

Importancia de la pureza de las vacunas antiaftosa en la interpretación de los estudios serológicos

Este artículo (n.º 24092015-00060-ES) ha sido revisado por expertos, aceptado y sometido a una revisión lingüística aprobada por los autores. Todavía no se ha finalizado el diseño para la impresión. Será publicado en diciembre de 2015, en el volumen 34 (3) de la *Revista científica y técnica*.

E. Smitsaart ^{(1)*}, A.M. Espinoza ⁽¹⁾, E. Maradei ⁽²⁾, B. Cosentino ⁽³⁾,
M. Guinzburg ⁽¹⁾, G. Madonni ⁽²⁾, G. Cadenazzi ⁽²⁾, R. Bottini ⁽³⁾,
J. Filippi ⁽¹⁾ & I. Bergmann ⁽⁴⁾

(1) Biogénesis Bagó S.A., Ruta Panamericana Km. 38,5 (B1619IEA),
Garín, Provincia de Buenos Aires, Argentina

(2) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
(SENASA), Dirección de Laboratorios, Fleming 1653, (1640)
Martínez, Provincia de Buenos Aires, Argentina

(3) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
(SENASA), Dirección Nacional de Sanidad Animal (DNSA), Paseo
Colón 367, (1063) Buenos Aires, Argentina

(4) Centro de Virología Animal (CEVAN), Instituto de Ciencia y
Tecnología Dr. César Milstein, CONICET, Saladillo 2468, (1440)
Buenos Aires, Argentina

*Autor encargado de la correspondencia:

eliana.smitsaart@biogenesisbago.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar si el grado de pureza alcanzado en las vacunas de uso convencional contra el virus de la fiebre aftosa en Argentina interfiere con la interpretación de los estudios seroepidemiológicos destinados a confirmar la ausencia de actividad vírica, que se realizan como respaldo al reconocimiento de zonas libres con vacunación.

La evaluación de 168 series de vacuna para comercializar en Argentina (2006-2012) y sometidas a control oficial en bovinos, así como las vacunaciones repetidas con vacunas de alta concentración antigénica en bovinos y en otras especies demostraron la no inducción de anticuerpos contra proteínas no estructurales (PNE).

Los resultados demuestran claramente que vacunas con potencia satisfactoria no inducen una respuesta contra PNE, ni siquiera forzando la respuesta inmunitaria mediante dosis más concentradas con un número alto de valencias y protocolos de revacunación a intervalos más cortos que los usados durante las campañas de vacunación. Estos resultados confirman que las vacunas aplicadas en los planes de vacunación sistemática poseen un grado de purificación antigénica compatible con las necesidades observadas a partir de los muestreos seroepidemiológicos. Asimismo, estudios serológicos ejecutados por el Servicio Veterinario Oficial (SVO) argentino (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria [SENASA]) en 2006-2011, con más de 23 000 sueros/año de bovinos incluidos en el plan de vacunación y destinados a confirmar la ausencia de circulación viral, revelaron un porcentaje promedio de resultados reactivos del 0,05, compatible con la especificidad de las pruebas.

En conclusión, las vacunas producidas por métodos convencionales y con comprobada potencia disponibles en Argentina están suficientemente bien purificadas, de forma tal que no interfieren con la interpretación de los muestreos seroepidemiológicos que se realizan como respaldo al reconocimiento de zonas libres de FA con vacunación.

Palabras clave

Actividad viral – Estatus sanitario – Fiebre aftosa – Estudios serológicos – Proteínas no estructurales – Vacuna – Vacunas DIVA – Vacunas purificadas.

Introducción

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad aguda y altamente contagiosa que afecta a animales de pezuña hendida. Es la de mayor importancia económica del ganado por el impacto que ejerce en el comercio internacional de animales y de sus productos.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) establece en sus guías el uso de medidas de control para que los países o zonas obtengan el reconocimiento de libre de FA con o sin vacunación, esencial para acceder a los mercados y colocar los productos y subproductos de las especies susceptibles a la enfermedad. Para obtener o recuperar el estatus de libre de enfermedad después de la aparición de brotes, los servicios veterinarios de cada país deben demostrar la efectividad de los programas de control y/o erradicación mediante una vigilancia clínica, virológica y serológica que asegure la ausencia de casos clínicos y de infección o circulación viral asintomática, esta última particularmente cuando se aplica la vacunación.

En las campañas de seguimiento, control y erradicación de la FA que se aplican a zonas o países que practican la vacunación sin aparición de casos clínicos, los métodos serológicos que permiten detectar anticuerpos contra las proteínas estructurales del virus no son de utilidad, ya que detectan tanto los anticuerpos que se producen en los animales después de la infección como después de la vacunación. Desde hace más de una década, se cuenta con indicadores serológicos que permiten la detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales (PNE) (1, 2, 3, 4) y, como se ha documentado ampliamente, la presencia de estos anticuerpos está asociada a la replicación viral en la población, independientemente de si los animales están o no vacunados. Consecuentemente, las pruebas que determinan la presencia de anticuerpos contra dichas proteínas han sido de gran utilidad para identificar zonas libres de FA (5), y así respaldar el reconocimiento internacional de zonas libres con vacunación. En este sentido, es esencial que las vacunas que se utilizan en las campañas de vacunación o en la vacunación de

emergencia cumplan con el requisito de pureza en cuanto a su contenido en PNE y que aseguren la no inducción de anticuerpos contra estas proteínas en los animales vacunados.

El uso de vacunas a través de la vacunación sistemática de bovinos y la vacunación de emergencia de todas las especies susceptibles ha demostrado ser una herramienta eficaz para el control de la enfermedad (6, 7) y ha permitido reducir significativamente la circulación viral hasta niveles indetectables. En Argentina, el programa de control y erradicación de la FA del Servicio Veterinario Oficial (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (SVO-SENASA) establece la vacunación sistemática de los bovinos de la zona libre con vacunación, cada seis meses en los menores de dos años y anualmente en los mayores de dos años. Estos períodos pueden modificarse según la situación epidemiológica y el riesgo. No se incluye en el programa la vacunación de cerdos, ovinos ni otras especies, excepto en las situaciones de riesgo que determine el SVO-SENASA.

En la producción de antígenos virales y de las vacunas inactivadas contra la FA, ha habido mejoras significativas de los sustratos utilizados para replicar el virus, de los agentes inactivantes, de los procedimientos de purificación de antígenos (8, 9) y de la calidad de los adyuvantes empleados (10). En ese sentido, se ha observado que vacunas en cuyo proceso productivo se incluyen etapas de purificación no inducen anticuerpos contra PNE, ni siquiera después de varias vacunaciones y/o con dosis doble y de alta concentración antigénica (2, 9, 11, 12).

Estos resultados hacen de estas vacunas unos productos de elección para su aplicación en la vacunación sistemática o como vacuna de emergencia de alta potencia, ya que han cumplido con los requisitos de pureza, inocuidad, potencia y eficacia que se establecen en la normativa del país en que son comercializados y debido a que han sido extensamente aplicadas en la población animal susceptible.

