

EMULSIFICANTE MONTANIDE 888 PARA LA PREPARACION DE VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO

D. Abaracón¹; J.A. Mesquita¹; S. Sallúa²; R. Pérez Rama²

COMUNICACION BREVE

La producción de vacunas con adyuvante oleoso (adyuvante incompleto de Freund) implica el uso de un antígeno en suspensión acuosa, de un aceite mineral blanco y de un agente emulsificante que permita la dispersión del antígeno inactivado (suspensión acuosa) en el seno del aceite mineral, formando una emulsión estable de tipo agua-en-aceite.

En el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) se usa antígeno producido en cultivos de células BHK₂₁, clon 13, en monocamada o suspensión (7) y un aceite mineral blanco USP (Marcol 52³). Inicialmente se usó el mono-oleato de manitol (Arlacel A⁴) como emulsificante y posteriormente fue sustituido por oleato de monoanhidro y deanhidromanitol (Montanide 80⁵). En ensayos comparativos realizados con vacunas en el CPFA, el Montanide 80 demostró poseer las mismas propiedades del Arlacel A (6) y está garantizado por una información técnica más completa de la firma productora.

La formulación de la vacuna elaborada en el CPFA consta de 50% de fase acuosa y 50% de la fase oleosa compuesta por 90% de Marcol 52 y 10% de agente emulsificante. La mezcla es finamente emulsificada por un proceso mecánico, en un aparato emulsificador industrial⁶ especialmente desarrollado para ese fin, quedando el producto final con una viscosidad elevada.

Para solucionar ese problema, y a pedido del CPFA, la firma SEPPIC desarrolló el octododecanoato de anhidromanitol, un nuevo emulsificante lipofílico, con un balance hidrofílico/lipofílico (HLB) de 5,0 (Montanide 888⁷); que supera todas las pruebas físicas y biológicas exigidas para productos de esta clase y permite producir emulsiones primarias de tipo agua-en-aceite de baja viscosidad, lo que facilita su manejo.

La viscosidad de la vacuna preparada con Montanide 888, medida en el viscosímetro Bröokkfield modelo LVT con la muestra a 25°C y el aparato ajustado a 12 rev/min es de aproximadamente 300 cps frente a 2400 cps que presentan las vacunas elaboradas con Arlacel A o Montanide 80, determinadas con el mismo viscosímetro ajustado a la misma velocidad y temperatura.

Cuando se centrifugan muestras de ambas vacunas a 1000 g por 60 minutos se observa un cuadro similar, sin separación de antígeno en el fondo del tubo y con una pequeña separación de aceite en la parte superior, que en la preparación con Montanide 888 es algo menor y más turbia. La estabilidad a 4°C es superior a dos años con ambas vacunas. La estabilidad a 37°C es de más de seis meses para las vacunas con Montanide 888 y de aproximadamente 30 días para las vacunas con Montanide 80.

En un ensayo preliminar realizado en el CPFA, una vacuna preparada con una muestra de Montanide 888 fue comparada con otra vacuna preparada con Montanide 80, y al ser aplicadas en bovinos jóvenes ambas mostraron un comportamiento inmunológico similar durante seis meses posvacunación, siendo la primera menos viscosa (3).

En la investigación efectuada, para confirmar el comportamiento y estabilidad inmunológicos,

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

²Dirección de Lucha Contra la Fiebre Aftosa (DILFA), Ruta Brig. Gral. Juan Antonio Lavalleja, Km 29, Pando, Canelones, Uruguay.

³Marcol 52 - Exxon Corporation, U.S.A.

⁴Arlacel A - ICI American Inc. Atlas Chemicals Division, U.S.A.

⁵Montanide 80 - SEPPIC, París, Francia.

⁶Caldeiraria e Mecânica INOX. Mauá-SP, Brasil.

⁷Montanide 888 - SEPPIC, París, Francia.

se realizaron varios experimentos en los que se compararon vacunas producidas con cuatro partidas diferentes de Montanide 888 frente a vacunas producidas con la misma composición antigénica y el mismo aceite mineral, pero con una partida ya conocida de Montanide 80, tomada como referencia. En algunos ensayos las vacunas fueron preparadas en volúmenes de 2,0 litros usando un emulsificador⁸ de mesa y en otras en volúmenes de 360 litros con el emulsificador industrial antes mencionado.

En el experimento 2 las vacunas con ambos emulsificantes fueron producidas con la fase acuosa formada por virus inactivado adsorbido sobre hidróxido de aluminio (2). En la preparación final había una parte de fase acuosa para 2 partes de fase oleosa.

Las pruebas fueron realizadas en bovinos susceptibles de 9 a 18 meses de edad, nunca vacunados contra la fiebre aftosa y la inmunidad fue evaluada por seroprotección según Cunha y colaboradores (4) y expresada en expectativas porcentuales de protección (EPP) según Gomes y Astudillo (5).

