

ARTÍCULOS ORIGINALES



Evaluación de dos formulaciones de vacuna antiaftosa oleosa bivalente (O1 campos y A24 cruzeiro), preparadas con dos sistemas diferentes de purificación y concentración.

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Néstor Mondragón¹, MV, MSc; Víctor Vera², MV, MSc, PhD; Guillermo Restrepo³, MV.

¹Maestría en Salud Animal, Universidad Nacional de Colombia.

²Director del Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Bogotá, Colombia.

³Gerente de Producción, Vecol S.A. Avenida El Dorado No. 82-93, Bogotá, Colombia.

nmondragon@gmail.com

(Recibido: 16 junio, 2006; aceptado: 9 octubre, 2006)

Resumen

El presente estudio evaluó el efecto de la masa antigénica y de diferentes métodos de purificación y concentración del virus de Fiebre Aftosa en la inducción de respuesta de anticuerpos específicos contra proteínas asociadas a la cápside (PC) y no asociadas a la cápside (PNC) en bovinos inmunizados con vacuna oleosa bivalente (A24 Cruzeiro y O1 Campos). Se formularon cuatro vacunas con diferente carga viral por dosis (Vacuna 1, 16.9; Vacuna 2, 8.8; Vacuna 3, 17.9; y Vacuna 4, 7.7 ug/dosis). Se inmunizaron 32 bovinos de 12 a 24 meses de edad (ocho por cada vacuna) a los días 0 y 30. La respuesta serológica contra PC fue evaluada con la prueba de ELISA CFL en términos de Expectativa de Protección Porcentual (EPP) al día 30 y la reactividad a PNC se determinó con el sistema ELISA-I 3ABC/EITB al día 60. Las vacunas formuladas con antígenos virales purificados con sales indujeron mayor EPP promedio tanto para virus A24 Cruzeiro (Vacuna 3, 89.8%; Vacuna 4, 83.4%) como O1 Campos (Vacuna 3, 92.6%; Vacuna 4, 82.2%) en comparación con los antígenos tratados con Polietilen Glicol cuyos resultados de EPP para virus A24 Cruzeiro fueron: Vacuna 1, 80.2%; Vacuna 2, 71.8%; y para virus O1 Campos: Vacuna 1, 78.1%; Vacuna 2, 73.7%. Adicionalmente, un bovino inoculado con la vacuna 3 fue positivo a PNC a los 60 días post vacunación (dpv). En este estudio se encontró que, dependiendo del proceso de concentración y purificación de antígenos, se pueden obtener resultados diferentes así: para los virus tratados con sales, con una baja (vacuna 4) y alta (vacuna 3) carga antigénica, es posible lograr muy buena inmunogenicidad, mientras que con alta carga antigénica se tiene mayor riesgo de inducir reactividad a PNC; y en el caso de los virus tratados con PEG se obtuvo buena protección, sin evidencia de interferencia en la determinación de los animales infectados cuando fueron evaluados por el sistema de detección de anticuerpos contra PNC.

Palabras clave: expectativa de protección porcentual (EPP), fiebre aftosa (FA), masa antigénica, proteínas asociadas a la cápside (PC), proteínas no asociadas a la cápside (PNC), virus de fiebre aftosa (VFA).

Introducción

La Fiebre Aftosa (FA), es una enfermedad del ganado causada por el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA), un miembro del género Aftovirus perteneciente a la familia Picornaviridae. Su erradicación constituye siempre una prioridad en las políticas de salud animal de los países donde la

enfermedad es endémica. En las regiones endémicas el mayor impacto económico de la enfermedad está asociado con reducción en la productividad, con impedimento para acceder a los mercados internacionales de ganado y con productos del ganado. En algunos países, la vacunación regular es una parte esencial de la estrategia de control de la enfermedad (18).

El genoma del VFA contiene un solo marco de lectura abierto (ORF) que da inicio a la síntesis de una poliproteína que es procesada por proteinasas virales en cuatro productos primarios de clivaje: Lpro que codifica una proteasa viral, P1-2A que codifica las PC y el polipéptido no estructural 2A, y P2 y P3 que codifican varios precursores y un total de ocho PNC (17). Cada una de las PNC está involucrada en múltiples funciones necesarias para la replicación del RNA genómico y formación de partículas en las células infectadas (30).

