

## VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO<sup>1</sup>

Hans G. Bahnemann<sup>2</sup> & Julio A. Mesquita<sup>2</sup>

### RESUMEN

*En este trabajo se describe la preparación de una vacuna con adyuvante oleoso y se dan algunos detalles pertinentes. Los resultados de estudios de inmunogenicidad en bovinos en pruebas de laboratorio y en experimentos de campo son indicados. También se discute la incidencia de fiebre aftosa en poblaciones bovinas vacunadas con vacuna oleosa en experimentos de campo de larga escala en Argentina y Brasil. La aplicación sistemática de vacuna antiaftosa oleosa induce mayor protección a la población bovina vacunada que la aplicación de vacunas convencionales de hidróxido de aluminio. Por lo tanto debería ser una importante herramienta en los programas de control de la fiebre aftosa en América del Sur.*

### INTRODUCCION

Durante los últimos 50 años la vacuna antiaftosa estándar ha sido preparada con antígeno inactivado adsorbido al hidróxido de aluminio. Aunque los métodos de producción e inactivación del antígeno han cambiado a través de los años, actualmente la mayoría de las vacunas son preparadas con hidróxido de aluminio, que ya fue usado en 1937 en la primera vacuna eficaz.

El primer estudio sobre el uso de un adyuvante oleoso con antígeno del virus inactivado fue publicado en 1963 (8). Posteriormente este adyuvante fue estudiado para la preparación de una vacuna antiaftosa eficaz para porcinos. En 1968 El Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) inició es-

tudios, de laboratorio y de campo, de una vacuna con adyuvante oleoso para ser aplicada en bovinos. Los estudios de campo se iniciaron en Brasil y luego se extendieron a Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Uruguay (6).

### PRODUCCION DE VACUNA

#### Producción de antígeno

Actualmente la mayoría de los laboratorios productores de vacuna antiaftosa usan cultivos celulares, principalmente células BHK-21, para la replicación del virus de la fiebre aftosa. Con este propósito, el CPFA también utiliza estas células cultivadas en monocamadas o en suspensión.

Los cultivos celulares son infectados con una semilla de virus que tiene pocos pasajes en cultivos celulares, un elevado título infeccioso y es controlada serológicamente para comprobar la especificidad de la cepa de virus. Las suspensiones de virus, después de recolectadas, son purificadas por un tratamiento intensivo con cloroformo y clarificadas por medio de filtración o centrifugación. Actualmente la mayoría de los laboratorios realizan la inactivación con un agente alquilante que proporciona una inactivación de primer orden o lineal. El inactivante preferido por la mayoría de los laboratorios productores de vacuna es la etilenimina binaria (BEI), desarrollada en el CPFA (4), donde es usada a 3mM durante 24 horas a 26°C. La prueba de inocuidad se hace en cultivos de células en monocamadas, realizando tres pasajes seriados.

La cantidad de antígeno viral en cada suspensión de virus es determinada por los títulos de infecciosidad; en el CPFA se usa la prueba de unidades formadoras de placa en monocamadas de cultivos celulares. La pureza y la especificidad del subtipo de cada suspensión de virus son controladas por la prueba de fijación del complemento. La cantidad de antígeno viral se determina con más precisión por la prueba de centrifugación de la suspensión viral en un gradiente de densidad de

<sup>1</sup> Presentado en el X Congreso Panamericano de Veterinaria y Zootecnia y V Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina, 23-27 septiembre 1985.

<sup>2</sup> Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Río de Janeiro, RJ, Brasil.

sucrosa o de cloruro de cesio. El CPFA usa la centrifugación en un gradiente de densidad de cloruro de cesio, que a la vez permite examinar la integridad del antígeno por electroforesis en gels de poli(acrilamida) (PAGE). En la producción regular de antígeno de virus de la fiebre aftosa en monocamadas y en suspensión de cultivos celulares en el CPFA, los valores para la masa antigénica de las cuatro cepas de virus usadas ( $O_1$  Campos,  $A_{24}$  Cruzeiro, A Venceslau y  $C_3$  Indaial) generalmente están entre 1,5 y 3 microgramos/ml.

