

CONTROL DE INOCUIDAD EN VACUNAS ANTIAFTOSA HIDROXIDO-SAPONINADAS MEDIANTE LA ELUCION Y CONCENTRACION DEL ANTIGENO

A. Alonso Fernández¹; M.S. Söndahl¹; D. Abaracon¹; Maria E. Ferreira¹

RESUMEN

Se describe un método de control de inocuidad de vacunas antiaftosas hidróxido de aluminio saponinadas. El antígeno fue eluido del hidróxido de aluminio mediante el tampón Matheka, seguidamente fue concentrado con polietilenglicol y después fue inoculado en células BHK cultivadas en botellas de Roux. Con cada serie de vacuna fueron inoculadas tres botellas de Roux con 1 ml de antígeno eluido y concentrado, lo que representa un total de 150 ml de vacuna.

INTRODUCCION

Los controles de inocuidad de las vacunas de fiebre aftosa preparadas con antígeno inactivado y adsorbido en hidróxido de aluminio se efectúan en bovinos (6), en ratones lactantes (7) y en cultivos celulares (1, 3 y 4). Actualmente, a pesar de considerarse la prueba en bovino como la de referencia (6), son más usados los cultivos celulares, prefiriéndose la inoculación del antígeno eluido del hidróxido de aluminio (3, 5 y 9) en vez de la vacuna integral, ya que ésta contiene habitualmente sustancias tóxicas para las células.

El presente trabajo describe los resultados de pruebas realizadas para detectar virus infectante en vacunas antiaftosa preparadas con antígeno inactivado, adsorbido en hidróxido de aluminio, a las que además se agregó saponina. Para tal fin, se contaminaron vacunas con virus de la fiebre aftosa, se eluyó el antígeno con la solución de Matheka, se concentró con polietilenglicol (PEG) y se inoculó en células IBRS-2 y BHK₂₁, Clon 13.

MATERIALES Y METODOS

Vacuna

Fueron usadas vacunas elaboradas con antígeno obtenido en células BHK₂₁, Clon 13, cultivadas en suspensión, inactivado con BEI (2) y adsorbido en hidróxido de aluminio. Además, cada ml de vacuna terminada tenía un miligramo de saponina.

Contaminación de la vacuna

A 7 frascos de vacuna fueron añadidas 10^{0,2}, 10^{1,2}, 10^{2,2}, 10^{3,2}, 10^{4,2}, 10^{5,2}, o 10^{6,2} dosis infectantes 50% cultivos celulares por ml (DI₅₀CC/ml) de vacuna, de la cepa C₃ Indaial-Brasil/71 adaptada a células BHK₂₁, Clon 13. La vacuna contaminada fue mantenida a 4°C durante 4 días.

Elución y concentración del antígeno

Al sedimento de 200 ml de cada vacuna contaminada o normal, obtenido por centrifugación a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C, fueron agregados 20 ml de la solución de Matheka (85 ml de 0,33M de Na H PO₄ 2H₂O más 15 ml de 0,33M KH₂PO₄, pH 7,5) (8). La mezcla después de mantenida en agitación suave durante 45 minutos a 4°C fue centrifugada en las condiciones indicadas anteriormente y se recogió el sobrenadante. Al sedimento se le volvió a añadir 20 ml de la solución Matheka para hacer una segunda elución. A los 40 ml de sobrenadante obtenidos en los dos tratamientos, fueron agregados 8% p/v de PEG 6000 M. La mezcla después de mantenida en agitación suave por 3 horas, fue centrifugada a 4°C durante 10 minutos a 8.000 g. El sedimento fue resuspendido en 4 ml de medio Eagle sin suero.

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Inoculación en botellas de Roux

El antígeno eluido y concentrado de cada frasco de 200 ml de vacuna fue inoculado en tres botellas de Roux con monoestrato de células BHK₂₁, Clon 13 de 48 horas, a razón de 1 ml por botella. Cuando a las 48 horas de incubación a 37°C no se observó efecto citopático, se realizó un segundo pasaje, inoculando una nueva botella de Roux con 10 ml de una mezcla del sobrenadante de las tres botellas, después de haber sido congeladas y descongeladas. Ante ausencia de efecto citopático después de 48 horas de incubación se realizó el tercer pasaje. Los cultivos celulares de los tres pasajes fueron examinados por fijación del complemento.

Titulación en microplacas

El virus añadido a la vacuna, el sobrenadante de ésta, el antígeno eluido y el mismo eluido y concentrado fueron titulados en cultivos celulares. Las diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁸ fueron inoculadas, cada una, en 8 cavidades de placas de microprueba que tenían camadas de células IBRS-2, Clon 17, de 24 horas. En cada cavidad fueron añadidos 0,1 ml de la dilución correspondiente. Seguidamente las microplacas fueron cubiertas con una placa de vidrio y colocadas en una estufa de CO₂ a 37°C. Transcurridas 48 horas de incubación, las placas fueron teñidas y fijadas durante 15 minutos con una solución acuosa con 10% de formalina y 0,1% de cristal violeta. Todas las cavidades que presentaron efecto citopático parcial o total fueron consideradas positivas. El título final 50% fue calculado por el método de Spearman-Kärber y expresado en DI₅₀CC/ml.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se indican las DI₅₀CC de virus de la cepa C₃ Indaial-Brasil/71 agregadas por ml en cada uno de los 7 frascos (A, B, C, D, E, F, G). También se incluyen las DI₅₀CC/ml detectadas en el sobrenadante obtenido por centrifugación de esas vacunas y en el antígeno eluido antes y después de concentrado con PEG.

