

Libros de **Cátedra**

Vacunas en rumiantes domésticos

Alejandra Larsen, Graciela Miceli
y Eduardo Mortola (coordinadores)

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

VACUNAS EN RUMIANTES DOMÉSTICOS

Alejandra Larsen
Graciela Miceli
Eduardo Mortola
(coordinadores)

Facultad de Ciencias Veterinarias



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Índice

Introducción	4
Capítulo 1	
Vacunas en veterinaria	5
<i>Jorge Bernagozzi</i>	
Capítulo 2	
Vacunas de nueva generación en veterinaria	33
<i>Eduardo Mortola</i>	
Capítulo 3	
Adyuvantes y sistema inmune	43
<i>Alejandra E. Larsen, Javier H. Barragán</i>	
Capítulo 4	
Vacuna contra la fiebre aftosa	58
<i>Alejandra Larsen</i>	
Capítulo 5	
Vacuna anticarbuncosa	72
<i>Jorge Bernagozzi</i>	
Capítulo 6	
Vacuna contra brucelosis bovina	87
<i>Graciela S. Miceli</i>	
Capítulo 7	
Vacunas para Rabia Paresiante	95
<i>Paresiante. Graciela S. Miceli</i>	
Capítulo 8	
Vacunas clostridiales en rumiantes	104
<i>Lais Luján Pardini</i>	
Capítulo 9	
Vacuna contra el Ectima Contagioso ovino	112
<i>Eduardo Mortola</i>	
Autores	119

Introducción

El material de lectura referido a vacunas veterinarias ha tenido y siguen teniendo, un papel importante en la salud animal, en la salud pública, el bienestar animal y también en la producción de alimentos. Este material supone un desarrollo importante de contenidos en forma escrita. A la fecha, no se cuenta con textos que formulen de manera ordenada, concisa y práctica conceptos básicos de las vacunas y vacunaciones en las especies domésticas, en animales de producción y de compañía. Los alumnos de los cursos de inmunobiología animal aplicada, así como también de otros cursos relacionados, como enfermedades de las diferentes especies, clínica y producción animal no cuentan en la actualidad con material bibliográfico de estudio y consulta, que concentre e interrelacione los conceptos inmunológicos con los de producción, uso y aplicación de vacunas veterinarias. Contar con este libro de Cátedra es de suma importancia para crear un material de consulta compilado, de rápido acceso y fácil lectura para un gran número de Docentes y Alumnos, que sin perder rigor científico ni académico suma a la comprensión efectiva de estas relevantes temáticas veterinarias.

CAPÍTULO 1

Vacunas en veterinaria

Jorge Bernagozzi

Las vacunas constituyen el método más económico y efectivo para prevenir las enfermedades infecciosas. Es importante, para una correcta aplicación, obteniendo los resultados esperados, poseer los conocimientos básicos de inmunología y de patogenia de la enfermedad, para saber determinar cuál es la vacuna correcta, el momento óptimo de aplicación y la frecuencia de la revacunación, que permitirá desarrollar una respuesta inmune adecuada.

Se debe asegurar que las vacunas a aplicar reúnan las condiciones mínimas de calidad exigibles para cada una de ellas y estén aprobadas por los Institutos Nacionales de Control, en el país es el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

Breve reseña histórica

Documentos atribuidos a Tucídides e Hipócrates consignan que las enfermedades se debían a acciones desafortunadas de los hombres que provocaban la ira de los dioses.

Se cree que la viruela fue la primera enfermedad que el ser humano intentó prevenir. Se presume que los primeros procedimientos se iniciaron en la India o en China alrededor del año 200 a JC.

En 1796, durante el momento de mayor extensión del virus de la viruela en Europa, Edward Jenner, observó que los ordeñadores que habían padecido la viruela vacuna (cow pox) quedaban protegidos contra la infección de la viruela humana (small pox), es así como inicia el camino del desarrollo de las vacunas, algo similar había sido observado en el año 1400. Jenner tomó el exudado de las pústulas de la viruela vacuna de la mano afectada de una granjera e inoculó este material en el brazo de un niño, quien mostró síntomas de la infección por el virus de la viruela vacuna. Un mes más tarde, aproximadamente, recuperado por completo, de la enfermedad provocada experimentalmente, Jenner, según las versiones, expuso al niño al virus de la viruela humana, y no mostró ningún síntoma o signo de enfermedad. Éste es un hito trascendente en la historia de la humanidad, ya que gracias a esta vacuna, prácticamente 200 años después, la Organización Mundial de la Salud, declara en 1979, la erradicación de la viruela humana en el mundo.

Louis Pasteur en 1880, trabajando con el cólera de las gallinas, comprueba que es posible proteger las enfermedades infecciosas mediante la inyección de gérmenes inactivados o atenuados. A partir de estas experiencias realizada por Pasteur y de otras que le siguieron en los años 1881, 1885y, paralelamente, con las llevadas a cabo por Robert Koch, dos científicos coetáneos, se puede afirmar que aquí comienza la etapa científicista de la inmunología y de la inmunoprofilaxis.

Robert Koch en el año 1880 intenta desarrollar una vacuna inactivada contra la tuberculosis que si bien no logra su objetivo como tal, se convertirá con el tiempo, en un excelente medio de diagnóstico para la tuberculosis. Así nace la tuberculina de Koch que sufrirá modificaciones a lo largo de las décadas hasta transformarse hoy en la PPD (Proteína Purificada Derivada).

En 1881 Louis Pasteur elabora la primera vacuna contra el carbunco bacteridiano sometiendo la cepa de campo de *Bacillus anthracis* a temperaturas “disgenésicas” de 42°C variando el tiempo, logrando “atenuar”, es decir reducir la patogenicidad de la cepa original (En el año 1886 se realiza la primera vacunación en la República Argentina, en Gualeguay, Entre Ríos, con vacuna donada por Louis Pasteur conocedor de la problemática de la enfermedad en la República Argentina).

En 1882 Louis Pasteur, con el Médico Veterinario Roux logra crear una vacuna efectiva contra la rabia desecando con hidróxido de potasio médula de conejos infectados con el virus rábico. Esta vacuna se encontraba en fase experimental y fue solo utilizada en animales; hasta que en 1885, frente a un pedido de la madre de un niño, quien había sido mordido por un perro rabioso y cuyo final era inexorablemente la muerte, decide a pesar de mostrarse renuente, aplicar la misma a humanos. La inoculación resultó exitosa y salvó la vida del niño. Con posterioridad y en solo 15 meses la crónica de la época consigna que más de 2500 personas mordidas por perros rabiosos fueron tratadas exitosamente.

En el año 1890 Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato en Berlín descubren la existencia de moléculas (anticuerpos) en el suero de los enfermos de difteria que habían sobrevivido, y observaron que la inoculación de sueros de estos individuos protegía a personas sanas contra la misma o mejoraban la situación de los afectados. Esto inicia el camino de la inmunoprofilaxis pasiva artificial y de las experiencias destinadas a inducir la formación de anticuerpos en animales con destinos profilácticos o curativos. En 1921, Calmette y otro Médico Veterinario, el Dr. Guerin, logran atenuar el *Mycobacterium tuberculosis bovis*, obteniendo la cepa BCG (Bacilo Calmette Guerin) utilizada hasta nuestros días para elaborar la vacuna antituberculosa de uso humano.

En el año 1923 Ramón observa que las toxinas diftéricas y tetánicas adicionadas con formol se transformaban en un nuevo producto, donde las toxinas perdían su capacidad “tóxica” pero conservaban su capacidad “inmunizante”, denominándolo toxoide, así comienzan trabajos para obtener anticuerpos neutralizantes en la especie equina para ser suministrado a los enfermos o infectados por la difteria, protegiéndolos, práctica que se extendió hasta bien entrado el siglo XX.

En 1925, Ramón observó que la respuesta al toxoide tetánico era mayor cuando se adicionaban a los antígenos determinados compuestos, sería el comienzo de lo que hoy conocemos con el nombre de adyuvantes o coadyuvantes de la inmunidad, en 1926 Glenny descubre que el toxoide diftérico adicionado o precipitado con alumbre resultaba muchos más inmunogénico que el toxoide aplicado solo.

Un avance importante en el diseño de vacunas, se observa cuando ciertas bacterias o en realidad ciertos componentes de la pared bacteriana de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*, entre otras, tenían la facultad de realzar la respuesta inmune. Así nace el concepto de adyuvante o adyuvancia intrínseca, en contraposición a la producida por las sales de aluminio u otras sustancias, que es conocida como adyuvancia extrínseca. Con los trabajos de Hilleman en 1966, comienzan a desarrollarse los adyuvantes oleosos (emulsión de agua en aceite), ejemplo el de Freund (completo e incompleto) caracterizándose, el completo, por las elevadas reacciones adversas que producía.

Introducción

Recordemos algunas definiciones:

Inmunología: es la ciencia biológica que estudia la inmunidad y el resultado de sus expresiones. A tal fin analiza: el sistema inmune, la respuesta inmune y la inmunidad.

Inmunobiología básica: estudia las células, tejidos, órganos, moléculas que constituyen el sistema inmune.

Inmunoprofilaxis: estudia la prevención de enfermedades, es una rama de la inmunología que se ocupa de la investigación, desarrollo y producción de elementos (inmunógenos, anticuerpos y/o células específicas) relacionados con la inmunidad adaptativa destinados a la prevención y/o curación de las enfermedades infecciosas y de los fenómenos resultantes de su aplicación.

Inmunoterapia: estudia el tratamiento de las enfermedades.

Sistema inmune: conjunto de órganos, tejidos y células distribuidos estratégicamente en el organismo, interrelacionados por la dinámica celular, como asimismo por mensajeros moleculares, producidos y liberados en la interacción con los agentes infecciosos, agresiones externas o elementos propios que se modifican y se comportan como desconocidos para él. La interacción y activación de éste sistema genera la respuesta inmune.

Inmunidad: como inmunidad se puede definir, al estado de reactividad orgánica individual que se expresa luego del reconocimiento de estructuras moleculares no codificadas genéticamente como propias, y condicionado por la actividad de mediadores innatos y adaptativos.

a.- **Inmunidad individual:** es el estado de reactividad individual que determina que ese organismo sea refractario a contraer tal o cual enfermedad luego de haber sido vacunado o sufrido la enfermedad clínica. Es propio y exclusivo de cada individuo.

b.- **Inmunidad colectiva:** es el estado que presenta un rodeo o conjunto de animales producto de la sumatoria de las inmunidades individuales, se considera que, con una tasa aproximada de 66 % de animales inmunes, es muy difícil que se produzca una epizootia en razón que, los animales sensibles se encuentran rodeados de animales refractarios que impiden o dificultan la diseminación de la enfermedad. Esta inmunidad colectiva sólo es válida para enfermedades infectocontagiosas.

Vacuna: toda suspensión de microorganismos en distinto estado biológico, metabolitos detoxificados, combinaciones de ambos, o bien partes estructurales de éstos, con el agregado o no de adyuvantes, que inoculados a un vertebrado superior, en las condiciones adecuadas, protegen de la infección, enfermedad, o reduce las consecuencias de éstas, disminuyendo lesiones específicas o evitando caídas de parámetros de producción, por inducir un estado de inmunidad activa artificial.

Los resultados de la vacunación estarán condicionados por factores asociados a la vacuna, al vacunador y al vacunado:

- *Vacuna:* uno de los pilares que determinan el éxito o fracaso de la vacunación. Además de la correcta elección de la misma (estado biológico, inmunógeno que corresponda a la enfermedad a prevenir), debe tenerse en cuenta, la correcta conservación, la fecha de elaboración/vencimiento y que cumpla con las normas de calidad indispensables.

- *Vacunador:* persona responsable de la elección y aplicación de la vacuna por la vía y dosis indicada, normas de higiene y de bioseguridad en la aplicación, correcto manejo de los frascos multidosis (no dejarlos expuestos a temperaturas elevadas en la manga, rayos del sol, higiene y asepsia en la extracción de las dosis, no guardar frascos utilizados). La vacunación es un acto profesional y como tal debe ser ejecutada por profesionales veterinarios con capacidad de resolución de los diversos problemas o alternativas que pueden producirse durante el acto vacunatorio, sobre todo reacciones anafilácticas que pueden desencadenarse y deben ser resueltas con la urgencia necesaria.

- *Vacunado:* individuo destinatario de la vacuna que debe encontrarse en perfecto estado sanitario y de nutrición, previo a la aplicación de la misma, que permita desarrollar una correcta respuesta inmune; el mismo se encuentra inserto en un medio ambiente cargado de potenciales agentes agresores, expuesto a diversas condiciones climáticas, frío, calor, tormentas que generan, factores estresantes a partir de la estimulación del eje hipotálamo-hipofisario, desencadenando la liberación de hormonas y corticoides que inducen un estado de inmunosupresión o de disminución de la capacidad de respuesta.

Finalidad e importancia de la vacunación

La finalidad es producir una potente inmunidad contra un determinado patógeno, que establezca mecanismos de memoria inmune perdurables.

Objetivos de la vacunación

Prevenir la infección: significa evitar el ingreso de los agentes agresores al organismo, de manera inespecífica por la inmunidad innata, superada ésta actúa la inmunidad adaptativa, para ello las vacunas deberían ser vivas o activas, en general con producción de Ig A local; son pocas en el país, la mayoría para aves .Ej: Vacuna contra *Bordetella bronchiseptica* aplicada por vía de las mucosas

Prevenir la enfermedad: son la mayoría, inducen respuestas de anticuerpos y/o células con capacidad de destruir agentes infecciosos, y/o neutralizar sus toxinas. Ej: Vacuna anti-aftosa, Vacuna contra carbunco, etc.

Prevenir la enfermedad del órgano blanco: estas vacunas no impiden la infección ni la multiplicación del agente infeccioso, pero impiden la llegada del agente al órgano blanco, que de suceder, sería mortal. Ej: Vacuna contra Encefalomiелitis equina, Vacuna anti-rábica aplicada post mordedura (medicina humana).

Reducir síntomas y/o lesiones: son vacunas destinadas a prevenir enfermedades del aparato respiratorio, bacterianas o virales, donde puede aparecer la enfermedad leve .Ej: Vacuna contra Pasteurellosis, Vacuna contra influenza equina.

Curar enfermedades: son las autovacunas, se producen con cepas aisladas de o los animales enfermos y van destinadas a ellos. Ej: Autovacunas contra papilomatosis (aún se utilizan, con normativas de SENASA).

Clasificación de vacunas

Se puede clasificar las vacunas en dos grandes grupos:

Vacunas convencionales: son producidas a partir de agentes biológicos (bacterias, virus, parásitos, hongos, toxoides), vivos, atenuados, modificados, inactivados o detoxificados, purificados, pero que conservan todas las estructuras características de los mismos.

Vacunas no convencionales: son las vacunas denominadas de nueva generación. Por nuevas tecnologías se ha permitido obtener de los microorganismos tanto las estructuras responsables de la respuesta inmune proyectiva, como aquellos otros ligados a la patogenicidad o infecciosidad. La ingeniería genética ha permitido, por un lado, la expresión de estos epitopes protectores en organismos no patógenos o bien elaborarlos por síntesis. También es posible eliminar aquellos epitopes responsables de la patogenicidad. Se está en una etapa de desarrollo de vacunas más seguras, más eficaces y contra organismos de difícil cultivo.

Estado biológico del inmunógeno:

Vivas o activas: el inmunógeno conserva la capacidad de multiplicarse o replicarse en el organismo receptor (fig. 1).

Vivas patógenas: son aquellas vacunas donde el inmunógeno conserva la patogenicidad original. Han caído en desuso, se fundamentaban en la aplicación o administración del agente patógeno por una vía distinta a la de la infección natural, se puede citar la vacuna del Ectima contagioso de los lanares.

Vivas atenuadas: Estos tipos de vacunas se preparan con el agente etiológico causante de la enfermedad que ha sido modificado mediante el pasaje por animales de laboratorio, medios de cultivo, cultivos celulares, embriones aviares, métodos físico-químicos (*Bacillus anthracis* cepa Sterne) para seleccionar, posteriormente, una variante de patogenicidad reducida. Dentro de las vacunas vivas atenuadas prácticamente se pueden encuadrar la mayoría de las vacunas activas a sustrato viral de pequeños animales, donde los virus han sufrido pasajes a través de cultivos celulares, fundamentalmente, y han disminuido su patogenicidad para el huésped natural.

En grandes animales, se puede citar, la vacuna contra brucelosis bovina cepa 19, con una patogenicidad natural disminuida. Otro ejemplo, es la vacuna cepa Sterne contra el carbunco bacteriano, a través del cultivo del *Bacillus anthracis* patógeno en placas de agar suero y en atmosfera con CO₂, logró eliminar la cápsula obteniendo una cepa acapsulada y acapsulogéna utilizada como vacuna.

Vivas modificadas: En este tipo de vacunas el agente etiológico tiene disminuida su capacidad infecciosa para la especie destinataria de la vacuna por haber sido adaptado a una especie no habitual, aumentando la patogenicidad para ésta y disminuyendo la misma para la especie a la cual se va a aplicar. El ejemplo clásico era la vacuna contra peste porcina cepa china donde el virus original fue adaptado al conejo (de allí el nombre vacuna contra peste porcina lapinizada, por lapin, en francés conejo) de más de 500 pasajes, perdiendo la patogenicidad para el cerdo, pero no su capacidad inmunizante y protectora. En la actualidad en la República Argentina no se utiliza vacuna contra peste porcina.

Estas vacunas a sustrato vivo atenuado o modificado presentan el inconveniente de impedir la eliminación del agente causal de la enfermedad, ya que a pesar de que no se produzcan casos de enfermedad continuamos insertando en el medio ambiente el agente etiológico aunque modificado o atenuado. Esta modificación génica debe ser estable, no debe revertir y en lo posible la cepa vacunal, no debe eliminarse por los emuntorios naturales de los animales vacunados, ya que si se produciría el pasaje en forma descontrolada de animal a animal podría volver a adaptarse a la especie original, con graves consecuencias.

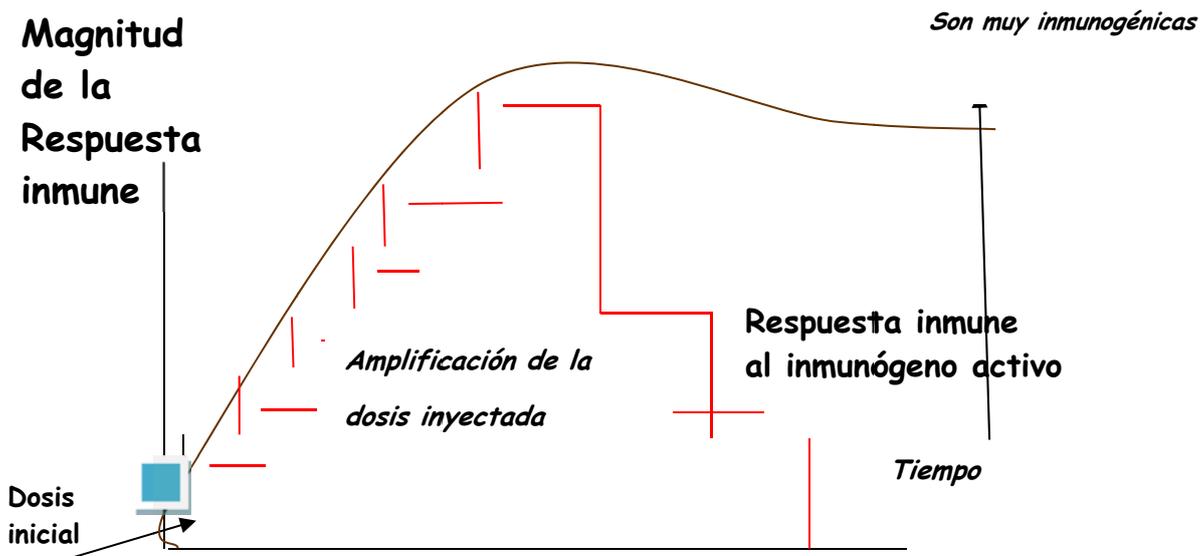


Figura 1. El inmunógeno conserva la capacidad de multiplicarse o replicarse en el organismo receptor.

Ventajas sustratos activos: 1. No se alteran los inmunógenos; 2. No requieren adyuvantes; 3. Protección prolongada con una sola aplicación; 4. Muy inmunogénica; 5. El sustrato vacunal se multiplica en el receptor y simula la infección natural del patógeno; 6. Generan una rápida respuesta inmune mediada por células y anticuerpos; 7. Según la vía de aplicación, pueden estimular respuestas de Ig A secretoria a nivel de las mucosas; 8. La intensidad de la respuesta inmune engendrada no depende de la masa antigénica inoculada, sino de la capacidad de replicación o multiplicación de la misma.

Desventajas de los sustratos activos: 1. Patogenicidad residual; 2. Reversión a la patogenicidad; 3. Presencia de virus adventicio; 4. Efectos sobre hembras preñadas; 5. Imposibilidad de utilización en animales inmunosuprimidos; 6. Contraindicada en animales salvajes; 7. Mayor exigencia en las condiciones de conservación.

Muertas o inactivas: el sustrato vacunal sufre un proceso de inactivación mediante procesos físicos, químicos o físico-químicos que determina que el inmunógeno pierda su capacidad infectante, de multiplicarse o sus propiedades tóxicas (Fig. 2). Son vacunas seguras ya que pueden aplicarse a hembras preñadas y animales inmunosuprimidos ya que no tienen riesgo de provocar enfermedad o afectar al feto. Se necesitan dosis repetidas para logara una mejor protección (Fig. 3)

El punto crítico es la correcta inactivación, respetando concentración, tiempo y temperatura. Una inactivación excesiva puede ocasionar alteraciones de los epitopes conformacionales propios del inmunógeno y esenciales para engendrar una correcta respuesta inmune, poniendo en riesgo el éxito de la vacunación.

Ventajas de los sustratos inactivos: 1. Son seguras; 2. No enferman; 3. No existe riesgo de diseminación; 4. Libres de patogenicidad residual; 5. Pueden ser aplicadas en

hembras preñadas; 6. Pueden utilizarse en especies salvajes; 7. Condiciones menos exigentes de conservación; 8. Pueden laborarse a partir de cepas muy patógenas, con los inmunógenos esenciales.

Desventajas de los sustratos inactivos: 1. Riesgo de alterar inmunógenos protectores; 2. Baja inmunogenicidad; 3. Se requieren varias dosis y adyuvantes. 4. Lenta respuesta inmune: IMAC; 5. Protección incompleta 6. Protección de corta duración.

Sustratos inactivos

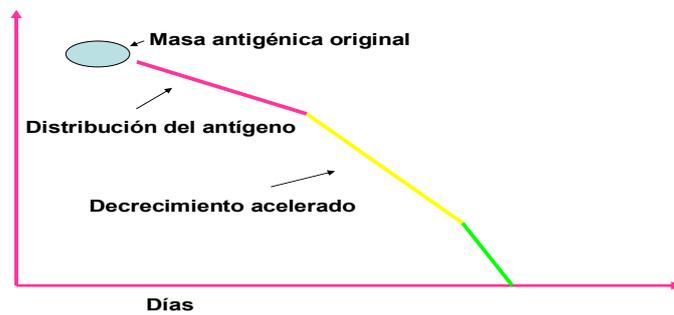


Figura 2. Vacunas inactivadas: masa antigénica y distribución en el organismo

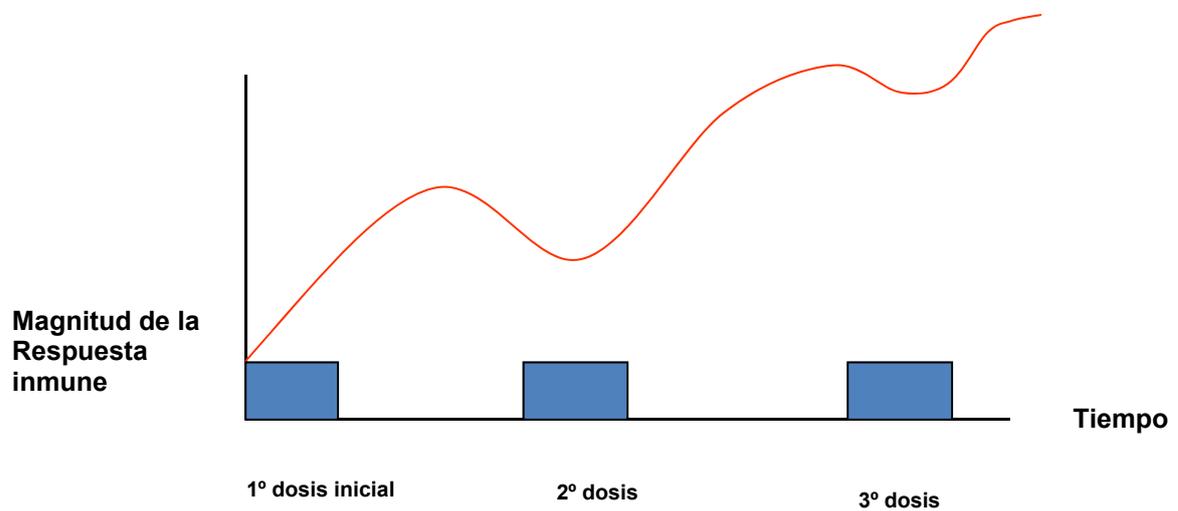


Figura 3. Dosis repetidas para mejorar la protección.

Tipo de sustrato específico

Bacterianas: el elemento inmunizante proviene de estructuras bacterianas, pudiendo estar constituido por bacterias enteras, partes de ellas, sus metabolitos detoxificados, su forma de resistencia o fracciones de las mismas.

Somáticas: el elemento inmunizante es el propio soma o cuerpo bacteriano completo. Ejemplo: *Clostridium chauvoei*, *Brucella abortus* cepa 19.

Metabólicas o toxovacunas: Vacunas elaboradas a base de los metabolitos producidos por las bacterias, es decir, sus toxinas. Generalmente son utilizadas las exotoxinas detoxificadas por medio de la acción del formaldehído. Se las denomina técnicamente toxovacunas. Ejemplos clásicos: vacuna antitetánica, antibotulínica, vacuna contra la toxina Epsilon del *Clostridium perfringens* tipo D. Debemos aclarar que estamos hablando de una vacuna en la cual se ha extraído el soma bacteriano, de lo contrario la debemos clasificar dentro del ítem siguiente.

Anavacunas: Este tipo de vacunas comprende aquellas que contienen en su composición: el antígeno vacunal propiamente dicho, por ejemplo *Clostridium chauvoei*, el medio de cultivo donde ha desarrollado y excretado sus toxinas, todo inactivado por acción del formaldehído. El ejemplo clásico de este tipo de vacuna es la triple bacteriana de uso en bovinos y lanares contra Mancha, Gangrena y Enterotoxemia. En este caso la toxina Epsilon se encuentra asociada a la masa bacteriana por eso está considerada como anavacuna. En realidad, son vacunas que llevan en su constitución excesiva cantidad de proteínas no específicas que quizás puedan interferir con una buena respuesta inmune contra los epitopes específicos responsables de la patogenicidad de los componentes. Es una estrategia muy interesante purificar estas vacunas para acotar la carga proteica y aumentar su respuesta específica.

Esporovacunas: el elemento que se inocular es la forma de resistencia de la bacteria, el esporo. El ejemplo clásico es la vacuna contra el carbunco bacteriano cepa Sterne. Estos esporos de *Bacillus anthracis*, deberán pasar, en el animal vacunado, a la forma vegetativa, producir toxina para que el vertebrado superior responda con una producción de anticuerpos específicos antitóxicos, que son los verdaderos responsables de la inmunidad en esta patología.

Víricas: El sustrato inmunizante son virus, completos o fracciones de los mismos. Podemos encontrar de acuerdo al estado biológico del sustrato inmunizante vacunas a: Virus activos: poseen capacidad de replicación o multiplicación; o a Virus inactivos: perdieron la capacidad de replicación o multiplicación por acción de agentes inactivantes.

A su vez se pueden clasificar en:

Vacunas a virus completos: el constituyente de la vacuna son virus íntegros.

Vacunas de fracciones virales: se seleccionan los epitopes responsables de algún factor de patogenicidad contra los cuales debe dirigirse la respuesta inmune específica a fin de prevenir la infección o enfermedad. Caben las mismas restricciones que en las vacunas de fracciones bacterianas (pobre inmunogenicidad, deben adicionarse adyuvantes).

Parasitarias: el sustrato vacunal son parásitos generalmente inactivados o atenuados. Algunas de estas vacunas son de dudosa eficacia, fundamentalmente en aquellos parásitos que

sufren durante su desarrollo numerosos cambios de fase en donde la inmunidad es específica para cada una de ellas.

Fúngicas: Las vacunas destinadas a la prevención de enfermedades causadas por agentes micóticos son muy poco frecuentes en medicina veterinaria.