En el presente trabajo se presentan datos sobre potencia y sobre las garantías de pureza en términos de PNE de las vacunas inactivadas

que se comercializan en Sudamérica. La estrategia utilizada fue la determinación de anticuerpos contra PNE con distintos esquemas de vacunación y revacunación de distintos hospedadores y en condiciones controladas. Asimismo, se presentan los resultados de los controles de potencia y de determinación de anticuerpos contra PNE obtenidos en el control oficial de las vacunas y datos de los estudios serológicos realizados en bovinos incluidos en el plan de vacunación sistemática de Argentina. Se demuestra que las vacunas convencionales utilizadas en Argentina con potencia satisfactoria no presentan interferencia con los estudios serológicos destinados a determinar la actividad viral, que se realizan como respaldo al reconocimiento/mantenimiento de un estatus sanitario de ausencia de FA con vacunación.

Materiales y métodos

Vacunas

Las vacunas fueron producidas, siguiendo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), por Biogénesis Bagó (Buenos Aires, Argentina). Los antígenos (O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001-A2001-, A Argentina 2000-A2000- y C3 Indaial) se produjeron en células BHK21 en suspensión, inactivados con etilenimina binaria, se concentraron, y se purificaron mediante polietilenglicol. Las vacunas se formularon como emulsión simple de agua-en-aceite con concentraciones antigénicas superiores a los 30 µg/dosis, en el caso de las vacunas polivalentes, y superiores a los 15 µg/dosis en el caso de las monovalentes. Estas concentraciones se consideran altas en relación a las documentadas por fabricantes europeos (13). Se utilizaron vacunas trivalentes a razón de 5 ml/dosis y vacunas tetravalentes o pentavalentes (Tabla I) y monovalentes (O1 Campos), a razón de 2 ml/dosis. Las vacunas comerciales presentadas a control oficial en los años 2006 a 2012 fueron vacunas tetravalentes (O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001 y C3 Indaial). Fueron controladas por el laboratorio fabricante y sometidas a un control oficial del SVO-SENASA para determinar la inocuidad, la pureza, la seguridad y la potencia, y las mismas cumplieron satisfactoriamente los requisitos de

dichos controles según la normativa vigente en Argentina (en el caso de las vacunas de 2 ml/dosis, 14, 15) y la normativa vigente en Brasil (en el caso de las vacunas de 5 ml/dosis).

Las vacunas de los experimentos 2, 3 y 4 fueron utilizadas comercialmente, mientras que la del experimento 1 fue una vacuna experimental. Para el ganado porcino se usó una vacuna monovalente comercial de exportación.

En las campañas de vacunación de Argentina se han utilizado vacunas de varios fabricantes. Durante el período 2006-2011 más del 88% de las vacunas aplicadas procedieron del laboratorio Biogénesis Bagó.

Ensayos de vacunaciones repetidas en bovinos

Estos ensayos se realizaron en condiciones controladas con bovinos en el Campo Experimental del SVO-SENASA, en Argentina. Los animales utilizados (N=87) fueron de raza Hereford, tenían de 18 a 24 meses de edad y estaban libres de anticuerpos contra la FA; procedían de la región patagónica de Argentina (zona sin vacunación contra la FA, Paralelo 42° Sur), y estaban desparasitados y en buenas condiciones sanitarias. En el Experimento 1-a se aplicó una dosis simple (2 ml) y en el Experimento 1-b una dosis doble (4 ml), siguiendo esquemas de tres administraciones a intervalos de 30 días. En el Experimento 2, así como en el 3 y en el 4, se administraron, respectivamente, 4 y 3 dosis simples de vacuna, a intervalos que variaron entre los 30 y los 90 días. En la Tabla I se describe el diseño de cada uno de los experimentos de vacunación con dosis repetidas, y se especifica el número de bovinos utilizados en cada ensayo, las cepas integrantes y el volumen por dosis de cada vacuna, el número de vacunaciones aplicadas y los momentos de vacunación. Las extracciones de sangre para la obtención de suero se realizaron el día 0 del ensayo y entre 30 y 60 días después de cada vacunación. En cada ensayo se utilizaron dos bovinos sin vacunar como control, a los cuales se extrajo sangre en los mismos momentos que a los vacunados.

Ensayos de vacunaciones repetidas en porcinos y ovinos

Se utilizaron cerdos (N=15) de raza Duroc Jersey, de dos meses de edad, sin vacunaciones previas contra la FA y previamente desparasitados. Los ovinos utilizados (N=23) fueron de raza Merino, tenían 12 a 48 meses de edad, no se habían vacunado previamente contra la FA y estaban desparasitados. Estos ensayos se realizaron en condiciones controladas en establecimientos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Estos porcinos y ovinos recibieron dos vacunaciones (la vacuna monovalente O1 Campos en el caso de los porcinos, y la vacuna tetravalente O1 Campos, A2001, A24 Cruzeiro y A2000 en el caso de los ovinos) con 30 días de intervalo, y se realizaron extracciones de sangre cada 30 días, hasta los 60 días después de la primovacunación (dpv).

Determinación de anticuerpos contra proteínas estructurales

El enzoinmunoanálisis en fase líquida (LP-ELISA) se utilizó para la detección de anticuerpos específicos contra las cepas de virus vacunales de las vacunas mencionadas. Los títulos obtenidos mediante LP-ELISA se transformaron en valores de expectativa porcentual de protección (EPP) para cada una de las cepas vacunales, según las tablas de correlación entre los títulos de LP-ELISA y la protección frente al virus de desafío (16). El control oficial de la potencia que se realiza en las series consiste en la determinación de anticuerpos por esta técnica en los sueros de un grupo de 17 bovinos 60 dpv (SENASA, Argentina, 14, 15). Para la aprobación de cada lote, el valor de EPP debe ser igual o superior al 75%. Los sueros obtenidos 28 a 30 dpv con vacunas trivalentes de 5 ml/dosis fueron también evaluados mediante un LP-ELISA de competición suministrado por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFPA), y los resultados se extrapolaron en la curva de EPP correspondiente (17).

Detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales

La determinación de anticuerpos contra proteínas no estructurales (PNE) se realizó en todas las muestras de bovinos mediante una prueba tamiz que consiste en un kit de ELISA para la detección de la proteína no capsidal 3ABC del virus de la FA (I-ELISA 3ABC), denominado «NCPanaftosa-Prueba Tamiz», seguida de una prueba confirmatoria que se realiza con el kit denominado «NCPanaftosa - Prueba Confirmatoria» (con el que se lleva a cabo una EITB – enzimoimmunotransferencia-) (4, 18); el conjunto de ambas pruebas se denomina sistema I-ELISA 3ABC Panaftosa/EITB. Los resultados se expresaron como T/C, que es el cociente entre el valor de absorbancia obtenido con suero problema (T) y el valor de absorbancia obtenido con suero control (C). Se consideraron sueros no reactivos aquellos que dieron valores de T/C <0,8, dudosos los que dieron valores de T/C entre 0,8 y <1, y reactivos los que dieron valores de T/C ≥ 1 . Los sueros con resultados en estas dos últimas categorías fueron confirmados por EITB.

