

VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA CON VIRUS PRODUCIDO EN CULTIVOS CELULARES CON SUERO BOVINO TRATADO POR POLIETILENGLICOL (PEG)*

Daniel Abaracón**, Homero Giacometti**

COMUNICACION PREVIA

Barteling (4) describió el uso de PEG en suero de bovinos vacunados contra la fiebre aftosa (FA), para precipitar los anticuerpos y otros elementos inhibidores de la replicación del virus. Este autor utilizó suero en varias concentraciones en el medio de cultivo para crecimiento de células BHK-21 en suspensión y encontró que su efecto como elemento promotor de crecimiento celular es casi igual al efecto del mismo suero sin tratar con PEG. También informó que fue posible inocular con virus células que desarrollaron en medio de cultivo con suero tratado con PEG, sin cambio de medio, lo que simplifica el proceso de producción de antígeno (4).

En nuestros ensayos preliminares con el uso de sueros tratados con PEG en cultivos celulares, hemos estudiado tres aspectos:

a) Eliminación de los anticuerpos en sueros de bovinos faenados en mataderos de regiones donde la FA es endémica.

b) Crecimiento celular utilizando suero de una misma partida de la cual una fracción fue tratada con 8,0% de PEG y otra fracción no fue tratada.

c) Producción y ensayos de eficacia de vacunas inactivadas preparadas con virus replicados en células BHK-21 Clon 13 en suspensión, en medio sin suero y suero tratado con PEG.

La tabla 1 muestra los títulos neutralizantes (7) antes y después del tratamiento con PEG. Los resultados son similares a los obtenidos con otras partidas de sueros.

En cultivos celulares en suspensión no hemos encontrado diferencias en el crecimiento celular usando ambas fracciones.

Ya hemos incorporado a nuestra rutina de trabajo el uso de sueros tratados con PEG para todos los cultivos celulares destinados a titulaciones de virus y a pruebas de ausencia de infectividad de virus en vacunas inactivadas. La susceptibilidad de estos cultivos al virus de la FA es superior a la de los cultivos celulares producidos con los mismos sueros sin tratar por PEG.

Se prepararon 2 vacunas trivalentes conforme a la técnica clásica con suero normal, enfriamiento, sedimentación, resuspensión de células e infección con virus (vacuna A) y con virus replicados en cultivos celulares sin enfriar, en su propio medio de crecimiento conteniendo 5,0% de suero bovino tratado por PEG (vacuna B).

En ambas técnicas se usaron las mismas semillas de virus a la misma multiplicidad de infección y los virus producidos fueron sometidos al mismo tratamiento con cloroformo al 1,0% bajo fuerte agitación, clarificación

* Polyethylene Glycol 6000. J.T. Baker, New Jersey 08865.

** Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589-ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

por placa Seitz K2, e inactivación por etilamina binaria (BEI) (1 y 2).

Las vacunas se prepararon en la siguiente forma: las suspensiones víricas monovalentes, cuyos títulos infectante 50%/ml y fijador del complemento figuran en la Tabla 2, después de inactivadas y sometidas a pruebas de no infectividad, se mezclaron en forma trivalente y se les agregó hidróxido de aluminio (al 2,5% Al₂O₃). Después de dejar en agitación por algunas horas, se dejó sedimentar el hidróxido de aluminio y se eliminó el líquido sobrenadante en cantidad suficiente para que cada dosis de vacuna trivalente de 5,0 ml contuviera el equivalente a: a) 2 ml de suspensión vírica de cada tipo; b) 2 ml de Al(OH)₃; c) 5 mg de saponina P₃*; d) 0,25 ml de glicerina neutra y e) merthiolate Lilly a una concentración final de 1:30.000.

La protección conferida por ambas vacunas se evaluó por índice de seroprotección (ISP) (6) en 20 bovinos de 15 meses de edad, de

raza Hereford, no vacunados y libres de anticuerpos contra la FA antes de la vacunación. Estos animales fueron criados y mantenidos durante la prueba en un establecimiento donde no se ha comprobado casos de FA por más de 12 años. Los bovinos identificados con los números 1 al 9 se vacunaron con vacuna A producida por el método clásico (Tabla 3) y los numerados 10 al 20 con vacuna B producida con suero tratado con PEG (Tabla 4).

No se observó diferencia significativa en ambos grupos tanto en porcentaje de animales considerados protegidos (ISP \geq 2,0) sobre el total, como en las expectativas porcentuales de protección según Gomes y Astudillo (8).

La conclusión preliminar es que el tratamiento de suero con PEG se muestra muy promisorio para la producción industrial de vacunas con virus replicados en cultivos celulares en suspensión. Los cultivos celulares pueden ser inoculados con el virus en el momento óptimo del crecimiento celular, sin pasar por las etapas de enfriamiento, sedimentación y substitución del medio de crecimiento celular por medio sin suero. La eliminación de estas etapas del proceso ofrecería grandes ventajas industriales, por aumento de capacidad de la planta instalada ya

* Food Industries Ltd. Walton on Thames, Surrey, England.