Las proteínas estructurales constituyen las partículas 146S (28) y varias subunidades incluyendo partículas naturalmente vacías (75S) y clusters pentaméricos de VP1, VP2 y VP3 (12S). Actualmente se acepta que la inmunogenicidad de las partículas 146S excede la de 75S y 12S por factores aproximados de 10 y 100 respectivamente (1,14). Se han realizado varios intentos para correlacionar la carga de antígeno, por ejemplo la cantidad de partícula 146s por dosis vacunal y el nivel de protección alcanzado (20,24, 29). Estudios realizados por Doel (10), revelaron que el límite operacional útil de partícula 146S por dosis estuvo entre 1.5 y 9.2 mg y que el incremento de la carga viral por encima de 9.2 mg por dosis, alcanza solamente un leve aumento en la potencia. Sin embargo, en todos los estudios anteriores el adyuvante utilizado, el proceso de producción de vacuna y el periodo de estudio, variaron.

La integridad de la partícula 146S es crucial para la eficacia de una vacuna y en algunos laboratorios productores es el parámetro clave para determinar la carga de antígeno dentro de la formulación. Sin embargo, dentro de la partícula 146S intacta la proteína VP1 puede estar parcialmente degradada por la acción de algunas enzimas proteolíticas y dependiendo de la cepa viral, esto puede reducir la habilidad de la partícula 146S de inducir anticuerpos protectivos (13).

Durante la replicación viral en el hospedero, se producen anticuerpos contra las proteínas capsidales (PC) y las no capsidales (PNC) (23). La detección de anticuerpos contra PNC es el método diagnóstico preferido para distinguir entre animales infectados de animales vacunados (7,21). Además, las pruebas

de detección de anticuerpos contra PNC tienen una ventaja sobre los que detectan anticuerpos contra PC y es que no son serotipo específicos (8).

Hasta el momento, las pruebas que detectan anticuerpos contra la poliproteína 3ABC han sido las más acertadas (9, 31). Las PNC se han producido en *E. coli* recombinante (5, 25) o en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes (32). Uno de los problemas asociados al uso de estos productos es la presencia de anticuerpos contra los antígenos utilizados como vectores de expresión, lo cual puede resultar en significativas reacciones no específicas, que hacen difícil la interpretación de los resultados de las pruebas (8).

Las vacunas actuales son preparaciones de concentrados de cultivos celulares infectados e inactivados químicamente. Previos estudios han demostrado que la aplicación repetida de vacunas de alta potencia producidas con antígenos purificados por ultracentrifugación (22), ultrafiltración (3, 22), cromatografía (11) o el uso de moléculas de condensación linear, tales como el PEG (16) no inducen anticuerpos contra PNC detectables por pruebas específicas. Idealmente las vacunas deben inducir anticuerpos en especial contra los antígenos capsidales y las preparaciones no deben contener o, en su defecto, contener bajas cantidades de PNC con el objeto de que dichas proteínas no interfieran en la interpretación de los resultados serológicos. Dependiendo del fabricante, la vacuna contiene diversas cantidades de PNC. El uso de vacunas libres de dichas proteínas es considerado como un requisito para la aprobación de la vacuna (19).

Teniendo en cuenta que las proyecciones del Programa Nacional de Erradicación de la Fiebre Aftosa, están dirigidas a lograr por etapas, la certificación de regiones libres con vacunación, hasta alcanzar esta condición para todo el país en el año 2006, se hace necesario evaluar e implementar métodos que permitan la fabricación de vacunas de alta potencia, que carezcan de PNC que puedan inducir anticuerpos detectados por pruebas específicas.

Con base en lo enunciado, este estudio tuvo como objetivo general evaluar el efecto de la

cantidad y de diferentes métodos de clarificación y concentración del virus de Fiebre Aftosa, en la inducción de respuesta de anticuerpos específicos contra proteínas capsidales y no capsidales, en bovinos inmunizados con vacuna oleosa bivalente (A24 Cruzeiro y O1 Campos).

Materiales y métodos

Animales experimentales

Se seleccionaron 34 bovinos entre los 12 y 24 meses de edad, negativos a anticuerpos contra el VFA (evaluados por ELISA competitiva en fase líquida) y negativos a anticuerpos contra proteínas no estructurales (evaluados por ELISA 3ABC). Durante el periodo experimental los animales se

mantuvieron en el Municipio de Gachetá, departamento de Cundinamarca (Colombia).