Los sueros de los ensayos de las vacunaciones repetidas de bovinos fueron analizados también por el método PrioCHECK FMDV NS (Prionics). Este método es un ELISA de bloqueo que permite la detección de anticuerpos en cualquier especie animal. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (PI). Se consideraron sueros no reactivos los que dieron un PI <50% y reactivos los que dieron un PI $\geq 50\%$. Además, los sueros del Experimento 1 fueron examinados por el método 3ABC-CEVAN (19). En este último, los resultados se expresaron como porcentaje de positividad (PP). Se consideraron sueros no reactivos los que dieron un PP <15%, dudosos los que dieron valores de PP de entre el 15% y el 20%, y reactivos los que dieron valores de PI $\geq 20\%$.

Las muestras de ovinos y porcinos fueron analizadas únicamente por el método PrioCHECK FMDV NS (Prionics).

En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para el control de pureza de cada lote de vacunas relativo a las PNE, el ente oficial argentino determina la presencia de reactores por el método I-ELISA 3ABC Panaftosa/ EITB utilizando los sueros obtenidos 60 dpv y los sueros prevacunación, en paralelo con el control de potencia y de seguridad de todas las series. Se incluyeron en el presente trabajo resultados oficiales de I-ELISA 3ABC Panaftosa/EITB de más de 2.800 sueros correspondientes a 168 series de vacunas tetravalentes (O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001, C3 Indaial) utilizadas durante 2006 (N=49), 2007 (N=42), 2008 (N=23), 2009 (N=22), 2010 (10), 2011 (9) y 2012 (13), que representan el control de más de 730 millones de dosis elaboradas por el laboratorio Biogénesis Bagó.

Vigilancia seroepidemiológica

Hace más de una década que el SVO-SENASA ejecuta encuestas serológicas aleatorias para evaluar las medidas de control implementadas y para obtener el reconocimiento y la revalidación anual por parte de la OIE de estatus sanitario en las zonas libres, con y sin vacunación. El muestreo se lleva a cabo según las indicaciones del Código Sanitario para los Animales Terrestres (*Código Terrestre*) (20). El muestreo utilizado fue el necesario para la detección de un evento, en dos etapas. Para el cálculo del tamaño de la muestra, se consideraron los supuestos de un 1% de prevalencia de rodeos infectados, un 10% de prevalencia de animales infectados y un 95% de nivel de confianza en cada una de las zonas en que se zonificó el país. En este trabajo se reportan los resultados de la determinación de anticuerpos contra PNE mediante I-ELISA 3ABC Panaftosa, y de la confirmación de reactores mediante EITB entre las muestras de bovinos tomadas durante la primera campaña de vacunación, los años 2006 a 2011, antes de aplicar la siguiente dosis de vacuna. Los predios con animales reactores fueron objeto de una investigación virológica y epidemiológica posterior que confirmó la ausencia de circulación viral (no mostrado). Estos datos formaron parte de la documentación presentada año a año por el SVO-SENASA a la OIE como respaldo al mantenimiento del estatus sanitario de las regiones libres de FA.

Análisis estadísticos

Los títulos de anticuerpos determinados por LP-ELISA tras las dos primeras vacunaciones de los ensayos de vacunaciones repetidas en bovinos se compararon mediante un análisis de la varianza (ANOVA), y el post-test utilizado fue el de Tukey-Kramer; el límite de significancia se fijó en un 5% ($P = 0,05$).

Resultados

Ensayos de vacunaciones repetidas en bovinos. Determinación de anticuerpos contra proteínas no estructurales

Los ensayos de vacunaciones repetidas permiten forzar una respuesta inmunitaria, y así detectar respuestas de anticuerpos contra PNE que podrían no ser detectadas con una primovacuna o con vacunas convencionales de una sola dosis. Estas pruebas se realizan para evidenciar la eficiencia del proceso de purificación y se aplican como respaldo durante el proceso de autorización o licencia del producto. Este enfoque permite dar confiabilidad a la interpretación de los muestreos al evaluar la actividad viral en zonas incluidas en el plan de vacunación o durante emergencias sanitarias, descartando la eventual interferencia de las vacunas con las pruebas utilizadas. Como se ha descrito en el apartado «Materiales y métodos», se utilizaron vacunas con 3, 4 y 5 valencias en dosis simple (2 y 5 ml) y doble (4 ml), administrando 3 y 4 dosis a intervalos de 30 a 90 días.

En las Figuras 1A, 1B y 1C se presenta, para cada momento post-vacunación, cuántos sueros de bovinos se clasificaron en cada categoría de resultados de T/C tras ser analizados con el I-ELISA 3ABCPanaftosa en los experimentos 1-a, 1-b (Fig. 1A), 2 (Fig. 1B) y 3 y 4 (Fig. 1C).

Como puede observarse, el perfil de reactividades encontrado en cada ensayo se conserva mucho. No hubo inducción de reactores ni siquiera forzando la respuesta inmunitaria mediante 1, 2 o 3 revacunaciones ni utilizando vacunas con dosis doble en esquemas de hasta dos revacunaciones. No se detectaron reactores positivos en los sueros de

los bovinos tras 1, 2, 3 o 4 vacunaciones en ninguno de los ensayos. Es de destacar que el sistema I-ELISA 3ABC Panaftosa/EITB considera la determinación por I-ELISA 3ABC Panaftosa y que todos los sueros sospechosos (valores de T/C de 0,8 a 1) o positivos (valores de $T/C \geq 1$) son sometidos a la prueba confirmatoria EITB. En ese caso, de todos los sueros estudiados ($n=360$) solo uno resultó reactor en el I-ELISA (0,28%), pero al analizarlo mediante EITB, resultó no reactor. El suero reactor solo lo fue tras la revacunación, siendo esta reacción transitoria y resultando no reactor en la siguiente extracción de sangre (120 dpv, Fig. 1A).

Los sueros de todos los experimentos fueron analizados mediante el PrioCHECK FMDV NS, y los del experimento 1 mediante el método del ELISA 3ABC CEVAN, no detectándose reactores en ningún momento post-vacunación (datos no mostrados).

Según los métodos aplicados, los bovinos sin vacunar que se incluyeron en cada uno de los ensayos permanecieron no reactores durante todo el estudio.

Ensayos de vacunaciones repetidas en bovinos. Determinación de anticuerpos contra proteínas estructurales

La determinación de anticuerpos tipo específicos (contra proteínas estructurales) mediante LP-ELISA permitió asegurar que las vacunas utilizadas indujeron una adecuada seroconversión frente a cada una de las cepas integrantes de cada vacuna (Fig. 2).

Los niveles de anticuerpos promedio por grupo tras la primera vacunación a los 60 dpv fue superior a $\log_{10} = 2,3$ frente a cada una de las cepas vacunales, superando los valores que establece la normativa vigente en Argentina para la aprobación de vacunas comerciales tetravalentes de 2 ml/dosis (14, 15). En el caso de vacunas comerciales trivalentes de 5 ml/dosis, los valores de EPP (17) superaron el nivel de exigido a los 28-30 dpv para cada una de las cepas vacunales. Los títulos promedio de anticuerpos tras una y dos vacunaciones aumentaron significativamente ($p < 0,01$) en cada experimento.