### Preparación de antígeno

La preparación de vacuna antiaftosa polivalente con hidróxido de aluminio generalmente se hace mezclando las vacunas inactivadas monovalentes. En el caso de las vacunas oleosas, y con el uso de inactivantes de primer orden, es posible mezclar suspensiones de antígeno monovalentes antes de adicionar el adyuvante. Los diferentes antígenos son mezclados de tal manera que una única dosis de vacuna contenga antígeno de cada tipo de virus suficiente para cumplir con los requisitos de potencia de los contralores oficiales.

La cantidad de antígeno a ser usada en una vacuna es determinada en varios laboratorios por la infecciosidad y los títulos de fijación del complemento de las suspensiones virales. La determinación de la masa antigénica por medio de centrifugación en un gradiente de densidad permite, sin embargo, una mejor estandarización del contenido antigénico de las vacunas antiaftosa.

Después de los controles de potencia de un gran número de vacunas preparadas con antígenos con determinaciones de masas antigénicas, el CPFA ha decidido usar actualmente las siguientes cantidades de contenido de antígeno por dosis de cada tipo de virus:  $O_1$  Campos,  $\geq 2,2$  microgramos; virus A,  $\geq 1,4$  microgramos (casi las mismas cantidades de  $A_{24}$  Cruzeiro y A Venceslau), y virus  $C_3$  Indaial,  $\geq 1,0$  microgramos. La dosis estándar de vacuna es de 5 ml y la cantidad total de antígeno está contenida en 2,5 ml de suspensión del antígeno sin ninguna concentración.

### Emulsificación

El último paso en la producción de una vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso es la mezcla del

antígeno viral con una parte igual de aceite mineral blanco (Marcol 52), que contiene 10% de un emulsificante (Montanide 888), y la preparación de una emulsión primaria agua-en-aceite.

Con este propósito, la mezcla de aceite emulsificada es esterilizada por filtración en cartuchos Millipore y adicionada a la preparación de antígeno. Esta mezcla antígeno-aceite-emulsificante es pasada a través de un emulsificador industrial de tipo Silverson desarrollado en el CPFA y el grado de dispersión de la emulsión es comprobado midiendo la resistencia con un medidor de conductividad producido localmente. Para obtener la resistencia deseada de más de 100 mega Ohm, la vacuna generalmente es pasada tres veces a través del emulsificador.

La estabilidad de la emulsión de la preparación final de la vacuna es controlada por la prueba de centrifugación (3000 rpm durante 3 horas) y por el mantenimiento de las muestras de vacuna a 37°C por 15 días.

### Prueba de potencia

El CPFA recomienda que la potencia de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso sea una expectativa porcentual de protección (EPP) de 85% en animales de 9 a 12 meses de edad. En las pruebas de desafío directas en bovinos, por lo menos 12 de 16 animales vacunados deberán estar protegidos (7).

Todas las partidas de vacuna preparadas en el CPFA son examinadas después de envasadas por medio de pruebas de potencia en cobayos y en bovinos. En cobayos, la dosis protectora cobayo 50% ( $DPC_{50}$ ) es determinada por inoculación de 0,25 ml de vacuna diluida con diluyente activo y desafiada con la cepa del virus homólogo al usado en la vacuna. El valor de la  $DPC_{50}$  es calculado por el volumen de vacuna inoculado, esto es, 0,25 ml. Sin embargo, no se ha establecido una relación directa entre el valor de la  $DPC_{50}$  y la protección en bovino. Por lo tanto, se considera la  $DPC_{50}$  más como una prueba de tamiz que como una prueba definitiva para el control de potencia.