Variedad de inmunógenos

Monovalentes. Están compuestas por un sólo tipo de bacteria o de virus o un solo subtipo. Ejemplo: vacuna antirrábica, vacuna antibrucélica, vacuna anticarbuncosa.

Polivalentes. Están compuestas por una bacteria o virus, pero que tiene distintos subtipos o serotipos. Ejemplo vacuna contra la encefalitis equina: un solo tipo de virus con dos subtipos Este y Oeste en la Argentina, y en otros países con el subtipo Venezuela. También corresponde aquí clasificar la vacuna antiaftosa.

Mixtas o asociadas. Es la aplicación de varios inmunógenos en un solo inóculo, ejemplo vacuna triple contra carbunco sintomático (mancha), gangrena, enterotoxemia. Otras combinan distintas especies de virus y/o bacterias, ejemplo, vacuna contra rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), diarrea viral bovina (BDV), para influenza (PI3), *moraxella*, *haemophilus sonnus*. O solamente distintos tipos de virus, vacuna contra distemper canino, parvovirus canino, adenovirus tipo II, y, otras más complejas asociando a los virus mencionados, bacterias como *Leptospiras*, *Bordetella bronchiseptica*, etc. Otro ejemplo: carbunco sintomático (mancha), gangrena gaseosa, enterotoxemia, con formulaciones comerciales que pueden llegar a diez inmunógenos distintos (*C. chauvoei*, *septicum*, *perfringens A*, *perfringens C*, *perfringens D*, *sordelli*, *novyii A*, *novyii B*, *novyii D*, *tetani*).

Este tipo de vacuna debe ser formulada por el laboratorio productor para que la respuesta inmune a cada agente en particular sea la adecuada para una eficiente protección. Una práctica totalmente desaconsejable es la elaboración "a campo", es decir por el vacunador en el mismo acto vacunatorio, de vacunas asociadas mezclando en la misma jeringas vacunas monovalentes, ya que es imposible realizar un perfecto balance de las concentraciones antigénicas y por ende conseguir una respuesta inmune acertada contra todas las valencias.

En uso de las vacunas mixtas o combinados depende del criterio del médico veterinario en cuanto a la situación epidemiológica de las enfermedades y el animal a vacunar.

Previo a la primovacunación es importante realizarse las siguientes preguntas:

- 1.- ¿Es estrictamente necesario la aplicación de una vacuna compuesta por un gran número de inmunógenos?
- 2.- ¿Es el momento adecuado para la aplicación de este tipo de vacuna?
- 3.- ¿Cuál es el objetivo de la aplicación de este tipo de vacuna?

En ciertos casos podría ser aconsejable el uso de vacunas mono o polivalentes en primovacunación y luego emplear vacunas combinadas. Ejemplo: ¿No será prudente aplicar vacunas

más focalizadas en las enfermedades que causan serios problemas, distemper, parvovirus, en una primera instancia; luego realizar los refuerzos correspondientes y después de que tenemos una sólida inmunidad contra esas patologías, aplicar la vacuna combinada que el profesional crea conveniente?

Las vacunas combinadas o mixtas deben poseer un perfecto balance de sus inmunógenos de manera tal que la capacidad de impacto de cada uno de ellos sobre el sistema inmune implique la respuesta de éste en forma acertada y eficiente contra cada componente, con una respuesta igual o superior, a la que entregaría una vacuna monovalente contra cada inmunógeno.

Vacunación simultánea: es la aplicación en el mismo momento, en el mismo acto vacunatorio de dos o más vacunas distintas, administradas en forma separada y en lugares diferentes. Ejemplo en el mismo acto, aplicar vacuna contra carbunco bacteridiano y en forma separada brucelosis o aftosa. Pueden realizarse cuando estudios previos demuestran la correcta respuesta inmune para cada uno de los inmunógenos. Este tipo de vacunaciones deberían realizarse luego de que estudios hayan probado que la respuesta inmune contra cada inmunógeno es igual o superior a la que induciría una vacuna monovalente.

Finalidad

Profilácticas: se aplican con el objeto de prevenir la aparición de una determinada enfermedad. Comprende a la mayoría de las vacunas. Su uso es programado, de acuerdo a planes de vacunación establecidos para cada especie y para cada situación epizootiológica.

Metafilácticas: se define, en términos generales, la metafilaxis como aquella medicación oportunamente aplicada a un grupo de animales con el objeto de minimizar o eliminar la aparición esperada, inminente o ya declarada, de una determinada enfermedad. La aplicación metafiláctica de una vacuna comprende la vacunación de un grupo de animales componentes de un rodeo en donde se ha detectado la aparición de un foco de una enfermedad, o bien la aparición de la misma en un rodeo contiguo. El ejemplo paradigmático es la denominada “vacunación en anillo”, donde se vacunan animales cercanos a la aparición del foco realizando la misma en forma concéntrica, es decir, comenzando con los animales más alejados de la zona donde hizo la aparición la enfermedad, y acercándose progresivamente y lo más rápidamente posible, al foco del brote. Esta metodología fue muy utilizada ante la aparición de casos de aftosa. Puede aplicarse a cualquier patología, carbunco, mancha, gangrena, etc.

Terapéuticas: cuando la vacuna se aplica con el objeto de curar una enfermedad. El ejemplo más difundido es la aplicación de autovacunas.

Especificidad del inmunógeno

Homólogas: el inmunógeno es el mismo, convenientemente acondicionado, que el agente etiológico de la enfermedad. Ejemplo: vacunas contra distemper, parvovirus, carbunco sintomático, etc.

Heterólogas: el agente inmunizante es distinto al agente etiológico de la enfermedad. Su uso se fundamenta en que el antígeno vacunal comparte determinantes antigénicos o epitopes con el agente etiológico, provocando una respuesta inmune “cruzada” con aquél. Algunas vacunas heterólogas presentan ventajas con respecto a las vacunas homólogas, citando como ejemplo la vacuna antisarampionosa de uso humano aplicada para prevenir en etapas muy tempranas de la vida del cachorro el distemper, ya que no es prácticamente interferida por los anticuerpos maternos que el cachorro pudo haber adquirido a través del bajo pasaje placentario en esta especie (5%) y fundamentalmente a través del calostro.

Vía de aplicación

Naturales: la vía de aplicación son las mucosas (oral, nasal o conjuntival) y el estado biológico debe ser activo o vivo. Al simular la entrada del agente como ocurre en la infección natural, estas vacunas tienen la capacidad de inducir la producción de IgA secretoria, previniendo la posterior infección del animal. Pueden ser de uso individual o masivo sobre todo en aves (vía nasal por aerosoles o vía oral en agua de bebida).

Parenterales: la vía de aplicación es subcutánea, intramuscular o intradérmica. El estado biológico puede ser vivo o muerto, generalmente inducen la producción de IgM o IgG circulantes y si bien no previenen la infección, impiden el desarrollo de la enfermedad.

Importancia o necesidad de aplicación

Vacunas core o centrales: son las vacunas destinadas a la prevención de las enfermedades causantes de mayor mortalidad en la especie, en una determinada edad; también se consideran vacunas centrales aquellas destinadas a prevenir enfermedades zoonóticas o aquellas que son obligatorias por disposiciones gubernamentales. Ejemplo de estas vacunas son rabia, parvovirus, distemper canino, aftosa, etc.

Vacunas periféricas: son todas aquellas vacunas que deben o pueden aplicarse además de las centrales. Es requerida su aplicación, solamente, en aquellos animales cuya ubicación geográfica, ambiente local o estilo de vida los pone en riesgo de contraer infecciones específicas. Ejemplo de estas vacunas son: tos de las perreras, adenitis equina, salmonelosis en bovinos, etc.

No recomendadas: son aquellas vacunas que si bien existen en el mercado, no es recomendado su uso por las organizaciones profesionales académico/científicas, por ejemplo la WSAVA (World Small Animal Veterinary Association). Este tipo de vacunas no poseen pruebas científicas suficientes que justifiquen su utilización y generalmente son de una disponibilidad o aplicación geográfica restringida.

Atributos esenciales de las vacunas

Seguridad

La seguridad es una característica esencial de las vacunas. Garantiza que la misma no producirá daño al ser inoculada.

Pureza

La vacuna debe contener exclusivamente el/los inmunógenos para los cuales fue diseñada. La presencia de agentes extraños a la formulación de la vacuna puede originar desde una enfermedad hasta interferencia en el desarrollo de la inmunidad. Una vacuna viva que no se encuentre pura puede ocasionar enfermedad por encontrarse un contaminante vivo eventualmente patógeno. Una vacuna muerta contaminada si bien no conlleva este peligro por encontrarse inactivada, la contaminación presente puede interferir con la respuesta inmune.

Potencia

Se entiende por potencia a la capacidad de una vacuna de brindar una respuesta inmune culi-cuantitativa que permita impedir la infección, enfermedad o reducir los síntomas en el caso que ésta se presente.

Se controla vacunando animales de laboratorio y midiendo la respuesta producida.

Eficacia

Se entiende por eficacia cuando la prueba se realiza, en condiciones experimentales, pero utilizando animales de la misma especie a la que se destina y evaluando la respuesta inmune producida.

Eficiencia

Se denomina eficiencia de una vacuna a los resultados obtenidos en las condiciones de uso normales, es decir a campo, y evaluando el resultado de la misma en función del índice de morbi/mortalidad post aplicación.

Efectividad

Se define con el nombre de efectividad de una vacuna, desde el punto de vista epizootiológico, a los resultados o beneficios de salud proporcionados por un programa de vacunación en

una determinada población o población objeto, cuando las vacunas son administradas en las condiciones reales o habituales de la práctica profesional o durante el desarrollo de programas específicos de vacunación.

Una buena eficacia no siempre implica una buena efectividad. La efectividad depende de diversos factores como la aceptación y accesibilidad de los productores y/o el profesional veterinario a la vacuna (recordemos la resistencia por parte de los productores, décadas atrás, a la aplicación de la antigua vacuna antiaftosa), las correctas pautas de aplicación de las vacunas, en lo que se refiere a dosis, vía de aplicación, lugar y técnica de aplicación, condiciones de salud del animal, conservación adecuada de las vacunas y manipulación correcta de las mismas durante el acto vacunal.

Condiciones que deben cumplimentar las vacunas

Protección

Capacidad de inducir una protección (Anticuerpos y/o células) que permitan al animal vacunado mantenerse libre de infección, enfermedad o reducir los síntomas en el caso de que esta se desarrolle.

Libre de efectos adversos

Las vacunas no deben ocasionar efectos adversos, salvo una pequeña inflamación en el lugar de aplicación, producto, la mayoría de las veces, de la acción del adyuvante que eventualmente contengan.

Los efectos adversos se clasifican en:

a. **Enfermedades vacunales:** se producen como consecuencia de la acción del inmunógeno. Puede estar mal inactivado o una deficiencia de la atenuación.

b. **Afecciones vacunales:** acción nociva producida por cualquier componente de la vacuna, excepto el inmunógeno. Una de las causas puede ser el adyuvante utilizado o sustancias tóxicas que se incorporaron accidentalmente a la vacuna y que no fueron detectadas en los controles de calidad.

Libre de patogenicidad residual

Las modificaciones genéticas producidas que permiten atenuar la patogenicidad de un agente infeccioso deben ser estables, permanentes que impidan la reversión hacia la forma patógena, sobre todo si son eliminadas del animal vacunado y se replican o multiplican libremente por contacto natural en otros individuos de la misma especie.

Sin capacidad de propagarse

Las vacunas activas o vivas no deben eliminarse por los emuntorios naturales. Al volcarse al medio ambiente, contaminan a éste y permiten que individuos de la misma especie contraigan la enfermedad atenuada. Hasta aquí, una ventaja. La vacuna inmuniza naturalmente a la población sin necesidad de intervención del hombre. El inconveniente radica que el pasaje indiscriminado puede ocasionar que la cepa atenuada revierta su patogenicidad, y ahora, lejos de vacunar, enferme. Por ejemplo, la vacuna contra la Peste Porcina Clásica, viva modificada adaptada a conejo, podría con los pasajes indiscriminados volver a adaptarse al cerdo y ahora producir enfermedad.

Interferencia

Los virus fundamentalmente, tienen la capacidad de interferirse por dos mecanismos distintos. Uno de ellos es la producción de interferón que bloquea el ingreso de nuevos virus a células sanas y la interferencia donde un virus es capaz de desplazar a otro y de esa manera interferir con las repuesta inmune. Por ello, las vacunas múltiples deben estar perfectamente balanceadas para permitir que la inmunidad sea la correcta para cada uno de los componentes.

Estabilidad

Las vacunas deben ser estables durante todo el período de validez asignado a la misma. La estabilidad debe comprender tanto al inmunógeno como al adyuvante si lo posee. Por ejemplo una vacuna oleosa cuyo adyuvante se separe o sea se desestabiliza la emulsión, por más que su inmunógeno específico permanezca íntegro, no debe utilizarse.

Fácil conservación

Deben ser de fácil conservación, requiriendo normalmente temperaturas de heladera, no debiendo sufrir procesos de congelamiento, ya que alteran su constitución, afectando fundamentalmente a la estabilidad de los adyuvantes, en el caso de que la vacuna los lleve incorporado en su formulación.

Las vacunas muertas o inactivadas y las toxovacunas son muchos más estables que las vacunas a sustrato activo o vivo.

Las vacunas vivas liofilizadas son más estables que las vacunas sin liofilizar. Pero aquí debemos llamar la atención, pues cuando son reconstituidas, deben ser utilizadas lo más rápido posible, preferentemente dentro de la hora o las 2 horas de haberlas hidratado. Una vez reconstituidas las vacunas liofilizadas se vuelven muy lábiles.

Administración sencilla y rápida

Si bien no hace a las características intrínsecas del inmunógeno, estas cualidades son esenciales para la aplicación y uso masivo de las mismas, es decir la aceptabilidad del producto.

Sin embargo, las vías de fácil aplicación más sencilla como por ejemplo en el agua de bebida, común en las vacunas para la especie aviar, tienen el inconveniente que la dosificación no es exacta porque depende de la cantidad de agua que ingiera cada animal.

Debemos llamar a la reflexión cuando se aplica la vacuna con jeringa automática multi-dosis donde la velocidad de aplicación impuesta por el operador puede determinar que no se aplique la dosis exacta de vacuna o que esta caiga fuera del animal por defectos de colocación de la aguja.

Costo

Las vacunas de uso veterinario deben ser de bajo costo. En animales de producción por su masividad y finalidad, la efectividad de la vacuna se mide en función de parámetros económicos (pérdida de kilos, muerte del animal, disminución de la producción de leche, disminución de la conversión alimento/kilo vivo, producción de lana). En cambio, en los animales de compañía o mascotas juega un valor afectivo.

El bajo costo no debe estar acompañado de una baja calidad.

Riesgo hacia el operador

El uso de las vacunas, idealmente, no debería representar riesgo para el operador. En general las vacunas de uso veterinario no lo conllevan. Sin embargo, la vacuna contra la brucelosis cepa 19 puede, por inoculación accidental, ser patógena para la especie humana. En caso de accidente, debe consultarse inmediatamente al médico a fin de instaurar el tratamiento correspondiente.

Pasos generales de elaboración de vacunas

1. Cepas

Las cepas a utilizar en la elaboración de vacunas deben estar perfectamente certificadas en su origen, especificando tipo, número de pasaje y libres de patógenos asociadas, si corresponde. Lo mismo debe acontecer con las líneas celulares donde se multiplicarán los virus.

La cepa original provista por un Laboratorio de referencia debe multiplicarse en el laboratorio productor y controlar que las características de la misma se correspondan con la cepa original. Se debe analizar la pureza, morfología, tinción, fase, viabilidad, ausencia de microorganismos contaminantes, producción de toxinas y toda otra prueba que cada cepa específica requiere. Estos cultivos deben ser acondicionados y guardados convenientemente para que no pierdan sus propiedades inmunogénicas ni su capacidad de multiplicarse. Este pasaje se rotula con el nombre específico de la cepa, consignando el número de pasaje que será uno más que el original. Por ejemplo si el original era *Bacillus anthracis* pasaje 4, nuestro cultivo será pasaje 5 o F1 o L1 del pasaje 4. Este primer pasaje se denomina cepa o lote semilla o máster seed y se lo debe rotular en forma progresiva cada ampolla, 1, 2, 3, etc. Se debe tratar de producir la mayor cantidad de ampollas o frascos posibles. Se las conserva en nitrógeno líquido a -196°C,

en Freezer de -80°C o liofilizados en heladera. No se recomienda el pasaje continuo a través de repiques.

El segundo paso consiste en abrir una ampolla o frasco de nuestro lote semilla y repetir el proceso anterior, con la diferencia que nuestro pasaje será L2 o F2 y se los denominará cepa o lote trabajo o máster work.

Para iniciar la producción de nuestra vacuna se abrirá una cepa trabajo, se la cultivará y amplificará hasta obtener la cantidad de masa antigénica necesaria. Se le deben realizar todos los controles específicos que aseguren la calidad de los microorganismos.

2. Sistemas y medios de cultivos

Se debe elegir el medio y sistema de cultivo que aseguren la correcta multiplicación de la cepa. Se atenderá características respiratorias y metabólicas de los microorganismos, aerobios, anaerobios, requerimientos esenciales para su crecimiento, para su esporulación o producción de toxinas.

En el caso de vacunas virales se hace necesario de encontrar la línea celular adecuada que permita su correcta multiplicación.

Los sistemas de cultivos deben ser aquellos que permitan la optimización del crecimiento garantizando sus propiedades inmunogénicas, tratando de conseguir la máxima concentración antigénica y que resulte lo más económico posible, ya que una característica importante es que las vacunas sean baratas para permitir su utilización masiva.

Podemos dividirlos los sistemas y medios de cultivo en:

Medios de cultivos: son soluciones de nutrientes adicionados de agar (sólidos) o líquidos.

Sistemas de cultivo

Estáticos: colocados en recipientes que permanecen asentados sobre una superficie fija.

Agitados: son medios líquidos que se colocan sobre plataformas oscilantes o con movimientos rotatorios denominados agitadores o shaker. Esta agitación origina una mayor oxigenación del medio y como consecuencia de ello un mayor desarrollo y concentración del elemento sembrado. Se utilizan en microorganismos aeróbicos.

Aireados: se colocan dispositivos en los medios líquidos que permitan insuflar aire filtrado estéril para aumentar la oxigenación del mismo.

Aireados y agitados: son los clásicos fermentadores donde se combinan la aireación con un sistema de agitación que permitan una mejor distribución y disolución del gas (aire) en el líquido.

Roller: son sistemas de cultivo de virus donde las células en vez de ser cultivadas en forma estática donde forman una monocapa bajo la superficie cubierta por el medio de cultivo, se colocan en botellas redondas que son ubicadas en aparatos denominadas rolleras donde las botellas, redondas a diferencias de las cultivo para monocapas que son rectangulares, giran permanentemente sobre su eje y permiten que el medio de cultivo bañe toda la superficie interna de las mismas y las células se fijen y multipliquen en toda la superficie de la botella en lugar

de solamente en la parte inferior del sistema estático, y determinan una concentración viral mucho más importante.

Líneas celulares: son líneas de células de origen generalmente de tumores que tienen la capacidad de multiplicarse prácticamente en forma indefinida. En estas líneas celulares se elaboran la mayoría de las vacunas de uso corriente. Por ejemplo, rabia, parvovirus, distemper, aftosa.

Microcarrier: se utilizan en vacunas víricas donde se colocan pequeñas esferas de material inerte que permite que sobre el mismo se fijen células y así aumentar la cantidad de las mismas y así obtener mayor masa viral.

Animales vivos: vacuna Fuenzalida Palacios contra la rabia que se multiplica en cerebro de ratón lactante. Otro ejemplo vacuna contra la Peste Porcina clásica lapinizada donde el virus se multiplica en conejos.

Huevos embrionados de aves: se inocula el virus y se multiplica. Ejemplo vacuna contra influenza.

Cultivos primarios de células: se extraen generalmente de huevos embrionados y se multiplican in vitro. Tienen el inconveniente de que no perduran durante muchos pasajes. Por ejemplo elaboración de vacuna contra encefalitis equina en fibroblastos aislados de embrión de pollo. Un párrafo especial merece el recordatorio del antiguo método de elaboración de vacuna antiaftosa donde el virus se multiplicaba en epitelio lingual bovino que se mantenía en supervivencia y se infectaba luego con el virus.

3. Controles de calidad y estandarización del sustrato específico

Los procesos de obtención del sustrato antigénico requieren la utilización del medio y sistema de cultivo adecuado como asimismo la incubación a la temperatura apropiada y durante el tiempo necesario.

Una vez obtenida la masa antigénica se hace necesario el control de la misma.

Pureza: debemos en primer lugar certificar que el producto que ha desarrollado corresponde solamente al elemento que intentamos reproducir.

Identidad: debemos establecer fehacientemente por diversas pruebas que efectivamente el producto obtenido corresponde por sus características a la cepa original.

Fase: en ciertas vacunas como brucelosis, carbunco bacteriano es importante que se encuentre el microorganismo en la fase adecuada, lisa para *Brucella abortus* cepa 19 y rugosa para *Bacillus anthracis* cepa Sterne.

Producción de toxinas: en el caso de las toxovacunas es necesario valorar la cantidad de toxina producida a partir de la cual, post inactivación, se elaborará la vacuna.

4. Recolección/ obtención del inmunógeno específico:

El inmunógeno obtenido en el proceso de cultivo debe ser obtenido lo más puro posible para destinarlo a la elaboración de la vacuna. Si se ha utilizado un medio de cultivo sólido se debe arrastrar la pátina bacteriana por lavados sucesivos con pequeñas cantidades de solución salina.

na bufferada. Si el microorganismo se desarrolló en un medio líquido, según la vacuna a elaborar puede ser recolectada incluyendo el medio de cultivo o bien separando los gérmenes por decantación mediante agregados de agentes aglutinantes (carboximetilcelulosa) o por centrifugación. En el caso de las anavacunas se procede a inactivar el cultivo, más el medio de producción más las eventuales toxinas que en él se han liberado.

Para el caso de toxovacunas (tétanos, botulismo, enterotoxemia) deben eliminarse los somas bacterianos y proceder a inactivar las toxinas.

5. Determinación de la concentración del microorganismo o agente vacunal

Una vez finalizada la etapa de multiplicación del inmunógeno se debe cuantificar la cantidad obtenida del mismo. Para ello se utilizan distintas técnicas según el elemento a medir. Para bacterias vivas o esporos se utiliza el conteo viable; para bacterias muertas por nefelometría; para virus se determina la concentración viral por determinación del título infectante; la cantidad de toxina producida se puede establecer por inoculación a animales o métodos inmunoserológicos. También pueden utilizarse en otros tipos de vacunas métodos que cuantifiquen la cantidad de proteína producida.

6. Inactivación

La inactivación es un proceso que solo se utiliza para las vacunas muertas o inactivas. Obviamente este paso no se realiza en las vacunas vivas o activas. Una vez que se ha determinado la calidad y concentración del agente vacunal, en caso de las vacunas muertas, deben someterse al proceso de inactivación.

Métodos físicos: por calor: ej. 60°C en agitación continua. Por luz ultravioleta: ej. Vacuna anti-rábica CRL. La luz ultravioleta produce una doble ligadura a nivel del ácido nucleico del virus.

Métodos químicos: se utilizan sustancias químicas como por ej. beta propio lactona, aziridinas, formol. En la práctica son métodos combinados físico-químicos donde se coloca la vacuna a una determinada temperatura y durante un tiempo establecido. En muchos casos, al terminar el periodo de incubación, es necesario neutralizar el agente químico inactivante para que no siga agrediendo y pueda modificar al agente vacunal.

La inactivación es un paso crítico en la elaboración de las vacunas muertas. Una falla en este paso accidentes vacunales ya que el agente etiológico se encuentra activo e infectante. De no detectarse esta falla en los controles de calidad, la vacuna lejos de proteger, produciría la enfermedad. Un exceso en el proceso de inactivación puede ocasionar desnaturalización del inmunógeno y una pobre o nula respuesta inmune específica.

Para asegurar la calidad de la vacuna y que los procesos fueron realizados correctamente se deben realizar los controles de calidad previa a la formulación.

7. Controles de calidad en el proceso de elaboración

La calidad de un producto final solo se asegura con la validación y control de los productos intermedios. Es el único mecanismo que permite obtener un producto final de óptima calidad.

Todo proceso que se desvíe de su estándar o que no cumpla con los mismos debe ser automáticamente rechazado, aun existiendo posibilidades de corregir sus defectos en pasos ulteriores

Control de esterilidad: se realiza en vacunas inactivadas o muertas. Se siembra el material en medios de cultivos que permitan el desarrollo de bacterias aerobias, anaerobias y hongos, saprofitas o patógenas y por lo tanto se deben cultivar a 37°C y 22°C durante un período de 14 días. Los medios utilizados más comunes son el Caldo Tripteína Soya, Caldo Tioglicolato, Caldo Tarozzi enriquecido, Caldo Saboureaux y placas de Agar Tripteína Soya. En caso de vacunas virales pueden sembrarse medios para detección de Micoplasmas. No se debe producir desarrollo de gérmenes.

Control de pureza: se realiza en vacunas vivas. Es igual al control de esterilidad con la salvedad que sólo debe desarrollar el microorganismo con el cual vamos a elaborar la vacuna.

Control de inocuidad: el control de esterilidad asegura que no hay microorganismos vivos, pero no certifica la inactivación de toxinas o la presencia de otro tipo de sustancias tóxicas. Para ello es necesario proceder a la inoculación de animales de laboratorio como ratones y/o cobayos. Se inoculan por vía subcutánea y se los observa por 14 días. Al cabo del periodo de incubación no deben aparecer alteraciones a nivel del sitio de la inoculación, ni generales ni obviamente producir la muerte del animal. En algunas vacunas en función de la bioética los animales son reemplazados por cultivos celulares que permitan certificar la ausencia de ciertas toxinas.

Control de seguridad general o toxicidad inespecífica: Se realiza de la misma manera que el control de inocuidad pero los animales se inoculan por vía intraperitoneal.

Control de inocuidad en vacunas víricas inactivadas: además del control anteriormente descrito, se neutraliza el agente inactivante y el material resultante de la cosecha viral se inocula a un cultivo celular apto para la multiplicación del virus en estudio. Se realizan tres pasajes ciegos como mínimo luego de un periodo de incubación de 72 hs en cada pasaje, no debiéndose registrar alteraciones en el crecimiento celular.

8. Estandarización

Método por el cual se determina la concentración del inmunógeno en la vacuna madre, producto del cultivo concentrado, purificado activo o inactivo. Es necesario para poder realizar la formulación y que la vacuna terminada contenga la cantidad adecuada de inmunógeno para producir inmunidad. Por ej. 10.000.000 de esporas carbuncosas por mililitro de vacuna. A continuación se describen diferentes métodos para distintos estados del sustrato vacunal.

Conteo viable: es el método utilizado para la estandarización de vacunas bacterianas vivas. El protocolo y la fórmula utilizados nos da a conocer la cantidad de bacterias por mililitro que obtuvimos de la producción del inmunógeno vacunal. Se realizan diluciones seriadas y la dilución adecuada se siembra en placas para contabilizar las colonias que desarrollan. Cada colonia se origina a partir de un microorganismo, de manera que multiplicando el número de colonias por la inversa de la dilución y por el factor de corrección para

llevar el volumen a 1 ml obtenemos el número de gérmenes viable por mililitro de vacuna. La fórmula utilizada es la siguiente:

N° de colonias x Inversa de la dilución x factor de corrección = número de esporas por ml.

Título viral: este es el método utilizado para vacunas a virus activo. Se realizan diluciones y se inoculan a placas conteniendo la línea celular a la cual está adaptada. El título viral es la inversa de la última dilución donde se registra actividad viral (por ejemplo efecto citopático, muerte celular).

Método nefelométrico u opacimétrico: se utiliza solamente en vacunas a bacterias muertas y se basa en la opacidad que presenta esa suspensión bacteriana. A mayor opacidad mayor concentración.

Escala de Mc Farland: escala patrón de precipitado de cloruro de bario. Colocando cantidades variables preestablecidas de ácido sulfúrico y cloruro de bario en 10 tubos de vidrio se elabora una escala que va del tubo N° 1 que representa la opacidad de 300 millones de gérmenes/ml al tubo N° 10, último de la escala, correspondiente a 3.000 millones de gérmenes/ml.

Para realizar la estandarización se toma un tubo similar (en grosor de vidrio y diámetro) al utilizado para confeccionar la escala y se compara la opacidad de la vacuna con el tubo a cuya concentración la queremos llevar. Se va agregando solución fisiológica hasta igualar opacidades y se determina cantidad de inmunógeno y diluyente necesario para la concentración buscada. Solo debe ser utilizada para vacunas muertas. No es apta para vacunas vivas porque se cometen errores importantes al contar como vivas, bacterias que están muertas.