Ensayos de vacunaciones repetidas en porcinos y ovinos

En Argentina, la vacunación contra la FA en ovinos y porcinos se aplica en situaciones de emergencia sanitaria o en casos de riesgo de infección por FA. Es por ello que también en estas especies se hace necesario asegurar que la vacunación y la revacunación contra la FA no induzca anticuerpos contra PNE y, por lo tanto, este indicador puede ser utilizado para detectar animales infectados tras un brote. Ninguna de las dos vacunas estudiadas indujo anticuerpos contra PNE ni en porcinos y ni en ovinos, ni después de una vacunación ni después de dos (Tabla II). Los niveles de anticuerpos específicos evaluados mediante LP-ELISA frente a O1 Campos (promedios/grupo) detectados tras la primera vacunación (a los 30 dpv) fueron de $\log_{10}=2,10$ en porcinos y de $\log_{10}=2,91$ en ovinos. Asimismo, en este momento los niveles de anticuerpos frente a A2001 fueron de $\log_{10}=3,07$ en ovinos. La segunda vacunación indujo un aumento en los títulos de anticuerpos específicos contra O1 Campos detectados a los 60 dpv tanto en ovinos ($\log_{10}=4,2$) como en porcinos ($\log_{10}=3,3$).

Control oficial de la potencia de las vacunas (lote a lote)

En Sudamérica, las autoridades sanitarias requieren el control de potencia en bovinos de cada lote de vacuna antiaftosa a comercializar, a fin de garantizar la potencia de los productos que se utilizarán en las campañas.

En la figura 3 se presentan los resultados de potencia, expresados en EPP en bovinos, correspondientes a series de vacuna destinadas a Argentina en el período 2010-2012 y evaluadas por la SENASA. Los valores de EPP de todas las vacunas superan el valor de corte establecido ($\geq 75\%$).

Control oficial de las vacunas en cuanto a la inducción de anticuerpos contra proteínas no estructurales

El SVO-SENASA comprueba en todos los lotes de vacuna la ausencia de reactividad a PNE en el producto final. Esta evaluación confiere

una mayor garantía de pureza en términos de PNE, como complemento de los antecedentes presentados en el expediente de registro del producto.

En la Tabla III se presenta el número de series de vacuna para uso local que se someten anualmente a control oficial en Argentina (vacuna tetravalente, 2 ml/dosis), así como los resultados finales del sistema I-ELISA 3ABC Panaftosa/EITB de todos los sueros evaluados en el período 2006-2012 en un laboratorio fabricante. No se detectaron reactores en los sueros de los bovinos vacunados.

Vigilancia seroepidemiológica

Uno de los pilares del éxito de las campañas de vacunación es la calidad de las vacunas utilizadas. En ese sentido, los resultados de vigilancia seroepidemiológica de las zonas incluidas en el plan de vacunación representan una medida indirecta de calidad de esta herramienta. En Argentina, el SVO-SENASA implementa anualmente estudios seroepidemiológicos con el objetivo de demostrar ausencia de circulación o infección viral en zonas con o sin vacunación de los bovinos y de otras especies susceptibles a la FA. A los efectos del presente trabajo, se tomarán en consideración los resultados de la determinación de anticuerpos contra PNE en bovinos de la zona incluida en el plan de vacunación utilizando muestras de las categorías etarias 1 (6 a 12 meses) y 2 (entre 12 y 24 meses). El porcentaje de positivos a anticuerpos contra PNE se situó entre el 0,01% y el 0,07% en el caso de la categoría 1, y entre el 0,05% y el 0,13% en el caso de la categoría 2, según el sistema I-ELISA 3ABC Panaftosa/EITB (Tabla IV), con un porcentaje promedio de resultados reactivos del 0,05, valores que concuerdan con la especificidad de la prueba (4). La investigación epidemiológica llevada a cabo en muestreos complementarios y en la distribución de estos reactores (datos no mostrados) indicó la ausencia de circulación de virus en la zona incluida en el plan de vacunación y, consecuentemente, la ausencia de interferencia de las vacunas con estas determinaciones.

Discusión

Está ampliamente aceptado que el uso de vacunas es el método más eficaz y rentable de prevenir y controlar enfermedades infecciosas como la FA. El *Código Sanitario para los Animales Terrestres* dispone de directrices sobre la vigilancia zoonosanitaria necesaria para apoyar las solicitudes de estatus de ausencia de infección o circulación viral, un estatus que permite acceder a mercados de carnes y subproductos, o mantenerlos. Los países que practiquen la vacunación y aspiren a obtener de parte de la OIE su reconocimiento de ausencia de FA con vacunación deberán demostrar una suficiente inmunidad poblacional y la ausencia de circulación viral mediante estudios serológicos y la determinación de anticuerpos contra PNE por metodologías validadas y reconocidas por la OIE (20).

Tanto los países con campañas de vacunación sistemática como aquéllos que son libres de FA sin vacunación deben disponer, para sus campañas o para la eventual vacunación de emergencia, de vacunas de probada eficacia y que no interfieran con los métodos destinados a la detección de animales infectados.

En el capítulo «pureza» (18) del *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* de la OIE se recomienda que en el proceso de registro el laboratorio fabricante provea información sobre la ausencia de inducción de anticuerpos contra PNE tras tres vacunaciones de terneros con dosis doble. La normativa argentina para el registro de vacunas contra la FA tiene en cuenta la presentación de antecedentes de potencia, inocuidad y pureza, los de esta última obtenidos mediante ensayos de revacunación con el producto a registrar que demuestren la ausencia de seroconversión respecto a PNE. Tras aprobar el registro, el control de series en términos de pureza consiste en determinar la presencia de anticuerpos contra PNE en sueros de animales vacunados, actividad que se realiza en paralelo con el control de eficacia (14, 15).

En el presente trabajo la ausencia de reactores a PNE en los ensayos de vacunaciones repetidas en bovinos, ovinos y porcinos permite concluir que el método de purificación es satisfactorio y que se ha

verificado mediante distintas metodologías y esquemas de vacunación. Reportes anteriores relativos a vacunas no purificadas no autorizadas en Argentina evidencian un aumento en el valor de T/C tras cada vacunación (21) y una mayoría de bovinos reactivos.

La respuesta humoral específica en los experimentos de vacunaciones repetidas indica niveles de anticuerpos superiores a los niveles de corte exigidos en las normativas vigentes y aumentos significativos tras las dos primeras vacunaciones, lo cual evidencia un efecto intensificador en esta respuesta y, por lo tanto, una concentración antigénica significativa. Tras la tercera vacunación, los títulos de anticuerpos se mantuvieron altos, con EPP superiores al 99% sin mostrar diferencias significativas respecto a los títulos previos. Según Black *et al.* (22), los altos niveles de anticuerpos podrían limitar la respuesta a las vacunaciones sucesivas debido a una neutralización del antígeno vacunal o a un efecto regulatorio en la producción de anticuerpos.

Además, en el control lote a lote de las series industriales mediante el sistema I-ELISA 3ABC Panaftosa/EITB, no se detectaron reactivos. Esto avala que las series de vacuna destinadas a la comercialización están suficientemente purificadas. Cabe señalar que todas las series tuvieron una potencia apropiada, y que más del 75% de las mismas mostraron EPP por encima del 90%.