La potencia en bovinos es comprobada inoculando animales que nunca tuvieron contacto con la fiebre aftosa y determinando el nivel de anticuerpos en los sueros recolectados entre 21 y 28 días

después de la vacunación. Los anticuerpos neutralizantes son medidos por pruebas de neutralización de virus en cultivos celulares o en ratones lactantes, también denominada prueba de seroprotección (SP). Los títulos de seroprotección son usados para calcular la EPP (11, 13, 14). Para la preparación de vacunas con las cantidades de antígeno anteriormente mencionadas, la media de la EPP es de 85% como mínimo, pero generalmente está entre 90 y 97. Todas las valencias que integran las vacunas son comprobadas en cada partida de vacuna.

Los laboratorios oficiales de control en la Argentina, Brasil y Uruguay han experimentado la vacuna con adyuvante oleoso del CPFA en pruebas de desafío directas en bovinos para determinar la potencia, estabilidad y duración de inmunidad.

## INMUNOGENICIDAD DE LA VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO

### Estudios experimentales

La inmunogenicidad de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso y la duración de la inmunidad inducida por estas vacunas en bovinos jóvenes y adultos primovacunados y revacunados fueron estudiadas en extensos experimentos de laboratorio en el CPFA y en el campo (1, 2, 3, 6, 12). Las Figs. 1 y 2 muestran algunos de los resultados obtenidos en la primovacunación y revacunación respectivamente.

La vacuna con adyuvante oleoso proporciona títulos de anticuerpos séricos más altos y durante más tiempo que la vacuna de hidróxido de alumi-

nio. Este efecto es mucho más evidente en la revacunación. La recomendación para la aplicación de la vacuna con adyuvante oleoso es, por lo tanto, que los animales jóvenes con menos de dos años de edad sean revacunados con intervalos de seis meses, mientras que en los animales con más de dos años de edad previamente vacunados, una revacunación sería suficiente.

### Desafío de campo

Los estudios de inmunogenicidad de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso, tanto de laboratorio como de campo, indicaron que este tipo de vacuna indujo niveles altos de anticuerpos para el virus de la fiebre aftosa y por períodos más largos de tiempo que la vacuna convencional de hidróxido de aluminio.

Dos países en América del Sur, Argentina y Brasil, ensayaron en larga escala la vacuna oleosa en programas de campo, comparándola con la vacuna convencional de hidróxido de aluminio (saponina). En Argentina, en Hipólito Yrigoyen, provincia de Buenos Aires, cerca de 68.000 bovinos fueron vacunados entre 1977 y 1981 con vacuna antiaftosa oleosa y la incidencia de fiebre aftosa en esos animales fue comparada, en la misma área, con los animales vacunados con vacuna comercial de hidróxido de aluminio. En 1982, Caggiano y colaboradores informaron sobre ese experimento (5) y los resultados se resumen en el Cuadro 1.

Recientemente Dora y colaboradores, en Brasil, publicaron un informe (9) comparando la

CUADRO 1. Desafío a campo de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. Hipólito Yrigoyen, provincia de Buenos Aires, Argentina, 1977-1981

Bovinos	V a c u n a s	
	Hidróxido de aluminio	Oleosa
Rebaños vacunados	1.719	494
Animales vacunados	620.462	67.715
Rebaños afectados	365	23
Animales expuestos	245.516	2.874
Animales enfermos	34.373	441
Morbilidad/1000	55	7

Fuente: Datos de Caggiano et al. (5).