Nefelómetros: antiguamente llamados a los turbidímetros y espectrofotómetros utilizados para determinar la concentración de bacterias muertas con una mayor exactitud comparada a la anterior donde la lectura se realiza a ojo desnudo.

Floculación: prueba de precipitación utilizada para estandarizar toxovacunas. La cantidad de inmunógeno de estas vacunas se cuantifica en Lf (límite de floculación) determinado por la reacción de floculación.

9. Formulación

Una vez que la/las valencias o inmunógenos han aprobado los controles de calidad y se ha determinado su concentración en la solución madre, se formula la vacuna. La formulación consiste en adecuar la concentración del inmunógeno a la cantidad establecida para asegurar una concentración capaz de inducir una respuesta inmune adecuada, ya sea por normas específicas de producción de esa vacuna, o por pruebas realizadas que aseguren que esa concentración provoca una respuesta inmune adecuada, o la establecida por bibliografía específica sobre el tema y publicada por organismos reconocidos, según sea el caso.

La formulación implica una serie de cálculos para lograr un producto final con la concentración adecuada de inmunógenos, adyuvantes, conservantes (fenol, thimerosal) y diferentes excipientes.

10. Envasado

Consiste en dispensar la vacuna en los envases finales en los que se va a distribuir. Debe producirse el envasado en áreas estériles con todo los cuidados necesarios para asegurar que la misma no se contamine con agentes extraños.

11. Rotulado

El rotulado de las vacunas está normado por la Autoridad Sanitaria de cada país. Es muy importante que el profesional veterinario sepa “leer” (interpretar) acertadamente el rótulo. Esta lectura permitirá al profesional elegir adecuadamente la vacuna a aplicar según las necesidades del caso, de la situación epidemiológica y de las condiciones del organismo receptor. Debe contener toda la información necesaria desde la fórmula, adyuvantes, dosis, refuerzos, vía de aplicación, fecha de elaboración, fecha de vencimiento, temperatura máxima y mínima de conservación, precauciones y reacciones adversas que la misma puede producir y tratamiento a aplicar en estos casos. Si eventualmente puede presentar riesgos para la salud humana, los teléfonos de los centros toxicológicos a donde se puede recurrir.

12. Controles de calidad a realizar a la vacuna terminada

Una vez finalizada la elaboración de la vacuna se deben realizar los controles de calidad finales. Para realizar estos controles se debe aplicar una fórmula de muestreo que indicará la cantidad representativa de frascos de vacuna del lote que se deberán testear.

13. Esterilidad o pureza

Se realiza de la misma forma ya descrita en los controles previos a la formulación.

Inocuidad: se realiza de la misma forma ya descrita en los controles previos a la formulación.

Seguridad: se realiza de la misma forma ya descrita en los controles previos a la formulación.

Potencia: las pruebas de potencia o actividad de una vacuna se realizan a fin de determinar si es capaz de brindar protección contra la enfermedad para que fuera diseñada. Se realiza en animales de laboratorio o animales de la especie destino, según protocolo de la vacuna. Si bien la prueba pueda dar una idea primigenia de la actividad de la vacuna, la especie, la vía de inoculación y la vía de desafío muchas veces no coinciden con la realidad de la aplicación de la vacuna y la patogenia de la enfermedad.

Existen diversas maneras de realizarlas.

Pruebas directas: se vacunan los animales y se los desafía con el agente etiológico contra el cual debe proteger la vacuna.

Pruebas indirectas: se vacunan los animales y se toman muestras de suero a efectos de valorar anticuerpos vacunales.

El suero de los animales vacunados se enfrenta in vitro con al agente etiológico, se incuba y luego se inocula a un animal de laboratorio sensible. Se determina ausencia o manifestación de enfermedad. Esta prueba se denomina seroneutralización.

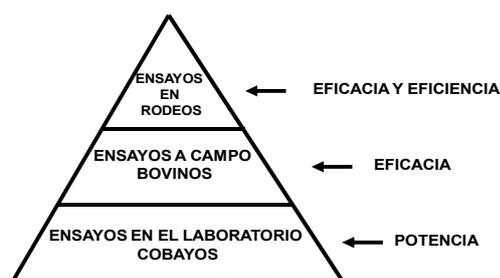
En el caso de vacunas virales, se puede realizar pruebas de seroneutralización, ELISA, inhibición de hemaglutinación, inmunofluorescencia.

14. Controles de calidad externos al laboratorio

Es necesario que la vacuna elaborada, previo su liberación al mercado, sea evaluada por laboratorios externos para confirmar su calidad. En la República Argentina, este rol lo cumple el SENASA.

El primer responsable de realizar las pruebas de efectividad de las vacunas es el laboratorio productor. Si analizamos la cantidad y tipo de pruebas de actividad realizadas a las vacunas observamos una pirámide donde en la base, la mayoría de las pruebas se realiza en animales de laboratorio y luego en forma decreciente encontramos ensayos en bovinos a campo en forma experimental y luego el análisis de la eficacia y eficiencia de las vacunas en los rodeos y en programas de control y erradicación respectivamente.

Una vez analizada la vacuna en el laboratorio productor es importante que un tercero ajeno al mismo, realice los ensayos de calidad, en nuestro caso los realiza SENASA, y por último y según el caso se realizan controles por organismos Internacionales.



Representación gráfica de la distribución de los controles a lo largo del proceso de producción de una vacuna.

Cuando se solicita información a un laboratorio productor sobre los controles de calidad a que somete sus vacunas es importante analizar una serie de parámetros: 1- especie utilizada en los controles. Debe ser la misma a la que se destina la vacuna; 2- tipo de control. Si es un ensayo a campo a nivel experimental seguramente los animales estarían debidamente desparasitados, alimentados, protegidos de la intemperie, situaciones estas que generalmente no se condice con la de los rodeos donde se aplicará la vacuna. 3-situación geográfica. 4- estrategia de elección de los animales: grupo etario, seleccionados al azar o se eligieron los mejores alimentados, más fuertes; 5. grupo testigo: es importante que la prueba incluya testigos donde podemos observar la diferencia de comportamiento de los vacunados con los testigos; 6- prueba utilizada para evaluar la respuesta vacunal; 7-Condiciones de bioseguridad: cuando las pruebas involucran el desafío de los animales con el agente etiológico patógeno; 8- método indirecto utilizado para dosaje de anticuerpos: no todas las pruebas serodiagnósticas pueden ser interpretadas de la misma manera.

Es importante verificar que la prueba se realizó bajo el sistema de doble ciego, es decir que el operador que aplico la vacuna o el placebo y el que realiza la descarga o verificación de formación de anticuerpos no conozca con cual grupo está trabajando. Y por último que los resultados sean sometidos a estudios estadísticos.

15. Liberación al mercado

Una vez aprobada la vacuna se libera al mercado siendo necesario que el laboratorio elaborador/distribuidor tenga un sistema de trazabilidad que permita el seguimiento de la eficiencia de la misma o bien ante la aparición de insucesos.

Respuesta inmune a las vacunas

La respuesta inmune a vacunas depende fundamentalmente del estado biológico de las mismas. Independientemente del estado del sustrato, todos los inmunógenos vacunales (activos o inactivos/ vivos o muertos) son detectados a través de sus PAMPs (por su sigla en inglés de patrones moleculares asociados a patógenos) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR por su sigla en inglés) presentes en las células que intervienen en la etapa de reconocimiento de la inmunidad innata, células presentadoras y procesadoras de antígeno, así como epiteliales, endoteliales, células cebadas entre otras que se encuentren en el punto de inoculación de la vacuna. Se activan las diferentes vías de señalización asociados a PRR desencadenando una respuesta inmune innata que activara y modulará la respuesta inmune adaptativa con el objetivo de dejar memoria protectora. Las vacunas vivas o activas modificadas o atenuadas replican en el animal vacunado estimulando una respuesta inmune adaptativa completa, tanto celular (Linfocitos T CD8 citotóxicos como linfocitos T CD4 colaboradores) como humoral (activación de los linfocitos B, diferenciación a células plasmáticas y síntesis de anticuerpos específicos, procesos modulados por ciertas subpoblaciones de los linfocitos T CD4 colaboradores) con la consiguiente diferenciación a células de memoria de aquellas células de la inmunidad adaptativa activadas. Una vacuna inactivada o muerta da solamente una respuesta de tipo humoral y deja memoria. La vía de administración de la vacuna también condiciona el tipo de respuesta inmune. Las vacunas aplicadas por vía parenteral inducen una respuesta celular, linfocitos colaboradores y respuesta humoral representada por anticuerpos circulantes con función opsonizantes, neutralizantes y activadores del sistema del complemento y células de la inmunidad que presenten receptores Fc para cada isotipo. La secuencia de aparición e isotipos se grafican en la figura 4. Las vacunas de aplicación local, como las de vía oral o intranasal, inducen la síntesis de IgA secretoria con función neutralizante evitando la adhesión de los patógenos a las células epiteliales en la puerta de entrada (Fig. 5).

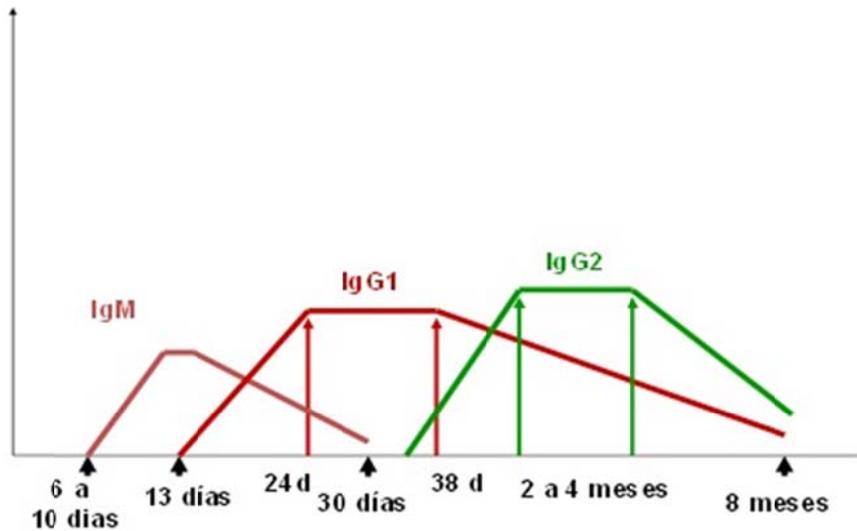


Figura 4. Evolución del título de anticuerpos en las vacunas aplicadas por vía parenteral

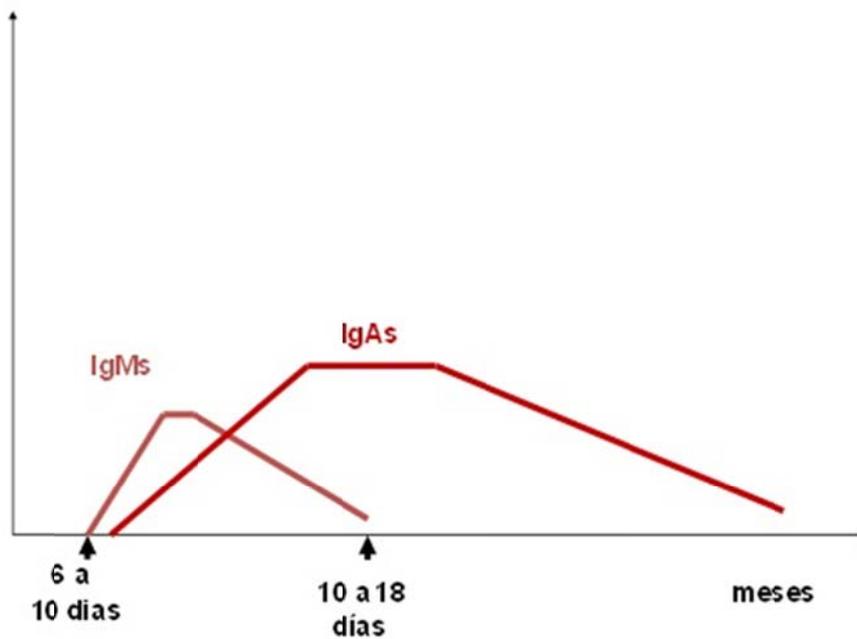


Figura 5. Evolución del título de anticuerpos en las vacunas aplicadas por vía de las mucosas

Cuando se vacuna una población no todos los individuos reaccionan de la misma manera. Cuando se realiza una evaluación y se la traslada a un gráfico de coordenadas, se observa que entre alrededor de un 5-8% de los animales reacciona de una manera muy pobre. Un porcentaje similar de los individuos reacciona a la misma vacuna produciendo alto título de anticuerpos. El resto de la población, entre un 80-85%, lo hace de una manera adecuada. Por otra parte cada vacuna tiene un coeficiente de conversión diferente rondando en promedio, las buenas vacunas, en un 80%. De manera que para poder lograr una buena inmunidad poblacional, es necesario vacunar el mayor número de individuos posibles (Fig. 6).

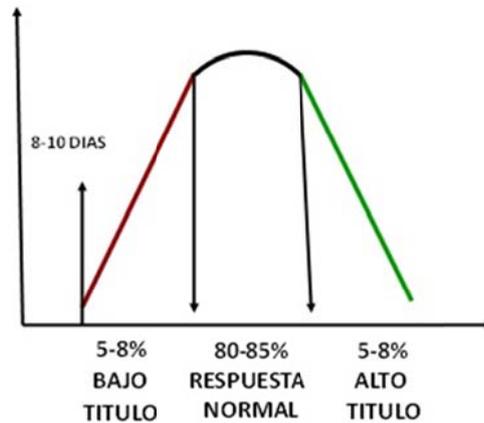


Figura 6: Curva de protección en animales vacunados.

Accidentes vacunales

Son resultados indeseables pero posibles después de una vacunación. Son consecutivos al acto de la vacunación y se traducen en efectos locales, o generales de aparición inmediata o tardía. Se clasifican en:

Afecciones

Son las producidas por el inmunógeno vacunal. Las causas pueden ser la reversión del poder patógeno en una vacuna atenuada, fallas en la inactivación de una vacuna muerta, transmisión de un virus adventicio, etc.

Fallas

La vacuna no protege contra el agente, las causas son inherentes a la vacuna (mala calidad por falta de controles, insuficiente inmunógeno, atenuación excesiva, emulsiones inestables), al vacunador (no ser profesional veterinario idóneo, no vacunar a la totalidad de la población, no respetar edad de vacunación o los intervalos previstos entre dosis, no vacunar hembras pre-servicio contra enfermedades que afectan al recién nacido, Fallas en la conservación y almacenamiento de las vacunas. etc) y al vacunado (actividad insuficiente del sistema inmune del animal vacunado debida a parasitosis, mala alimentación animales, enfermedades recurrentes, anticuerpos maternos).

Lesiones

Son las que resultan del acto vacunal relacionadas con los excipientes y adyuvantes de la vacuna. Estas sustancias pueden desencadenar reacciones locales en el lugar de la aplicación, reacciones de hipersensibilidad tipo I, II, III y IV; trastornos de la gestación y alteraciones de la producción en la explotación lechera.

Duración de la inmunidad

En términos inmunológicos, la duración de la inmunidad, es el período en el que los efectores y/o la memoria inmunológica persisten con capacidad para prevenir la infección o la enfermedad cuando el animal es expuesto al agente etiológico en condiciones naturales.

Pruebas para predecir el estado inmune

Pueden utilizarse diferentes test que permitan evaluar la presencia de células sensibilizadas específicas, o bien dosaje de anticuerpos circulantes.

La inmunidad secretoria, Ig. A secretoria, presente en las mucosas es mucho más difícil de determinar.

La ausencia o presencia de anticuerpos circulantes no asegura que el animal se encuentre susceptible a la infección. No en todas las enfermedades la presencia de anticuerpos se correlaciona con la protección. En ciertos casos como en parvovirus canino y en rabia se han puesto a punto pruebas que correlacionan el título del suero con la protección.

La ausencia de anticuerpos o células específicas efectoras presupone necesario la revacunación del mismo.

Rutas de aplicación

Debe utilizarse la indicada por el laboratorio productor. La aplicación por una vía distinta puede provocar enfermedades o anular la vacunación (por ejemplo vacunas termosensibles).

Referencias

- Abbas, A.K, Lichtman, A.H, Pillai S. (2014). Cellular and Molecular Immunology. 8ª edición. Philadelphia, USA; Elsevier Saunders.
- Day MJ. & Schultz RD. (2011). Veterinary Immunology Principles and Practice. London, UK; Manson Publishing.
- Fiordalisi, M.N, Lim, L.C.L, Kane KL, Folds JD. (1999). Active and passive immunization. En: Topley & Wilson. 1999. Microbiology and Microbial Infections. Bacterial infections, 9th edition. Philadelphia, USA. Ed. William J Hausler Jr-Max Sussman. pp 107-119.
- Gutiérrez Pabello J.A. (2010). Inmunología Verterinaria. Mexico DF; Ed. Manual Moderno.
- Hadler SC, Redd SC y Sutter RW. Immunoprophylaxis of viral diseases. En: Topley & Wilson. 1999. Microbiology and Microbial Infections. Bacterial infections, 9th edition. Philadelphia, USA. Ed. William J Hausler Jr-Max Sussman. pp 973-988.

- Hunter P. Vaccination. (1997). The Control of Animal Diseases in South Africa. London, UK; Promedia Publications.
- Roth, JA. (2004). Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 5^{ta} Edición, Tomo 1 (OIE). p 634. Cap. 1.1.7.
- Manual de Vacunas de Latinoamérica. 2005. Asociación Panamericana de Infectología. RR Donnelley Moore. pp. 1-32.
- Morrow, J.W. (2012). Vaccinology: principles and practice. London, UK; Ed Wiley-Blackwell.
- Orenstein W, Picazo J (eds.). Vacunas. 2009. 2^{da} Edición. Buenos Aires. pp 1-121.
- Pandey R. (2011). Veterinary Vaccines (Progress in Vaccinology). Berlín; Ed Springer.
- Pennimpede EF, Gómez CM, Stanchi NO. 2004. Introducción a la Inmunobiología. La Plata; Editorial de la Universidad de La Plata (edulp) pp 345-653.
- Sánchez-Vizcaíno J.M. (2010). Curso de Introducción a la Inmunología Porcina. 3^{ra} Edición. Madrid. <http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/index.htm>
- Tizard, I.R. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8^{va} Edición. Philadelphia, USA; Ed Elsevier Saunders.

CAPÍTULO 2

Vacunas de Nueva Generación en Veterinaria

Eduardo Mortola

Introducción

Las vacunas que se vienen utilizando tradicionalmente en medicina veterinaria se basan en el empleo del agente patógeno completo atenuado o inactivado, o en algunos casos parte del microorganismo o sus productos, pero no incluyen microorganismos a los que se han introducido modificaciones genéticas diseñadas en el laboratorio.

Desde la época de Jenner, pasando por Louis Pasteur, quien inició sus trabajos sobre vacunas, sin conocer nada de la inmunología - *de hecho los anticuerpos fueron descubiertos recién treinta años después* - y hasta un par de décadas atrás, el enfoque para el desarrollo de vacunas fue casi estrictamente microbiológico. Los microbiólogos identifican primeramente al agente que causa la enfermedad infecciosa y lo atenúan para que cuando se administre como vacuna genere una inmunidad protectora en el individuo sin causarle enfermedad. Interesantemente, este enfoque, que se utilizó durante más de 100 años, no ahonda en los principios por los que estos microorganismos atenuados provocan *-una inmunidad protectora-* en el hospedador receptor de la vacuna. Los posteriores estudios en vacunología, centraron la atención no sólo en el microorganismo en cuestión, sino en la identificación de los antígenos protectores, los adyuvantes necesarios para provocar inmunidad protectora y los tipos de células B, células T y otras respuestas inmunológicas necesarias para proporcionar una protección eficiente. De este modo, la biología de la vacuna sufrió un giro desde un enfoque más o menos empírico hacia uno altamente inmunológico, en el que día a día se trata de delinear una serie de vías fascinantes.

En las últimas décadas los avances en el conocimiento de la respuesta inmune y las nuevas tecnología de ingeniería molecular y ADN recombinante conjuntamente con el conocimiento más profundo del agente patógeno, llegando a la propia estructura molecular permitieron identificar en un gran número de agentes infecciosos, las proteínas de interés inmunológico y producirlas en diferentes sistemas; o bien, eliminar aquellas proteínas que no representan interés inmunológico y/o puedan estar relacionadas con la virulencia. De esta manera, se desarrollaron vacunas de nueva generación como alternativa de mejorar las tradicionales, o para aquellas enfermedades para las cuales no existían vacunas. Estas vacunas no están elaboradas con el agente infeccioso completo y permiten, entre otras ventajas, la diferencia-

ción serológica de los animales vacunados frente a los infectados mediante simples técnicas inmunológicas de laboratorio.

La estrategia para la obtención de estas vacunas de nueva generación, se basa en la identificación de la proteína o proteínas de un agente infeccioso, capaces de inducir una respuesta inmune protectora, de forma semejante a la que induciría el agente infeccioso completo; o bien, en la identificación de aquellas proteínas que no tienen interés inmunológico ni replicativo o que pudieran estar relacionadas con la virulencia y no necesarias para la vacuna. De esta manera y mediante técnicas de ingeniería genética, se pueden seleccionar los genes correspondientes, clonarlos y expresarlos en diferentes sistemas o eliminarlos mediante una delección selectiva. Otra variante de este sistema sería, una vez identificada la proteína de interés inmunológico, la obtención de la proteína o proteínas por síntesis proteica.

Otra característica importante en la estrategia de obtención de estas nuevas vacunas, es la posibilidad de incorporar, además de las proteínas de interés inmunológico, secuencias de otros antígenos que puedan aumentar la estimulación de la respuesta inmune.

En base a las diferentes metodologías utilizadas (recombinación, delección génica, etc.) o al tipo de producto obtenido (proteínas inactivas, vacunas atenuadas-delecionadas, recombinantes vivos) se pueden clasificar las vacunas de nueva generación, en replicativas y no replicativas. Las replicativas incluyen vacunas vivas delecionadas y a recombinantes vivos; las no replicativas, vacunas a subunidades, vacunas a proteínas sintéticas, vacunas anti-idotipo y vacunas a ADN. Existen actualmente a nivel experimental vacunas comestibles.

Vacunas marcadas o vacunas DIVA

El uso del término DIVA (por su sigla en inglés de “Differentiating Infected from Vaccinated Animals”) *-diferenciando animales infectados de vacunados-*, está ampliamente aceptado en la actualidad, no solo en veterinaria sino también se aplica al campo de la salud pública.

Las vacunas DIVA surgen por la necesidad de establecer medidas de control sanitario animal para erradicar enfermedades, evitando la eliminación de animales no infectados, así como para controlar la posible entrada de enfermedades en países donde las mismas están erradicadas.

En las vacunas tradicionales, la respuesta inmune conferida (principalmente de anticuerpos) es en la mayoría de los casos indistinguible entre animales vacunados y animales infectados. Esta situación dificulta el control y erradicación de las enfermedades en producción animal, además de dificultar el movimiento y exportación de animales y sus productos entre países.

Las vacunas DIVA son capaces de inducir una respuesta inmune protectora eficaz, son más seguras que las vacunas clásicas y permitir la discriminar serologicamente entre los animales vacunados y aquellos infectados.

El carácter marcador viene dado por el hecho de que estas vacunas tienen como mínimo, una proteína antigénica o epítipo menos que el agente infeccioso en cuestión. De esta forma

la vacuna induce una respuesta inmune sólo frente a los antígenos o epitopes que contiene. Por el contrario, los animales que no están vacunados, pero sí infectados por el agente, inducirán una respuesta inmune frente a todos los epitopes del agente infeccioso. Así pues, resulta esencial que una vacuna DIVA o marcadora se utilice en conjunción con una prueba de diagnóstico diferencial.

Dentro de las estrategias utilizadas para crear una vacuna DIVA se encuentran principalmente las vacunas delecionadas, vacunas a subunidades, vacunas ADN, las vacunas basadas en vectores virales que no replican de forma eficiente (defectivas en replicación), las vacunas peptídicas, etc.

Vacunas vivas delecionadas o deleteadas

El avance tecnológico y la ingeniería molecular permitieron el desarrollo de vacunas deleteadas, mediante la identificación en el genoma de ciertos genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogenicidad del agente. De esta manera, se crearon en el laboratorio virus y bacterias con modificaciones genéticas donde los genes relacionados con la patogenicidad se encuentran delecionados (eliminados) para conseguir cepas atenuadas de manera estable y segura. Sin embargo, conservan su poder inmunogénico intacto, o sea, su capacidad de generar una respuesta inmune protectora. Las mismas técnicas se utilizan para virus y bacterias, pero en el caso de las bacterias es más complicado debido al gran tamaño y complejidad de su genoma. La primera vacuna creada de este tipo es la de la pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky que afecta el ganado porcino con severas consecuencias. La segunda enfermedad controlada mediante esta estrategia es la de la rinotraqueítis infecciosa bovina. Ambas enfermedades son ocasionadas por virus muy parecidos del género Herpesvirus. Dentro de los grandes retos que existen actualmente en el desarrollo de este tipo de vacunas es la de la fiebre aftosa.

En la vacuna delecionada contra la enfermedad de Aujeszky o *-vacuna gE negativa-* se eliminaron los genes que codifican para las glicoproteínas gE relacionada con la patogenicidad de la enfermedad. Las vacunas producidas con estas cepas inducen buena protección en los animales, pero no inducen anticuerpos frente a la proteína gE, por lo que los animales vacunados con ellas pueden ser diferenciados de los animales infectados, ya que el virus que produce la enfermedad sí presenta la proteína gE.

Los cerdos vacunados con una vacuna deleteada gE negativa desarrollarán anticuerpos frente a todas las proteínas de virus menos contra la gE, mientras que en los animales infectados se detectarán anticuerpos contra todas las proteínas del virus incluyendo la gE. Estos anticuerpos *-anti-gE-* son diferenciados por una técnica de ELISA indirecto. Así pues, se utilizarán dos pruebas de ELISA indirecto. Uno de ellas detecta anticuerpos solo frente a la proteína gE (que será negativo en aquellos animales vacunados), y el otro detecta anticuerpos contra el virus completo (cerdos infectados los que serán positivos también a gE).

Vacunas vivas recombinantes

Las vacunas recombinantes vivas están basadas en la utilización de un microorganismo (virus o bacteria) que actuaría como vector y que por técnicas de ingeniería genética se le adicionó uno o varios genes que codifican proteínas responsables de inducir una respuesta inmune de protección en el animal destino de la vacuna. La estrategia general es expresar antígenos protectores en un vector replicativo, de esta forma, este nuevo microorganismo recombinante puede utilizarse como vacuna (Figura 1).

Este tipo de vacuna presenta 4 características esenciales:

- Se incorpora uno o varios genes que codifican para una o varias proteínas inmunogénicas en el genoma de un microorganismo atenuado que se denomina vector.
- El vector al replicarse en el organismo receptor, expresa los genes propios y el que produce la proteína incorporada.
- La proteína incorporada se presenta al sistema inmune en su superficie celular.
- Induce respuesta inmune humoral y celular.

El microorganismo que se ha utilizado más frecuentemente como vector de expresión ha sido el virus de vaccinia, ya que dispone de genoma amplio y bien estudiado lo que permite insertar genes extraños sin alterar su replicación. El inconveniente de este vector es que al ser un virus capaz de infectar la mayoría de las especies animales, incluso al hombre, se obtendría una vacuna viva no específica de especie y por lo tanto susceptible de inmunizar a cualquier animal. Otro vector empleado es la familia de los poxvirus. Un ejemplo de este caso es el empleo del poxvirus de canario que lleva adicionados genes que codifican dos proteínas inmunogénicas del virus del moquillo canino. El poxvirus del canario es inocuo para el perro pero gracias a la expresión de las proteínas del virus del moquillo protege al animal de esta enfermedad.

Son vacunas que siendo vivas o replicativas son altamente seguras.

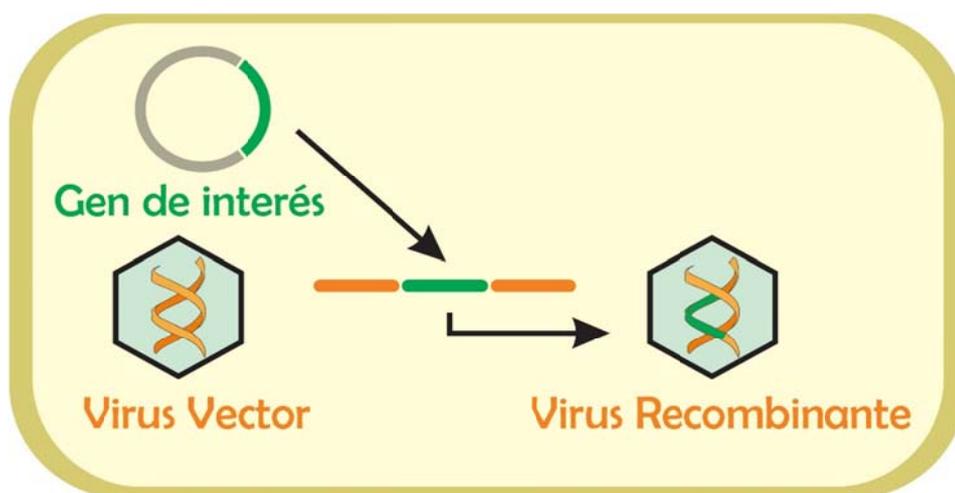


Figura 1. Estrategia de producción de Vacunas Vivas recombinantes (Imagen de elaboración propia).