CUADRO 1. *Detección de virus activo en vacunas contaminadas con virus de la fiebre aftosa cepa C₃ Indaial*

Vacuna	DI ₅₀ CC/ml			
	Agregadas a la vacuna por ml	En el sobrenadante vacuna	En el antígeno eluido	En el antígeno concentrado
A	6,2 ^a	3,5	6,5	7,5
B	5,2	T ^b	5,5	6,0
C	4,2	T	4,8	5,2
D	3,2	T	3,4	4,0
E	2,2	T	T	2,8
F	1,2	T	T	2,5
G	0,2	T	T	1,7

^aTítulo infeccioso expresado en log 10.

^bToxicidad celular hasta la dilución 10⁻¹.

Se observó que 0,1 ml de la fase acuosa de la vacuna o del antígeno eluido con el tampón Matheka era tóxico para las células IBRS-2 hasta en la dilución 10⁻¹. La vacuna integral presentó el mismo efecto. Sin embargo, 0,1 ml del antígeno eluido y concentrado 10 veces con PEG no tenía toxicidad para células IBRS-2 cultivadas en microplacas. Igualmente 1 ml de ese antígeno tampoco fue tóxico para monocamadas de células BHK₂₁, Clon 13, cultivadas en botellas de Roux.

El antígeno eluido y concentrado de cada una de las siete vacunas contaminadas fue inoculado en botellas de Roux con monoestratos de células BHK₂₁, Clon 13, a razón de 1 ml por botella. Todas las vacunas fueron infectantes en el primer pasaje. La fijación del complemento mostró que era la cepa C₃ Indaial.

Idéntica experiencia fue realizada con tres vacunas no contaminadas. Los antígenos eluidos y concentrados de estas vacunas fueron negativos en los tres pasajes realizados.

DISCUSION

Los métodos clásicos de control de inocuidad se basan en hacer 100 observaciones por la inoculación de 0,1 ml, ya sea en la lengua de bovinos (6), en células (3) o en ratones lactantes (7). Cuando

todas las observaciones son negativas, aún puede haber 4,5% de inóculos positivos en la vacuna con una posibilidad de error de 0,01 (3). La seguridad del método puede aumentarse considerablemente elevando el número de observaciones o el volumen de inóculo (7). La mejor manera para aumentar el volumen del inóculo es eluir el antígeno del hidróxido de aluminio y después concentrarlo (9).

El procedimiento descrito en el presente trabajo reduce 200 ml de vacuna a 4 ml de inóculo, es decir, 1 ml de antígeno eluido y concentrado corresponde a 50 ml de vacuna. Si se inoculan 3 botellas de Roux, a razón de 1 ml por botella, se controlan en total 150 ml de vacuna, en vez de 10 ml usados en los métodos convencionales (3, 6 y 7).

Los datos del Cuadro 1 muestran que el título de virus por ml del antígeno eluido y concentrado es en media 10 veces más que el de la vacuna contaminada. Esto, unido al aumento del inóculo, hace que el procedimiento estudiado sea unas 10 veces más sensible que los métodos convencionales para detectar virus infectante en las vacunas anti-aftosas inactivadas hidróxido-saponinadas. Por otro lado, la posibilidad de no detectar virus activo en una muestra de 1 ml de antígeno eluido y concentrado de una vacuna infectante es de 0,03 para un $P = 99\%$. Además tiene la ventaja de que se elimina la toxicidad de la vacuna integral, del sobrenadante y del antígeno eluido, aspecto de gran importancia cuando se trabaja con vacunas que contienen saponina.

REFERENCIAS

1. ANDERSON, E.C.; CAPSTICK, P.B.; MOWAT, G.N.; LEECH, F.B. *In vitro* method for safety testing of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg., Camb.*, 68: 159-172, 1970.
2. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47 (1): 47-56, 1975.
3. DANNACHER, G.; FEDIDA, M.; THOMAS, J.P.; COUDERT, M.; PEILLON, M. Contrôle d'innocuité du vaccin antiaphteux sur cultures cellulaires. *Rec. Méd. vét.* 146: 1395-1414, 1970.
4. FAYET, M.T.; PETERMANN, H.G. Control de inocuidad de vacunas contra la fiebre aftosa que contienen formol, saponina o hidróxido de aluminio. *Gac. Vet., B.Aires*, 33: 580-590, 1971.
5. GAILIUNAS, P. Detection of minimal quantities of foot-and-mouth disease virus with bovine kidney tissue cultures. *App. Microbiol.* 13: 872-875, 1965.
6. HENDERSON, W.M. Significance of tests for non infectivity of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg., Camb.*, 50: 195-208, 1952.
7. HENDERSON, W.M.; LUCAM, F.; GARCIA-PIRAZZI, A. Le contrôle des vaccins antiaphteux à virus inactivé. Solutions adoptées en Amérique du Sud spécialement en République Argentine. *Symp. Intern. Virol. Vet. CIE-AISM*, Lyon, 2324 Mai 1962.
8. MATHEKA, H.D. Über das Verhalten des Maul und Klauenzeuchevirus bei Adsorption an Aluminiumhydroxyd und nachfolgender Elution. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 174: 473-505, 1959.
9. PHARMACOPÉE EUROPÉENNE. Groupe d'experts No. 15V. Fiebre Aphteux. Document PA/PH/Exp. 15V/T (75) 4.