Diseño experimental

Treinta y dos bovinos fueron distribuidos aleatoriamente en dos lotes de 16 animales cada uno. Cada lote fue dividido en dos grupos (Lote A = grupos 1 y 2; Lote B = grupos 3 y 4) de ocho animales cada uno. Por cada lote de animales se dejó un control, para un total de 34 bovinos. Los animales del Lote A se inocularon con vacunas formuladas con virus purificado y concentrado por ultrafiltración (UF) y polietilén glicol (PEG) y los animales del Lote B con virus purificado y concentrado con ultrafiltración (UF) y tratamiento con sales (sales). La cantidad de antígeno A24 Cruzeiro y O1 Campos utilizada por dosis en cada uno de los grupos se observa en la tabla 1:

Tabla 1. Diseño experimental para la evaluación de dos formulaciones de vacuna antiaftosa.

	Lote			
	A (16 bovinos)		B (16 bovinos)	
GRUPO (vacuna)	1 (8 bovinos)	2 (8 bovinos)	3 (8 bovinos)	4 (8 bovinos)
A ₂₄ (µg / dosis)	7	3.5	7	3.5
O ₁ (µg / dosis)	11	5.5	11	5.5
Purificación	UF + PEG	UF + PEG	UF + sales	UF + sales

Esquema de vacunación

Los 32 animales se inocularon con 2 ml de vacuna vía intramuscular al día 0 y 30. Las muestras de sangre se tomaron los días 0 y 30 post-vacunación y 30 posterior a la revacunación para separar el suero y realizar las pruebas de ELISA competitiva en fase líquida (CFL) con el fin de medir la expectativa porcentual de protección (EPP) y el sistema I-ELISA 3ABC/EITB para determinar la reactividad a proteínas no estructurales (PNE).

Producción de antígenos

Las cepas del Virus de Fiebre Aftosa A24 Cruzeiro y O1 Campos replicadas cuatro veces en bovino y adaptadas a cultivo de células BHK 21 en monocapa por tres pasajes (virus A) y cinco pasajes

(virus O), provenientes del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) y suministradas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), se replicaron en cultivos industriales de células BHK 21 en suspensión. El cultivo se monitoreó cada hora para medición de pH y recuento celular. El virus fue cosechado entre las 8 y 11 horas posteriores a la infección una vez se detectó efecto citopático (ECP) en el 97% de las células. Al finalizar el cultivo se tomaron muestras para Control de Esterilidad (CE) y Fijación de Complemento (FC).

Clarificación e inactivación de virus

Cada cosecha viral se trató con cloroformo (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ) a una concentración final de 0.5% y posteriormente se pasó a través de una centrifuga de flujo continuo a 6000 r.p.m. con el fin de eliminar detritus celulares.

El proceso de inactivación se realizó con doble adición de inactivante BEI a una concentración de 3 mM durante 24 horas a 26°C (2,4,12). Una vez terminado el proceso, se tomaron muestras para titulación viral por FC y para realizar tres pases ciegos seriados en monocapas de células BHK 21 como prueba de inocuidad de acuerdo con los requerimientos de vacunas decretado por la OIE (26). La concentración de virus fue estimada de acuerdo con la técnica de cuantificación de partícula 146s descrita por Doel y Collen (15).

Concentración y purificación de cosechas virales inactivadas

La cosecha viral industrial fue concentrada con ultrafiltro de 300K en cartucho (Millipore Corporation, Bedford, MA), hasta alcanzar un factor de concentración de 2.9 X. De cada uno de los antígenos se tomaron dos muestras una de 2 litros y otra de 5 litros. A 1600 ml de la muestra 1, se le adicionó PEG 8000 (Dow Chemical Company, Midland, MI) a una concentración final del 7% y se dejó sedimentar hasta lograr un factor de concentración de 35 X con relación a la inicial. El sedimento se resuspendió en una solución tamponada teniendo en cuenta la concentración necesaria para la formulación de las vacunas (véase Tabla 1). La muestra 2 fue necesario llevarla a un factor de concentración mayor con un ultrafiltro de 300K en cassette (Millipore Corporation, Bedford, MA), y se le realizó el tratamiento con sales de la siguiente manera: se ajustó el pH hasta 8.6 con hidróxido de potasio (Merck KGaA, Darmstadt), el pH se estabilizó con fosfato de sodio (Merck KGaA, Darmstadt), y luego se le adicionó cloruro de calcio (Merck KGaA, Darmstadt) lentamente sin dejar que el pH descendiera de 8.4. La muestra se dejó en agitación por 24 horas y finalmente se dejó sedimentar. El sobrenadante fue utilizado en la formulación de la vacuna de acuerdo con la concentración indicada.