Vacunas a subunidades de proteínas recombinantes

Esta técnica se basa en la producción de una proteína o proteínas de un agente infeccioso sin necesidad del propio microorganismo, mediante técnicas de ingeniería genética se aísla el o los genes en cuestión que se incorporan a los llamados vectores de expresión que pueden ser bacterias, virus o levaduras y de esta manera estos vectores expresan una o de varias proteínas del agente infeccioso. Se produce uno o varias proteínas, en cantidad, de un agente infeccioso, que se purifican y pueden ser utilizadas como vacuna de subunidades.

Los vectores de expresión más utilizados son las bacterias, fundamentalmente el *E. coli*, las levaduras como la *Pichia pastoris* y sobre todo virus de insectos llamados baculovirus. Las bacterias presentan problemas para glicosilar adecuadamente los polipéptidos producidos, por lo que normalmente, las proteínas obtenidas, presentan menor capacidad inmunogénica. La elección de uno u otro vector depende muchas veces de la calidad y tipo de proteína que se necesita como inmunógeno.

Actualmente, también se incorporaron las plantas como sistemas de expresión de proteínas heterólogas.

Para realizar este tipo de tecnología necesitamos previamente conocer en detalle la estructura de virus, sus diferentes proteínas, la función de cada una de ellas en la multiplicación viral y fundamentalmente su genoma. Brevemente los pasos de esta metodología son (Figura 2):

- Identificar y obtener el gen que codifica para la proteína de interés inmunológico e insertarlo en un plásmido.
- Introducir el plásmido en un vector de expresión (*E. coli*, Baculovirus).
- Aislar y multiplicar el vector de expresión recombinante que contiene el gen de interés.
- Multiplicar el vector recombinante en el sistema apropiado para producir la proteína de interés.
- Purificar la proteína de interés para emplear como posible inmunógeno.

Lamentablemente, en muchos casos, la respuesta inmunitaria obtenida con una vacuna de subunidades es inferior a la obtenida con la vacuna convencional.

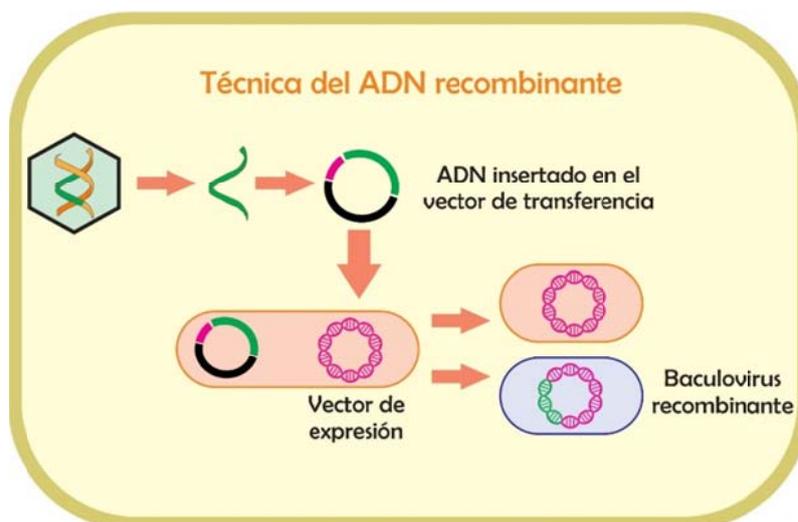


Figura 2. Estrategia de producción de vacunas a subunidades en Baculovirus (Imagen de elaboración propia).

Vacunas a proteínas sintéticas

Las vacunas sintéticas consisten en una copia de la secuencia genotípica que codifica para la proteína antigénica del patógeno y su posterior síntesis por medio de métodos químicos. Los polipéptidos que copia la secuencia primaria de aminoácidos de los epítopes de un microorganismo, estrechamente relacionados con la respuesta inmune protectora.

Mediante ingeniería genética y la utilización de anticuerpos monoclonales, es posible identificar fragmentos con capacidad inmunogénica y posteriormente obtenerlos sintéticamente haciéndolos que adopten una configuración espacial para ser reconocida por el sistema inmunológico del huésped (Figura 3). Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica radica en la dificultad en mimetizar la conformación tridimensional nativa del epítope, lo que deriva en una dificultad en el reconocimiento antigénico por parte de las células inmunes y por tal motivo una falta de respuesta.

Este tipo de vacunas tuvo un escaso desarrollo y sólo a nivel experimental.

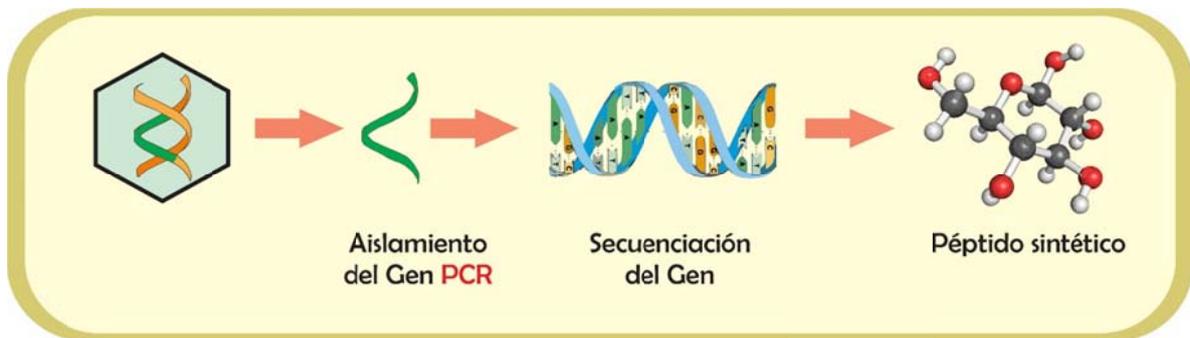


Figura 3. Estrategia de producción de vacunas a proteínas sintéticas (Imagen de elaboración propia).

Vacunas anti-idiotipo

El concepto básico de este tipo de vacunas es la utilizar en lugar de un antígeno, un anticuerpo que reproduzca la morfología del antígeno y que por lo tanto induzca una respuesta inmune, en forma inocua.

Para producirlas, el primer paso es obtener un anticuerpo contra un determinado antígeno, denominado idiotípico, se le purifican las regiones variables de las inmunoglobulinas, que poseen la estructura inversa del epítope inductor y se inoculan en un animal para estimular la producción de anticuerpos anti-idiotipo. Estos anticuerpos tendrán la misma estructura que el antígeno original y por tanto servirían como antígenos para inmunizar frente al primer antígeno que inicio la cadena (Figura 4). Los anticuerpos anti-idiotipo pueden ser policlonales o monoclonales y podrían ser utilizados como vacunas, especialmente en aquellos casos en los que es muy difícil obtener las proteínas, codificar los genes correspondientes a las proteínas de interés inmunológico o cuando el agente patógeno sufre continuas mutaciones.

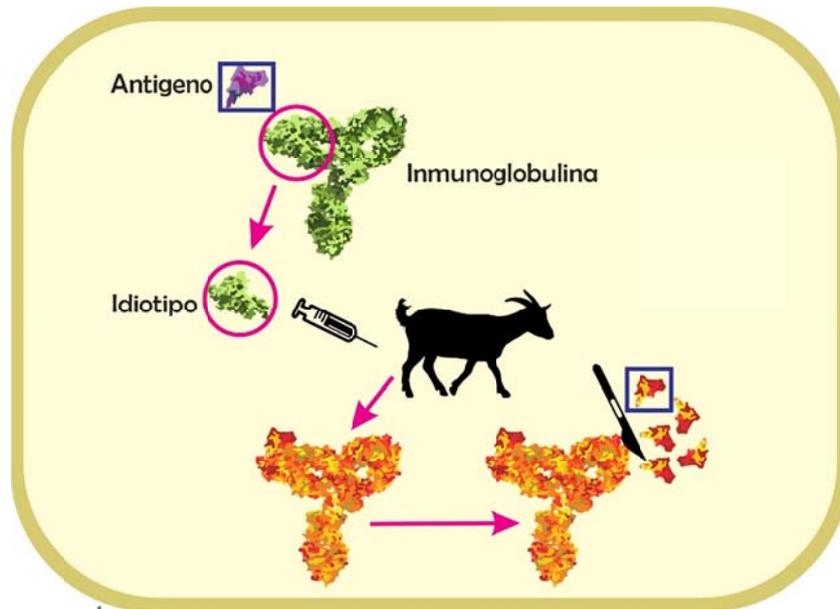


Figura 4. Estrategia de producción de vacunas anti-idiotipo (Imagen de elaboración propia).

Vacunas a ADN

En este tipo de vacunas, se caracteriza por la aplicación al huésped directamente una porción de ADN purificado que contenga el gen de la proteína que induce la respuesta inmune. Esta respuesta es de tipo humoral y celular al igual que las vacunas vivas atenuadas.

Para este tipo de vacuna, llamadas también vacunas a ADN desnudo, se emplean plásmidos en los que se introduce el gen o genes del patógeno contra el que se pretende inmunizar y que codifican para las proteínas inmunogénicas responsables de inducir una respuesta inmune protectora. Cuando se inyecta el plásmido en el músculo o en la piel, las células del paciente vacunado captan ese plásmido y lo incorporan en su núcleo, permitiendo la expresión del gen foráneo y produciendo la proteína recombinante. Las propias células del cuerpo se convierten en fábricas de vacunas, creando los antígenos necesarios para estimular el sistema inmunitario, simulando una infección natural (Figura 5). En medicina veterinaria hay muy pocas vacunas a ADN, algunos ejemplos actuales son la vacuna de ADNp contra el Virus del Oeste del Nilo, la vacuna de ADNp contra el virus de la necrosis hematopoyética del salmón de criadero y la vacuna de ADNp que codifica para el melanoma canino.

En Medicina Veterinaria, se han desarrollado algunas vacunas de ADN. En vacuno, se han constituido vacunas a partir del gen de la glicoproteína D de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina 1 (IBR-1), el gen que codifica para la proteína G del Virus Sincitial Respiratorio Bovino (BRSV) y para la proteína E2 del Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV).

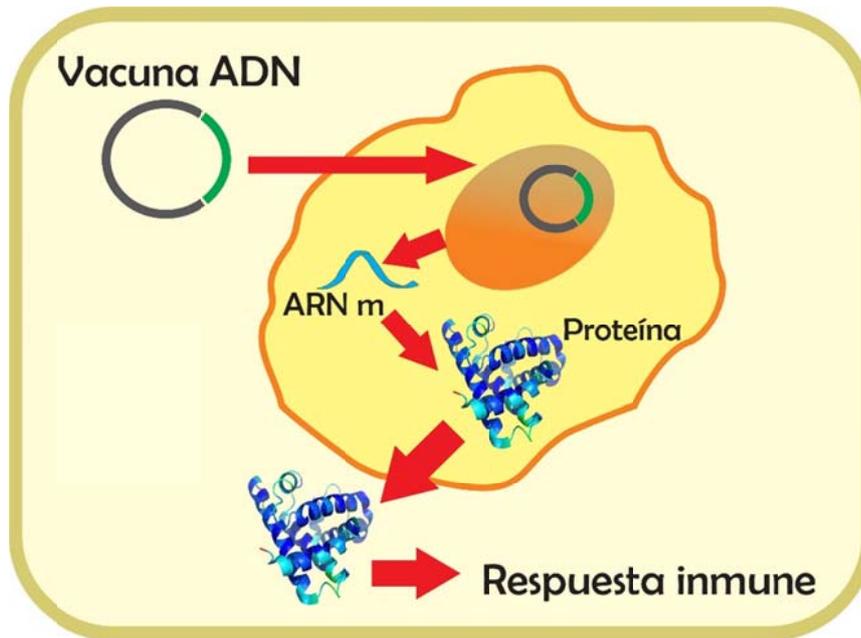


Figura 5. Estrategia de producción de vacunas ADN (Imagen de elaboración propia).

Finalmente, se pueden mencionar las vacunas comestibles, se encuentran a nivel experimental, se trata de plantas a las que se les introdujo, mediante técnicas de ingeniería genética, un gen portador de la información necesaria para producir en su interior una proteína antigénica. Estas plantas, de carácter transgénico, pues se modificaron genéticamente, pueden ser cultivadas de manera natural y consumidas como vacunas comestibles por humanos y animales. Tienen la ventaja de su administración oral, que por ello da lugar a una respuesta inmunitaria mucosa. Su inconveniente es que los antígenos de la vacuna pueden sufrir una degradación en el estómago y el intestino antes de desencadenar la respuesta inmunitaria.

Referencias

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2014). Cellular and Molecular Immunology. 8ª edición. Philadelphia, USA; Elsevier Saunders.
- Amon, R y Ben-Yedidia, T. (2003). "Old and New Vaccine Approaches, International Immunopharmacology". ELSEVIER. Revista internacional de inmunofarmacología. Vol. 3.pp 1195-1203.
- Berrios Etchegaray, P. (2001). "Vacunas no tradicionales y nuevas tecnologías en su preparación". Revista TecnoVet. Vol.3, N°2.
- Borja Zamfir GM, Ramírez, OT y Lara AR (2014). "Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente. Bio Tecnología", 17 (3), pp 87-109.
- Casto Gálvez DA. et al. (2000). "Inmunogenicidad y contagiosidad de una vacuna de virus vivo atenuado contra la enfermedad de Aujeszky en cerdos". Vet. Mex., 31 (3) pp 345-356

- Cho, WM. (2003). "Subunit Protein Vaccines: Theoretical and Practical. Considerations for HIV-1". *Current Molecular Medicine*. Vol. 3, N° 3. Pág. 243-263.
- Day MJ. & Schultz RD. (2011). *Veterinary Immunology Principles and Practice*. London, UK; Manson Publishing.
- Fiordalisi MN, Lim, LCL, Kane KL, Folds JD. Active and passive immunization. En: Topley & Wilson. 1999. *Microbiology and Microbial Infections. Bacterial infections*, 9th edition. Philadelphia, USA. Ed. William J Hausler Jr-Max Sussman. pp 107-119.
- Flores-Mendoza L, Silva-Campa E y Hernández J. (2010). Ed. 1. Cap. 21. Pp .259-269. *Manual Moderno. "Inmunología Veterinaria"*.
- Ford, RB. (2004). "La tecnología de vacunas recombinantes". InfoMerial. Información técnica para el médico veterinario.
- Garmory, S.G, Perkins DS, Philpot JR y Titball WR (2005). "DNA Vaccines for Biodefense". *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1343-1361.
- Gutiérrez Pabello, JA. (2010). *Inmunología Verterinaria*. Mexico DF; Ed. Manual Moderno.
- Hadler SC, Redd SC y Sutter RW. Immunoprophylaxis of viral diseases. (1999). En: Topley & Wilson. 1999. *Microbiology and Microbial Infections. Bacterial infections*, 9th edition. Philadelphia, USA. Ed. William J Hausler Jr-Max Sussman. pp 973-988.
- Hunter P. Vaccination. (1997). *The Control of Animal Diseases in South Africa*. London, UK; Promedia Publications.
- Huygen, K. (2005). "Plasmid DNA vaccination". *Microbes and Infection*. 7: 932-938.
- López, M., et al. (2004). Ed: Genoma Epaña. Spainfo, S.A. "Vacunas de nueva generación. Informe de vigilancia tecnológica"
- Loza-Rubio, E. y Gómez-Lim, M.A. (2006). " Producción de vacunas y otros compuestos biológicos en plantas transgénicas". *Vet.Mex*. N°37. Vol 4.
- Manual de Vacunas de Latinoamérica. (2005). Asociación Panamericana de Infectología. RR Donnelley Moore. pp. 1-32.
- Morrow JW. (2012). *Vaccinology: principles and practice*. London, UK; Ed Wiley-Blackwell.
- Mota-Sánchez, J. (2009). " Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria". *Salud Pública Mex*; 51 (3), 463-469.
- Orenstein W, Picazo J (eds.). *Vacunas*. (2009). 2^{da} Edición. Buenos Aires. pp 1-121.
- Pandey, R. (2011). *Veterinary Vaccines (Progress in Vaccinology)*. Berlín; Ed Springer.
- Pastoret, P.P; Blancou,J; Vannier, J; Verschueren. (1997). *Veterinary Vaccinology*. Elsevier Ed.
- Pennimpede EF, Gómez CM, Stanchi NO. (2004). *Introducción a la Inmunobiología*. La Plata; Editorial de la Universidad de La Plata (edulp) pp 345-653.
- Plotkin SA. (2011). "History of Vaccine Development". Springer New York.
- Rodas JD. 2006. "Vacunas antivirales de última generación". *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.*, Vol.19:1.
- Roth, JA. (2004). *Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health*. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 5^{ta} Edición,Tomo 1 (OIE). p 634. Cap. 1.1.7.

- Sánchez-Vizcaíno, JM. (2010). Curso de Introducción a la Inmunología Porcina. 3^{ra} Edición. Madrid. <http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/index.htm>
- Sánchez-Vizcaíno JM. (2004). Ed: 2^a. Cap. 9. "Curso de introducción a la inmunología porcina".
- Sánchez-Vizcaíno, JM. (2007). Cap. 25. Pág. 513-535. Pearson Prentice Hall. "Manual de Inmunología Veterinaria".
- Tizard, IR. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8^{va} Edición. Philadelphia, USA; Ed Elsevier Saunders.
- Toledano Fonseca, M. (2013). "Vacunas comestibles". Revista de Química de la Universidad Pablo de Olavide. Nº 12.
- Traavik T. (2007). "GE Vaccines: Benefits and Risks". Conference. Troms Biosafety Course.
- van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Gerdts, V.; Loehr, B.I.; Pontarollo, R.; Rankin, R.; Uwiera, R. and Babiuk LA. (2000). "Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals". Advanced Drug Delivery Reviews.43: 13-28.
- Weiner DB y Kennedy RC.(1999). "Genetic Vaccines". Scientific American's.
- Zanetti F, Rudak L, Micucci M, Conte Grand D, Luque A, Russo S, Taboga O, Pérez O. Calamante, G. (2012). "Obtención y evaluación preliminar de un virus canarypox recombinante como candidato a una vacuna antirrábica". Revista Argentina de Microbiología., 44: 75-84.

CAPÍTULO 3

Adyuvantes y sistema inmune

Alejandra E. Larsen, Javier H. Barragán

El objetivo de la vacunación es la generación de una inmunidad activa artificial en respuesta a un inmunógeno capaz de dejar protección contra la infección o la enfermedad. Para lograr este objetivo a menudo se requiere la adición de un adyuvante. Los adyuvantes tienen como función amplificar la respuesta inmune contra el inmunógeno vacunal que acompañan en la formulación de una vacuna son sustancias que modulan y mejoran la inmunogenicidad del inmunógeno vacunal. La palabra adyuvante se desprende de la palabra latina *adjuvare*, que significa "ayudar". Fueron descritos por primera vez hace más de 90 años por Ramón que las definió como "sustancias utilizadas en combinación con un antígeno específico que produce una respuesta inmunitaria más robusta que el antígeno solo". Ramón en 1925 demostró su acción en la búsqueda de sustancias que mejoraran la respuesta humoral en caballos que utilizaban para producir sueros hiperinmunes anti toxinas diftérica y toxina tetánica. Desde que Glenny y Freund desarrollaron los primeros adyuvantes, el hidróxido de aluminio y las emulsiones de Freund, respectivamente, que se utilizan hasta ahora, el primero como adyuvante de la mayoría de las vacunas de uso veterinario y humano (para estos últimos en estos hay un gran desarrollo y utilización de adyuvantes de nueva generación), el segundo se utiliza para la demostración de potencia y toxicidad así como para la producción de sueros hiperinmunes. Los adyuvantes se han obtenido de forma empírica pero las crecientes exigencias de las agencias reguladoras y los avances más recientes alcanzados en la inmunología básica y la toxicología han propiciado que en la actualidad exista una tendencia al diseño racional de los candidatos a adyuvantes, lo cual permitirá lograr productos cada vez más eficaces y seguros.

Los últimos avances logrados en el conocimiento de los mecanismos de la inmunidad innata y su participación en la inducción de la inmunidad específica, particularmente la descripción de los PRR (*Pattern recognition receptors*), sus ligandos y los eventos moleculares que conducen a la activación de señales intracelulares, constituyen hoy un pilar importante en el diseño de los adyuvantes sobre todo para vacunas de uso en humanos.

Normalmente no son necesarios en las vacunas vivas, pero son fundamentales en las vacunas convencionales inactivadas o las de nueva generación no replicativas. Las vacunas convencionales inactivadas tienen un inmunógeno vacunal que fue alterado en su inmunogenicidad natural por los procesos de producción (sobre todo durante la purificación) e inactivación a los que fue sometido, por lo tanto la cantidad y calidad de los PAMPs (*Pathogen-associated molecular pattern*), así como

el microambiente donde son inoculados no generan una respuesta lo suficientemente robusta para inducir una respuesta inmune de larga duración. En este sentido las vacunas de nueva generación no replicativas, sobre todo aquellas en las cuales el inmunógeno vacunal está altamente purificado, no inducen respuesta innata y por lo tanto tampoco activan la respuesta adaptativa, son vacunas que necesitan obligatoriamente ser acompañadas por un adyuvante para aumentar su eficacia. A pesar que existen muchos adyuvantes de nueva generación, muy pocos han logrado ser aprobados, por inocuos o accesibles, para suplantar a los que se utilizan normalmente en las vacunas de uso veterinario. En este tipo de vacunas el costo es un factor crítico ya que la vacunación es parte del manejo de grandes cantidades de animales, en programas de control y erradicación obligatorios en el país, donde los propietarios asumen el costo de la vacunación.

Características generales de los adyuvantes

Los adyuvantes deben cumplir con ciertas características para ser eficaces en su función (Tabla 1). Deben ser estables y seguros ya que los accidentes vacunales causados por su utilización pueden tener impacto en el crecimiento del animal, la tasa de reproducción, confort animal. No deben encarecer el producto a pesar de que su utilización abarata el costo de la vacuna ya que su adición permite incorporar menos inmunógeno vacunal a la formulación, y así alcanzar una mayor cobertura de animales vacunados.

Tabla 1: Características de un adyuvante «ideal».

Característica	Descripción
Seguro	No debe producir eventos adversos inmediatos o a largo plazo.
Composición química	Debe estar perfectamente definida.
Mecanismo de acción	Debe estar perfectamente definido.
Degradabilidad	Debe ser totalmente biodegradable.
Estabilidad	Debe permanecer químicamente estable por al menos 2 años y con poca probabilidad de variación entre lotes.
Inmunomodulador	Debe inducir una robusta respuesta inmune contra el inmunógeno vacunal, generando un alto porcentaje de protección, a bajas concentraciones de inmunógeno vacunal, en pocas dosis y por diferentes vías de aplicación.
Inmunológicamente inerte	No debe generar respuesta inmune contra sí mismo.
Eficacia	Debe presentar elevada eficacia contra cualquier tipo de inmunógeno.
Producción	De fácil preparación.
Costo	Bajo/económico.

Por lo tanto no existe un adyuvante universal por lo que deben ser elegidos de acuerdo al criterio veterinario en orden de obtener el mejor balance entre eficacia y seguridad. Existen diversas razones para incorporar adyuvantes en vacunas más allá de incrementar la inmunogenicidad del inmunógeno vacunal:

a) incrementar la respuesta inmune específica (seroconversión) en diversas poblaciones con especial interés en aquellas con reducida capacidad de inmunorespuesta, como ocurre en animales lactantes y gerontes, así como en animales inmunodeprimidos;

b) facilitar el uso de menores cantidades de inmunógeno en una vacuna y así alcanzar una mayor cobertura de animales vacunados;

c) reducir las dosis de vacunas, mejorando su adaptación a planes nacionales de control y erradicación, disminuyendo los requerimientos logísticos y mejorando el costo-beneficio, con un impacto de particular importancia en países subdesarrollados;

d) inducir respuesta inmune de memoria de larga duración.

En el siguiente cuadro se enumeran algunos de los factores que se deben tener en cuenta al elegir un adyuvante Tabla 2.

Tabla 2: Criterios para elegir un adyuvante

Criterio	Descripción
Sensibilidad de especie	Algunas especies son más sensibles que otras. Bovinos, pequeños rumiantes y aves toleran muy bien adyuvantes oleosos tipo agua en aceite, los cerdos toleran mejor el aceite en agua.
Duración de la inmunidad	Corta duración: apropiados para cría intensiva. Larga duración: apropiados para animales de compañía
Combinación adyuvante/inmunógeno	Extracto crudo: no se justifica un adyuvante oleoso. Es aconsejable hidróxido de aluminio. Proteínas altamente purificadas: necesitan un adyuvante que asegure una respuesta inmune robusta.
Respuesta vacunal efectiva	Determinar que inmunidad protectora es la adecuada (humoral o celular) según patogenia y características de la vacuna.
Vía de administración	Vía parenteral: hidróxido de aluminio, oleosos, saponinas. Vía mucosa: productos bacterianos como oligonucleótidos sintéticos que contengan CpG dinucleotidos no metilados.

Clasificación

Es muy difícil lograr una única y óptima clasificación de los adyuvantes debido a su diversidad y en muchos casos aún no se conocen los mecanismos de acción. Una clasificación se basa en la naturaleza de los adyuvantes y los divide en adyuvantes de tipo gel, agentes tensoactivos, productos bacterianos, productos basados en aceites y emulsiones, adyuvantes particulados, proteínas de fusión y lipopéptidos, a los que se suman los inmunomoduladores e inmunoestimulantes como las citoquinas y otros compuestos naturales que activan el sistema inmune innato y que no están incluidos en ninguno de los grupos anteriores.

También se los puede clasificar según qué sustancia actúa como adyuvante. Adyuvantes extrínsecos: aquellas sustancias que no tienen propiedades inmunogénicas per se, como aluminio, emulsiones, saponina. Adyuvantes intrínsecos: aquellas sustancias que, además de ser inmunogénicas, exaltan la respuesta inmune contra los otros inmunógenos formulados en la vacuna.

Según su mecanismo de acción se los puede clasificar en:

- 1) Facilitadores de la presentación de inmunógenos.
- 2) Facilitadores de co-estimulación.
- 3) Facilitadores de la polarización a Th1/Th2.

La última clasificación propuesta es según su función:

- 1) inmunopotenciadores: sustancias que incrementan la respuesta contra el inmunógeno;
- 2) sistemas de liberación: compuestos que sirven como matriz para el inmunógeno mejorando el estímulo de la respuesta inmune
- 3) inmunopolarizantes.

Mecanismos de acción

Los adyuvantes actúan de distintos modos, tienen función de vehículo específicos de delivery/entrega, o actúan como depósito en el lugar de inoculación para inducir señales de peligro o DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), generando cada uno de ellos una respuesta inmune específica.

En la mayoría de los casos los adyuvantes al ser inoculados causan algún tipo de lesión en los tejidos, favoreciendo el reclutamiento de células del sistema inmune que se activan

al reconocer patrones moleculares tanto asociados al patógeno como asociados a daño. Una vez que reconocen lo no propio y/o lo propio alterado se activa del sistema inmune innato que según la calidad y cantidad de estímulo activa y modula la respuesta adaptativa. El reconocimiento por parte de los macrófagos residentes en el lugar de inoculación induce una respuesta pro-inflamatoria que resulta en un conjunto de procesos inmunes como el reclutamiento y activación de células del sistema inmune en especial neutrófilos, monocitos y células dendríticas, durante estas procesos de activación-acción del sistema inmune algunas células son inducidas a apoptosis y otras sufren necrosis. Estos sucesos inmunes dan lugar a los signos de inflamación en el lugar de inyección, calor, dolor local, zona colorada por la hiperemia.

Extrañamente y a pesar de su utilización en billones de dosis de vacunas de uso en medicina veterinaria y en humanos todavía no está totalmente aclarado el mecanismo de acción de los adyuvantes, por el cual potencian la respuesta inmune hacia el inmunógeno vacunal que acompañan en la formulación.

Los adyuvantes tienen varias formas de actuar y en algunos desencadenan una secuencia lógica de eventos inmunes.