Los estudios serológicos destinados a determinar la prevalencia de anticuerpos contra PNE en las diferentes zonas con programas de vacunación permiten valorar el grado de circulación viral. En caso de utilizar vacunas con PNE residual, podrían detectarse reactivos positivos a PNE, lo cual exigiría un análisis complementario para descartar que los reactivos se deben a una reacción post-vacunal y no a la circulación viral, puesto que esta última situación afectaría al estatus otorgado por la OIE a ese país o región. El bajo porcentaje de reactivos detectado, acorde con la especificidad de la prueba (4), y la investigación virológica y epidemiológica posterior indicaron la ausencia de circulación viral y, complementariamente, la ausencia de

interferencia de las vacunas aplicadas con las pruebas de determinación de anticuerpos contra PNE.

Este es el primer trabajo que demuestra que vacunas potentes producidas por métodos convencionales alcanzan un nivel de pureza, en términos de PNE, que permite una interpretación precisa de los resultados de la vigilancia seroepidemiológica, cuya determinación de anticuerpos contra PNE respalda el estatus sanitario de zonas libres de FA. Se llega a esta conclusión a partir del uso de vacunas con una concentración antigénica y un número de valencias altos, tras forzar la respuesta inmunitaria mediante el aumento de dosis y con revacunaciones, y vacunando a intervalos más cortos que los usados en las campañas de vacunación. Además, estos datos se complementan con el control lote a lote ejecutado por el SVO-SENASA sobre las vacunas antes de su liberación, en el que se analizaron más de 5.500 sueros.

En conclusión, las vacunas inactivadas caracterizadas en este trabajo y a la venta, y controladas rigurosamente por las autoridades sanitarias, permiten disponer de una herramienta esencial en campañas de erradicación realizadas en respaldo al reconocimiento de estatus de ausencia de actividad viral en zonas donde se practica la vacunación o tras una o más vacunaciones de emergencia.

Conclusiones

En ensayos de vacunación repetida en bovinos, ovinos y porcinos, vacunas sometidas a procesos de purificación con una concentración antigénica y un número de valencias altos no inducen anticuerpos contra PNE.

El control lote a lote ejecutado por el SVO-SENASA en bovinos sobre las vacunas antes su liberación asegura una potencia satisfactoria y la ausencia de seroconversión respecto a PNE en las vacunas liberadas.

Vacunas potentes producidas por métodos convencionales y en cuyo proceso productivo se incluyen etapas de purificación antigénica permiten una interpretación precisa de los resultados de vigilancia

seroepidemiológica, cuya determinación de anticuerpos contra PNE permite respaldar el estatus sanitario de zonas libres de FA.

Bibliografía

1. Neitzert E., Beck E., Augé de Mello P., Gomes I. & Bergmann I.E. (1991). – Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. *Virology*, **184** (2), 799–804.
2. Bergmann I.E., de Mello P.A., Neitzert E., Beck E. & Gomes I. (1993). – Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, **54** (6), 825–831.
3. Fondevila N., O'Donnell V., Duffy S., León E., Smitsaart E. & Schudel A.A. (1997). – Indicadores seroepidemiológicos para la evaluación de las campañas de control de fiebre aftosa. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **16** (3), 784–792. Página web: web.oie.int/boutique/extrait/00contents719724.pdf (consultada el 1 de abril de 2015).
4. Bergmann I.E., Malirat V., Neitzert E., Beck E., Panizzuti N., Sanchez C. & Falczuk A. (2000). – 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.*, **145** (3), 473–489.
5. Bergmann I.E., Malirat V., Dias L.E. & Dilandro R. (1996). – Identification of foot-and-mouth disease virus free regions by use of a standardized enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay. *Am. J. Vet. Res.*, **57** (2), 972–974.
6. Mattion N., König G., Seki C., Smitsaart E., Maradei E., Robiolo B., Duffy S., León E., Piccone M., Sadir A., Bottini R., Cosentino B., Falczuk A., Maresca R., Periolo O., Bellinzoni R.,

Espinoza A., Torre J.L. & Palma E.L. (2004). – Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease. *Vaccine*, **22** (31–32), 4149–4162.

7. Pluimers F.H., Akkerman A.M., van der Wal P., Dekker A. & Bianchi A (2002). – Lessons from the foot and mouth disease outbreak in the Netherlands in 2001. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **21** (3), 711–721. Página web: web.oie.int/boutique/extrait/3.8.Pluimers.pdf (consultada el 1 de abril de 2015).

8. Barteling S. (2004). – Modern inactivated Foot-and-mouth disease (FMD) Vaccines: Historical background and Key elements in Production and Use.. *En: Foot and Mouth Disease Current Perspectives* (F. Sobrino & E. Domingo, edit.), Reino Unido CRC Press, 305–333

9. Espinoza A.M., Maradei E., Mattion N., Cadenazzi G., Maddonni G., Robiolo B., La Torre J., Bellinzoni R. & Smitsaart E. (2004). – 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*, **23** (1), 69–77.

10. Aucouturier J., Dupuis L. & Ganne V. (2001). – Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, **19** (17–19), 2666–2672.

11. Bergmann I.E., Neitzert E., Malirat V., Ortiz S., Colling A., Sánchez C. & Correa Melo E. (2003). – Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay and its use as an epidemiological indicator of foot-and-mouth disease viral activity. *Arch. Virol.*, **148** (5), 891–901.

12. Bergmann I.E., Neitzert E., Malirat V., de Mendonça Campos R., Pulga M., Muratovik R., Quintino D., Morgados J.C., Oliveira M. & de Lucca Neto D. (2006). – Development of an

inhibition ELISA test for the detection of non-capsid polyprotein 3ABC in viral suspensions destined for inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Dev. Biol. (Basel)*, **126**, 241–50, discussion 327.

13. Goris N., Merkelbach-Peters P., Diev V.I., Verloo D., Zakharov V.M., Kraft H.P. & De Clercq K (2007). – European Pharmacopoeia foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle: between test variability and its consequences. *Vaccine*, **25** (17), 3373–3379. Doi:10.1016/j.vaccine.2006.12.049

14. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria Sanidad Animal, Argentina (SENASA) (2006). – Resolución 351/2006 - Boletín Oficial N° 30.940 – 5 julio 2006. Página web: infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/115000-119999/117636/norma.htm (consultada el 1 de abril de 2015).

15. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria Sanidad Animal, Argentina (SENASA) (2010). – Resolución 111/2010. Página web: infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/160000-164999/164766/norma.htm (consultada el 1 de abril de 2015).

16. Maradei E., La Torre J.L., Robiolo B., Esteves J., Seki C., Pedemonte A. Iglesias M., D'Aloia R. & Mattion N. (2008). – Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphthovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*, **26** (51), 6577–6586. Doi:10.1016/j.vaccine.2008.09.033

17. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: SISLEGIS (2008). – Instrução Normativa N° 50, Regulamento técnico para a produção, controle da qualidade, comercialização e emprego de vacinas contra a febre aftosa. Página web: sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674&tipoLegis=A (consultada el 1 de abril de 2015).

18. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2012). – Manual de Pruebas Diagnósticas y de Vacunas para Animales Terrestres, Capítulo 2.1.5. Fiebre Aftosa. OIE, Paris, Francia. Página web: www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.05.FMD_Spanish.pdf (consultada el 1 de abril de 2015).