Formulación de vacunas de agua en aceite (w/o)

El volumen de cada dosis vacunal fue de 2 ml. Las vacunas bivalentes se formularon para cada contenido de antígeno (véase Tabla 1, grupos 1 y

2) y se emulsificaron en una proporción de 40:60 (v/v). El 40% de adyuvante incompleto de Freund preparado con aceite mineral y un emulsificante y el 60% de los antígenos en solución acuosa. Las emulsiones se realizaron pasando la mezcla de antígenos - óleo a través de un emulsificador de flujo continuo (Silverson, Waterside, CB).

Titulación de anticuerpos contra proteínas capsidales del virus de fiebre aftosa (ELISA CFL)

El ensayo inmunoenzimático competitivo en fase líquida se realizó siguiendo los lineamientos estandarizados por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (27), en el cual la correlación del título promedio de anticuerpos con el resultado de protección contra el desafío se expresa como EPP. Este método es utilizado por el ICA como prueba de potencia para vacunas comerciales en Colombia.

Detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del virus de fiebre aftosa. Sistema I-ELISA / EITB

El sistema utilizado para demostrar la ausencia de dichos anticuerpos está conformado por una prueba de ELISA indirecto (I-ELISA) como "screening" que utiliza la poliproteína no capsidal del VFA 3ABC, seguido de la confirmación de las muestras sospechosas o reactivas mediante un ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB), empleando como sondas serológicas las proteínas no capsidales del VFA 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC, obtenidas por métodos de recombinación genética (6). Se realizó la técnica propuesta por Bergmann *et al* (6).

Análisis estadístico

Los cálculos se realizaron utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute INC. SAS/Stat., 1988). La comparación entre el nivel de anticuerpos (en términos de expectativa porcentual de protección individual) inducidos por las diferentes formulaciones de vacunas se

realizaron por medio del cálculo de análisis de varianza, con el fin de determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Los resultados de ELISA 3ABC / EITB se expresaron en número de animales positivos.

Resultados

Cultivos virales, clarificación e inactivación de virus

A los cultivos virales producidos industrialmente se les realizó las pruebas de esterilidad e inocuidad cumpliendo los requisitos dictados por la OIE (2004), con el fin de utilizarlos en la formulación de las vacunas .

Purificación y concentración de antígenos

Durante el proceso de concentración y purificación se observó pérdida de antígeno al tratarlo con sales ya que se encontró un 10% menos de los virus A/1841-42 y un 13% menos para los virus O/2285-86 (datos no incluidos en este documento) al ser evaluados por medio de la prueba de determinación de partícula 146S.

Prueba de campo

Los resultados de la determinación de partícula 146S en las cuatro vacunas estuvieron de acuerdo con la formulación inicial, es decir que las vacunas 1 y 3 tenían 16.9 y 17.9 ug/dosis, y las vacunas 2 y 4 tenían 8.8 y 7.7 ug/dosis, respectivamente. Sin embargo, a pesar de tener una cantidad de antígeno por dosis similar, la EPP a los 30 dpv fue mayor en los antígenos clarificados con sales que fueron utilizados en las vacunas 3 (89.8 y 92.6%) y 4 (83.4 y 82.2%) en comparación con las vacunas 1 (80.2 y 78.1%) y 2 (71.8 y 73.7%) para virus A24 Cruzeiro y O1 Campos respectivamente, como se observa en la tabla 2.

En relación con los resultados de ELISA-I 3ABC a los 30 dpv, un animal (bovino No. 28) perteneciente al grupo Vacuna 3 mostró un título positivo (1050); sin embargo, al realizar la prueba confirmatoria de EITB el resultado fue negativo.

Tabla 2. Resultados de la estadística descriptiva de la Expectativa de Protección Porcentual (EPP) para virus A24 Cruzeiro y O1 Campos a los 30 dpv.