Actuando como señal de daño

Como se sabe, los animales domésticos, como cualquier vertebrado superior presentan un sistema inmune innato y adaptativo. La respuesta innata comienza a partir del reconocimiento de patrones moleculares altamente conservados tanto presentes en los patógenos (PAMPs) y así como moléculas resultantes del daño de tejidos propios (DAMPs). Estos patrones moleculares son reconocidos por los PRRs e informan al sistema inmune innato qué tipo de peligro tiene que afrontar y solucionar. Según la combinación de estímulos, el sistema inmune innato diferencia infección versus traumatismo, infección por microorganismos de vida intracelular versus extracelular, diferencian patógenos virales, bacterias, hongos y parásitos, con el objetivo de montar una respuesta inmune específica y adecuada para su eliminación, reparar el daño y dejar recuerdo de la misma.

La respuesta inmune adaptativa así modulada por la información del inmunógeno vacunal en combinación con el adyuvante, traducida y plasmada en el estímulo que le brinda la inmunidad innata, responde de una manera mucho más específica mediante anticuerpos y linfocitos T capacitados para reconocer secuencias cortas y específicas del inmunógeno Figura 1.

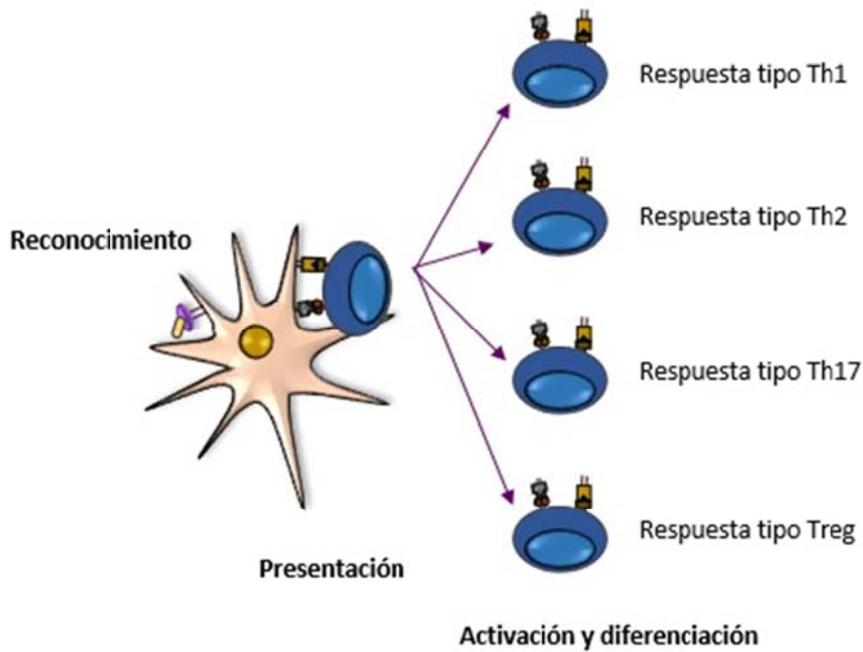


Figura 1: Secuencia de activación de la inmunidad adaptativa. En punto de inoculación de la vacuna se produce el reconocimiento de PAMPs del inmunógeno vacunal que se presentan condicionados según el adyuvante utilizado. Las células dendríticas como células procesadoras y presentadoras de antígeno son las únicas capaces de activar un linfocito T virgen, el cual se activa y prolifera en distintas estirpes celulares según el estímulo en el sitio de inoculación.

La respuesta inmune adaptativa puede tardar días o semanas en desarrollarse, periodo en el cual la inmunidad innata se mantiene activa como único medio de defensa. Como se muestra en la figura 1 la respuesta inmune resultante está determinada por el tipo de señal de daño en sí misma, y se demostró que los adyuvantes actúan como señal de daño modulando la respuesta inmune hacia el inmunógeno vacunal, resultando en una respuesta de larga duración tipo específica: respuesta Tipo Th2 (inmunidad humoral necesaria y eficaz para combatir parásitos y microorganismos de vida extracelular) o respuesta tipo Th1 (inmunidad humoral necesaria y eficaz para combatir microorganismos de vida intracelular), tipo Th17 (para inducir inmunidad en las mucosas y patógenos extracelulares) y respuesta tipo T reguladora (regulación y/o supresión de la respuesta). Por lo tanto dependiendo del tipo de inmunógeno, el microambiente donde se inocule el mismo y la duración de la estimulación inmune, la respuesta inmune puede durar mucho tiempo, dando lugar a establecer memoria inmune específica. La memoria inmune, en la cual se apoya el fundamento de la vacunación, nos asegura que en un segundo contacto con el mismo inmunógeno (ya sea vacunal o infeccioso) la respuesta sea rápida y más efectiva, tanto la respuesta efectora como la de memoria. Al vacunar a un animal estamos imitando el primer encuentro con ese patógeno pero sin enfermedad y nos asegura una memoria inmune protectora.

Actuando como vehículo de delivery

La formación de un depósito del inmunógeno vacunal en el sitio de inoculación representa una función importante de algunos adyuvantes, este efecto depot se relaciona con la liberación lenta del inmunógeno y su mejor presentación y reconocimiento por las células procesadoras y presentadoras de antígeno. La mayoría de los adyuvantes de sales de aluminio y las nano y micro partículas actúan por efecto depot. El inmunógeno es atrapado en el adyuvante y su liberación es lenta pudiendo extenderse días o semanas. En este sentido también podemos incluir a los adyuvantes oleosos agua en aceite que promueven la optimización del reconocimiento por parte de las células presentadoras de antígeno. Algunos estudios demuestran lo contrario, pero no existen los suficientes estudios para poder refutar lo explicado en este ítem.

Activación del inflammasoma

Como se explicó anteriormente, los PRR están especializados para reconocer una gran variedad de signos de daño. En las últimas décadas se describieron varias familias de PRR y entre ellos se reconocieron los NLR por su sigla en inglés de *nucleotide oligomerization domain (NOD) like receptors*, presentes en muchas células del sistema inmune y especializados en el reconocimiento de señales de daño, inclusive estímulos del microambiente que lo rodea así como estímulo microbiano. El inflammasoma pertenece a la familia de los NLRs e involucra proteínas relacionadas con el reconocimiento de las señales de daño y la subsecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-18 e IL-33. Se asocia a las sales de aluminio con este mecanismo ya que se les adjudica cierto daño de las células que están en contacto con las sales de aluminio induciendo a necrosis y/o apoptosis.

Adyuvantes como estímulo para la activación y maduración de las células procesadoras y presentadoras de antígeno

El reclutamiento de células al sitio de inoculación es de suma importancia para que lleguen las células procesadoras y presentadoras de antígeno. Macrófagos y células dendríticas reconocen y endocitan al inmunógeno vacunal, se activan y maduran rumbo a los órganos linfáticos secundarios. Luego de ubicarse en la zona T, donde los linfocitos T CD4⁺ colaboradores y CD8⁺ citotóxico reconocen sobre ellas, y en el contexto del CMH, pequeños péptidos antigénicos resultado del procesamiento del antígeno. Esto representa la señal 1 de activación linfocitaria que desemboca en la proliferación de los linfocitos vírgenes y se transforman en linfocitos efector antígeno específico que reconocen y eliminan células infectadas (linfocitos T CD8⁺ citotóxicos) y que liberan citoquinas que promueven la

diferenciación y maduración de diferentes células de la inmunidad (linfocitos T CD4⁺ colaboradores). Las señales 2 y 3 donde las moléculas de co-estimulo en combinación (señal 2) y en sinergia con las citoquinas (señal 3) modulan la respuesta inmune adaptativa para que sea eficaz y controlar el daño (inmunidad celular contra patógenos intracelulares, o inmunidad humoral para combatir a los patógenos extracelulares).

Adyuvantes más utilizados en las vacunas de uso veterinario

Emulsiones

Las emulsiones fueron descritas por primera vez en 1916 pero casi 20 años después fue Jules Freund el que desarrollo el concepto. Una emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o fase dispersante). Las emulsiones tienen 2 fases, una acuosa, la que contiene el inmunógeno vacunal, y una fase oleosa que representa al adyuvante propiamente dicho. Para estabilizar la mezcla se agregan emulsionantes también denominados surfactantes¹ que son compuestos anfipáticos, presentan una porción hidrofílica (soluble en agua) y otra hidrofóbica (insoluble en agua). Estas moléculas se alinean de tal manera que las partes hidrofílicas quedan de un lado y las partes hidrofóbica del otro lado. Según el tipo de surfactante se pueden preparar distintos tipos de emulsiones. Cuando el surfactante tiene más afinidad por la fase oleosa la emulsión es del tipo AGUA en ACEITE, y la fase antigénica está dispuesta en pequeñas gotitas dispersas en la fase oleosa. Aquellos surfactantes que tiene gran afinidad por la fase acuosa generan emulsiones del tipo ACEITE en AGUA, en este caso la fase continua es agua y la fase dispersa es el aceite. Ciertos surfactantes tienen una afinidad intermedia y generan emulsiones más complejas como AGUA en ACEITE en AGUA. La fase continua es agua, por pequeñas gotitas de aceite dispersas, que a su vez en su interior presentan pequeñas gotitas de agua que contienen al inmunógeno (Figura 2).

¹ Surfactantes: son compuestos que bajan la tensión superficial entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido

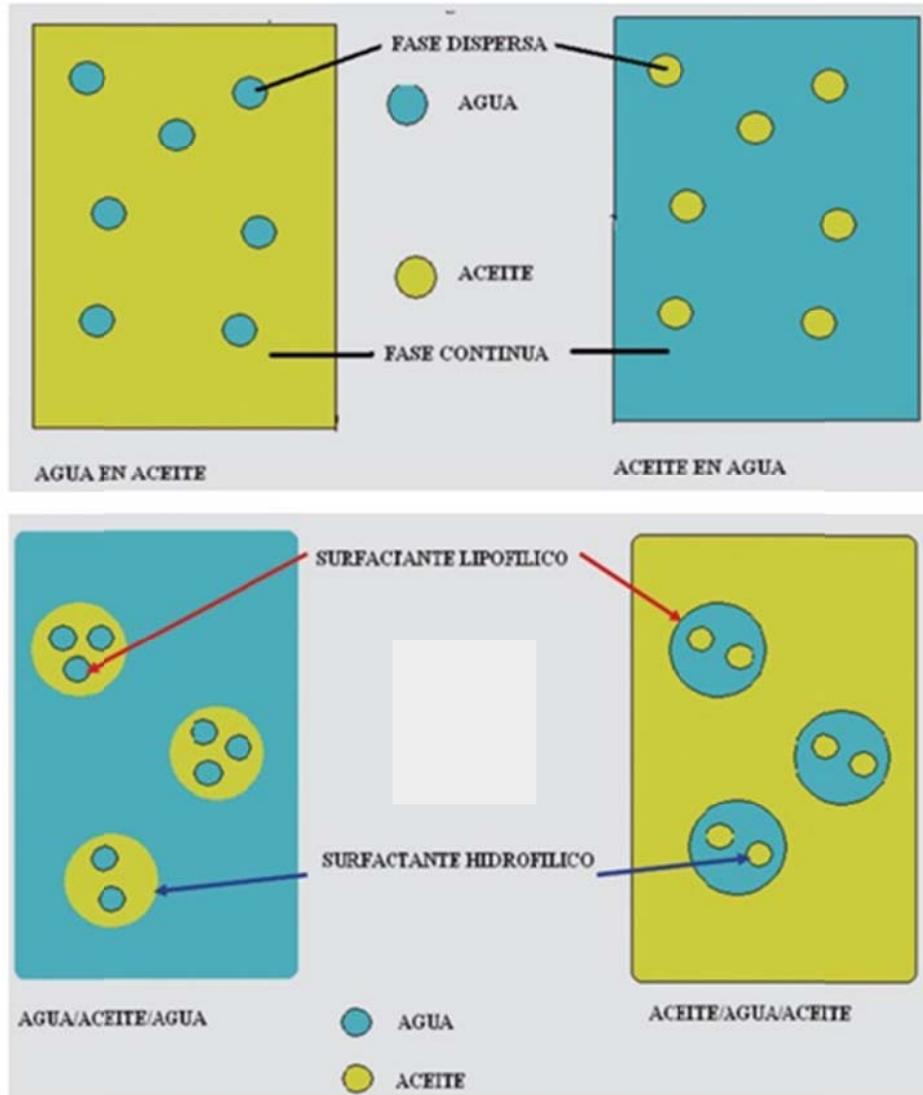


Figura 2: esquema de las distintas emulsiones y sus componentes.

Los parámetros que determinan la calidad de la emulsión como adyuvante están relacionados no solo con la capacidad de modular positivamente la respuesta inmune frente al inmunógeno vacunal, sino también está relacionado con la eficacia y la seguridad del adyuvante. La eficacia está dada por el poder de mantener estable la emulsión en sí, y los parámetros que se utilizan para establecerlo son: test de la gota, conductividad, tamaño de partícula y estabilidad a diferentes temperaturas. Por otro lado la seguridad está relacionada con la viscosidad y la capacidad de hacer daño al aplicarla.

Mecanismo de acción

Efecto deposito: según el tipo de emulsión la liberación del antígeno será más o menos lenta. Un inmunógeno sin adyuvante se dispersa rápidamente, la emulsión aceite/agua permite un ligero retardo en la liberación, pero el inmunógeno es rápidamente liberado al medio. Agua/aceite es una emulsión que libera muy poco inmunógeno o directamente nada. La capacidad de liberar o no del inmunógeno por parte de este tipo de emulsión está relacionada con la estabilidad de la misma, una vez que pierde estabilidad el inmunógeno es rápidamente liberado, aunque más lentamente que en aceite/agua. Freund determinó el efecto deposito al eliminar el inoculo del sitio de aplicación y comprobar que el efecto adyuvante continuaba. Este fenómeno puede ser explicado por la el fenómeno de microdifusión de pequeñas gotitas de aceite desde el sitio de inoculación que son drenados por linfa hacia los órganos linfáticos asociados.

Efecto protector: las emulsiones protegen a los inmunógenos de la degradación enzimática.

Efecto inmunogénico: cambian la carga externa del inmunógeno haciéndolo más inmunogénico.

Mejora el reconocimiento antigénico: induce inflamación con reclutamiento de células procesadoras y presentadoras de antígenos así como linfocitos. El surfactante mejora el reconocimiento al interactuar con la membrana celular.

Atrapamiento de linfocitos: en el linfonódulo estimula el acumulo de linfocitos retardando la recirculación y favoreciendo la asociación celular.

Los aceites que se utilicen como adyuvantes deben ser seguros. Los adyuvantes oleosos pueden inducir reacciones generalizadas como fiebre o locales como granuloma, absceso. El grado de lesión depende de varios factores como por ej. el origen. Los aceites minerales son una mezcla de diferentes carbohidratos con diferente largo de cadena de carbono, permanecen en el punto de inoculación y son progresivamente eliminados por células como el macrófago.

Emulsiones agua en aceite

Están recomendadas para bovinos y pequeños rumiantes, aves y peces. El ejemplo más paradigmático es el de la vacuna contra la fiebre aftosa, antiguamente se utilizaba como adyuvante al hidróxido de aluminio, que aunque es muy seguro no resultaba muy eficaz dado que se necesitaban mínimo 3 dosis o más por año para proteger a los animales vacunados. Actualmente se utiliza aceite mineral y se mejoró la eficacia de la vacuna teniendo en cuenta que los animales permanecen protegidos por al menos 1 año o en condiciones epidemiológicas favorables se puede extender a dos años. Experiencias en ratones han determinado que los adyuvantes tipo emulsión agua en aceite inducen una fuerte respuesta humoral a IgG2a así como una respuesta a linfocito T CD8⁺ citotóxico.

Emulsiones agua en aceite en agua

Este adyuvante tiene dos desventajas importantes, el proceso convencional de producción genera un producto no muy estable y conlleva un proceso de dos etapas que genera dificultades al momento de la formulación. Actualmente existen emulsiones agua/aceite/agua producto de un proceso de un solo paso que produce una emulsión más

estable, menos viscosa y fácil de formular. Su composición favorece una respuesta inmune rápida y de corta duración, así como de larga duración a la vez. El inmunógeno vacunal incluido en la fase acuosa externa es liberado rápidamente permitiendo una respuesta a los 4 días en la vacuna anti fiebre aftosa. La respuesta de larga duración esta mediada por la liberación lenta del inmunógeno contenido en la fase acuosa interna que es liberado lentamente como ocurre en las emulsiones agua en aceite.

Emulsiones aceite en agua

Este tipo de emulsión es muy fluida, bien tolerada e induce una respuesta inmune de corta duración. El proceso de producción es muy conveniente ya que requiere un simple mezclado de los componentes. Es una buena opción para las vacunas en cerdos que estén en la etapa de engorde ya que no produce lesiones y no causan alteraciones en la carcasa. Por sus características es muy bien aceptada para las vacunas de equinos y pequeños animales

El ejemplo más conocido de este adyuvante son el adyuvante completo e incompleto de Freund. Ambos contienen agua en mayor cantidad que aceite y un emulsificante, pero el adyuvante completo tiene bacilo tuberculoso muerto y desecado. La ventaja del adyuvante completo es la excelente respuesta inmune que induce, pero también representa su desventaja al inducir importantes reacciones adversas además de una sensibilización específica hacia el bacilo tuberculoso. Su uso está casi restringido a la primera y única inoculación en planes de hiperinmunización.

Sales de aluminio

El fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio son los adyuvantes más utilizados tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. Son muy seguras.

Presentan una estructura física heterogénea compleja a la cual se absorbe el inmunógeno mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbica. El hidróxido de aluminio a pH 7,4 presenta carga positiva y tiene afinidad por las proteínas ácidas, en cambio el fosfato de aluminio es de carga negativa y se une a las proteínas básicas.

Mecanismo de acción

Efecto depósito. Hasta hace poco tiempo se le adjudicaba el mecanismo de acción de efecto depósito, pero la mayoría de los antígenos en contacto con los fluidos intersticiales son rápidamente liberados del gel de aluminio. De todos modos el grado de absorción o atrapamiento que genera el gel de aluminio permite la liberación lenta aumentando la duración de la interacción del inmunógeno con el sistema inmune, mejorando el reconocimiento por parte de las células procesadoras y presentadoras de antígeno.

Actuando como DAMPs. También se le atribuye a las sales de aluminio el efecto de inducir la formación de ácido úrico en la célula con la aparición de DAMPs² provocando la activación de las células del sistema inmune.

También existen indicios que estimularía al inflamasoma.

Tipo de respuesta adaptativa. Las sales de aluminio se han utilizado con gran éxito en aquellas vacunas que requieren anticuerpos como mecanismo de protección. Generan una buena respuesta tipo Th2 pero tiene poco efecto sobre los linfocitos T colaboradores Th1 y los linfocitos T CD8 citotóxicos, respuesta celular requerida para proteger contra enfermedades causadas por patógenos de vida intracelular.

La seguridad de este tipo de adyuvante es considerada excelente, billones de niños y animales han sido inmunizados con vacunas que contienen sales de aluminio. Los efectos adversos serios son muy raros, aunque se han reportado reacciones alérgicas y casos de granulomas en el punto de inoculación siendo más comunes en la administración subcutánea que intramuscular.

Saponinas

Las saponinas son glucósidos obtenidos a partir de plantas, como la *Quillaja saponaria* en América del Sur. Se utiliza mucho en la industria cosmética y alimenticia como emulsificante. Varias saponinas han sido testeadas y comercializadas para el uso en veterinaria. Aunque no esté muy claro la forma de actuar, tienen función surfactante lo que facilita la penetración de las proteínas a través de la membrana generando una respuesta intracelular. También se la considera una sustancia irritante que podría estar involucrada en la generación de DAMPs.

Este adyuvante se utilizó en diferentes formatos, como extractos purificados, Quil-A (InvivoGen), QS-21 (Cambridge Biotech Corp.) pero también formando complejos con estructura tipo caja denominadas ISCOMs (*Immuno Stimulating COMplex*), se constituyen por la mezcla de colesterol, fosfolípidos y saponina, que integran al inmunógeno vacunal cuando se lo incorpora a la mezcla.

Las vacunas que se formulan con ISCOMTM han demostrado que promueven la respuesta inmune humoral y celular. Las saponinas preferidas para ser usadas en la formulación de ISCOMs son Quil A o QS21 y el esteroles utilizado es preferentemente colesterol y el fosfolípido usado es generalmente fosfatidiletanolamina.

En medicina veterinaria, la primera vacuna comercial basada en ISCOMs fue diseñada para caballos, y contiene las proteínas hemoaglutinina y neuraminidasa, provenientes de la envoltura del virus influenza. Induce una respuesta inmune de larga duración (alrededor de 15 meses), tanto celular como humoral. En rumiantes se han utilizado de forma experimental en formula-

² DAMPs: por su sigla en inglés "damage-associated molecular patterns", patrones moleculares asociados a daño, son sustancias que se liberan por células en situación de stress o en proceso de muerte. Son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR por su sigla en inglés) presentes en las células del sistema inmune.

ciones contra el virus herpes bovino tipo 1 y el virus de la diarrea viral bovina. Si bien los IS-COMs muestran una actividad adyuvante potente, poseen limitaciones como lo son su costo, dificultad de manufactura, baja estabilidad y se ha observado toxicidad y la aparición de reacciones adversas asociadas a su utilización.

Ligandos de TLR y otras moléculas pequeñas

Como se comentó los TLR son PRRs de señal capaces de reconocer estructuras conservadas que se presentan como patrones moleculares que se repiten en un grupo dado de gérmenes (PAMPs).

La identificación de estos PAMPs induce la activación de varias vías de señalización de las células inmunes y la consiguiente síntesis de efectores inmunes, moléculas co-estimuladoras y citoquinas. Ejemplo de algunos ligandos de TLR pueden ser LPS, PolyI:C, CpG ODN. La mayoría ha sido experimentalmente probada en varias especies animales como candidatos a adyuvantes. Por ejemplo los oligonucleótidos CpG han probado ser altamente eficaces en cerdos, bovinos así como en animales de experimentación como ratones, simios y monos. En algunas vacunas y en combinación con ligandos de TLR se han incluido pequeñas moléculas como péptidos antimicrobianos, y aunque no se sabe muy bien el porqué, han demostrado efecto adyuvante.

Partículas

Los adyuvantes tipo partícula han sido ampliamente estudiados. Son polímeros sintéticos o naturales con un tamaño pequeño que va de nanopartículas (50-100nm) a micropartículas (2-5 um). El mecanismo de acción está relacionado con la ventaja de vehicular y presentar en forma particulada al inmunógeno haciéndolo más fácilmente reconocible por las células procesadoras y presentadoras de antígeno. Se ha experimentado con partículas como el copolímero ácido **poli** (D,L-láctico-co-glicólico) y polifosfacenos. En medicina veterinaria, de forma experimental, micropartículas y nanopartículas han mostrado ser eficientes en la inducción de una respuesta inmune humoral y celular en diferentes especies animales.

Liposomas y virosomas

Los liposomas fueron descritos como adyuvantes hace más de 40 años. Son esferas sintéticas fosfolípicas formadas por capas de lípidos que pueden encapsular antígenos y actuar como sistemas de liberación e inmunopotenciación. Pueden ser usados como sistema de entrega para proteínas, antígenos derivados de péptidos y ácidos nucleicos que codifican antígenos.

nos (plásmidos de ADN o ARNm) o bloqueen genes objetivos (siARN). Los liposomas convencionales son capaces de liberar proteínas en los compartimentos endosomales-lisosomales favoreciendo el procesamiento de estas moléculas en el interior de las CPA y la presentación de los péptidos inmunodominantes derivados del inmunógeno, en las moléculas del complejo MHC II. Se ha observado en diversos estudios que su uso potencia tanto la inmunidad humoral y células contra antígenos proteicos y polisacáridos.

La potencia de los liposomas dependen de su tamaño, polaridad, número de capas lipídicas, carga eléctrica y el procedimiento de ensamblado. El dolor producido en el sitio de la inyección es probablemente la mayor limitación de algunas vacunas basadas en liposomas.

En medicina veterinaria los liposomas no han sido utilizados de forma masiva, algunos de los ejemplos más importantes de su uso en animales incluyen el estudio de liposomas como nuevos sistemas de entrega de terapia contra el cáncer y vacunas para perros y gatos.

Los virosomas son estructuras unilaminares compuestas por membranas lipídicas y proteínas de membranas virales constituyen partículas vacías a las que se les puede incorporar un inmunógeno y potenciar la inmunidad contra distintas formulaciones de vacunas.

Representan una nueva forma de vacunas que imitan de manera muy exitosa al virus nativo por lo que se las denomina partículas "virus-like" o similares a virus. Se generan mediante la reconstitución de la envoltura viral, sin el material genético del virus

El mecanismo de acción es la estimulación de las CPA. Se unen al ácido siálico de estas células, son endocitados y se produce la fusión del virosoma a la membrana del endolisosoma. El inmunógeno vacunal puede sufrir las dos vías de procesamiento según permanezca en el endosoma (via exógena de procesamiento) o salga del compartimento al citoplasma (via endógena de procesamiento).

En general, hasta hoy los virosomas han sido usados en medicina veterinaria y humana preferentemente con fines investigativos. Algunos de los virus estudiados son el virus de la influenza, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la enfermedad de New Castle y el virus Sendai.

Referencias

- Batista-Duharte A, Lastre M y Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. 2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;32(2):106–114
- Bernagozzi JA, Barragan JH. ADYUVANTES OLEOSOS: definición, características, tipos de respuesta inmune que engendran, reacciones adversas. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Pcia. Bs As.* 82:5969. [Url:http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/com_un_varias_especies/82-revista_cvpba_59.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/com_un_varias_especies/82-revista_cvpba_59.pdf)
- Coffman R L, Sher A, Seder RA (2010): Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33: 492–503.

- Garçon A, Leroux-Roels G, Cheng W. Vaccine adjuvants Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology CHAPTER 4 Volume 1/Issue 1/89e113
- Gerdts V, Mutwiri GK, Richards J, van DrunenLittel-van denHurk S, Potter AA (2013): Carrier molecules for use in veterinaryvaccines. *Vaccine* 31: 596–602.
- Marrack P, McKee AS, Munks MW (2009): Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*9: 287–293.
- Mutwiri G, Gerdts V, Lopez M, Babiuk LA (2007): Innate immunity and new adjuvants. *Rev Sci Tech* 26: 147–156.
- Reed SG, Orr MT, Fox CB (2013): Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* 19: 1597–1608
- Schwendener RA (2014): Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *TherAdv Vaccines* 2: 159–182.
- Takeshi Arakawa (2011) Adjuvants: no longer a ‘dirty little secret’, but essential key players in vaccines of the future, *Expert Review of Vaccines*, 10:1, 1-5, DOI: 10.1586/erv.10.140
- Volker Gerdts Adjuvants for veterinary vaccines – type and modes of action. *BerlinerundMünchener-TierärztlicheWochenschrift* 128, Heft 11/12 (2015), Seiten45–463

CAPÍTULO 4

Vacuna contra la fiebre aftosa

Alejandra Larsen

La fiebre aftosa (FA) o glosopeda es la enfermedad más contagiosa de los mamíferos biungulados. Es una enfermedad de curso agudo y a pesar de que no causa la muerte en animales adultos es responsable de grandes pérdidas económicas. Es una enfermedad que está presente en todo el mundo, pero gracias a la vacunación pudo ser erradicada en varios continentes: Europa occidental, América del Norte y Australasia.

Agente Etiológico

La FA está causada por un virus del género *Aftovirus*, de la familia *Picornaviridae*. Existen siete serotipos de virus de la FA: O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1. Como lo indica su nombre, tienen distribuciones geográficas distintas, Asia 1 y los territorios de África del Sur (SAT) tipos 1, 2 y 3. Los serotipos A, O y C son de amplia distribución mundial. La infección con un serotipo o subtipo determinado no confiere inmunidad cruzada. Dentro de los serotipos se pueden identificar muchas cepas que pueden no dar reacción cruzada con las cepas de aislamientos previos.

El virus de la FA tiene un genoma de ARN monocatenario sentido positivo. La partícula de virus se compone de una única copia del genoma encapsidado por 60 copias de las 4 proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, y VP4 de virus de la FA. Una copia de VP1, VP2, VP3, VP4 y proteínas forma un protómero; 5 protómeros conforman un pentámero; y 12 pentámeros forman una cápside viral completa (Figura 1). La proteína VP1 presenta un bucle entre los residuos 140-160 que representa una zona conservada que se relacionan con integrinas relacionadas con el inicio de la etapa de adsorción celular y es un importante sitio de neutralización del virus.

