

VACUNA ANTIAFTOSA: ELEMENTOS PARA EVALUAR EL PROCESO DE PRODUCCIÓN

Gilfredo C. Darsie, José L. dos Reis y Jonas L. da Silva
PANAFTOSA - OPS/OMS

La vacuna antiaftosa utilizada en Sudamérica en las últimas décadas, presenta una formulación que contiene antígenos inactivados de diferentes cepas virales y un adyuvante oleoso en emulsión primaria del tipo agua en aceite.

Esta información resumida y sencilla, en realidad no refleja la complejidad de los procesos de producción y de control de calidad que deben ser cumplidos para la obtención de un producto final que cumpla con la finalidad de proteger a los animales vacunados de la manifestación de la enfermedad.

El objetivo de nuestra presentación, es recordar y aclarar algunos puntos que deben ser llevados en consideración por los profesionales que realizan los controles de calidad en los laboratorios oficiales.

Los principales métodos de producción de antígenos en los laboratorios de Sudamérica en los últimos años han sido el denominado Método de Frenkel, que utiliza como sustrato para la replicación viral el epitelio de la lengua de bovinos, obtenido en mataderos, y los cultivos celulares con la utilización de la línea BHK 21 clon 13, principalmente, en suspensión y/o en monocapa. En ambos métodos, el proceso busca reproducir *in vitro* condiciones semejantes a las que ocurren

in vivo para que el sustrato celular sea capaz de multiplicarse o mantenerse viable para la replicación del virus.

Las condiciones son dadas por los medios de cultivo químicamente definidos que básicamente son formulados con soluciones balanceadas de sales, carbohidratos, soluciones de aminoácidos y vitaminas esenciales, y con suero bovino como suplemento orgánico. La complejidad de las formulaciones hace con que el control de calidad de los insumos sea realizado rutinariamente para cada lote de medio, comprobándose indicadores de osmolaridad, concentración hidrogeniónica (pH), capacidad de soportar el crecimiento de los cultivos celulares y la esterilidad de estos cultivos. Dos de los insumos que presentan alta capacidad de introducir problemas en los cultivos celulares, son el suero bovino y el agua. El suero por la gran variabilidad de los lotes en cuanto a factores de crecimiento, las toxinas existentes por los contaminantes bacterianos introducidos durante su recolección en los mataderos, por los contaminantes virales adventicios y por los niveles de anticuerpos vacunales existentes en las regiones bajo programas de vacunación. Como solución de estos problemas, se utiliza la inactivación o la irradiación y el tratamiento por polietilenglicol, además de cuidados específicos en la recolección.

entera responsabilidad del productor, una vez que su inoculación por la vía intramuscular puede llevar a la formación de abscesos asépticos. Su acción es significativa en relación a la inducción temprana de anticuerpos y su utilización es de uso casi común, aunque la mayoría de los productores no la registran. Es importante recordar que el estímulo inducido por ella también induce respuesta significativa en relación a otros antígenos existentes en la vacuna, aumentando los riesgos de ocurrencia de reacciones pós-vacunales indeseables. La mezcla obtenida a través de acción mecánica, de una emulsión primaria del tipo “agua-en-aceite”, presenta diferentes grados de dispersión de la fase acuosa, lo que va a determinar la estabilidad de la emulsión y la duración de inmunidad de la vacuna. Así, una vacuna que presente una estabilidad corta, tiene alta capacidad de inducir respuesta rápida y de altos niveles, pero tendrá una duración de inmunidad corta. Vacunas con esta característica son excelentes para utilización en acciones de emergencia pero pueden no atender a los programas regulares de vacunación sistemática. A nivel de proceso, es realizada la

prueba de estabilidad a la temperatura, en la cual el producto final es mantenido a 37°C o 56°C debiendo mantenerse sin ruptura de la emulsión por 15 o 5 días respectivamente. El mismo criterio debe ser adoptado por el controlador oficial. Vacunas que no presenten estabilidad deben ser rechazadas, no importando el grado de ruptura.

Cuales son los puntos críticos del proceso?

Cuales son los puntos a ser controlados?

De lo que hablamos, creo que queda claro que son preguntas de difícil respuesta. La búsqueda de la calidad que garantice al consumidor un producto eficaz y seguro involucra centenas de pruebas en el control del proceso. La exclusión de una de ellas puede significar una interpretación errada de los datos y la pérdida del producto en la prueba final, que es la de potencia realizada por el servicio oficial. Así, la permanente discusión y colaboración entre productor y controlador debe ser una más de las buenas prácticas de producción.

**Producir es controlar
y para controlar
es necesario
saber producir.**

La utilización de suero fetal no es económicamente viable en los cultivos industriales. En relación a la calidad del agua, lo mínimo requerido es una agua del tipo II, que es descrita como la que pasa por un proceso de bidestilación o por la deionización completa. En estos casos, la presencia de microelementos es prácticamente nula, y las pruebas de control registran conductividad eléctrica muy próximo del cero. Esta calidad química puede ser de baja utilidad caso exista la presencia de toxinas orgánicas producidas por microorganismos, en general por algas.

Estos son factores que alteran la cantidad de células en los cultivos, pero peor que esto, también alteran la calidad de las células obtenidas. Como la verdadera "fabrica" del virus son ellas, cualquier alteración sufrida puede llevar a la producción de semillas o de suspensiones con diferentes grados de desviación en relación a las muestras de referencia y de control pudiendo llevar a resultados desastrosos en el producto final, muchas veces no explicables por las pruebas de control de proceso.