Grupo	Parámetro estadístico	O1 Campos	A24 Cruzeiro
Vacuna 1	Promedio	78.09	80.23
	Desviación Estándar	17.95	15.56
	Coeficiente Variación	22.99	19.39
Vacuna 2	Promedio	73.58	71.76
	Desviación Estándar	23.81	31.24
	Coeficiente Variación	32.36	43.53
Vacuna 3	Promedio	92.60	89.79
	Desviación Estándar	3.97	6.06
	Coeficiente Variación	4.28	6.75
Vacuna 4	Promedio	82.21	83.43
	Desviación Estándar	28.21	23.76
	Coeficiente Variación	34.32	28.47

A los 30 días posteriores a la revacunación, la EPP promedio para virus O1 Campos de los cuatro grupos experimentales fue del 100% y para virus A24 Cruzeiro superior a 97.3 como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados del promedio y desviación estándar de la Expectativa de Protección Porcentual (EPP) para virus A24 Cruzeiro y O1 Campos a los 30 posteriores a la revacunación.

Grupo	Parámetro estadístico	O1 Campos	A24 Cruzeiro
Vacuna 1	Promedio	100.0	97.3
	Desviación Estándar	0.0	8.2
Vacuna 2	Promedio	100.0	99.5
	Desviación Estándar	0.0	1.1
Vacuna 3	Promedio	100.0	98.3
	Desviación Estándar	0.0	5.0
Vacuna 4	Promedio	100.0	98.9
	Desviación Estándar	0.0	1.7

Al realizar la prueba de ELISA-I 3ABC a los 30 días posteriores a la revacunación, dos bovinos resultaron positivos (No. 2 y No. 19) y uno (No. 28) al igual que a los 30 dpv se mantuvo como indeterminado (véase Tabla 4).

Tabla 4. Títulos de los bovinos positivos o indeterminados en resultados de ELISA-I 3ABC a los 30 días posteriores a la revacunación.

Grupo	Bovino	Título	Resultado
Vacuna 1	2	1.074	Positivo
Vacuna 3	19	1.926	Positivo
Vacuna 4	28	0.972	Indeterminado

Al realizar la prueba de EITB, el bovino No. 19 se confirmó como positivo, el cual perteneció al grupo inoculado con la Vacuna 3.

Discusión

En este estudio se evaluó por primera vez en Colombia la respuesta de anticuerpos contra las P) del VFA cepas A24 Cruzeiro y O1 Campos medidos en términos de EPP por medio de la prueba de ELISA CFL y anticuerpos contra PNC con el sistema ELISA-I 3ABC / EITB, en bovinos vacunados con virus en diferentes concentraciones y obtenidos por dos métodos de concentración y purificación viral: 1) ultrafiltración seguido de concentración y purificación parcial con PEG; y 2) ultrafiltración seguido de purificación parcial con Sales.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los promedios de la EPP entre los diferentes grupos experimentales, se observaron tendencias sobre las cuales se discute a continuación.

Durante el tratamiento con Sales de los antígenos utilizados para las vacunas 3 y 4 se observó una caída en el contenido de la partícula 146S. Para explicar esta pérdida, se han propuesto dos alternativas: la primera es que parte del virus puede ser precipitado por las sales y la segunda sugiere una degradación de partículas virales inestables de tal manera que en ambos casos no pueden ser determinadas por el método de Partícula 146S; sin embargo, hasta el momento no se tiene certeza del porqué se presenta este fenómeno de reducción de masa antigénica durante el proceso.

En la presente investigación se observó para los antígenos concentrados con PEG (vacunas 1 y 2) que al duplicar la cantidad de antígeno por dosis la EPP promedio para virus A24 Cruzeiro incrementó 8.5 puntos y para virus O1 Campos 4.4 puntos. De manera similar ocurrió con los virus tratados con sales (vacunas 3 y 4) con un incremento de 6.4 puntos para el virus A24 Cruzeiro y de 10.4 puntos para el virus O1 Campos. Lo anterior indica que las vacunas formuladas con mayor carga viral inducen una mejor EPP promedio a los 30 dpv en

comparación con las vacunas formuladas con menor carga viral. Sin embargo, teniendo en cuenta que el incremento en la EPP fluctuó entre 4.4 y 10.4 puntos es importante considerar que para la elección de un método seguro de producción de vacuna contra la FA debe existir un equilibrio entre una buena EPP y la ausencia de reactividad a PNC ya que las vacunas con alta carga antigénica pueden también contener PNC concentradas que induzcan anticuerpos, que interfieran con las pruebas actualmente utilizadas para evaluar la actividad viral en campo.