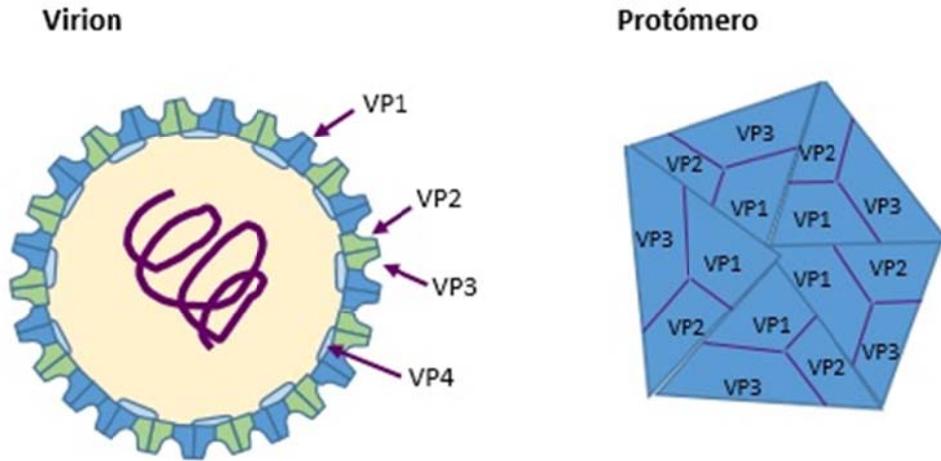


Figura 1: Esquematación del virus de la FA. Virus no envuelto, esférico, de 30 nm de diámetro, con cápside que rodea el genoma de ARN desnudo.

El genoma codifica proteínas estructurales que constituyen la cápside y también codifica proteínas no estructurales (Figura: 2) como son las proteínas asociadas a la replicación: ARN polimerasa, clivasas. El genoma ARN monocatenario sentido positivo actúa como ARN mensajero que se traduce en proteínas estructurales y no estructurales, capaces de completar un ciclo en 4 hs y producir 100.000 partículas por célula (Figura: 2).

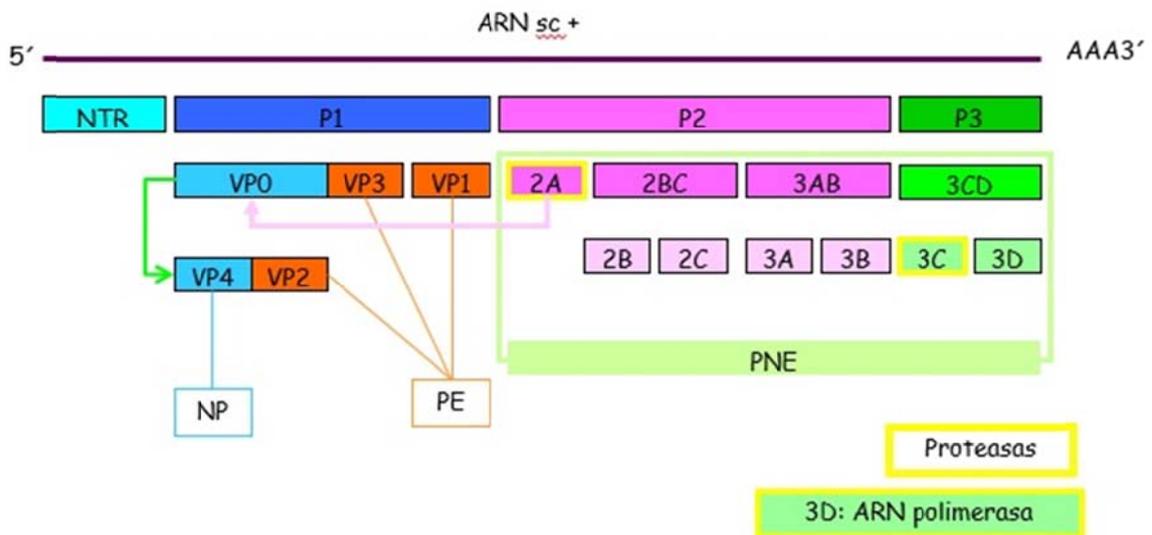


Figura 2: Esquematación del genoma del virus de la FA y producto de su traducción.

Características de la enfermedad

La patogenia de la enfermedad se puede resumir en una serie de eventos a tiempos bien definidos. En la tabla 1 se esquematizan los eventos que se desarrollan en un bovino luego de la infección con el virus de la FA. No es una enfermedad zoonótica aunque el hombre puede infectarse rara vez y accidentalmente, evento relacionado con personas que trabajan en contacto directo con el virus.

Vacuna contra la fiebre aftosa

Historia

La historia de la vacuna contra la FA es realmente fascinante, asociada a nombre muy importantes de la época dorada de la microbiología. Hasta el año 1926 todavía se seguía utilizando el método de suero-virus, ya en la década del 30 se comenzó a buscar métodos de cultivo in vitro donde se pudieran propagar el virus. Con este propósito H. S. Frenkel desarrolló un método de partida en la evolución de la industria de la vacuna contra la FA, se basaba en recuperar el epitelio lingual de vacas inmediatamente después de ser sacrificadas en el matadero y cultivarlo en suspensión en un medio relativamente simple. Luego de una etapa de multiplicación viral, se separaban epitelio y detritus celular por centrifugación. A esta suspensión viral se le agrega cloroformo y formaldehído y finalmente era adsorbida a hidróxido de aluminio. Las dosis que se utilizaban en esta época eran increíbles, dosis de 30 ml. El mejoramiento de la técnica de concentración y el agregado de adyuvantes permitió en algunos años bajar a 15 ml. Partiendo de una coyuntura donde Europa sufría 320.000 focos por año en 1952, la aplicación de esta vacuna permitió disminuir muchísimo el número de focos. Este excelente resultado generó exceso de confianza en los granjeros y fueron suspendiendo la vacunación. Esta decisión supuso un desastre económico para los productores de vacunas y se generaron alianzas entre países como Francia y Argentina junto al laboratorio Merieux que se asociaron para la producción de vacunas, convenio que se replicó en otros países de Eurasia y África. El objetivo de estas alianzas fue descentralización de la producción para disminuir riesgos. Como consecuencia de la decisión de los granjeros de dejar de vacunar en 1956 se produjo un nuevo brote generalizado en toda Europa.

Una de las estrategias para disminuir el volumen de la dosis, aparte de mejorar métodos de concentración, fue adicionar saponina como adyuvante, logrando una dosis de 5ml con la que se logró vacunar el 80% de los animales generando en ciertas regiones el estado de casi libre de la enfermedad.

Tabla 1: La patogenia de la Fiebre Aftosa

Patogenia de la Fiebre Aftosa		
1	Inhalación o ingesta del virus	24-75 hrs.
2	Infección en células epiteliales de la cavidad nasal, laringe, faringe, tráquea y esófago	
3	Replicación del virus y diseminación a las células adyacentes	
4	Paso del virus a torrente sanguíneo y linfático	
5	Infección de los nódulos linfáticos y otras glándulas	
6	Infección de células de la cavidad oral, patas, ubres, rumen	
7	Comienzo de Fiebre	
8	Aparición de vesículas (úlceras) e intensificación de los síntomas	76-92 hrs.
9	Salivación, descarga nasal y claudicación	
10	Ruptura de las vesículas (úlceras)	
11	Finaliza la fiebre	120 hrs.
12	Finalización de la viremia y comienzo de la producción de anticuerpos	
13	Disminución del título viral en varios tejidos y líquidos	Desde el 8vo día.
14	Lesiones empiezan a cicatrizar. El animal empieza a comer	Desde el 10mo día.
15	Desaparición gradual de virus en tejidos y líquidos	Desde el 15to día.
16	Aumenta la producción de anticuerpos	
17	Enfermedad resuelta. Virus persiste en la faringe (animal portador	15 días.

Para evitar que los granjeros tomaran decisiones que ponían en peligro la sanidad en el ganado, a partir de 1961 el gobierno requiere que se vacune obligatoriamente cada 6 meses. Con la reducción de la dosis más el rifle sanitario se completa la estrategia de control. En la década del 70 se reemplazaron los inactivantes formol y glutaraldehído por etileamina bina, mejorando los controles de inactivación. Hoy en día se reemplazó el método de Frenkel por el cultivo en células de embrión de hámster.

Características y clasificación

La vacuna contra la FA es una stock vacuna o vacuna convencional. El sustrato vacunal es el virus de la fiebre aftosa entero, inactivado y homólogo. Es una vacuna polivalente, que en los últimos años y por las características epidemiológicas de la enfermedad en la región, paso a ser tetravalente. Las cepas incluidas en la vacuna son: O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001, C3 Indaial. También contiene adyuvante, hidróxido de aluminio más saponina, o adyuvante oleoso como aceite mineral. La administración es parenteral, intramuscular y su función es profiláctica y metafiláctica según la situación epidemiológica al momento de su utilización.

Producción de vacuna contra la FA

Obtención de Cepa- Inmunógeno vacunal

La vacunación contra un serotipo de la FA no proporciona una protección cruzada contra otros serotipos e incluso puede darse el caso que no proteja contra otras cepas del mismo serotipo. Por esto es sumamente importante obtener cepas de brotes que afecten a la región de cría de ganado susceptible y poder cotejar características inmunogénicas con las cepas vacunales.

-Selección de virus naturales para la concordancia de vacunas. Selección de cepas vacunales concordantes.

La selección de la cepa vacunal adecuada es central para el control de la FA mediante programas de vacunación, así como para el establecimiento y mantenimiento de reservas de inmunógenos vacunales que se puedan utilizar en caso que surjan nuevos brotes. En estos tiempos ya existen reservas de inmunógenos vacunales contra los cuales se prueba el virus aislado en un brote. Para evitar los riesgos de la manipulación de virus, existen varios métodos serológicos in vitro que cuantifican las diferencias antigénicas entre las cepas aislada del brote de FA y, a partir de ahí, estimar la probable protección cruzada entre una cepa vacunal y un aislamiento natural. A este proceso se lo denomina "concordancia vacunal". La caracterización genética (análisis de secuencia del gen VP1) y el perfil antigénico (mediante la prueba de Fija-

ción de Complemento o ELISA) también pueden revelar la emergencia de nuevas cepas para las que se requiera la concordancia vacunal y, a la inversa, pueden indicar que un aislamiento dado es similar a otro para el que ya se dispone de información sobre concordancia vacunal.

Por lo tanto las cepas vacunales pueden ser cepas aisladas en un brote, en el caso que no presenten concordancia vacunal con los inmunógenos vacunales en stock, ya caracterizados. Por otro lado si la cepa del brote tiene concordancia vacunal con las cepas stock, se utilizarán estas últimas para formular la vacuna.

-Validación como cepa vacunal

Los virus del inóculo primario (el que se emplea para la producción) deben estar caracterizados antigénicamente y, si es posible también genéticamente, y se debe demostrar que son puros y están libres de todos los agentes extraños declarados por la autoridad competente. Debe establecerse la homología con los aislamientos originales candidatos y debe demostrarse la efectividad contra las cepas circulantes de las que ellos se derivan.

Método de producción

El método de propagación del virus recomendado para la producción del inmunógeno vacunal es el crecimiento de virus de la FA en grandes cantidades de cultivos en suspensión o en monocapa utilizando líneas celulares en condiciones de esterilidad. Es importante destacar que el virus es vulnerable al ataque por enzimas proteolíticas, como las producidas por microorganismos. También resulta crítico el control del pH y de la temperatura debido a la labilidad del virus a estos factores. Ambos parámetros de cultivo deben controlarse con precisión. La temperatura óptima para el crecimiento celular y vírico está en el rango de los 37°C, la temperatura de desnaturalización está alrededor de 26°C. Durante las siguientes fases de la producción, la temperatura debe reducirse a 4-6°C. Los virus deben mantenerse a un pH cercano a 7,6 y nunca por debajo de 7,0. Se utiliza una cepa adecuada de virus para infectar una suspensión o monocapa de una línea celular establecida, como células de riñón de hámster bebe o BHK (por su sigla en inglés). Tales cultivos deben estar libres de microorganismos contaminantes, como virus adventicios, bacterias, hongos. Cuando el virus alcanza su título máximo, lo cual se determina por infectividad, Fijación de Complemento y otras pruebas, el cultivo se clarifica, a menudo tratándolo con clorofórmico seguido de centrifugación y filtración. A continuación, el virus se inactiva añadiendo etilenimina, normalmente en forma de etilenimina binaria (BEI) que se añade a la suspensión de virus mantenida a 26°C. Normalmente, la inactivación se prolonga durante 24 horas, seguida de una segunda dosis de BEI durante otras 24 horas más. La duración del tratamiento con BEI y la temperatura utilizada para la inactivación debe validarse según cada caso o laboratorio. Después de la inactivación, la neutralización de cualquier BEI residual en el producto se neutraliza con una solución de tiosulfato. El virus inactivado se puede concentrar por ultrafiltración, precipitación con polietilenglicol o adsorción con óxido de polietileno; el virus concentrado e inactivado puede purificarse aún más por procedimientos más sofisticados como la cromatografía. Si es necesario, esta solución madre de inmunógeno vacunal concentrado se pueden mantener a -70°C o a temperaturas más bajas durante muchos años. Normalmente las vacunas convencionales contra la FA se

presentan en forma acuosa y con adyuvante oleoso. En la formulación final, la vacuna acuosa, se prepara adsorbiendo el virus en gel de hidróxido de aluminio como adyuvante. Otros componentes del producto final incluyen antiespumante, rojo de fenol (dependiendo de la legislación de cada país), hidrolizado de lactoalbúmina, caldo de triptosa con fosfato, aminoácidos, vitaminas y sales tamponadas. También se incorpora un segundo adyuvante, la saponina, y merthiolate/cloroformo como conservante. Las vacunas con adyuvante oleoso se formula utilizando aceites minerales de alta calidad, como Marcol y Drakeol. Las vacunas oleosas tienen varias ventajas sobre la vacuna estándar con hidróxido de aluminio/saponina, sobre todo su eficacia en los cerdos por la prolongación de la duración de la inmunidad. El aceite mineral se pre-mezcla, por lo general, con un agente emulsionante, como el monooleato de manosa, antes de añadir una proporción o el total de la fase acuosa de la vacuna, y se emulsiona mediante un dispersador coloidal, o un emulsificador mecánico continuo o de flujo ultrasónico. Se pueden producir emulsiones dobles más complejas (agua/aceite/agua) emulsionando de nuevo en una fase acuosa que contenga una pequeña cantidad de detergente, como Tween 80. Una alternativa adicional es la representada por los adyuvantes oleosos "listos para usar" ha supuesto un avance significativo en los últimos años. Los aceites con ésteres del ácido octadecenoico y 2,5 anhidro-d-manitol, por ejemplo, forman fácilmente emulsiones dobles o mezcladas (agua/aceite/agua) que son estables y de baja viscosidad sin que se necesite un equipo emulsionantes sofisticado. Cuando se utilizan componentes novedosos, incluido el adyuvante oleoso, en cualquier vacuna, es importante tener en cuenta que debe evaluarse su estatus relativo a los residuos en productos derivados de especies usadas en la fabricación de alimentos para garantizarle a la autoridad expendedora de licencias la inocuidad para los consumidores. Este requisito limita de forma considerable la gama de adyuvantes que se pueden utilizar en especies utilizadas en los alimentos.

Controles de Proceso

Estos controles se realizan en cada una de las etapas midiendo parámetros en los diferentes puntos críticos. El control de pH y temperatura o control de inactivación, son controles claves para la calidad de la vacuna. Para más detalles consultar al manual de la OIE (OIE 2007).

Controles de producto final

Las pruebas sobre el producto final que deban utilizar ganado vacuno se realizan bajo supervisión del SENASA

Inocuidad: En un número adecuado de cabezas de ganado se realiza una prueba de toxicidad local y sistémica sobre un lote de ensayo de vacuna.

Potencia: La prueba de potencia se puede realizar en animales o por pruebas serológicas. Los animales utilizados son bovinos que deben cumplir ciertas características (más de 6 meses de edad, procedentes de áreas libres de FA, sin vacunación previa contra la FA y no reactivos a los diferentes tipos de virus de la FA). Se deben vacunar tres grupos de por lo menos cinco animales, y un grupo se deja como control de dos animales no vacunados.

El desafío se realiza 3 semanas (presentación acuosa) y hasta 4 semanas (aceite) postvacunación. Se utiliza una suspensión de virus bovino completamente virulento y apropiado a los tipos de virus presentes en la vacuna ensayada, se inocula por vía intradérmica en dos zonas de la superficie superior de la lengua. Los animales se observan durante por lo menos 8 días. Los animales control mostrarán lesiones en otros sitios además de la lengua y desarrollarán lesiones en al menos tres patas. Del número de animales protegidos en cada grupo, se calcula la PD50 (dosis protectora media) que contiene la vacuna.

Las pruebas de potencia en otras especies, como ovejas, cabras o búfalos, o son diferentes o no están estandarizadas.

Para establecer la potencia de una vacuna también se pueden utilizar otras pruebas indirectas. Se puede utilizar seroneutralización in vivo o in vitro, ELISA.

Pureza: Es un control para determinar la presencia de anticuerpos frente a proteínas no estructurales

Según el Código de Salud de la OIE para animales terrestres estipula un criterio para volver a establecer un estado de ausencia de FA después de un brote, en un contexto de programa de vacunación, se testea la presencia de anticuerpos contra PNE en animales vacunados. Un procedimiento es vacunar terneros con una dosis doble de vacuna que contenga el máximo número y cantidad de inmunógenos permitidos. Estos terneros deben vacunarse al menos tres veces durante un periodo de 3–6 meses y 30-60 días posteriores realizar el serodiagnóstico para detectar la presencia de anticuerpos contra las PNE. Las PNE analizadas son 3A, 3B, 2B, 2C, 3ABC y las pruebas utilizadas son ELISA convencionales o de captura y los positivos se confirman por Western blot.

Duración de la inmunidad: Para establecer un nivel satisfactorio de inmunidad, lo normal es proceder a una primera fase de dos inoculaciones, separadas 2-4 semanas entre sí, seguida por una revacunación cada 4-12 meses. La frecuencia de revacunación dependerá de la situación epidemiológica y del tipo y calidad de la vacuna utilizada

Estabilidad: La caducidad de las vacunas convencionales contra la FA suele ser de 1-2 años a 4°C. Es un punto crítico ya que estas vacunas son sensibles a la temperatura y no deberían congelarse ni mantenerse por encima de 4°C.

Control de lote

Para mayor y detallada información consultar el capítulo de Fiebre Aftosa de la OIE (OIE 2007)

Respuesta inmune inducida por la vacunación

Inmunógeno vacunal

El producto de la replicación viral durante la producción de la vacuna da como resultado una mezcla antigénica, compuesta por proteínas irrelevantes y una pequeña cantidad de proteínas

virales: proteínas estructurales (PE) y proteínas no estructurales (PNE) del VFA. Las PE incluyen: 1- partículas virales enteras (146S); 2-subunidades (75S); 3- agrupamientos de pentámeros (12S) y proteínas virales VP (1, 2, 3). La inmunogenicidad está relacionada no solo con la composición química del inmunógeno, sino por su distribución espacial en la estructura viral, las partículas virales enteras son 10 veces más inmunogénicas que las subunidades y 100 veces más inmunogénicas que los agrupamientos de pentámeros. Las partículas virales enteras deben contener a la VP1 integrada e intacta para que sea realmente inmunogénica, su alteración (por ejemplo por acción de proteasas) y a pesar de no alterar la estabilidad de la cápside, disminuye mucho la inmunogenicidad del virus y por ende la de la vacuna. No todos los subtipos del VFA se comportan de la misma manera, el cultivo del VFA serotipo A da como resultado mayor concentración de subunidades que de partículas virales enteras, por lo tanto en la formulación aparece en mayor concentración. La pérdida de la conformación de los epitopes en la estructura de la cápside viral y la consecuente pérdida de la inmunogenicidad, hacen foco en la importancia de la integridad de la capsida viral de las vacunas convencionales y explica porque las vacunas de nueva generación presentan menos inmunogenicidad induciendo una muy pobre respuesta inmune protectora.

El VFA es una partícula relativamente inestable en términos de sensibilidad a la temperatura y el pH, lo que tiene mucha importancia en la estabilidad del inmunógeno vacunal, sobre todo cuando la cadena de frío no se respeta. La estabilidad del virus frente al pH varía según el serotipo, por ejemplo la cepa C Noville es más lábil en medio ácido que el serotipo virales A y O, la integridad e infectividad de la partícula viral se ve afectada cuando el pH está por debajo de pH7 y 7,5 respectivamente. La infectividad también se ve reducida cuando se sobrepasa el pH 8 en el caso de los serotipos A y O, y por arriba de 8,5 en el caso del serotipo C. El glutaraldehído que se le agrega como excipiente a la formulación vacunal tiene como función prolongar la estabilidad de la partícula.

Las PNE no generan respuesta inmune protectora, ya que los anticuerpos específicos contra ellas tienen poco o nula capacidad de neutralizar a la partícula viral entera. El proceso de ultrafiltración permite conservar las partículas virales y deshacerse de las proteínas solubles entre las que se encuentran las PNE, evitando así la interferencia en el diagnóstico serológico de los animales sospechosos de padecer FA.

Respuesta humoral

Como toda respuesta primaria frente a una primovacuna la primera inmunoglobulina en aparecer contra la FA es la IgM. Aparece entre el 2do o 4to día postvacunación y perdura por un largo periodo de tiempo, más de 80 días. La IgG aparece después del 4to día postvacunación y tiende a hacer el pico de concentración a los 35 días. La cinética de la respuesta humoral está sujeta al tipo de adyuvante presente en la formulación de la vacuna. El subtipo predominante de IgG inducidas por vacunas convencionales es el subtipo IgG1, en cambio en vacu-

nas a subunidades el isotipo predominante es IgG2, teniendo en cuenta la protección estimulada por ambas vacunas, se infiere que el subtipo IgG1 es el más importante en la inmunidad humoral protectora en bovinos.

La protección vacunal después de una sola dosis de vacuna tiende a ser de corto plazo, como se señaló previamente esto depende mucho del tipo de vacuna así como de la presencia y nivel de anticuerpos maternos y su posible interferencia.

La respuesta inmune postvacunal en las mucosas es muy diferente a la respuesta que genera la infección natural. La inducción de IgA secretoria (IgAs) depende mucho del tipo de vacuna y el intervalo entre dosis. Normalmente la revacunación con vacunas convencionales no genera niveles significantes de IgAs en mucosas. Se ha demostrado en forma experimental que varias dosis de vacunas o el aumento en varias veces la dosis vacunal en una aplicación promueve la aparición de IgAs en mucosa orofaríngea.

Las Igs que se detectan en orofaringe son tanto IgM como IgG, de esta última predomina el subtipo IgG1. Este fenómeno se ve favorecido por la reacción inflamatoria en la orofaringe que permite la trasudación de las Igs a la mucosa.

En cerdos luego de vacunar con una formulación oleosa aparecen anticuerpos neutralizantes a los 3 o 7 días en orofaringe, el título no se modifica por revacunación. En cambio la respuesta humoral sistémica aumenta en cada revacunación. La vacuna agua en aceite es más efectiva en esta especie.

Respuesta celular

La vacuna contra la FA induce linfocitos T de memoria, aunque con una sola dosis la respuesta celular es débil. A diferencia de la respuesta humoral, la respuesta celular frente a la infección no parece ser muy superior a la respuesta por vacunación. La respuesta celular presenta reacción cruzada entre diferentes serotipos, no así la respuesta humoral. Esta reactividad cruzada se atribuye a los epitopes altamente conservados de la VP1, VP2 y VP3.

Duración de la inmunidad

La duración de la inmunidad es muy variable y depende del tipo de vacuna utilizada, ya que varía mucho la calidad del inmunógeno vacunal y los adyuvantes utilizados. Generalmente se acepta que las vacunas oleosas generan una respuesta inmune de mayor duración que aquellas que utilizan hidróxido de aluminio/saponina como adyuvante. La duración de la inmunidad de forma efectiva no depende solamente de la respuesta de memoria que pudiera establecerse luego de la vacunación, sino también del subtipo de inmunoglobulina inducido y particularmente en la magnitud de la respuesta inicial.

La inmunización a altas dosis de inmunógeno genera una alta concentración inicial de anticuerpos en suero que decrece rápidamente a bajos niveles y de baja afinidad. Por el contrario, dosis bajas de antígeno genera, en un principio, un aumento moderado de anticuerpos, pero que siguen aumentando en el tiempo y se consigue una concentración y afinidad mucho mayor que en dosis altas de inmunógeno.

En general la vacunación contra la FA en bovinos genera un pico de anticuerpos en el día 21 o 28 pos vacunación, aunque a veces se ha registrado el pico en el día 14. El título de anticuerpos vacunales puede declinar rápidamente o mantenerse relativamente elevado por varios meses antes de caer a niveles por debajo de los de protección. Este último perfil serológico se reconoce más frecuentemente en las vacunas oleosas.

Es innegable que las vacunas contra la FA no generan inmunidad de larga duración, y por eso se hace necesaria la revacunación regular para mantener un nivel protector de anticuerpos vacunales.

Plan de control y erradicación

La naturaleza altamente contagiosa de la FA, así como el amplio rango de hospedadores que presenta, sumado a la facilidad de diseminación y dispersión del virus, tanto nacional e internacionalmente, hace de vital importancia que las autoridades sanitarias nacionales continúen controlando y auditando la producción de vacunas que garantice la alta calidad que requiere esta enfermedad. La disminución o suspensión de la vacunación en regiones endémicas supone consecuencias desastrosas para el estatus sanitario de las naciones y el mundo.

En el país existe un Programa Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa que rige desde 1994. La FA es una enfermedad de denuncia obligatoria e inmediata. Las campañas de vacunación se implementan en forma efectiva a partir de la década del 90, la aplicación de un nuevo plan de erradicación permitió cortar la circulación viral mediante la vacunación y vigilancia epidemiológica. Con un corto periodo de "País libre de fiebre aftosa sin vacunación", la necesidad de mantener una inmunidad poblacional sólida y persistente para contrarrestar la compleja situación regional de fronteras, sobre todo en el norte del país, se decide mejorar el plan de erradicación bajo 4 pilares fundamentales: 1-Vacunación sistemática, obligatoria y universal de los bovinos. 2- Control del mantenimiento de la cadena de frío de la vacuna. 3- Sistema eficaz de identificación de los bovinos. 4- Participación activa de los productores como parte ejecutora de las políticas delineadas a nivel nacional por el SENASA. Bajo este programa se logra la interrupción de la circulación viral para la población bovina, y se solicita a la OIE el reconocimiento de "Zona libre de fiebre aftosa que practica la vacunación" al territorio ubicado al norte del paralelo 42°. Otra medida importante fue establecer "Cordón fronterizo" de 25 Km de ancho contra las fronteras de Bolivia y Paraguay que comprende territorios de las provincias de Salta y Formosa, extendido a las provincias de Corrientes y Misiones, territorio donde se vacuna a

todos los animales susceptibles, con el objetivo es evitar la introducción de la enfermedad en el territorio nacional.

Existen controversias con respecto al rol de los carriers o portadores, en la diseminación y mantenimiento del virus. Se define como carrier a aquellos animales de los que el virus de la FA puede ser aislado luego de 28 días postinfección. Algunos sostienen que esta característica por sí sola no debería ser concluyente y que aparte, debería ser capaces de transmitir la infección de manera comprobada. Según la especie esta condición puede no existir, por ejemplo en cerdos, o puede durar por varios años (5 en el búfalo de agua). A pesar que no se ha podido demostrar fehacientemente el rol del carrier como principal responsable de la trasmisión del virus en un brote importante, igualmente se le atribuye cierto rol en la transmisión especialmente en poblaciones de bovinos susceptibles o con vacunación deficiente. La implementación de campañas de vacunación adecuadas, con inmunógenos de calidad, son suficientes para reducir al mínimo la persistencia de carriers.

La zona libre de fiebre aftosa sin vacunación está conformada por la Patagonia al sur del paralelo 42° a la que se le suma una pequeña zona de altos valles andinos, denominada Valles de Calingasta, de la provincia San Juan. En la siguiente Figura se puede observar el detalle de las diferentes zonas epidemiológicas de la FA en el país. Figura: 3



Figura 3: Mapa político de la República Argentina. Detalle de las zonas epidemiológicas de la FA.

Protocolo de vacunación

El protocolo de vacunación no es sinónimo de receta, y en ningún caso debería repetirse sin el debido análisis de los factores que lo influyen. La dosis está determinada en 2 ml por vía intramuscular o subcutánea en la tabla del cuello.

En el caso de la vacunación contra FA existe un comité de expertos que conjuntamente con el SENASA atendiendo los requisitos internacionales dispuestos por la OIE, sumado a la calidad de las vacunas aprobadas y las circunstancias del país, determinan el mejor protocolo de vacunación para controlar esta enfermedad. Para ellos se implementan medidas como las que se discuten a continuación.