19. Robiolo B., Seki C., Fondevilla N., Grigera P., Scodeller E., Periolo O., La Torre J. & Mattion N. (2006). – Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests. *Vaccine*, **24** (7), 997–1008.

20. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2014). – Código Sanitario para los Animales Terrestres, Capítulo 8.7. Fiebre Aftosa. OIE, Paris, Francia. Página web: www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/chapitre_fmd.pdf (consultada el 1 de abril 2015).

21. Maradei E. (2007). – Use of non-structural proteins of FMDV to differentiate vaccinated and infected animals in Argentina. *En: The use of Non-structural Proteins of Foot-and-mouth Disease virus (FMDV) to Differentiate between Vaccinated and Infected Animals*. RCA Project. Joint FAO/IAEA programme. IAEA, Vienna, IAEA-TECDOC-1546, Pág. 197-204. Página web: www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1546_web.pdf (consultada el 1 de abril de 2015).

22. Black L., Rweyemamu M. & Boge A. (1984). – Revaccination response of cattle as a function of the 140S foot and mouth disease antigen dose. *J. Comp. Pathol.*, **94** (3), 417–424.

Tabla I**Diseño de los ensayos de vacunaciones repetidas en bovinos**

Experimento N.º	N.º de bovinos	Cepas incluidas en la vacuna	Dosis/volumen	Vacunaciones (dpv)*
1-a	17	O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001, A2000	1 dosis/2 ml	0, 30 y 60 dpv
1-b	17		2 dosis/4 ml	
2	16	O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001, A2000 y C3 Indaial	1 dosis/2 ml	0, 90, 120 y 150
3	17	O1 Campos, A24 Cruzeiro y C3 Indaial	1 dosis/5 ml	0, 60 y 90 dpv
4	18			0, 42 y 90 dpv

* días post-primovacunación

Tabla II

Respuesta de anticuerpos contra proteínas estructurales (determinada por enzimoimmunoanálisis en fase líquida) y de anticuerpos contra proteínas no estructurales (determinada por PrioCHECK FMDV NS) en ovinos y porcinos tras vacunaciones repetidas

Especie	Vacuna	Títulos de LP-ELISA O1 Campos		Títulos de LP-ELISA A2001		Reactores PrioCHECK FMDV NS	
		Post 1. ^a vac ¹	Post 2 ^{da} vac ²	Post 1. ^a vac	Post 2 ^{da} vac	Post 1. ^a vac	Post 2 ^{da} vac
Porcinos	Monovalente O1 Campos	2.10 ³ (0.19) ⁴	3.3 (0.27)	ND	ND	0/13 ⁵	0/13
Ovinos	Polivalente	2.91 (0.52)	4.20 (0.45)	3.07 (0.58)	4.14 (0.49)	0/23	0/23

- 1) Post-primera vacunación (30 días post-primovacuna)
 2) Post-segunda vacunación (60 días post-primovacuna)
 3) Promedio de títulos de anticuerpos por grupo según el enzimoimmunoanálisis en fase líquida, expresado como inversa del log₁₀
 4) Entre paréntesis: desviación estándar
 5) Número de sueros reactivos respecto al total de sueros analizados
 ND: no determinado
 ELISA: enzimoimmunoanálisis

Tabla III
Control oficial en Argentina de las vacunas del laboratorio
fabricante Biogénesis Bagó en cuanto a la inducción de
anticuerpos contra proteínas no estructurales

Año	N.º series	N.º millones de dosis	Sueros reactivos ELISA 3ABC/EITB ¹ /total evaluados	Series aprobadas/evaluadas
2006	49	132	0/1650	49/49
2007	42	119	0/1428	42/42
2008	23	127	0/782	23/23
2009	22	122	0/748	22/22
2010	10	74	0/340	10/10
2011	9	67.4	0/306	9/9
2012	13	94.7	0/442	13/13
Total	168	736.1	0/5696	168/168

1) Los sueros pre-vacunación y 60 dpv de cada bovino vacunado con cada una de las series de vacuna son determinados por I-ELISA 3ABC Panafosa, y luego los sueros con T/C \geq 0,8 (sospechosos y positivos) son analizados mediante enzimoimmunotransferencia.