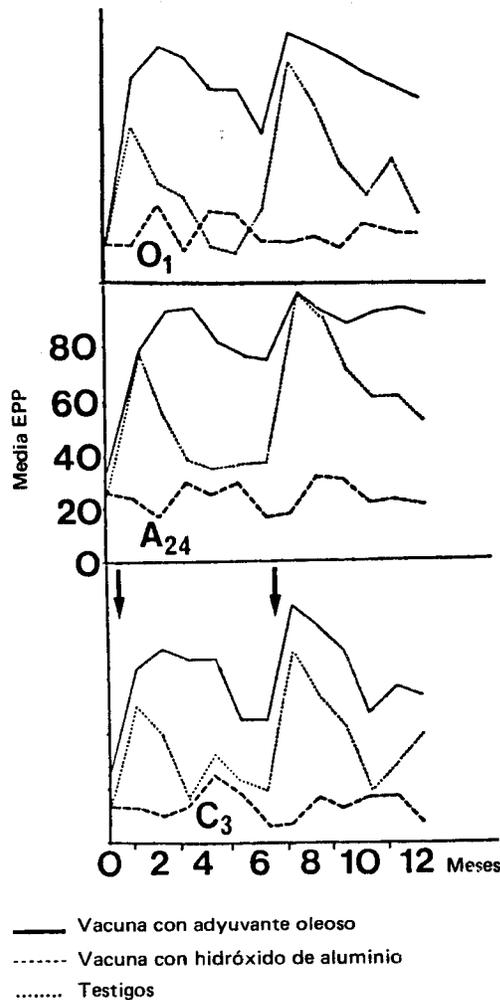


FIGURA 1. Expectativa porcentual de protección (EPP) de bovinos para los subtipos O<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> y C<sub>3</sub> del virus de la fiebre aftosa.

incidencia de fiebre aftosa durante una epidemia en Bagé, Río Grande do Sul, Brasil, en 1980, en dos grupos de bovinos vacunados con vacunas de hidróxido de aluminio y oleosa, respectivamente. Los resultados de ese estudio se resumen en el Cuadro 2.

Aunque en el experimento en Argentina el número de animales vacunados con vacuna oleosa es considerablemente menor que en el grupo control, se puede percibir claramente que la incidencia de

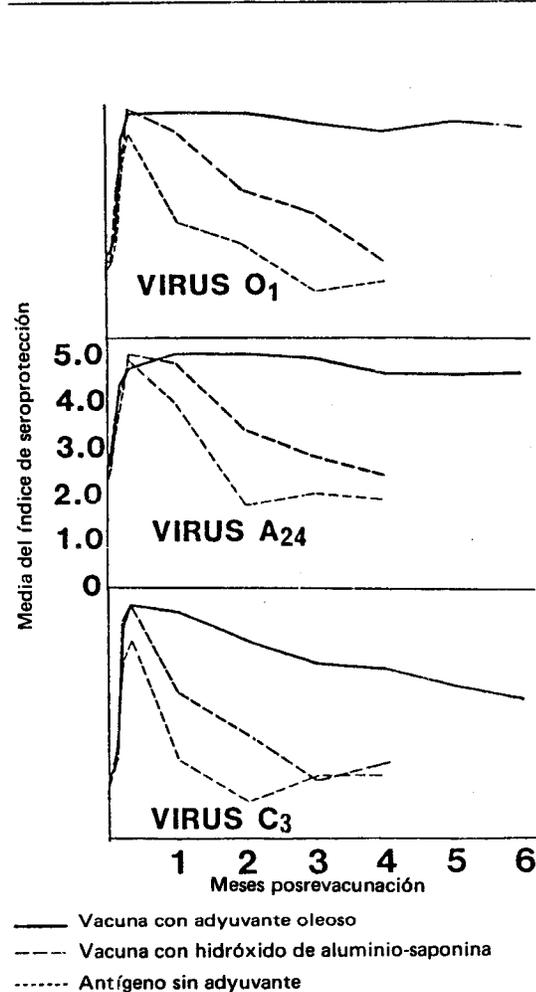


FIGURA 2. Media del índice de seroprotección de bovinos revacunados con vacunas con adyuvante oleoso, con hidróxido de aluminio-saponina o antígeno sin adyuvante

la enfermedad es menor en el grupo vacunado con vacuna oleosa. La tasa de morbilidad en el grupo vacunado con vacuna de hidróxido de aluminio es de 55 por 1000 mientras que en el grupo vacunado con vacuna oleosa solamente es de 7.

