- 3) BARTELING, S. J. (1972).—The use of frozen cells in the agar cell-suspension titration technique. *Arch. ges. Virusforsch.*, **38**: 271-273.
- 4) BAUER, K. y NEUKIRCH, M. (1976).—Auftreten einer verstarkten Reaktion auf die Testinfektion nach der Vakzinierung mit Aerosolen von inaktiviertem Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virus. *Zbl. Vet. Med. B.*, **23**: 274-383.
- 5) —, WITTMANN, G., GEILHAUSEN, H. y IRION E. (1974).—Die Schutzimpfung von Schweinen mit einer DEAE-Dextranhaltigen, bivalente Maul-und Klauenseuchevakzine. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **87**: 170-173.
- 6) BIJLENGA, G. y VAN DEN BOGAARD, A. E. J. M. (1973).—In vivo enhancement of rabies infection by Diethylaminoethyl-Dextran. *Arch. ges. Virusforsch.*, **42**: 96-101.
- 7) BUERKI, F. (1975).—Zur Epizootiologie und Immunoprophylaxe der Maul-und Klauenseuche. *Wien. tierärztl. Wschr.*, **62**: 266-270.
- 8) CORDERO, M., CÁRMENES, P. y MARTÍNEZ, A. (1972).—Field and laboratory experiences with an antiaphthous vaccine for pigs, inactivated with EEI and DEAE-dextran as an adjuvant. *Rep. Meet. Stand. Tech. Comm. Europ. Comm. FMD. F.A.O. Roma.*
- 9) FAYET, M.-Th. (1969).—Concentration du virus de la fièvre aphteuse par le polyéthylene glycol. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **268**: 3.140-3.141.
- 10) GEILHAUSEN, H. E. (1974).—Experiences over a period of three years with the practical employment of a Diethylaminoethyl Dextran (DEAE-D) containing foot-and-mouth disease (FMD) virus vaccine for pigs. *Bull. Off. int. Epiz.*, **81**: 1.055-1.062.
- 11) HOUSTON, W. E., CRABBS, C. L., KREMER, R. J. y SRINGER, J. W. (1976).—Adjuvant effects of Diethylaminoethyl-Dextran. *Infect. Immun.*, **13**: 1.559-1.562.
- 12) JAKUBIK, J., WITTMANN, G. y SKODA, R. (1975).—Immunisierung von Kälbern mit der EEI-DEAE-Dextran-Vakzine gegen die Aujeszksche Krankheit. *Zbl. Vet. Med. B.*, **22**: 827-832.
- 13) KAADEN, O. R., DIETZSCHOLD, B., MATHEKA, H. D. y TOKUI, T. (1971).—Konzentrierung und Reinigung von Maul- und Klauenseuche (MKS) Virus durch Polyäthylenglykol (PEG). *Arch. ges. Virusforsch.*, **3**: 104-113.
- 14) KÄRBER, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharm.*, **162**: 480-483.
- 15) KIHM, U. (1976).—Comparaison d'un vaccin antiaphteus bivalent avec adjuvant huileux à un vaccin avec adjuvant DEAE-Dextran chez les porcs. *Symposium Internacional «Fiebre Af-tosa» (Lyon. Asoc. Intern. Stand. Biol.*
- 16) KOVATS, J. (1974).—Experiencias sobre la inmunización de cerdos contra la fiebre aftosa. *Magyar Allatorv. Lapja.*, **12**: 817-820 (original en húngaro).
- 17) LARSEN, B. y THOERLING, E. B. (1969).—Inhibitory effect of DEAE-Dextran on tumour growth. Action of Dextran sulphate after *in vitro* incubation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **75**: 229-236.
- 18) LEUNEN, J. (1972 a).—Fièvre aptheuse. Vaccin pour porcs. *An. Méd. Vét.*, **116**: 351-360.
- 19) — (1972 b).—Stabilité du vaccin antiaphteux porc au DEAE-Dextran. *An. Méd. Vét.*, **116**: 361-362.
- 20) PERONA, A. (1974).—Feldversuche mit Maul- und Klauenseuche-Vakzinen bei Mastschweinen in Spanien. *Tierärztl. Umsch.*, **29**: 658-669.
- 21) ROEDDER, H. (1975).—Halbarkeitsprüfung einer DEAE-Dextran-Haltigen Maul- und Klauenseuchevakzine am Schwein. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, **82**: 183-184.
- 22) — y SCHIEREN, J. R. (1975).—Einsatz einer DEAE-Dextran Haltigen Maul- und Klauenseuche (MKS) Vakzine/Schwein im Kreis Heinsberg. *Tierärztl. Umsch.*, **30**: 415-422.
- 23) RYSER, H. J.-P. (1967).—A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size. *Nature*, **215**: 934-936.

- 24) STTROBE, R., CHARLIER, G., AERT, A. VAN, DEBECQ, J. y LEUNEN, J. (1974).—Studies about the adjuvant activity of saponin fractions in foot-and-mouth disease vaccine. II. Irritation and adjuvant activity of saponin fractions obtained by chromatography on Sephadex G 100. *Arch. Exper. Vet. Med.*, **29**: 385-392.
- 25) THORLING, E. B., LARSEN, B. y NIELSEN, H. (1971).—Inhibitory effect of DEAE-Dextran on tumor growth. Effect of charge density and molecular size. *Acta, Pathol. Microbiol. Scand.*, **79**: 81-90.