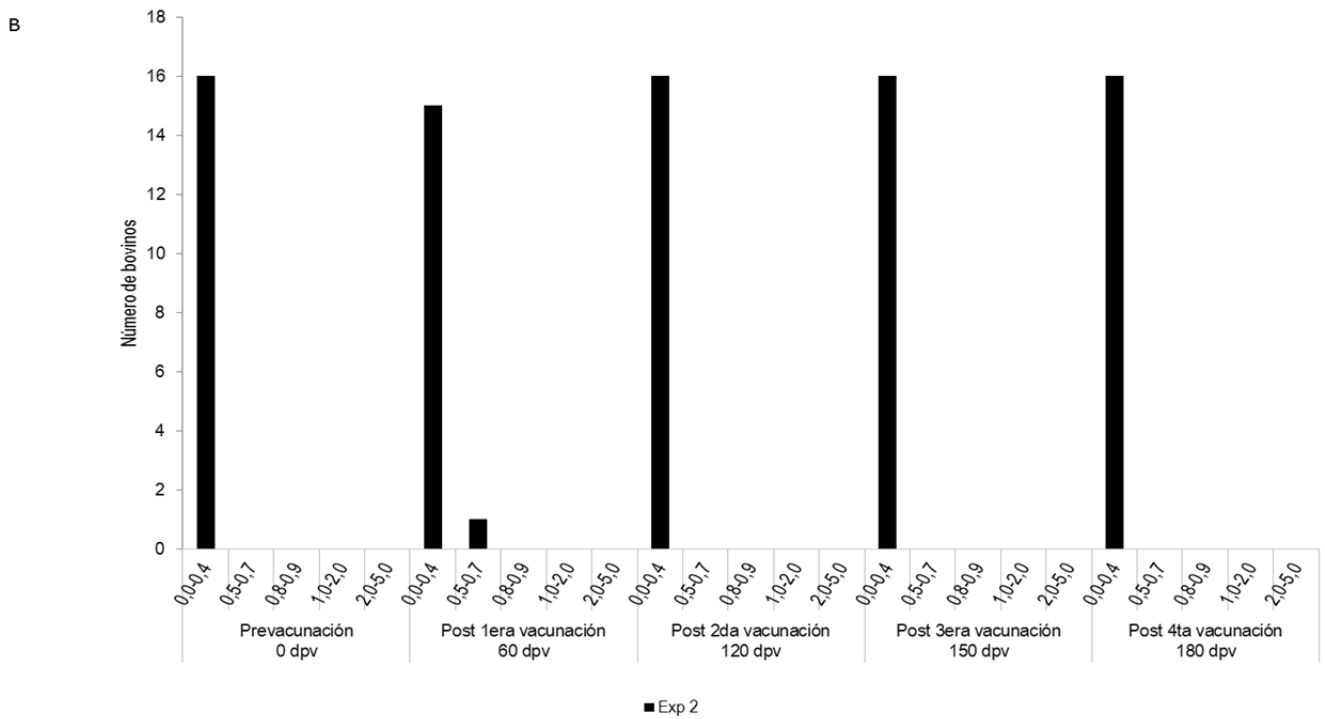
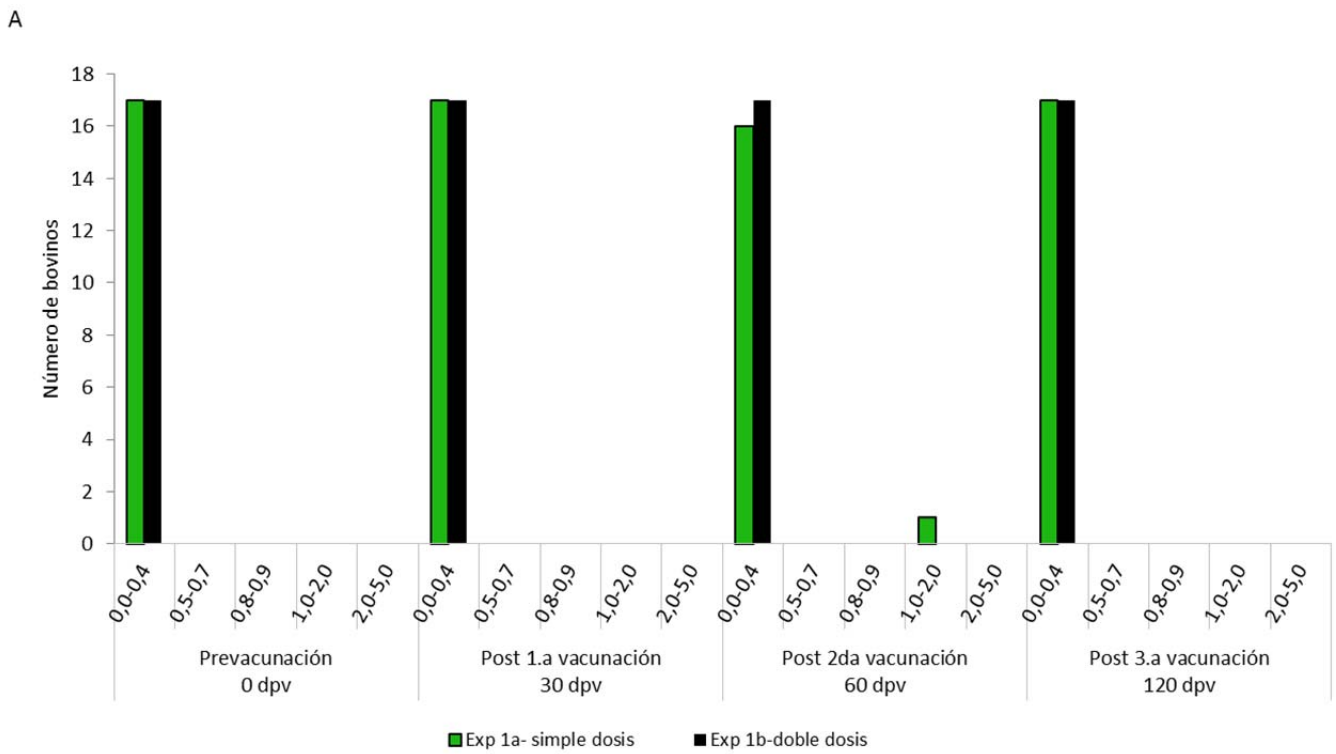
Tabla IV

Resultados de los muestreos (2006-2011) de bovinos de las categorías etarias 1 (6 a 12 meses) y 2 (entre 12 y 24 meses) en zonas incluidas en el plan de vacunación realizado por el Servicio Veterinario Oficial - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina

Año	Categoría 1		Categoría 2	
	Número de bovinos	% positivos*	Número de bovinos	% positivos
2006	16 200	0.02	10 413	0.07
2007	16 464	0.02	10 121	0.10
2008	20 632	0.04	13 034	0.07
2009	14 762	0.07	9 749	0.11
2010	15 969	0.01	10 382	0.13
2011	15 646	0.01	10 281	0.05

* % reactores por el método I-ELISA 3ABC Panaftosa/EITB

ELISA: enzimoimmunoanálisis



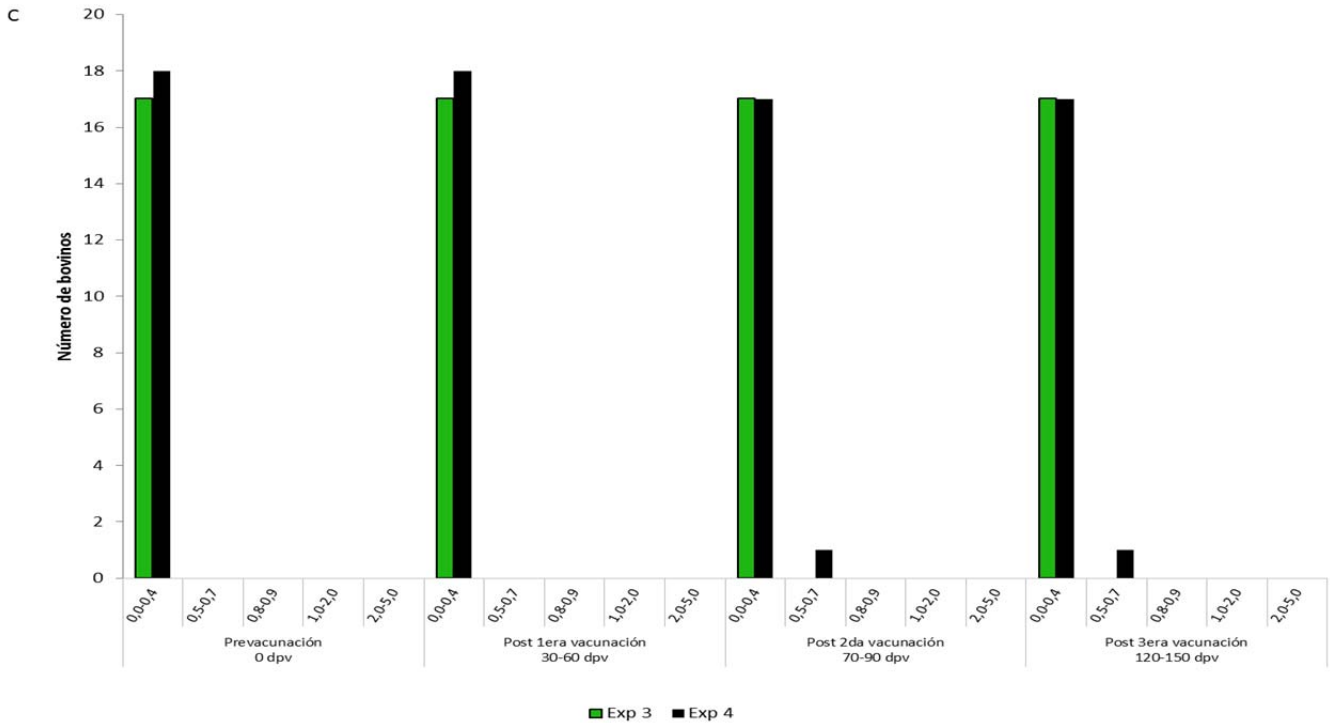


Fig. 1
Determinación de anticuerpos contra PNE en bovinos tras varias vacunaciones