El experimento en Brasil comprende poblaciones bovinas comparativas de más de 200.000 animales para cada tipo de vacuna. Las tasas de morbilidad para la vacuna de hidróxido de aluminio y para la vacuna oleosa fueron 45 y 6

CUADRO 2. *Desafío a campo de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. Bagé, Río Grande do Sul, Brasil, 1980*

Bovinos	Vacuna hidróxido de aluminio	Vacuna oleosa		
		Total	Primovacunados	Revacunados
Rebaños vacunados	1.813	620	316	304
Animales vacunados	220.532	240.616	87.831	152.785
Rebaños afectados	73	20	9	11
Animales expuestos	30.780	17.164	5.647	11.517
Animales enfermos	9.958	1.546	1.218	328
Morbilidad/1000	45	6	14	2

Fuente: Datos de Dora et al. (9).

respectivamente, sorprendentemente similares a las del experimento en Argentina (Cuadro 3). También es muy interesante la comparación de los animales vacunados una, dos o más veces con vacuna con adyuvante oleoso. Los animales primovacunados tenían una tasa de morbilidad dos tercios más baja en comparación con la vacuna de hidróxido de aluminio. Los animales vacunados dos o más veces con vacuna oleosa tuvieron una tasa de morbilidad más de veinte veces más baja que los animales vacunados con vacuna de hidróxido de aluminio.

Estos resultados muestran que la incidencia de la enfermedad es bastante reducida en poblaciones de animales vacunados con vacuna con adyuvante oleoso. Concordamos con Dora y colaboradores que si todos los animales en esa determinada área hubiesen sido vacunados con una vacuna con adyuvante oleoso, la incidencia hubiese sido insignificante. Esta opinión es confirmada por la observación de que la población bovina en Bagé, que continúa siendo vacunada con vacuna oleosa, no ha tenido ningún caso de fiebre aftosa en los años siguientes a la epidemia de 1980, aunque aún se presentan brotes de fiebre aftosa en Río Grande do Sul (10). Sin embargo, la incidencia de la enfermedad ha sido drásticamente reducida, ya que casi la mitad de la población bovina en ese estado, 5.5 millones de animales de un total de 12 millones de bovinos, actualmente es vacunada con vacuna con adyuvante oleoso.

CUADRO 3. *Tasas de morbilidad (por 1000) de fiebre aftosa en dos experimentos de campo de larga escala con vacunas de hidróxido de aluminio y con adyuvante oleoso*

País	Vacunas	
	Hidróxido de aluminio	Oleosa
Argentina 1977-81	55	7
Brasil 1980	45	6

### PRODUCCION ACTUAL Y FUTURA DE VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO

El CPFA prepara actualmente vacunas inactivadas con adyuvante oleoso para proyectos oficiales de campo en la Argentina, Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela, y tiene en existencia 50.000 dosis de vacuna para situaciones de emergencia en áreas libres de la enfermedad.

La excelente experiencia con esta vacuna en epidemias de fiebre aftosa en el sur de Brasil y el gran interés de los ganaderos en su aplicación llevaron a las autoridades gubernamentales de Brasil a establecer laboratorios de producción de vacuna con adyuvante oleoso en Campinas (Gobierno Federal) y en Porto Alegre (Gobierno del Estado, Río Grande do Sul) que se encuentran en operación desde 1984.

Los laboratorios privados de producción de vacuna en Brasil están interesados en esta vacuna y ya han producido partidas experimentalmente. A través de la experiencia de los proyectos oficiales, apoyados por el CPFA, varios países en América del Sur también están interesados en la producción de este tipo de vacuna en un futuro próximo. Por tanto, es probable que el volumen de producción de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso en América del Sur aumentará considerablemente. La aplicación sistemática y masiva de este tipo de vacuna tendrá un profundo efecto en la situación epidemiológica de la fiebre aftosa en el continente.