Las pruebas en cobayos fueron hechas por dosis protectoras 50% en cobayos vacunados por vía intramuscular con 1/20 de la dosis bovina con vacunas diluidas en diluyente activo (emulsión igual a la vacuna pero sin virus), y comprobados a los 30 días posvacunación.

Los resultados observados en las seis pruebas en bovinos (Cuadro 1) no muestran diferencias significativas entre los dos emulsificantes, tanto en vacunas recién elaboradas como conservadas a 4°C por hasta 24 meses. Esta observación vale tanto para las vacunas de tipo oleoso como para las vacunas con antígeno adsorbido sobre hidróxido de aluminio (aceite/hidróxido). Los valores observados en cobayos son en media siempre superiores a los de las vacunas preparadas con Montanide 80.

Como consecuencia de estos ensayos, las vacunas con adyuvante oleoso producidas en el CPFA pasaron a ser preparadas con Montanide 888 desde septiembre de 1982, con excelentes resultados en las pruebas de control regular de vacunas y en la respuesta serológica de los bovinos de campo.

REFERENCIAS

1. ABARACON, D., GIACOMETTI, H., MESQUITA, J.A. El uso de la etilenimina binaria (BEI) como inactivante de virus de la fiebre aftosa producido por diferentes técnicas semi-industriales. (The use of binary ethylenimine (BEI) for the inactivation of foot-and-mouth disease virus produced by different semi-industrial techniques). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 33-34: 1-5, 7-11, 1979.
2. ABARACON, D., MESQUITA, J.A., GIACOMETTI, H., SALLUA, S., PEREZ RAMA, R. Preparación de vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso usando antígenos adsorbidos sobre hidróxido de aluminio. (Formulation of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines containing antigen adsorbed to aluminum hydroxide). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 45-46: 43-46, 47-50, 1982.
3. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Informe Anual 1980, pág. 32.
4. CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., 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., B.Aires*, 19 (110): 243-267, 1957.
5. 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.
6. GOMES, I., AUGÉ DE MELLO, P. Comparación de vacunas con adyuvante oleoso preparadas con Arlancel A y Montanide 80. (Comparison of oil adjuvanted vaccines prepared with Arlancel A and Montanide 80). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 31-32: 41-42, 43-44, 1978.

⁸Silverson-Machine (Sales) Ltd. London, England.

CUADRO 1. Comparación entre Montanide 888 y Montanide 80. Ensayos con vacunas recién elaboradas y luego de conservadas a 4°C por hasta 24 meses.

Experi- mento Nº	Vacunas	Tipo de vacuna Dosis bovino	Meses conserv. a 4°C	EPP ^a						DPC ₅₀ ^b		
				O		Virus A		C		O	Virus A	C
				30 ^c	90	30	90	30	90	30 ^c	30	30
1	Vacuna N° 1 Mont. 80	Oleosa 5 ml	1	79	60	85	70	93	72	32	64	51
	Vacuna N° 2 Mont. 888 (Part. 1)	Oleosa 5 ml	1	90	88	86	93	97	92	79	128	64
	"	"	24	99	99	92	90	99	97	-	-	-
2	Vacuna N° 3 Mont. 80	Aceite/ hidróxido 2,0 ml	9	84	76	94	75	95	75	27	32	12
	Vacuna N° 4 Mont. 888 (Part. 1)	Aceite/ hidróxido 2,0 ml	9	93	89	93	71	98	92	32	27	19
	"	"	24	99	98	97	89	99	90	-	-	-
3	Vacuna N° 5 Mont. 80	Oleosa 5,0 ml Prod. Ind.	3	99	83	91	90	99	83	110	128	32
	Vacuna N° 6 Mont. 888 (Part. 2)	Oleosa 5,0 ml Prod. Ind.	3	90	86	82	85	97	85	128	200	128
4	Vacuna N° 7 Mont. 80	Oleosa 5,0 ml	2	77	76	80	69	95	88	-	-	-
	Vacuna N° 8 Mont. 888 (Part. 3)	Oleosa 5,0 ml	2	83	93	72	84	99	96	-	-	-
5	Vacuna N° 9 Mont. 80	Oleosa 5,0 ml Prod. Ind.	1	98	-	96	-	98	-	≥32	≥32	16
	Vacuna N° 10 Mont. 888 (Part. 3)	Oleosa 5,0 ml Prod. Ind.	1	99	-	99	-	98	-	≥32	≥32	≥32
6	Vacuna N° 11 Mont. 80	Oleosa 5,0 ml Prod. Ind.	1	98	98	94	93	99	97	16	≥32	≥32
	Vacuna N° 12 Mont. 888 (Part. 4)	Oleosa 5,0 ml Prod. Ind.	1	99	99	97	99	99	99	≥32	≥32	16

^a Expectativa porcentual de protección.

^b Dosis protectora cobayo 50%.

^c Días posvacunación.