En el presente estudio es posible que la integridad estructural de algunos epítopes de los antígenos utilizados en la formulación de las vacunas 1 y 2 se hayan alterado durante el proceso de concentración con PEG. Estos resultados sugieren que aunque la carga viral expresada en términos de partícula 146S es un factor importante que influye en la potencia de la vacuna, también es fundamental el mantenimiento de la integridad estructural y conformacional de los epítopes virales.

Una de los posibles factores que puede estar influenciando la respuesta de anticuerpos contra PC evaluada como EPP es que, en el tratamiento con PEG los antígenos pierden solubilidad y por lo tanto se precipitan; sin embargo, en el caso de la purificación con sales, el antígeno se mantiene soluble y aparentemente solo una parte se precipita o se degrada. Teniendo en cuenta que en los antígenos concentrados con PEG se utiliza el precipitado y en el caso de los antígenos clarificados con sales se utiliza el sobrenadante, es posible que la forma de presentación del antígeno en forma particulada o soluble, respectivamente, esté influenciando dicha respuesta en los bovinos.

Otra posibilidad es que el porcentaje de PEG utilizado para concentrar los antígenos de las vacunas 1 y 2 en la fase acuosa puede ser un factor clave que afecte en algún grado la formación de la emulsión agua en aceite (W/O) y por lo tanto afecte la inmunogenicidad de dichas vacunas (Ganne, comunicación personal, citado por Iyer *et al* (20)) lo cual probablemente sea consecuencia de inestabilidad en la emulsión.

En lo que respecta a la reactividad a PNC, solamente un bovino perteneciente al grupo inmunizado con la vacuna 3 dió como positivo al evaluar el suero a los 30 días posteriores a la revacunación por medio del sistema ELISA-I / EITB. Es importante saber que si en la prueba de reactividad a PNC realizada por el ente regulador nacional (ICA) uno o más bovinos de 30 dan resultado positivo, no se aprueba el lote comercial. Lo anterior sugiere que aunque la vacuna 3 que mostró la mayor EPP promedio, tiene suficientes PNC que indujeron una respuesta de anticuerpos detectables por pruebas serológicas, lo cual puede interferir en los resultados de vigilancia epidemiológica que se realizan a nivel nacional para mantener o declarar zonas libres de aftosa con vacunación.

Desde el punto de vista del Plan de Erradicación de la Fiebre Aftosa, las vacunas 1 y 4 serían las más indicadas para ser utilizadas en las campañas de vacunación masiva ya que indujeron una EPP promedio a los 30 d.p.v. de 80.2 y 83.4% para virus A24 Cruzeiro y de 78.1 y 82.2% para el virus O1 Campos, respectivamente. Sin embargo, desde el punto de vista de producción industrial, la vacuna que muestra mayor potencial es la 4 ya que aparte de inducir una buena EPP promedio y no inducir reactividad a PNC, es una vacuna que tiene la mitad de la carga viral en comparación con la vacuna 1, lo cual redundaría en menores costos de producción y es probable que debido a su baja carga antigénica (7.7 ug/dosis) también tenga menor cantidad de PNC disminuyendo de esta manera la probabilidad de inducir respuesta de anticuerpos contra dichas proteínas.

De acuerdo con los resultados, los dos procesos de concentración y clarificación (Ultrafiltración + PEG y Ultrafiltración + Sales) evaluados en este estudio presentan unos aspectos en pro y otros en contra. El tratamiento con PEG es más fácil de realizar ya que demanda tres únicos pasos que son la esterilización del PEG, la mezcla con el antígeno a concentrar, la puesta a sedimentar y posteriormente el retiro del sobrenadante. Mientras que para el tratamiento con Sales es necesario esterilizar las soluciones, adicionarlas gradualmente durante varias horas, dejar en

agitación y posteriormente dejar sedimentar para finalizar con la eliminación del precipitado. Aparte de demandar mayor mano de obra el tratamiento con sales y teniendo en cuenta que el VFA es muy sensible al pH, el hecho de tener que manipular las partículas virales incurre en mayor riesgo de contaminación o degradación de la partícula 146S. En comparación con el tratamiento con Sales, el PEG tiene un mayor costo y al parecer afecta en algún grado la inmunogenicidad de la partícula 146S como se observa en los resultados de EPP promedio a los 30 dpv.