## REFERENCIAS

1. ABARACON, D., ALONSO FERNANDEZ, A., MAGALLANES, N., CHARLES, E.G., DURINI, L. A. Protección de bovinos después de vacunados con vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso. (Protection of cattle following vaccination with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine). *Bol.Cntr. Panam.Fiebre Aftosa* 37-38: 41-43, 45-47, 1980.
2. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa con vacuna oleosa. (Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines). *Bol.Centr.Panam.Fiebre Aftosa* 26: 23-25, 27-29, 1977.
3. AUGÉ DE MELLO P., SUTMÖLLER, P., FREITAS COSTA, K.de, MILLAN, A. Persistencia de anticuerpos en respuesta a la revacunación con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. (Persistence of antibody response after revaccination with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine). *Bol.Centr. Panam.Fiebre Aftosa* 37-38: 37-38, 39-40, 1980.
4. BAHNEMANN, H.G., AUGÉ DE MELLO, P., ABARACON, D., GOMES, I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bull.Off.int.Epiz.* 81: 1335-1343, 1974.
5. CAGGIANO, C.H., GIMENO, E.J., TKACICK, E., VILCHES, A.M. Aplicación experimental a campo de vacuna con adyuvante oleoso en la República Argentina. *Proc.16th Conf.FMD Comm.*, OIE, Paris, 14-17 Sept. 1982. Vol.1, p 223-241.
6. CASAS OLASCOAGA, R. Summary of current research of Pan American Foot-and-Mouth Disease Center on oil adjuvanted vaccines. *Bull.Off.int.Epiz.* 89 (11-12): 1015-1054, 1978.
7. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa. *Ser.Man.Téc.* No. 2, 1980.
8. CUNLIFFE, H.R. & GRAVES, J.H. Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: comparison of two adjuvants in cattle. *Can.J.Comp.Med.Vet.* 27: 193-197, 1963.
9. DORA, J.F.P., COELHO NUNES, J.C., da SILVEIRA, J.S.G., JORGENS, H.N., ROSENBERG, F.J., ASTUDILLO, V.M. Epidemia de fiebre aftosa en Bagé, RS, Brasil, 1980. Evaluación de dos sistemas de vacunación. (Epidemic of foot-and-mouth disease in Bage, RS, Brazil, 1980. Evaluation of two systems of vaccination). *Bol.Centr.Panam.Fiebre Aftosa* 49-50: 3-9, 11-17, 1984.
10. DORA, J.F.P. Comunicación personal-Personal communication, 1985.
11. GOMES, I. & ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bol.Centr.Panam.Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1975.
12. GOMES, I., SUTMÖLLER, P., CASAS OLASCOAGA, R. Respuesta en bovinos a la exposición del virus de la fiebre aftosa un año después de inmunizados con vacuna con adyuvante oleoso. (Response of cattle to foot-and-mouth disease (FMD) virus exposure one year after immunization with oil-adjuvanted FMD vaccine). *Bol.Centr.Panam.Fiebre Aftosa* 37-38: 25-29, 31-35, 1980.
13. SUTMÖLLER, P., FREITAS COSTA, K.de, GOMES, I. Prueba de seroneutralización por microtécnica para fiebre aftosa: cálculo de la expectativa porcentual de protección. (The serum microneutralization test: establishment of an expected percentage of protection). *Bol.Centr.Panam.Fiebre Aftosa* 39-40: 31-36, 37-42, 1980.
14. SUTMÖLLER, P., GOMES, I., ASTUDILLO, V. Potency estimation of FMD vaccines according to antibody assay results. *Mtg.Techn.Com.Eur.Comm. FMD*, Lelystad, Netherlands, 20-22 Nov., 1983. p.62-66.