- 26) TURUBATOVIC, R., ERCEGOVAC, D. y PANJEVIC, D. (1974).—Ethylethyleneimine as an inactivator and diethylaminoethyl-dextran as an adjuvant in vaccines against foot-and-mouth disease in swine. *Acta veter., Belgrado*, **24**: 7-10.
- 27) —, —, — y LOLIN, M. (1972).—Diethylaminoethyl-dextran as an adjuvant in vaccines against foot-and-mouth disease in swine. *Acta veter., Belgrado*, **22**: 151-155.
- 28) WAGNER, G. G., CARD, J. L. y COWAN, K. M. (1970).—Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. ges. Virusforsch.*, **30**: 343-352.
- 29) — y MCVICAR, J. W. (1970).—Foot-and-mouth disease virus antibodies: comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice. *Appl. Microbiol.*, **20**: 995-997.
- 30) WITTMANN, G. (1970).—Die Werwendung von Diaethylaminoethyl-Dextran (DEAE-D) als Adjuvans bei der Immunisierung von Meerschweinchen mit inaktiviertem Maul-und Klauenseuche (MKS)-Virus. *Zbl. Bakt. I. Orig.*, **213**: 1-8.
- 31) WITTMANN, G. (1972 a).—Versuche, sekretorische Antikörper bei Maul-und Klauenseuche (MKS)-immunen Schweinen nachzuweisen sowie Schweine intranasal gegen MKS zu immunisieren. *Zbl. Vet. Med. B.*, **19**: 779-781.
- 32) — (1972 b).—Frühe Stadien der Immunität nach Impfung von Schweinen mit einer Maul- und Klauenseuche-DEAE-Dextran-Vakzine. *Zbl. Vet. Med. B.*, **19**: 406-411.
- 33) — (1972 c).—Versuche zur Revakzinierung von Schweinen mit einer äthyl-äthylenimin (EEI)/DEAE-Dextran-Vakzine gegen Maul-und Klauenseuche (MKS) vom Subtyp O₁. *Zbl. Vet. Med. B.*, **19**: 45-54.
- 34) — y BAUER, K. (1969).—Oertliche Reaktionen nach der Impfung von Schweinen mit Maul- und Klauenseuche (MKS) Vakzinen, die Freund'sches Adjuvans enthalten. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, **82**: 2-4.
- 35) WITTMANN, G., BAUER, K. y MUSSGAY, M. (1970 a).—Versuche zur Schutzimpfung von Schweinen mit Vakzinen aus inaktivierten Maul-und Klauenseuche (MKS) Virus. II. Versuche mit Aethylaethylenimin (EEI) inaktiviertem Virus und Diaethylaminoethyl-Dextran (DEAE-D) als Adjuvans. *Arch. ges. Virusforsch.*, **20**: 139-159.
- 36) —, — y — (1970 b).—Versuche zur Schutzimpfung von Schweinen mit monovalenten Aethylaethylenimin (EEI)/Diaethylaminoethyl-Dextran (DEAE-D) Vakzinen gegen Maul- und Klauenseuche vom Virustyp A und C. *Zbl. Vet. Med. B.*, **17**: 1.058-1.063.
- 37) —, — y — (1970 c).—Versuche zur Schutzimpfung von Rindern mit einer Aethylaethylenimin (EEI)/Diaethylaminoethyl-Dextran (DEAE-D)-Vakzine gegen Maul- und Klauenseuche vom Virustyp O₁. *Zbl. Vet. Med. B.*, **17**: 1.067-1.068.
- 38) —, — y — (1971 a).—Versuche zur Schutzimpfung von 6 bis 8 Wochen alten Ferkeln mit Aethylaethylenimin (EEI)/Diaethylaminoethyl-Dextran (DEAE-D)-Vakzinen gegen Maul- und Klauenseuche von Virustyp O₁. *Zbl. Vet. Med. B.*, **18**: 135-146.
- 39) —, — y — (1971 b).—A survey on experiments on vaccination of pigs against foot-and-mouth disease virus with the aid of EEI/DEAE-dextran vaccines which have been done in the Federal Research Institut for Animal Virus Diseases in Tübingen for the last 3 years. *Rep. Meep. Res. Group. Stand. Techn. Comm. (Tübingen) European Comm. FMD. F.A.O. Roma.*
- 40) —, — y — (1972 a).—Essais d'immunisation des porcs contre la fièvre aphteuse par l'emploi de vaccine EEI/dextran. *Bull. Off. int. Epiz.*, **77**: 875-885.
- 41) —, — y — (1972 b).—Experiments on vaccination of pigs with ethylethyleneimine (EEI)/Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-D) foot-and-mouth disease vaccines. Influence of route of inoculation and dose of antigen on the duration of immunity. *Arch. ges. Virusforsch.*, **36**: 251-264.
- 42) WITTMANN, G., DIETSCHOLD, B., BAUER, K. (1975).—Some investigations on the adjuvant mechanism of DEAE-Dextran. *Arch. Virol.*, **47**: 225-235.
- 43) WOODMAN, E. S. (1968).—Localized incorporation of iododeoxyuridine from polycation-complexed iododeoxycytidyl acid into DNA of several murine and hamster tumors. *Cancer Res.*, **28**: 2.007-2.016.