Los resultados de la EPP para virus O1 Campos y A24 Cruzeiro a los 30 días después de la revacunación, corroboran lo reportado por varios autores siendo la respuesta al refuerzo muy buena para el virus de Fiebre Aftosa ya que para A24 Cruzeiro estuvo entre 97.3 y 99.5% y para O1 Campos fue de 100% en todos los experimentos.

De este estudio preliminar se puede inferir que dependiendo del proceso de concentración y purificación de antígenos para producción de VA, con una baja carga antigénica se puede lograr una buena inmunogenicidad expresada en términos de EPP y aún con alta carga antigénica por dosis, no interfiere en la determinación de los animales infectados cuando son evaluados por el sistema de detección de anticuerpos contra PNC que se utiliza actualmente en el país.

Es importante recalcar que se requieren más estudios con un mayor número de animales por grupo experimental con el fin de evaluar la repetitibilidad de los resultados y así poder determinar cual tipo de tratamiento y formulación es el más adecuado para utilizar en producción industrial, teniendo como premisa la fabricación de vacunas de alta calidad que induzcan excelente EPP y que el contenido de PNC sea mínimo o nulo de tal manera que no promuevan la producción de anticuerpos que interfieran con la evaluación de la actividad viral en campo.

Agradecimientos:

Los autores expresan agradecimientos a la Empresa Colombiana de productos Veterinarios S.A. Vecol S.A. por la financiación del presente trabajo de investigación.

Summary

Evaluation of foot and mouth disease oil bivalent vaccines (O1 Campos and A24 Cruzeiro) produced by different purification and concentration methods.

This project evaluated two methods for viral concentration and purification and the effect of antigenic mass of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) in the capacity of bivalent vaccine products (A24 Cruzeiro y O1 Campos) to induce antibodies against proteins associated to the capsid (CP) and proteins non associated to the capsid (NCP) of the virus, in cattle. Groups of 8 bovines (aged 12 to 24 months) were immunized on day 0 and 30 with one of four vaccines that were formulated with a different viral load (vaccine 1, 16.9; vaccine 2, 8.8; vaccine 3, 17.9 and vaccine 4, 7.7 ug/dose). The antibody response against CP detected by ELISA CF_L was evaluated on days 30 and 60; the reactivity against NCP was measured by ELISA-3ABC/EITB. Antigens treated with salts induced higher reactivity against CP compared those treated with PEG. One of the animals vaccinated with salt treated antigens was positive to NCP. We found that different results could be obtained depending of the process for antigen concentration and purification: virus treated with salts, with either a high or a low antigenic load (vaccines 3 and 4) induced a strong immunity, but with a high antigenic load there is a major risk of inducing reactivity against NCP. In the PEG treatment (vaccines 1 and 2), we obtained good protection, without interference in the assessment of the infected animals when they were evaluated by ELISA-3ABC-I/EITB for epidemiological purposes.

Key words: *antigenic mass, Food and Mouth Disease Virus (FMDV), perceptual expected protection (EPP), proteins associated to the capsid (PC), proteins non associated to the capsid (PNC),*

Referencias

- Aggarwal N, Barnett PV. Antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV): an analysis of the specificities of anti-FMDV antibodies after vaccination of naturally susceptible host species. *J Gen Virol* 2002; 83 : 775-782.
- Bahnemann HG. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* 1990; 8: 299-303.
- Barteling SJ. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev Sci Tech* 2002; 12: 577-588.
- Barteling SJ, Vreeswijk J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 1991; 9: 75-88.
- Bergmann IE, Astudillo V, Malirat V, Neitzert E. Serodiagnostic strategy for estimation of foot-and-mouth disease viral activity through highly sensitive immunoassays using bioengineered nonstructural proteins. *Vet Q* 1998; 20 Suppl 2:S6-9.
- Bergmann IE, Malirat V, Neitzert E, Beck E, Panizzutti N, et al. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch Virol* 2000; 145: 473-489.
- Bronsvort BM, Sorensen KJ, Anderson J, Corteyn A, Tanya VN, et al. Comparison of two 3ABC enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of multiple-serotype foot-and-mouth disease in a cattle population in an area of endemicity. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2108-2114.
- Clavijo A, Wright P, Kitching P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet J* 2004; 167: 9-22.
- De Diego M, Brocchi E, Mackay D, De Simone F. The nonstructural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol* 1997; 142: 2021-2033.
- Doel TR. Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 1999; 17: 1767-1771
- Doel TR. Repeated administration of maximum payload emergency vaccines made from inactivated purified antigen concentrates do not induce significant titres of antibodies against non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. In Report of a Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease –EUFMD-; Rome: Island of Moen; 2001. p. 88-92.
- Doel TR. FMD vaccines. *Virus Res* 2003; 91: 81-99.
- Doel TR. Natural and vaccine induced immunity to FMD. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 288: 103-131.