TABLA 1 - *Títulos neutralizantes contra el virus de la fiebre aftosa de suero antes y después del tratamiento con PEG*

	Tipo de Virus		
	O ₁	A ₂₄	C ₃
Antes de tratado ^{a)}	3,1*	3,1	3,0
Después de tratado ^{b)}	0,8	0,5	0,8

* Microneutralización en células IBRS-2 (7).

a) Suero centrifugado y filtrado por placas Seitz EKS.

b) El mismo suero tratado con 8,0% de PEG por 1 hora a 4° C, centrifugado y filtrado por placas EKS.

TABLA 2 - Características de los antígenos producidos en células BHK-21 en suspensión con el método convencional y con suero tratado por PEG

Tipo de Virus	Títulos del antígeno	
	CCDI _{50%} /ml*	FC**
Vacuna A ^{a)}		
O ₁	10 ^{7,2}	1/10
A ₂₄	10 ^{7,2}	1/11
C ₃	10 ^{7,3}	1/12
Vacuna B ^{b)}		
O ₁	10 ^{7,5}	1/13
A ₂₄	10 ^{7,4}	1/14
C ₃	10 ^{7,3}	1/12

* 50% dosis infectante por cultivo celular.

** 3 unidades de complemento y 90 minutos contacto suero y virus.

a) Procedimiento convencional con suero normal.

b) Procedimiento ensayado con suero tratado por PEG.

que los tanques serían ocupados por un menor tiempo para cada ciclo de producción de virus, por economía de medio de cultivo, y por ahorro de células que siempre se pierden o afectan parcialmente en su vitalidad en los procesos de enfriamiento y resuspensión.

En la preparación de vacunas con antígenos producidos con células en suspensión por el método convencional siempre quedan cantidades residuales de suero. Esas pequeñas cantidades de suero desnaturalizadas por la acción de formalina durante el proceso

de inactivación de las vacunas, han sido factores desencadenantes de severas reacciones alérgicas de tipo inmediato en bovinos sensibilizados (5). Por esa razón consideramos que se debería usar inactivantes como el BEI que no tendría acción sobre el suero (3). Es de fundamental importancia determinar si una vacuna cuya suspensión antigénica contiene 5,0% de suero bovino, podría actuar como sensibilizante para futuras vacunaciones.

TABLA 3 - *Indices de seroprotección de los bovinos 28 días postvacunación con vacuna producida por el método convencional*

Bovino Nº	Tipo de Virus		
	O ₁	A ₂₄	C ₃
1	3,3	5,3	3,8
2	3,5	4,5	4,3
3	4,5	5,4	≥ 4,0
4	3,0	1,8	2,5
5	2,3	2,8	2,1
6	2,3	4,2	2,0
7	≥ 5,5	≥ 5,8	4,9
8	≥ 5,3	≥ 5,8	5,0
9	4,8	2,7	4,9
Valores >2,0 sobre el total	9/9	8/9	9/9
Expectativas de protección	95%	93%	95%

TABLA 4 - *Indices de seroprotección de los bovinos 28 días postvacunación con vacuna producida por el método de suero tratado por PEG*

Bovino Nº	Tipo de Virus		
	O ₁	A ₂₄	C ₃
10	2,3	3,5	1,3
11	≥ 5,3	4,8	4,4
12	4,5	2,8	2,3
13	2,8	5,0	≥ 4,0
14	5,3	4,3	≥ 4,5
15	2,3	4,3	2,0
16	2,1	5,5	1,8
17	≥ 5,5	≥ 5,8	≥ 4,5
18	5,0	≥ 5,3	5,0
19	≥ 5,3	5,5	≥ 4,6
20	≥ 5,3	3,8	≥ 4,6
Valores >2,0 sobre el total	11/11	11/11	9/11
Expectativas de protección	95%	95%	90%

REFERENCIAS

1. 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.
2. 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. Épizoot.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
3. BAHNEMANN, H.G.
Inactivation of viruses in serum with binary ethyleneimine. *J. clin. Microbiol.* 3 (2): 209-210, 1976.
4. BARTELING, S.J.
Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in growing BHK-suspended cell cultures. *Bull. Off. int. Épizoot.* 81 (11-12): 1243-1254, 1974.
5. CAPSTICK, P.B.; PAY, T.W.F.; BEADLE, G.G.; BANDAU, R.; BOGE, A.
Some studies on allergic reactions to foot-and-mouth disease vaccine in Lower Saxony, Germany. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee at the Instituto Zooprofilattico Sperimentale. Brescia, Italy, 24-26 September 1969. FAO. ROME, 1970, pp. 213-218.
6. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I.
El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.* 19 (110): 243-267, 1957.
7. FERREIRA, M.E.V.
Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-24, 1976.
8. GOMES, I.; ASTUDILLO, V.
Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1975.