Se establecen períodos de vacunación antiaftosa para bovinos por Regiones, en el Territorio Nacional, acorde al cronograma que surja de las condiciones epidemiológicas, de las características geográficas y productivas de las mismas. Se realizan dos campañas de vacunación, en una se vacunan a todas las categorías y en la otra campaña se vacuna a animales menores de dos años. Deben vacunarse todos los animales mayores de 6 meses. En el contexto de la vacunación antiaftosa, se considera animal adulto a aquel que fue vacunado en forma consecutiva en cuatro oportunidades en los períodos correspondientes a cada plan, en los dos primeros años de vida, al resto de la categorías se los considera bovinos menores.

Lo ideal que estos períodos de vacunación no se extiendan los sesenta días corridos, vacunando la totalidad de los bovinos existentes en el área geográfica de acción de cada plan específico. También se dispuso como medida de contención que durante los meses de vacunación establecidos en cada plan, se prohíbe el movimiento de hacienda de aquellos establecimientos que no hayan completado la vacunación y registro de la totalidad de los bovinos. Están exceptuados a esta regla los animales con destino a faena inmediata o mercado terminal, siempre y cuando no se haya excedido la fecha de vencimiento de la vacunación del establecimiento remitente.

Se considerará vacunado, a todo bovino que haya sido inoculado en tiempo y forma por personal reconocido y autorizado por SENASA; respetando en todos los casos los períodos de vacunación; los plazos intervacunales; las exigencias del programa y que sean registrados en la Oficina local del SENASA que corresponda. Se debe registrar el acto de vacunación en todos los casos, y el registro resultante debe acreditarse en el Ente Sanitario Local en la Oficina de SENASA de la jurisdicción.

A las disposiciones de SENASA se debe sumar el compromiso del productor para que las campañas de vacunación sean exitosas, para esto el establecimiento debe contar con las instalaciones mínimas e indispensables que permitan efectuar adecuadamente las tareas de vacunación, a los efectos de disminuir los riesgos del operador y accidentes vacunales. También debe conocer y acatar todas las normas relativas a la vacunación y movimiento de hacienda.

Los períodos de vacunación antiaftosa también son diseñados según las regiones. Para las Regiones Central, Mesopotámica y Patagónica Norte A, la estrategia de vacunación sistemática será la ejecución de dos campañas de vacunación en el año, cuyas fechas para cumplir con el

primer período se extenderán desde el 15 de febrero al 15 de mayo de cada año, y el segundo período del 15 de septiembre al 15 de diciembre. Para las Regiones del NOA y Cuyo, la vacunación en dos campañas asimétricas al año, se cumplen en un primer período, desde el 1° de marzo al 1° de mayo y el segundo período del 1° de julio al 1° de septiembre. Estos cronogramas se ejecutan bajo la coordinación de las Comisiones provinciales de Sanidad animal (CO-PROSAS), encargadas de garantizar plazos establecidos aunque también podrán adoptar, cuando las condiciones de producción, ecológicas, climáticas, epidemiológicas y otras de orden Regional así lo exijan, criterios ampliatorios con la intervención y aprobación previa de la Comisión nacional de Lucha contra la Fiebre aftosa (CONALFA) y del SENASA.

Referencias

- Graham J Belsham. (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the Picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* Vol. 60, pp 241-260
- VII SEMINARIO INTERNACIONAL DE CONTROL DE VACUNA ANTIAFTOSA Rio de Janeiro, Brasil 10 - 14 Setiembre, 2001.
- Doel, T.R. (1996). Natural and vaccine-induced immunity to foot and mouth disease: the prospects for improved vaccines. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15 (3) 883-911.
- OIE 2007. CAPÍTULO 2.1.10. FIEBRE AFTOSA. Manual de la OIE sobre animales terrestres http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/2.1.01_Fiebre_aftosa_2007.pdf
- SENASA. (2017). Fiebre Aftosa en bovinos y bubalinos. Estatus sanitario y vacunación. <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/produccion-primaria/sanidad-animal/enfermedades-y-estra-sani/fiebre-aftosa>

CAPITULO 5

Vacuna anticarbuncosa

Jorge Bernagozzi

El carbunco, carbunco bacteridiano, carbón, grano malo o ántrax es una enfermedad zoonótica, infecto-contagiosa aguda o sobreaguda que afecta fundamentalmente a animales herbívoros, causando epizootias con grandes pérdidas económicas.

El *Bacillus anthracis* es el agente etiológico de la enfermedad y teniendo en cuenta la facilidad de cultivo, la capacidad de formar esporas de larga perdurabilidad en el ambiente y de alta capacidad infectante.

El carbunco afecta tanto animales domésticos así como salvajes y exóticos. La especie humana es susceptible y el contagio se presenta a través de contactos con animales infectados, utensilios o productos animales contaminados. Se han descrito casos de contagios a través de la ingesta de alimentos cortados con cuchillos utilizados en necropsias, por monturas o aperos elaborados con cuero de animales enfermos y la forma más clásica, la enfermedad de los cardadores de lana.

Un poco de historia

Es una enfermedad muy antigua y las crónicas se remontan a referencias que datan del año 3000 AC, aunque existe documentación fehaciente sobre la enfermedad en Europa entre los años 1491 y 1190 AC. El carbunco se encuentra descrito en el Viejo Testamento (Exodus 9:3) como dos de las diez plagas.

Hacia fines del siglo XV John Bell describe la enfermedad en las personas cardadoras de lana y en 1850 Casimir Davaines, médico francés, describe por primera vez el agente etiológico al observarlo en frotis de sangres de carneros infectados.

En 1876 Robert Koch lo aísla en estado puro y lo clasifica dándole el nombre de *Bacillus anthracis*.

Una vez aislado y tipificado del agente etiológico, comenzó la investigación para el desarrollo de vacunas destinadas a prevenir la enfermedad.

El primer uso exitoso de la vacuna se produce hacia los años 1880 y 1881. En la célebre experiencia realizada en Pouilly le-Fort, Jean- Joseph Henri Toussaint, William Smith Greenfield y Louis Pasteur, vacunaron y desafiaron con una cepa patógena 24 carneros, 1 cabra y 6 vacas con total éxito.

A partir de esta experiencia exitosa se produjeron una serie de modificaciones de la vacuna, siendo una de las más significativas la desarrollada por Max Sterne en 1937, donde empíricamente logra eliminar el plásmido pXO2 que codifica la capsula, desarrollando la vacuna anticarbuncosa que lleva su nombre a partir de una cepa acapsulada y acapasulógena de *Bacillus anthracis*, única vacuna autorizada por el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad) en el país.

Se han desarrollado además vacunas a toxoides, libres de gérmenes, adsorbidas en hidróxido de aluminio y hasta vacunas recombinantes a base de antígeno protector (rPA).

Agente etiológico

El agente etiológico es el *Bacillus anthracis*. Pertenece al género *Bacillus* constituido por bacilos grandes Gram positivos, aerobio, con capacidad de esporular y presenta capsula. Miden aproximadamente 3 a 10 μm de largo y 1 a 1,5 μm de ancho. No son exigentes desde el punto de vista metabólico, desarrollando muy bien en medios comunes con una temperatura óptima de incubación de 37°C y con capacidad de desarrollar entre 25 y 37°C.

La esporulación comienza cuando las formas vegetativas empiezan a crecer en presencia de medios envejecidos o en condiciones atmosféricas adversas. Los esporos poseen una larga sobrevivencia en el medio ambiente lo que facilita la prevalencia de la enfermedad.

Patogenia

Todas las especies susceptibles presentan las tres vías clásicas de infección: inhalatoria, digestiva y cutánea, por abrasiones de la piel. Un párrafo particular merece algunos casos mencionados por la inoculación accidental de vacuna anticarbuncosa. Los bacilos son eliminados por los emunatorios naturales y en contacto con el oxígeno esporulan y permanecen viables durante años dependiendo del tipo de suelo sobre todo en aquellos alcalinos con pH superiores a 6.

Factores de patogenicidad

Esporos

Forma de resistencia del bacilo. En contacto con el oxígeno del aire se produce la esporulación y de esta manera perdura por años en el suelo. Tiene forma esférica u oval, no deforma el bacilo y mide aproximadamente 0,3 a 1 μm (Figura 1).

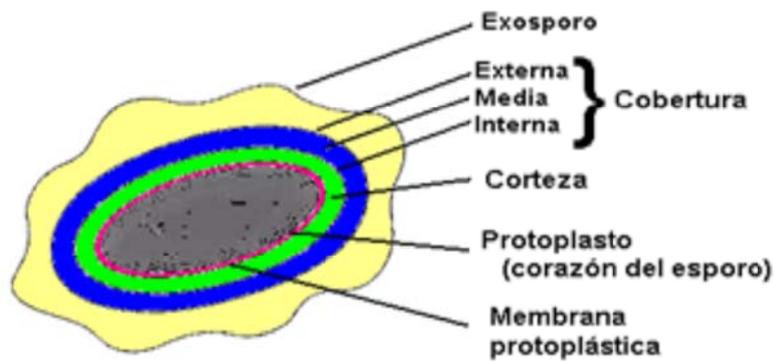


Figura 1: Corte de esporo de *B. anthracis*. Protoplasto, corazón del esporo o core. Contiene el DNA y todos los elementos necesarios en forma deshidratada con capacidad de dar nacimiento a la nueva célula. Corteza. Finas láminas compuestas de peptidoglicanos, que le dan al esporo mucha resistencia a diversos agentes injuriantes. Cobertura. Estructura proteica con capacidad de tamizar y excluir el paso hacia la parte más profunda del esporo de algunas enzimas y productos químicos. Exosporo. Estructura más externa del esporo en forma de saco. *Bacillus subtilis* no posee esta capa.

Está formado por varias capas, siendo la más externa el exosporo, seguida hacia el interior de una cobertura con tres capas o estamentos -externa, media e interna- luego la corteza, la membrana protoplástica y el protoplasto o corazón del esporo.

Cápsula

Es un factor importante en la patogenia de la enfermedad ya que impide la fagocitosis y protege al bacilo de la acción lítica del complemento.

La cápsula del bacilo es una estructura compuesta enteramente por ácido poli- D-glutámico o poli-D- γ -glutamato y esta codificada en el pXO2.

La cepa Sterne es resultado de la pérdida de este plásmido y se define como cepa acapsular y acapasulógena.

Toxina

La toxina producida por las formas vegetativas del *B. anthracis* provoca la muerte del individuo y la posterior liberación de los esporos al medio para reiniciar el ciclo. La existencia de las toxinas fue constatada por Smith y Keppie en el año 1954 al demostrar que el suero de cobayo infectado por *Bacillus anthracis* esterilizado por filtración y por lo tanto libre de bacterias era capaz de producir la muerte de un cobayo sano cuando se lo inculaba por vía endovenosa.

Bacillus anthracis produce una única toxina de estructura proteica codificada por un plásmido termosensible denominado pXO1. Está constituida por tres factores antigénicamente diferentes, codificados por genes plasmídicos distintos y denominados:

1-el antígeno protector, PA, (*protector antigen*) o FP (*factor protector*), 2-el factor edematógeno o FE o EF (*edema factor*) 3- el factor letal o FL o LF (*lethal factor*).

El PA es el vehículo que permite el ingreso a las células del hospedador de los otros dos factores. Cada molécula de PA se une en forma aleatoria al FE o al FL, constituyendo a través de esta unión la toxina edematógena y la toxina letal respectivamente.

Los tres componentes de la toxina del ántrax son secretados en forma independiente y se encuentran libres en las fases líquidas de la sangre, en la linfa y también en los tejidos. La activación sólo se produce cuando la fracción PA se une a su receptor específico en la superficie celular

La bacteria cuenta con otros factores de virulencia que se enumeran en el siguiente cuadro

Otros factores de virulencia

Factor de virulencia	Característica
Sideróforos. Bacilibactina y petrobactina	Captación de hierro
Capa S o S-layer (surface layer)	Estructura que rodea la célula vegetativa. Función de tamiz para ciertas sustancias. Facilita adherencia a macrofagos
Lipoproteína MntA	Relacionada con el crecimiento y resistencia al sistema inmune
Sintetasa de óxido nítrico. baNOS	Previene el daño del ADN viral

Susceptibilidad de las especies a la infección

Existen notables diferencias de sensibilidad a la infección entre las diversas especies. La cabra es la más sensible y se considera especie centinela. Le siguen los óvidos, excepto los carneros de Argelia, bovinos, equinos, cerdos. Los perros y gatos, si bien son bastante resistentes enferman y suelen morir por edema de glotis y trastornos gastrointestinales. Las aves son muy resistentes y las carroñeras pueden eliminar esporos por sus heces

Los ratones y ratas son sensibles pero algunas razas son resistentes. Los cobayos son sensibles a la inoculación del bacilo y/o sus toxinas.

Los animales poiquilotermos, entre ellos los peces, son muy resistentes.

Patogenia de la enfermedad

El esporo constituye la forma de resistencia del bacilo y asegura la permanencia del mismo en el medio ambiente y la fuente de infección principal. La cápsula impide o retarda la fagocitosis facilitando la multiplicación de las formas vegetativas.

Las toxinas dan el golpe de gracia provocando la muerte del animal.

El proceso de activación de la toxina lo podemos resumir de la siguiente manera.

La toxina es una típica A-B toxina donde los componentes de la misma se secretan por separado y precisan activarse luego de elaborados.

Existen tres tipos de receptores en los que el primer eslabón de activación de la toxina puede unirse y donde va a comenzar la activación del PA. Ellos son los denominados:

-TEM8, marcador tumoral del endotelio 8 o también denominado ANTXR1.

-CMG2, proteína 2 de la morfogénesis celular o también ANTXR2.

-Beta1 integrina, recientemente descrita, con propiedades de cumplir funciones de receptor.

El precursor PA pesa 83 kD, es secretado por el bacilo y debe ser activado proteolíticamente por tripsina, por una proteasa no identificada del suero o por proteasas ubicadas en la superficie celular (furinas o furinas like) que reconocen ciertas secuencias.

Después de la proteólisis, el PA, ya sea en solución o adherido a la célula, pierde una fracción de unos 20 kD, dando lugar a la formación del PA63, modificando su estructura y generando una configuración compuesta por homoheptámeros hidrofóbicos. Esta nueva forma, cuando se encuentra en vesículas (endosomas) con un pH inferior a 7, adquiere la capacidad de formar canales en la membrana de la célula, los que son rápidamente obstruidos por bloqueadores específicos. El FL y el FE poseen, como terminal, un heptapéptido que se integra con el PA63, existiendo una competitividad entre ambos, que determina la unión en forma aleatoria de sólo uno de ellos. El PA activado puede asociarse con más de 3 moléculas de FL o FE. El proceso finaliza con la liberación en el citosol de las moléculas tóxicas neoformadas.

Una vez en el citosol ejercen su actividad específica.

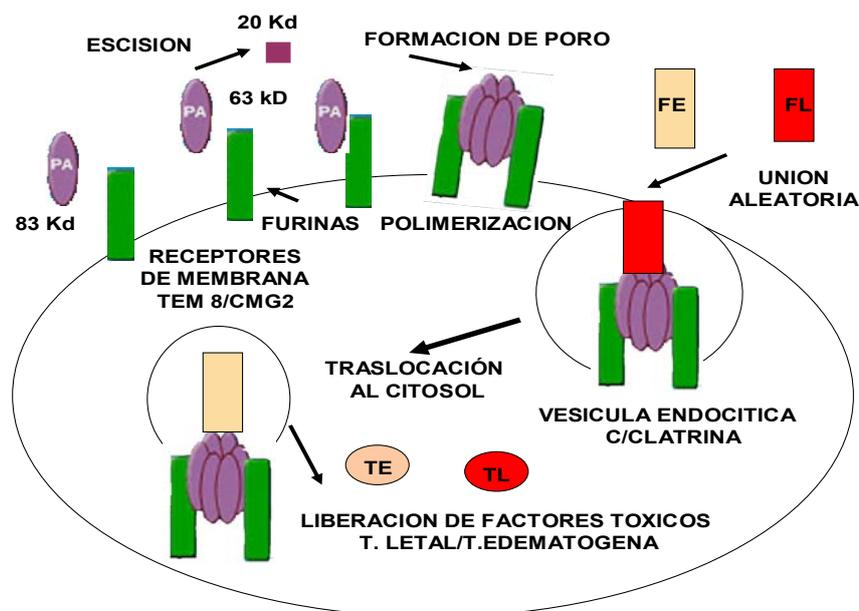


Figura 2: Esquema clásico de la formación de las toxinas e internalización al citosol celular. El PA se une a su receptor específico. Por acción enzimática de las furinas se libera una fracción de 20Kd. El PA, ahora de 63 Kd, se polimeriza y da lugar a la formación de un poro donde se unirán en forma aleatoria el FE o el FL. Endocitosis a través de vesículas recubiertas con clatrina. Traslocación al citosol y liberación de la toxina letal provocando muerte celular, temprana o retardada, y de la toxina edematógena provocando edema e inhibición de fagocitosis.

Vacunas

Teniendo en cuenta la gravedad de la enfermedad, la casuística, mortalidad y especies afectadas, incluida la humana, una vez aislado y clasificado el agente etiológico, los esfuerzos estuvieron dirigidos a la prevención de la enfermedad a través de vacunas.

Las experiencias personales de Louis Pasteur, Robert Koch y otros microbiólogos contemporáneos, demostraron que la inoculación de bacilos envejecidos o calentados que habían perdido su capacidad de multiplicación, protegían a los animales inoculados cuando a estos se le descargaba la misma cepa, pero patógena.

Pasteur tenía una vasta experiencia en la prevención de enfermedades de la gallina a través de la inoculación de bacilos calentados.

Sometió al *Bacillus anthracis* a una temperatura de incubación superior a la recomendada. La incubó a 42-43°C definiendo esta temperatura como “temperatura disgenésica” para el bacilo.

La primera experiencia con esta vacuna data del año 1881 y fue llevada a cabo por el propio Pasteur conjuntamente con Jean- Joseph Henri Toussaint y William Smith Greenfield en Pouilly le-Fort.

La experiencia consistió en una primera inoculación con una vacuna elaborada a partir de una cepa cultivada a 42-43°C durante 15 a 20 días. Esta cepa fue conocida y utilizada como vacuna en forma comercial, con el nombre de cepa Pasteur I.

La segunda dosis aplicada dos semanas después consistió en una inoculación con una cepa que había sido sometido a la misma temperatura de incubación pero durante menos días, 10 a 12, y por lo tanto resultó ser más agresiva. Esta cepa fue conocida como Pasteur II. La cepa Pasteur I era patógena para ratones y cobayos y la Pasteur II, mucho más patógena llegando a afectar conejos.

Pasteur creyó erróneamente haber atenuado la cepa mediante ese proceso de incubación. En realidad el cultivo a temperatura disgenésicas logra eliminar al menos 10 plásmidos que determinan la capacidad de formar PA y FL (Sterne 1937; Blaustein et al 1989; Mikesell et al 1973).

El grado de atenuación de la cepa dependía entonces de la mayor o menor cantidad de formas vegetativas que habían perdido el plásmido y por ende la capacidad de producir toxina. El remanente que lo conservaba tenía la capacidad de elaborar la toxina y por lo tanto de ello dependía la capacidad patógena de la cepa y la capacidad inductora de anticuerpos de la misma.

Luego de esta experiencia exitosa la vacuna elaborada por Pasteur adquirió una excelente reputación extendiéndose su uso a lo largo de todo el mundo incluida la Argentina. Fue una vacuna que se aplicó exitosamente durante más de 50 años, pero si bien colaboró eficazmente en el control de la enfermedad, con el devenir de los años y la masificación de su uso, comienzan a aparecer algunos inconvenientes, entre los que pueden mencionarse el diferente grado de patogenicidad de los diferentes cultivos aún realizados en la misma forma, ya que depende la misma de la relación en que se encuentren formas vegetativas patógenas vs no patógenas.

Eran vacunas de difícil estandarización y complicadas de aplicar en aquellas especies muy sensibles al carbunco.

La vacuna sufrió una serie de modificaciones pero siempre partiendo de la base de la elaborada por Pasteur. Zenkowski (1887), recomendó el uso de glicerina para suspender las vacunas esporuladas, con un triple objetivo: inhibir el desarrollo de contaminantes, aumentar la longevidad de los esporos y actuar como adyuvante de la inmunidad.

Otros autores propusieron la aplicación simultánea de vacuna y suero anticarbuncoso, lo cual tornaba engorroso y poco seguro el procedimiento ya que una dosis grande de vacuna (esporos) podría matar al animal y una pequeña no sería inmunógena ya que el suero contrarrestaría los efectos de la vacuna. Este método fue propuesto por Sorberhein (1913), quien adicionó suero a la segunda aplicación, es decir a la cepa menos atenuada.

Todas las vacunas elaboradas con esporos atenuados de ese entonces deben considerarse como ligeras modificaciones del método original propuesto por Pasteur.

Durante las décadas de 1920 y 1930, la vacuna original sufrió importantes modificaciones. Durante la primera de las décadas mencionadas, a la vacuna original de Pasteur se le adicionó un 50-60% de glicerina.

En esta década también se realizaron experiencias con la aplicación de una dosis única de vacuna suspendida en glicerina de una cepa lo suficientemente atenuada que no era patógena para conejos pero mantenía la patogenicidad para cobayos. Todas las vacunas elaboradas con la cepa Pasteur resultaron muy difíciles de estandarizar.

Entre los años 1929 y 1937 se realizaron distintas experiencias con diferentes tipos de vacunas, adicionándose entre un 4 y un 10% de saponina para atenuar la virulencia de la cepa. La saponina es un detergente que provoca una inflamación muy intensa, limitando la diseminación de los esporos, haciendo la vacuna más segura y favoreciendo la inducción de la inmunidad. Sin embargo, es capaz de producir fuertes reacciones inflamatorias y de hipersensibilidad, cuando la pureza de la saponina no es la adecuada.

El método original fue propuesto por Mazuchi (1931) quien adicionaba a la vacuna original entre 2 y 5% de saponina.

Una de las vacunas más conocidas fue la Carbazoo, producida por el Instituto Seroterápico Milanés y luego en Estados Unidos por el laboratorio Lederle.

Estas vacunas estaban preparadas a partir de cepas de alta patogenicidad, y para reducir la misma, muchos autores de la época, incluido Max Sterne consideraban que el agregado de saponina disminuía la peligrosidad de las mismas. De esta manera llegaron a adicionar saponina a la vacuna hasta en una concentración del 10% que provocaba gravísimas reacciones adversas. El propio Sterne, antes de desarrollar la vacuna que lleva su nombre disminuyó la concentración de saponina entre el 0,1 y el 0,5%

Max Sterne, nacido en Italia, en 1905, logró desarrollar una vacuna a partir de una cepa de carbunco patógena en el año 1937.

La cepa patógena aislada fue cultivada durante 24 horas en un medio que contenía 50% de suero equino en una atmósfera con un 30% de anhídrido carbónico. Obtuvo una cepa rugosa

acapsulada y acapsulógena, es decir sin cápsula y sin capacidad de producirla como consecuencia de haber perdido el plásmido responsable de la formación de la misma. Esta nueva cepa fue denominada 34 F2 y la vacuna elaborada a partir de la misma tuvo una amplia difusión en el campo veterinario.

La cepa Sterne ha perdido el plásmido pXO2 responsable de la formación de la cápsula pero mantiene el pXO1, responsable de la formación de toxina, siendo esta falta de capacidad de la producción de cápsula la única diferencia con la cepa patógena o de campo. Esto determina que la cepa Sterne pueda ser fácilmente endocitada por los PMN (debemos recordar que la cápsula es un componente con propiedades antifagocitarias), aunque mantiene intacta la capacidad de producir toxina en forma similar a la cepa patógena.

En 1944, Sterne comunicó el empleo de su vacuna en gran escala en Sudáfrica. A partir de entonces, el uso de la vacuna avirulenta de Sterne se ha extendido por todo el mundo incluida la Argentina, donde es la única vacuna aprobada por el ente nacional de regulación, SENASA, para su uso en Medicina Veterinaria.

El éxito obtenido por esta vacuna determinó que se pensara en utilizarla en Medicina Humana. Dada la capacidad de producción de toxinas que posee la cepa, la vacuna fue calificada como muy agresiva y peligrosa para ser empleada en la especie humana. Sin embargo, y a pesar de ello, fue autorizada y utilizada en numerosas ocasiones en la Unión Soviética, mientras que la mayoría de los países la consideraron inaceptable.

Vacuna Sterne: generación de la respuesta inmune

La vacuna Sterne de uso veterinario es un inmunógeno a base de esporos, clasificada técnicamente como espora vacuna, que contiene, como mínimo, 10.000.000 de esporas por mililitro, suspendidas en partes iguales de solución salina bufferada y glicerina, adicionada de saponina como coadyuvante de la inmunidad.

Los anticuerpos antitóxicos son los principales responsables de la protección, teniendo en cuenta que estamos ante una enfermedad séptico-toxémica, siendo las toxinas liberadas la principal causa de muerte. Hasta el momento no se ha puesto énfasis sobre la inmunidad mediada por células, pero es indudable que la misma debe ejercer su función en algún proceso intermedio y colaborar en la prevención de la enfermedad.⁶¹

La principal función de los anticuerpos es neutralizar al factor PA y así impedir que el mismo se heptamerice y permita la unión de los factores edematógenos o letal para dar lugar a la toxinas letal y edematógena

La inducción de la respuesta inmune está condicionada a la desesporulación del *Bacillus anthracis* cuando son inoculados en el organismo. La saponina, que actúa como adyuvante, provoca un fenómeno inflamatorio local marcado, que determina una disminución de la tensión de oxígeno en el foco flogósico provocado por la inoculación. Precisamente aquí las esporas

encuentran un medio adecuado, baja tensión de oxígeno, para comenzar a desesporular y pasar a forma vegetativa. Estas formas vegetativas serán acapsuladas, y acapsulógenas, por lo tanto podrán ser fácilmente fagocitadas por las células endocíticas y así regular la cantidad de células con capacidad de producir toxina.

Las pequeñas cantidades de toxina producida comienzan con la inducción de los anticuerpos neutralizantes que van contrarrestando los efectos tóxicos de la misma. De esta manera cuando la producción de toxina aumenta por el incremento de las formas vegetativas, el organismo posee la suficiente cantidad de anticuerpos como para evitar la enfermedad.

La cepa de campo con presencia de cápsula que inhibe la fagocitosis, no es limitada en su multiplicación y por ende elaboran grandes cantidades de toxinas que ocasionan la muerte del animal.

Esta explicación, si bien coherente, no se condice con la realidad en algunos aspectos. Hay otros factores que intervienen como es la presencia de PA en los esporos que parece comenzar una respuesta inmune primaria. También la inmunidad depende de la supervivencia de las células dendríticas resistentes a la acción de la toxina que serán las responsables de desencadenar la respuesta inmune. Las células dendríticas sensibles mueren por la acción tóxica y por ende no pueden generar respuesta inmune alguna. En la enfermedad natural la cantidad de toxinas generadas determina una mortalidad alta de células dendríticas e incapacidad de generar respuesta inmune.

La cepa Sterne como quedo expresado anteriormente tiene la capacidad de producir toxina y por lo tanto es una vacuna potencialmente peligrosa. Es absolutamente imprescindible que esté correctamente estandarizada en una concentración de 10.000.000 millones de esporas por mililitro. Si la concentración de esporos supera los 15.000.000 de esporos es necesario realizar prueba de seguridad complementaria en ovejas.

La dosis recomendada en vacunos y equinos es un mínimo de $2-10 \times 10^6$ esporas cultivables; en el caso de las ovejas, las cabras y los cerdos, es de 1 a $1,5 \times 10^6$ esporas cultivables. Los equinos pueden desarrollar la inmunidad de forma lenta tras la vacunación inicial; por lo tanto, algunos fabricantes recomiendan una vacunación inicial de dos dosis, administradas con 1 mes de diferencia, seguidas de un recordatorio anual único.

Las esporas de *Bacillus anthracis* son estables en vacuna no liofilizada o liofilizada y no son necesarios conservantes. Se recomienda guardarla refrigerada (4°C).

Las cabras y llamas son muy sensibles y debe administrarse con precaución y como máximo una dosis de 1ml., asumiendo riesgos.

Los animales vacunados no deben destinarse al sacrificio para consumo humano antes de las 2 o 3 semanas posteriores a la inoculación.

En caso de inoculación accidental de la vacuna en la especie humana, se aconseja consultar al médico e iniciar tratamiento con antibióticos en forma temprana. En la mayoría de los casos no resulta patógena para el humano, pero individuos con inmunodeficiencias pueden presentar algún inconveniente.

La vacuna se aplica a partir de los 3 a 4 meses de edad. La inmunidad dura alrededor de un año, quizás algo menos, dependiendo de circunstancias individuales. La época ideal de vacunación es el comienzo de la primavera de manera que los animales estén inmunizados en el verano que es donde la enfermedad recrudece, si bien la aparición puede presentarse en cualquier época del año. En los campos malditos, es decir donde la aparición de casos es mayor, se aconseja dos vacunaciones al año. No es aconsejable vacunar hembras preñadas.