14. Doel TR, Chong WKT. Comparative immunogenicity of 146S, 75S, and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol* 1982; 73: 185–191.
15. Doel TR, Collen T. Quantitative assessment of 146S particles of FMDV in preparation destined for vaccines. *J Biol Stand* 1982; 10: 69–81.
16. Espinoza AM, Maradei E, Mattion N, Cadenazzi G, Maddonni G, et al. Foot-and-mouth disease polyvalent oil vaccines inoculated repeatedly in cattle do not induce detectable antibodies to non-structural proteins when evaluated by various assays. *Vaccine* 2004; 23: 69–77.
17. Gradi A, Foeger N, Strong R, Svitkin YV, Sonenberg N, et al. Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro. *J Virol* 2004; 78: 3271–3278.
18. Höhlich BJ, Wiesmüller KH, Haas B, Gerner W, Correa R, et al. Induction of an antigen-specific immune response and partial protection of cattle against challenge infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV) after lipopeptide vaccination with FMDV-specific B-cell epitopes. *J Gen Virol* 2003; 84: 3315–3324.
19. ICA. Instituto Colombiano Agropecuario 2005. Resolución No. 001166 [15 de Abril de 2005] URL: <http://www.ica.gov.co/>
20. Iyer AV, Ghosh S, Singh SN, Deshmukh RA. Evaluation of three 'ready to formulate' oil adjuvants for foot-and-mouth disease vaccine production. *Vaccine* 2001; 19: 1097–1105.
21. Kweon CH, Ko YJ, Kim WI, Lee SY, Nah JJ, et al. Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods. *Vaccine* 2003; 21: 1409–1414.
22. Lubroth J, Lopez A, Ramalho AK, Meyer RF, Brown F, et al. Cattle response to foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins as antigens within vaccines produced using different concentrations. *Vet Q* 1998; 20 Suppl 2: S13–17.
23. Mackay DKJ, Forsyth MA, Davies PR, Berlinzani A, Belsham GJ, et al. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-capsid proteins in ELISA. *Vaccine* 1998; 16: 446–459.
24. Morgan DO, Bachrach HL, McKercher PD. Immunogenicity of nanogram to milligram quantities of inactivated foot-and-mouth disease virus I Relative virus-neutralizing potency of guinea pig sera. *Appl Microbiol* 1969; 17: 441–445.
25. Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the Aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infection. *Virology* 1991; 184: 799–804.
26. OIE. Organización Internacional de Epizootias. Foot and Mouth Disease Part 2, Sección 2.1, Chapter 2.1.1. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2004; URL: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summary.htm
27. PANAF-TOSA–OPS/OMS. Elisa Competición fase líquida (ELISA-CFL) y su uso en control de potencia de vacunas antiaftosa. VII seminario internacional de control de vacuna antiaftosa. Rio de Janeiro, 2001. P. 13 - 20.
28. Patil PK, Bayry J, Nair SP, Gopalakrishna S, Sajjanar CM, et al. Early antibody responses of cattle for foot-and-mouth disease quadrivalent double oil emulsion vaccine. *Vet Microbiol* 2002; 87: 103–109.
29. Pay TWF, Hingley PJ. Correlation of 146S antigen dose the serum neutralizing antibody response and the level of protection induced in cattle by foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 1987; 5: 60–64.
30. Porter AG. Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol* 1993; 67: 6917–6921.
31. Rodriguez A, Dopazo J, Saiz JC, Sobrino F. Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine. *Arch Virol* 1994; 136: 123–131.
32. Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES, Salt JS, Nqindi J, et al. Differentiation of infection from vaccination in foot and mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB, and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol* 1998; 143: 1461–1476.