Las barras indican cuántos sueros de bovinos se clasificaron en cada categoría de resultados de T/C tras ser analizados con I-ELISA 3ABC Panaftosa

El eje «y» corresponde al número de bovinos, y el eje «x» a los valores de T/C

Panel A: Experimento 1a y b: las barras claras (1a) corresponden al grupo de dosis única, y las barras negras (1b) al grupo de dosis doble

Panel B: Experimento 2

Panel C: Experimento 3 (barras claras) y 4 (barras negras)

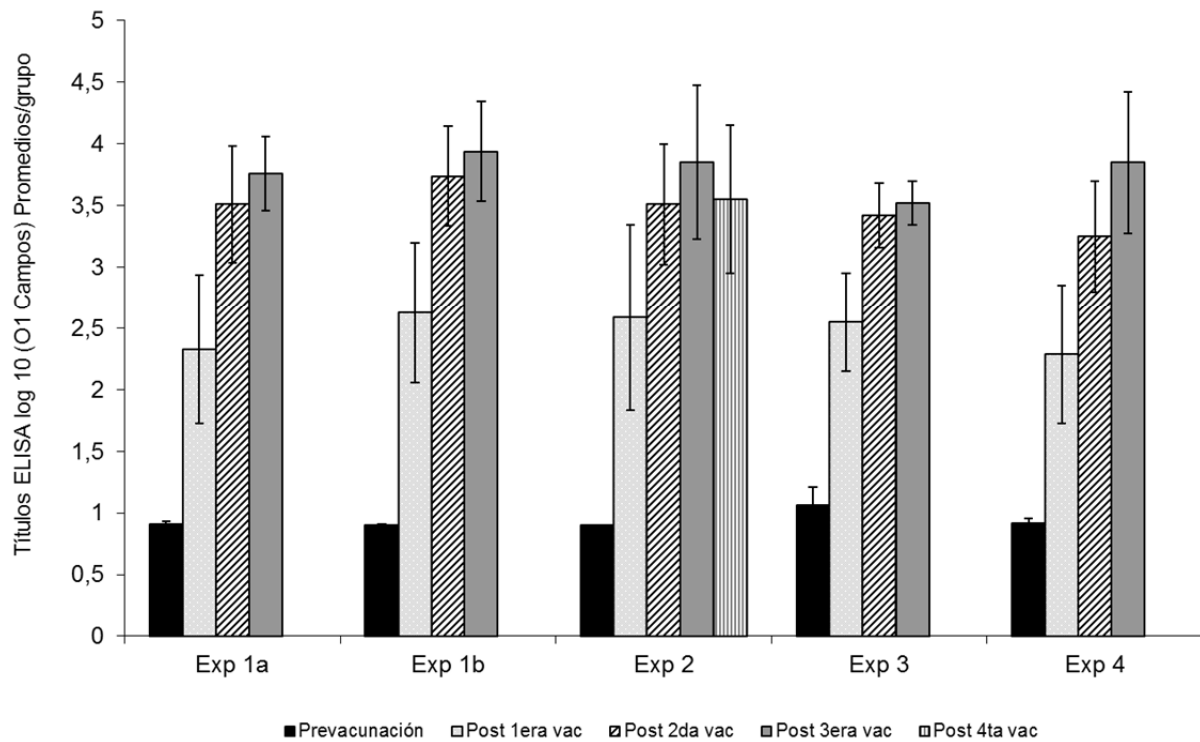


Fig. 2

Títulos de anticuerpos promedio/grupo, determinados mediante enzoinmunoanálisis en fase líquida (\log_{10}), frente a O1 Campos antes y después de cada vacunación de bovinos, correspondientes a los experimentos 1a, 1b, 2, 3 y 4

Las líneas verticales indican la desviación estándar

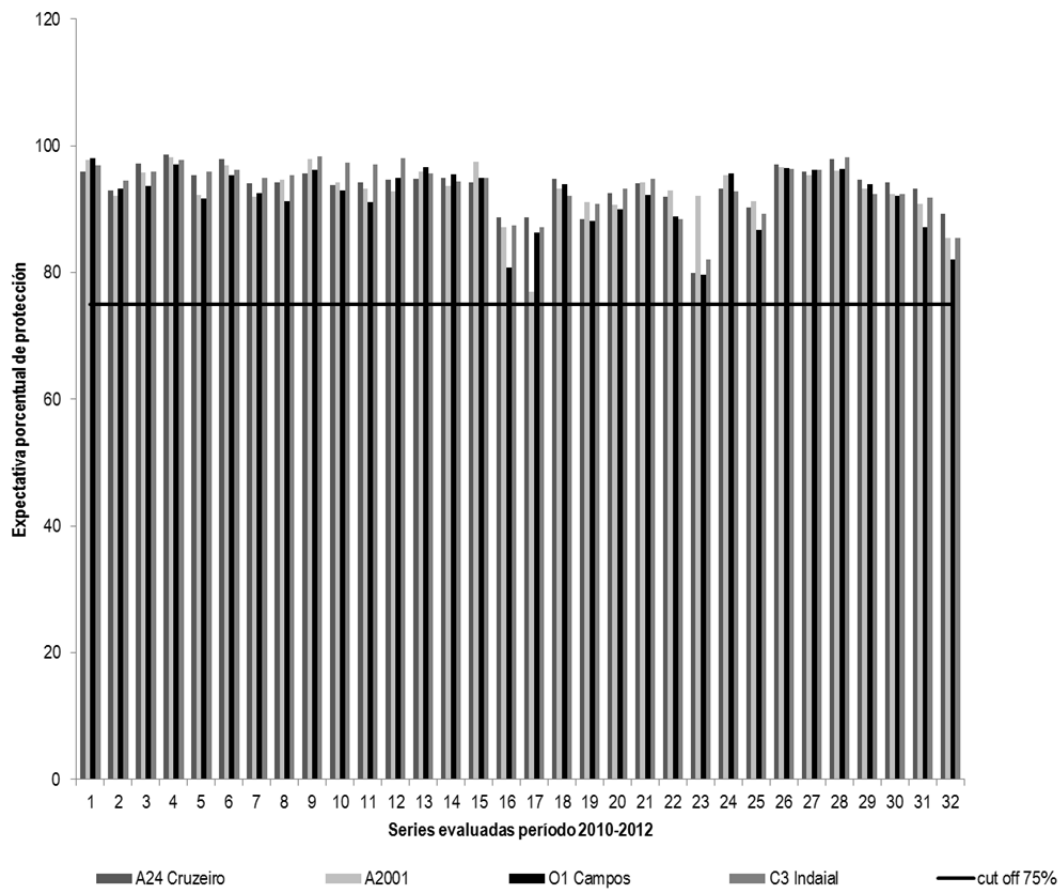


Fig. 3
Resultados de los controles de potencia, expresados como expectativa porcentual de protección, efectuados en series de vacuna contra la fiebre aftosa presentadas en el período 2010 a 2012 al Servicio Veterinario Oficial argentino (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria)

Las barras indican la expectativa porcentual de protección