Las semillas de virus utilizadas en la producción de vacunas, son determinadas por los servicios oficiales de sanidad animal de los países en acuerdo con PANAFTOSA como centro de referencia. Las cepas son elegidas primero por su importancia epidemiológica y después por su amplitud inmunogenica, estabilidad y capacidad de replicación en las condiciones de producción industrial. Una vez hechos estos estudios, el virus de referencia es entregado a los países que lo necesitan y cabe a los laboratorios de control nacionales hacer su replicación en volúmenes que permitan su distribución a las industrias, como virus de control oficial de potencia, además de suplir las necesidades del control en las pruebas de rutina. En este punto, deben ser realizados controles de homologia, pureza y esterilidad en

los diferentes pasajes para garantizar que no hay diferencias en relación al virus de referencia o contaminaciones, con otros virus o bacterias. A los laboratorios de producción, cabe producir sus semillas para tal finalidad en los volúmenes necesarios y con los mismos criterios de control de calidad internos, además de otros que crean necesarios.

Una vez obtenidas las semillas, el próximo paso es la producción de las suspensiones virales. Esta etapa del proceso exige monitoreo constante de parámetros como pH, temperatura, agitación de la suspensión, esterilidad, tiempo y características del efecto citopatogenico. Cualquier alteración en uno de estos factores puede ser la causante de una respuesta imperfecta de las células y llevar a cambios en las características de las suspensiones producidas. Estas deben ser controladas en cuanto al titulo fijador del complemento, titulo infeccioso, pureza, esterilidad y en algunas ocasiones cuanto a la masa antigenica e integridad de las partículas 140 S.

El próximo paso en el proceso es la clarificación de la suspensión viral, normalmente hecha por la acción del cloroformo. El tratamiento busca retirar lo máximo posible de antigenos no virales, como proteínas, lipoproteinas y otros de origen celular, además de los debris celulares y células enteras vivas o muertas al final de la replicación. Después, es realizada la filtración o la centrifugación para completar el proceso. Estos son procedimientos que también llevan a la perdida de calidad y por lo tanto deben ser realizadas pruebas de control a cada paso del proceso, como las referidas anteriormente.

La inactivación es el paso del proceso de producción en el cual se deben tomar los cuidados más rigurosos. Una vacuna puede hasta tener una potencia en límite inferior de aceptación, pero nunca puede ser la causante de una infección en

un animal vacunado. La utilización del BEI como inactivante, principalmente cuando se adopta la doble inactivación en dos tanques, ha proporcionado un alto grado de seguridad, pero siempre deberán ser realizadas las pruebas de cinética de la inactivación y de no presencia de virus residual activo, además de esterilidad y pureza. El proceso también causa pérdidas, y por lo tanto son recomendados los mismos controles de calidad de los pasos anteriores.

Debido a las pérdidas que pueden ocurrir durante el proceso de producción hasta este punto, la mayoría de los laboratorios recurre a la concentración de los antígenos después de su inactivación para compensarlas. Una segunda clarificación puede ser necesaria si el antígeno va a ser concentrado por ultrafiltración, lo que significa una pérdida más. La concentración es menos dañosa al antígeno si es obtenida por la precipitación por acción del polietilenglicol. Lo importante a tener en cuenta, es que la concentración realizada sin una buena purificación de la suspensión del antígeno, lleva a la concentración de otros componentes, como las enzimas proteolíticas. La acción de estas enzimas, puede causar daños importantes en el capsideo viral que ni siempre son detectados por las pruebas de control de proceso rutinariamente utilizadas. Así, suspensiones con altos títulos de fijación del complemento y altos contenidos de partículas 140 S, pueden tener sus epitopos inmunogénicos degradados, inmediatamente o, lo que es peor, con el pasar del tiempo. Esto justifica lo que ocurre con frecuencia en la vacuna de muchos laboratorios, las cuales presentaron excelentes resultados en las pruebas internas y son rechazadas en el control de potencia oficial, realizado normalmente hasta 60 días después de la formulación. Recordemos que algunas de las suspensiones que hacen parte de las mezclas

pueden haber sido producidas con una antelación de meses, lo que compromete más la calidad final. Uno de los mayores puntos de discusión entre los laboratorios productores y el servicio oficial de control, es evidenciado cuando aquellos presentan sus protocolos de composición antigénica de las vacunas, normalmente teniendo por punto básico de evaluación el contenido de masa antigénica, y sostienen que la formulación es semejante en vacunas aprobadas y rechazadas y por lo tanto el resultado malo no puede estar acertado. Respecto a esto, se debe siempre tener en cuenta que la determinación del contenido de partículas 140 S es una prueba de carácter físico, no significando que el mismo tenga siempre la misma correlación con protección. La prueba más contundente de esto es que el mismo contenido de 140 S de suspensiones producidas por replicación del virus en cultivos celulares en monocapa induce respuesta inmunitaria mucho mayor que la inducida por aquellas producidas en cultivos celulares en suspensión. Además, cualquier cambio en el proceso de multiplicación celular puede inducir cambios significativos en la característica del virus replicado, algunos fácilmente detectados y otros que no se puede cuantificar. La utilización de paneles de anticuerpos monoclonales puede ayudar en el proceso de decisión sobre la calidad de las suspensiones antigénicas, pero también los resultados obtenidos no son definitivos para estimación de la potencia de la vacuna.

Finalmente, llegamos a la formulación de la vacuna la cual consiste en mezclar los antígenos que están en una fase acuosa con el aceite para obtener una emulsión. En Sudamérica se ha definido que la emulsión debe ser del tipo agua en aceite, quedando a criterio del productor la elección del emulsificante y del aceite. La inclusión de saponina en la formulación debe ser evaluada, registrada en los protocolos de la vacuna y de