La vacuna tiene la capacidad de producir inflamación en el sitio de inoculación.

Está contraindicada la administración simultánea de antibióticos a animales vacunados, pues el antibiótico puede interferir con la vacuna. No se deben dar antibióticos durante algunos días antes y algunos días después de la vacunación.

La lucha contra el carbunco debe encararse de una manera integral, es decir a través de la vacunación, que es obligatoria, la correcta deposición y decontaminación de los cadáveres y el correcto manejo de los animales.

Vacunas en la especie humana

Si bien la vacuna Sterne, dado su éxito en Medicina Veterinaria, se pensó en utilizarla en Medicina Humana, se la descarto por ser muy reactogénica y porque la capacidad de producción de toxinas que posee la hacen riesgosa para la especie humana. Sin embargo fue probada en la Unión Soviética.

La vacuna para uso humano denominada AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed) está basada en el antígeno protector (PA) adsorbido en hidróxido de aluminio y es utilizada en los Estados Unidos desde hace muchísimos años.

Las primeras vacunas de uso humano datan de la década del 50 en el Reino Unido y desde la década del 60 en Estados Unidos. Fueron probadas y demostraron su efectividad en la prevención de la infección en muchos modelos animales, incluidos primates no humanos.

La inmunogenicidad de la vacuna es baja y requiere de la aplicación de varios refuerzos para generar una respuesta aceptable.

Se fundamenta en la formación de anticuerpos anti PA que inhabilitan la heptamerización del mismo y la posterior formación e introducción de las toxinas a las células.

Existen otras vacunas en experimentación.

Vacunas aplicadas por la vía de las mucosas

Estas vacunas están diseñadas con el objeto de prevenir la infección y poder luchar así más eficazmente contra el carbunco inhalatorio fundamentalmente.

En este sentido, es de vital importancia el desarrollo de IgAs en las mucosas del organismo.

Con este objetivo, se están desarrollando vacunas para generar inmunidad en las mucosas por vacunación oral utilizando como vectores *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S. entérica* serovar Typhi) o *Lactobacillus* genéticamente modificados con capacidad de expresar PA.

También se encuentran en vía de desarrollo vacunas inoculadas por instilación nasal, a base rPA asociado a microesferas que se colocan en la nariz, o adsorbidas a liposomas para aumentar la inmunogenicidad.

Vacunas a base pa recombinante (rpa)

El desarrollo de la ingeniería genética permite la elaboración del rPA y desarrollar una vacuna a partir del mismo adyuvado con hidróxido de aluminio.

Vacunas de doble protección

Se han elaborado vacunas a partir de rPA complementado con antígenos capsulares y otros superficiales del *Bacillus anthracis*.

Vacunas basadas a base de esporos inactivados

Fueron ensayadas en cobayos requiriendo una alta concentración de esporos y aun así la protección entregada era muy baja.

Vacunas a base de capsulas

Destinada a elaborar anticuerpos que neutralicen la capacidad antifagocítica de la cápsula y así facilitar la endocitosis. El inconveniente que tienen es que la cápsula tiene baja capacidad inmunógena y requiere la copulación de la misma con ciertas proteínas para aumentar la capacidad de inducir inmunidad.

Vacunas de plásmidos

Se han realizado ensayos inoculando el plásmido codificador del PA al ratón y se logró la inducción de IgG en bajo título. La revacunación de los mismos con rPA aumento considerablemente la producción de anticuerpos.

Carbunco rural en la argentina

Entre los años 1590 y 1609 aparecen en las actas del Cabildo referencias a la aparición de la enfermedad en la República Argentina.

En el año 1847 fue el médico y científico argentino Francisco Javier Muñiz quien describe el primer caso humano de la enfermedad.

El poeta José Hernández, autor del célebre libro Martín Fierro, en una publicación que data del año 1882 describe una enfermedad denominada “ el grano, enfermedad conocida desde tiempos muy antiguos” y ya menciona la necesidad de no cuerear animales muertos súbitamente.

La primera remesa de vacuna anticarbuncosa que ingresa al país fue enviada por el propio Louis Pasteur en el año 1859, a raíz de la grave problemática que representaba la enfermedad.

La primera constancia debidamente documentada del uso de la vacuna anticarbuncosa en la República Argentina data del año 1886 y fue aplicada en una estancia de la localidad de Gualeguay, provincia de Entre Ríos.

El Dr. Bidali, discípulo de Pasteur y con quien había trabajado, fue uno de los primeros en elaborar, desarrollar e impulsar la producción de la vacuna en el país.

En la República Argentina fueron utilizadas en forma rutinaria durante muchísimos años las vacunas Pasteur, denominadas Pasteur I y Pasteur II. También fue utilizada una cepa denominada Chaco, probablemente de patogenicidad intermedia entre las Pasteur I y II, de difícil caracterización, una cepa denominada Delphy 5 y la Cepa Sterne.

A través de la Resolución 705/81, SENASA establece las normas de elaboración, control y uso de la Cepa Sterne.

La Ley N° 6703/1961 y la Resolución 115/2014 establecen la obligatoriedad de la vacunación en la Provincia de Buenos Aires.

La Provincia de Santa Fe mediante la Resolución N° 1007/14 vigente, establece el Plan de Vacunación OBLIGATORIO contra Carbunco bacteridiano.

El Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires a través de la Resolución 115/2014 establece una serie de medidas que pueden consultarse en la página de la institución.

*<http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/carbunco.php>

Desde el año 2002 a la fecha, el Dr. Ramón Nosedá y el Laboratorio Azul emiten informes y alertas de casos de carbunco rural en la Provincia de Buenos Aires.

Puede consultarse la información en la página oficial del Laboratorio o bien en los boletines emitidos.

La negligencia de los productores de no vacunar y la de los organismos de control nacional y/o provinciales de no fiscalizar el cumplimiento de las leyes vigentes adecuadamente, continuará manteniendo esta zoonosis en forma endémica. La intervención de los focos activos por la autoridad competente, la eliminación eficiente de los cadáveres y la vacunación obligatoria, son las únicas herramientas para su control; como medida preventiva y de protección de los bienes jurídicos: Salud Humana y Salud de los Ganados como fuente de producción.

Para el control de la enfermedad se hace necesario cumplir con 5 premisas importantes:

- Vacunación obligatoria de las especies susceptibles.
- Prohibición de cuerear animales muertos súbitamente.
- Eliminación de cadáveres en forma idónea, factible y eficiente.
- Introducir la figura del VETERINARIO CO-RESPONSABLE SANITARIO.
- Capacitación del personal involucrado en tareas de riesgo sanitario de los establecimientos ganaderos.

Puede obtener una información más completa se sugiere consultar los informes de

*OMS-WHO-CSR/C8-370-37 y los producidos por Laboratorio Azul Diagnóstico S. A. - Av. 25 de Mayo 485 (7300) Azul- Provincia de Buenos Aires - ARGENTINA. E-mail: rnoseda@laboratorioazul.com.ar

Referencias

- Abramova FA, Grimberg LM, Yampolskaya OV, Walker DH. (1993). Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlosk outbreak of 1979. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1993; 90:2291-4.
- Barth H, Aktories K, Popoff KR, Stiles BG. (2004). Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(3):373-402.
- Bail O. Research into natural and artificial anthrax immunity. *German Zentralb, Bakteriolog. Parasitenk Infektionskr.* 1904; 47:270-2.
- Bail O. Veränderung der Bakterien in Tierkörper. Ueber die Korrelation zwischen Kapselbildung, Sporenbildung und Infektiosität des Milzbrandbazillus. *Zentralbl Bakt Paras Infekt Krank. I. Orig.* 1915; 75:159-73.
- Bernagozzi J. A., Barragán J.H., Anselmino F. (2016). Carhunco. Pasado y presente. *16 AnalectaVet;* 36 (2): - Impresa ISSN 0365514-8 Electrónica ISSN 1514-2590
- Blaustein O, Koehjer TM, Collier RJ, Finkelstein A. Anthrax toxin: Channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipoid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86, 2209-13.
- Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 2001; 4:225-9.

- Cendrowski S, MacArthur W, Hanna P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol Microbiol.* 2004; 51:407-17.
- Chabot, D. J., Scorpio, A., Tobery, S. A., Little, S. F., Norris, S. L. and Friedlander, A. M. Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. 2004. *Vaccine* 23, 43-47.
- Coulson, N. M., Fulop, M. and Titball, R. W. *Bacillus anthracis* protective antigen, expressed in *Salmonella typhimurium* SL 3261, affords protection against anthrax spore challenge. 1994. *Vaccine* 12, 1395-1401.
- Crane BR, Sudhamsu J, Patel BA. Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 2010; 79:445-70.
- Davis B, Dulbecco R, Herman N, Eisen H, Ginsberg H, 1996. *Tratado de Microbiología*. 4a Ed. Barcelona. Salvat Editores.
- Domínguez Carmona M, Domínguez de la Calle M. El *Bacillus anthracis* como agresivo. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. <http://www.ranf.com>
- Elliot JL, Mogridge J, Collier RJ. A quantitative study of the interaction of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen. *Biochemistry.* 2000; 39, 6706-13.
- Fouet A. The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30:374-85.
- Koch R. Die aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. *Beiträge zur biologie der planzen.* 1876; 2:277-310
- Geison GL. *The private science of Louis Pasteur*. 1995. Princeton, NJ. Princeton University Press.
- Glomski IJ. *Bacillus anthracis* dissemination through host. En: Bergman NH. 2011. *Bacillus anthracis and Anthrax*. Hoboken, New Jersey. Wiley Blackwell, cap.12.
- Hanna P. Anthrax pathogenesis and host response. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 225, 13-35.
- Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA. For the Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a biological weapon: updated recommendations for management. *JAMA.* 2002; 287(17):2236-52.
- Ingram RJ, Harris A, Ascough S, Metan G, Doganay M, Ballie L, Williamson ED, Dyson H, Robinson JH, Sriskandan S, Altmann DM. Exposure to anthrax toxin alters human leucocyte expression of anthrax toxin receptor 1. *Clin Exp Immunol.* 2013; 173:84–91.
- Ivins BE. Anthrax vaccines. How stable is the potency? Presented at the ASMth ifc, General Meeting. 1998; Atlanta, May 18.
- Liu, S. Anthrax toxin targeting of myeloid cells through the CMG2 receptor is essential for establishment of *Bacillus anthracis* infections in mice. *Cell Host Microbe.* 2010; 8, 455-62.
- Mazzucchi M. The New Anti-Anthrax Vaccine Carbozoo. Its Composition and its Use in Practice. *Clin. Vet, Milano.*1931; 54, 577-80
- Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun,* 1983; 39, 371-6.

- Moayeri M, Leppla S. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Current opinion in Microbiology*. 2004; 7:19-24.
- Moayeri M, Sastalla I, Leppla SH. Anthrax and the inflammasome. *Microbes Inf.* 2011; 14:392-400.
- OIE. Manual de la OIE 2012. www.oie.int/es/
- Pasteur L, Roux E, Charbeland C. Sur l'étiologie du charbon, *C.R.Acad Sci. (Paris)*, 1880; 91:86-94.
- Pavan ME, Pettinari MJ, Cairó F, Pavan E, Cataldi AA. Bacillus anthracis: una mirada molecular a un patógeno célebre. *Revista Argentina de Microbiología* 2011; 43:294-310.
- Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, Eisen JA, Gill, SR.. The genome sequence of Bacillus anthracis Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 2003; 423, 81-86.
- Shlyakhov EN, Rubinstein E. Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine* 1994; 12(8), 727-30.
- Smith H, Keppie J. Observations on experimental anthrax: demonstration of specific lethal factor produced in vivo by Bacillus anthracis. *Nature*. 1954; 173, 869-70.
- Sterne M. Avirulent anthrax vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 1937; 7, 41-3.
- Tizard I. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 2009. 8ª Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.
- Turnbull PC. Anthrax vaccine: past, present and future. *Vaccine* 1991; 9(8),533-9.
- Zegers, N. D., Kluter, E., van Der Stap, H., van Dura, E., van Dalen, P., Shaw, M. and Baillie, L. Expression of the protective antigen of Bacillus anthracis by Lactobacillus casei: towards the development of an oral vaccine against anthrax. 1999 *J. Appl. Microbiol*, 87, 309-314.

CAPITULO 6

Vacuna contra Brucelosis bovina

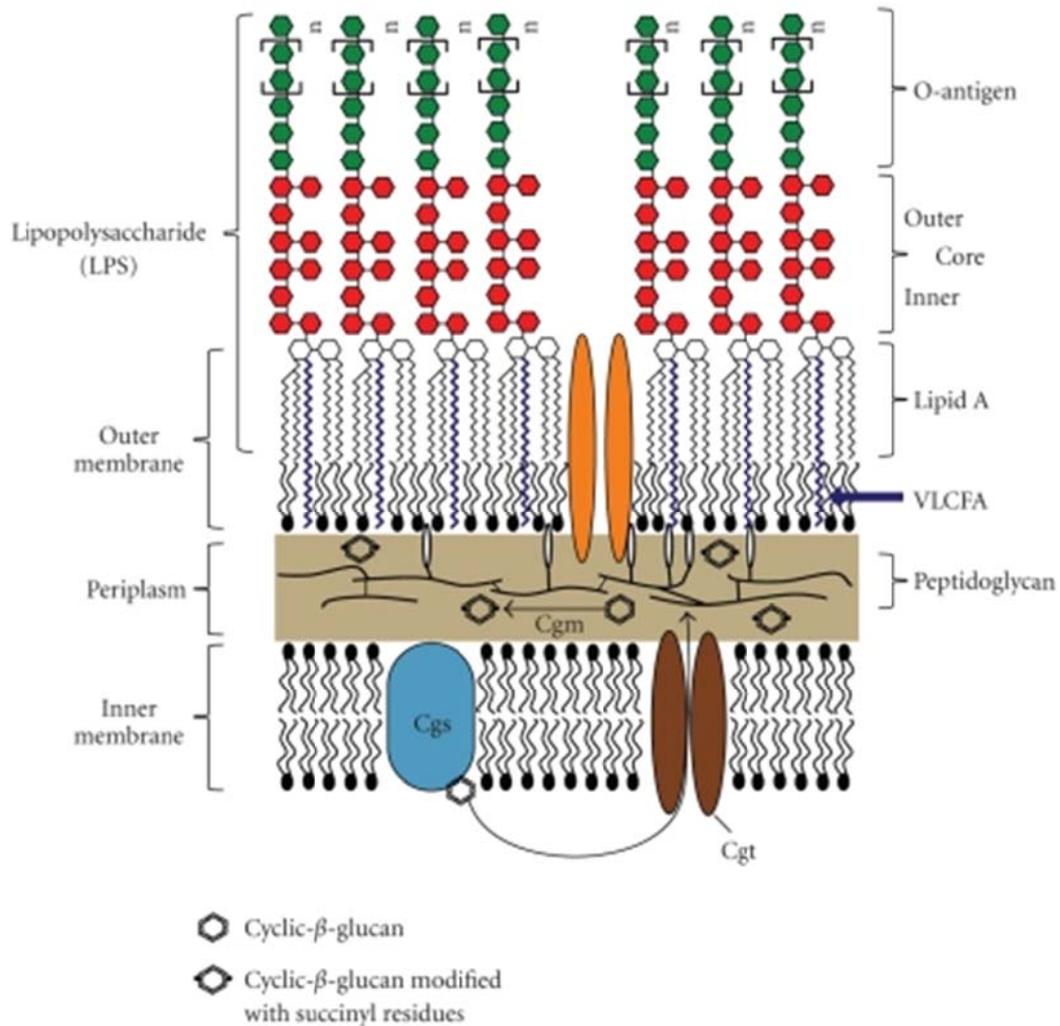
Graciela S. Miceli

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa, de curso crónico, de distribución mundial, que afecta a distintas especies de animales domésticos, de vida salvaje y al hombre. Es de transmisión vertical (60 a 70% de crías de madres con la afección, nacen enfermas) y horizontal entre los animales. Es de importancia en salud pública, debido a los costos generados por la incapacidad física que producen en el enfermo y las pérdidas ocasionadas por la afectación del ganado, ya que disminuye su capacidad reproductiva, produce abortos en el ganado, partos con crías débiles y contaminación de lácteos y carne. La brucelosis del ganado bovino (*B. abortus*), ovino y caprino (*B. melitensis*) y porcino (*B. suis*), son enfermedades que figuran en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y deben ser notificadas de manera obligatoria a la OIE. Es una enfermedad que no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado, esto favorece la evolución a la cronicidad.

Agente etiológico

La *Brucella* es un cocobacilo gram (-), de vida intracelular, inmóviles, de crecimiento lento. No poseen cápsula ni forman esporas. Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como receptores de electrones. Tiene un lipopolisacárido (LPS) fuertemente inmunodominante, junto con su capacidad de sobrevivir en el interior de las células, constituye uno de los factores de virulencia. Otra característica genética es que presenta una secuencia de dos cromosomas circulares y la ausencia de plásmido, esto último refleja su adaptación al nicho ecológico (ambiente intracelular). Se reconocen distintas especies, por sus variantes antigénicas y porque cada una tiene un hospedador principal, pero puede infectarse en forma cruzada entre los distintos hospedadores, existen: *B. abortus* (bovino), *B. canis* (canino), *B. melitensis* (caprino), *B. neotomae* (rata del desierto), *B. suis* (porcino), *B. ovnis* (ovino); en los últimos años se han identificado nuevas especies lisas: *B. pinnipedialis* (pinnípedos), *B. ceti* (cetáceos), *B. microti* (topillos campesinos y zorro rojo) y *B. inopinata* (trasplantes humanos).



Int.J.Microbiol.A.Haag.2010

Patogenia

La enfermedad es asintomática en las hembras no gestantes, cuando las bacterias ingresan en el organismo, son fagocitadas por los neutrófilos y monocitos y transportados por vía hematogena a los sinusoides del hígado, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, donde se multiplican en los macrófagos, los que juegan un rol central en la respuesta inmune, ya que no solo procesan y presentan antígenos sino que la supervivencia de la *Brucella* dentro de ellos está asociada a proteínas citoplasmáticas de la bacteria, entre ellas la superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) y la catalasa, la SOD forma parte del sistema antioxidante de la bacteria, el cual la protege de los intermediarios reactivos del oxígeno, ya que transforma el superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno gaseoso, la catalasa ayuda a SOD a detoxificar el ambiente bacteriano, la expresión de estas enzimas favorecen la permanencia en el interior del fagocito. En las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que, por lo general, provoca el aborto entre el quinto y noveno mes de gestación, incluso en ausencia de aborto se produce una gran excreción de microorganismos a través de la placenta, los líquidos fetales y los exu-

dados vaginales; como difusor de la enfermedad es también el hábito de las hembras de lamer los recién nacidos o los fetos abortados; las mamas y ganglios regionales pueden infectarse, con aparición de bacterias en la leche; las gestaciones posteriores llegan a término, pero la infección uterina y la mamas repiten la eliminación de microorganismos. Los machos pueden desarrollar orquitis, epididimitis, dermatitis escrotal, eliminando bacterias por semen, que ha demostrado ser una vía importante de transmisión cuando se utilizan programas de inseminación artificial, puede también eliminar por orina, se pueden presentar higromas (acumulación de líquido en las articulaciones de los miembros anteriores o posteriores, motivo que le impide el servicio natural). *Brucella* puede causar esterilidad en ambos sexos. Los terneros nacidos de madres infectadas, pueden eliminar bacterias por materia fecal, son los denominados silentes, los cuales son potenciales enfermos en la adultez.

En equinos ocasiona lesiones caracterizadas por inflamación y abscesos localizados a la altura de la nuca, se conoce como “Mal de la Cruz”.

B. ovis afecta exclusivamente al ovino y produce un cuadro que es la “Epididimitis del carnero”.

En los cerdos se considera venérea,

Datos Histórico

450 a.C Hipócrates existían evidencias de una enfermedad similar en humanos.

1854-1856-Guerra de Crimea fue descrita por primera vez.

1859- fue identificado por Marston en la isla de Malta (Fiebre de Malta)

1886 - Bruce aisló un *Micrococcus melitensis*, del bazo de un soldado en la Isla de Malta.

1895-Bang relacionó *B. abortus* con aborto del ganado vacuno.

1905-Zammit dedujo que las cabras eran reservorios (relación zoonótica)

1920-Evans relaciona a Bruce y Bang y establece el género *Brucella*.

1914-Traum aisló *B. suis*.

1956-Buddle y Boyce identificaron *B. ovis*.

1957-Stonner y Lackman aíslan *B. neotomae*.

1968- Carmichel y Brunner descubren *B. canis* en perro.

Epidemiología

La brucelosis es una zoonosis, se asocia frecuentemente a la población rural, afectando también a personas que están expuestos como veterinarios, laboratoristas y empleados de frigoríficos. En Argentina la principal especie responsable de enfermedad en el hombre es *B. suis*.

Presenta dos patrones epidemiológicos:

1) patrón urbano-alimentario, por consumo de leche y quesos no pasteurizados.

2) patrón rural-laboral, por exposición profesional al ganado infectado o sus productos, sea por contacto o inhalación. En este caso tiene una cierta tendencia estacional, generalmente ocurre en primavera y verano, que es el período de reproducción de los animales. La forma de eliminación, por lo emuntorios, en el parto o aborto completa el ciclo infeccioso, asegurando la contaminación de otros animales, por la gran cantidad de bacterias que se expulsan al medio, la persistencia del germen en la naturaleza, que se da porque pueden sobrevivir y mantener la

capacidad infectante durante períodos de tiempo variables, relacionados a las condiciones del medio en el que sean eliminadas. especialmente en condiciones de frío y humedad.

Puede transmitirse al ser humano, aun con la piel intacta

Es importante la enfermedad en la fauna salvaje, la presencia de este reservorio complica la erradicación de la afección.

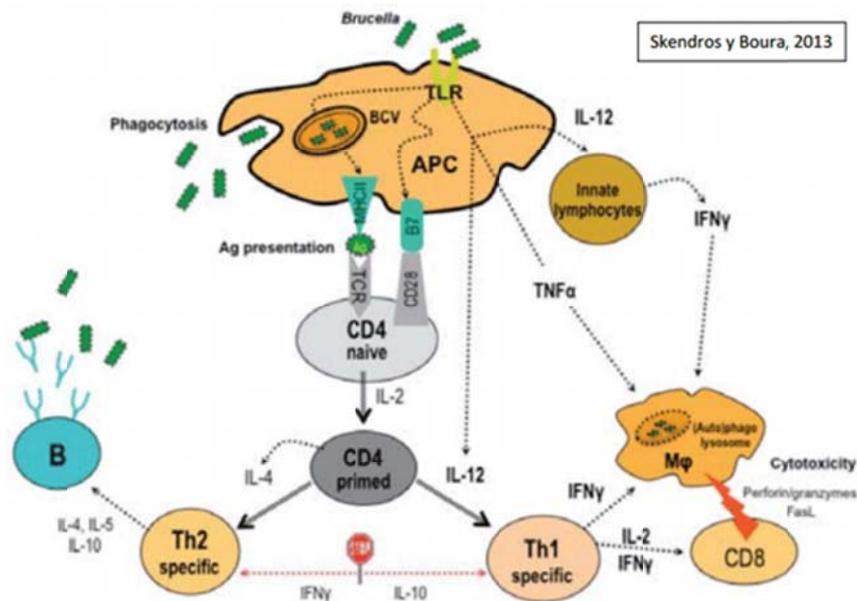
Respuesta Inmune

Cuando ingresa *Brucella* al organismo:

Inmunidad innata (II): trata de reducir el número inicial de bacterias promoviendo una respuesta mediante: 1) los macrófagos, el ingreso de la bacteria se produce a través de la interacción entre el receptor de tipo Toll4/MD2 complejo, que une al lípido A a la molécula de CD14 y el LPS, que a su vez, induce la producción de IL12 estimulando las células NK, y linfocitos LTh, que secretan INF γ favoreciendo la respuesta LTh1, la cual estimula la respuesta celular; 2) los neutrófilos, dentro de éstos, son capaces de ser transportadas a los tejidos linfoides; 3) células natural killer (NK), linfocitos $\gamma\delta$ y el Complemento (C'), se activa la vía alterna, la cual es incapaz de eliminar la *B.abortus* 2308, la lisis de *Brucellas* estaría mediada por la vía clásica, que puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS.

Los receptores Toll son importantes en la II, inducen señales intracelulares que activa al factor NF-kB, modulando la producción de citoquinas. El LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar linfocitos B (LB) sin la participación de lo LTh, generando IgM.

Inmunidad adaptativa se basa en tres mecanismos: 1^{ero} el INF γ , producido por células TCD4, CD8, NK, Linfocitos $\gamma\delta$, es una de las citoquinas que activa la función bactericida en macrófagos, 2^{do} la citotoxicidad de las células T CD8 y T $\gamma\delta$ que eliminan macrófagos activados y 3^{ero} isotipos de anticuerpos IgG2a que opsonizan al patógeno para facilitar la fagocitosis. El TNF α parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados.



Diagnóstico

El diagnóstico de certeza se establece aislando el microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos como placenta. Los métodos serológicos sólo aportan un diagnóstico presuntivo, cuando se efectúan en forma uniforme y se los interpreta con criterio epidemiológico constituyen, un instrumento más práctico para el diagnóstico.

Métodos directos: aislamiento de bacterias a partir de hemocultivos.

Métodos indirectos: sólo serán enumeradas, no es el propósito de este capítulo, figuran en detalle en el Manual de Diagnóstico Serológico de Brucelosis bovina de SENASA.

Se utilizan como antígenos, suspensiones de *Brucellas S ó R* según la cepa bacteriana.

Las cepas utilizadas son cepas *Brucellas abortus* 1119-3, sirven para detectar anticuerpos anti *B. suis, abortus y melitensis*, para *ovis y canis* necesitan específico de especie.

Las Pruebas son:

Pruebas de aglutinación: rápida BPA. Aglutinación lenta en tubo: SAT y 2 Me.

Fijación de Complemento.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Elisa Indirecto (ELISA-I) y Elisa de Competición (ELISA-C).

Polarización de Fluorescencia. (FPA)

Prueba de aglutinación rápida en placa para cepas rugosas de *B canis*. (RSAT).

Prueba de Inmunodifusión en agar (IDGA).

Vacunación

La prevención de la diseminación de *Brucella* se basa en la aplicación de la vacuna, en nuestro país, se utiliza la cepa S19, se cree que proviene, aunque hay alguna controversia en la bibliografía, de un aislamiento en 1923 a partir de leche de vaca, era una cepa virulenta, se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 año en el laboratorio, obteniéndose bacterias atenuadas. Tiene ventajas y desventajas, el mayor inconveniente es la producción de anticuerpos que pueden confundir el diagnóstico. **Es una vacuna viva atenuada.**

La vacuna con cepa 19S protege contra el aborto y la infección, la dosis aplicables a las hembras es de $15-30 \times 10^{10}$ células de *Brucella abortus*, por dosis de vacuna, se aplica 2ml, por vía subcutánea. **No se vacuna a los machos.**

El período de aplicación de la vacuna es entre **los 3-8 meses, preferentemente 6 meses**, variando el tiempo de negativización de acuerdo al momento de la vacunación, si se vacunan a los 3 meses, sucede a los 2 meses posteriores, a los 6 sucede 6 meses posteriores y si se realizaría a los 9 meses (fuera de lo permitido) aparecen anticuerpos hasta los 15 meses, considerando ese individuo sospechoso. Se realiza la vacunación considerando el momento del servicio.

Método de Producción y Controles, sigue los lineamientos de las vacunas vivas atenuadas. (Cap.1).

Respuesta Inmune a la Vacunación

Al ser una vacuna viva atenuada, produce respuesta celular y humoral, siendo la respuesta celular la más importante.

En respuesta a la vacunación, se producen anticuerpos de las clases IgM e IgG, las IgM son las primeras en aparecer, se detectan entre 5-7 días postvacunación, alcanza su pico a las 2-3 semanas, posteriormente decrece su concentración, sin desaparecer por varios meses, las IgG se producen más tarde, entre 14-21 días y alcanzan su máxima concentración entre los 28-42 días, declina rápidamente y desaparecen antes que IgM; las IgG que se producen son IgG₁ e IgG₂, siendo la 1 las más abundantes en suero y supera la concentración de IgG₂, lo mismo sucede en el enfermo crónico, en el animal infectado la secuencia en la producción y persistencia tiene una diferencia, las IgG desarrollan el nivel más alto y persisten más tiempo, por un estado activo y progresivo de la enfermedad ó en caso de cronicidad, a medida que progresa la infección, la IgM tienden a desaparecer, la repetición del estímulo o la vacunación hace que la IgG por la memoria inmunológica se sintetice más rápida y eficazmente, en tanto IgM se comporta como un estímulo primario simple, ya que no posee memoria. La IgG₁ disminuye en el período próximo al parto, debido a la movilización hacia el calostro, en la leche del animal enfermo aparecen también IgM e IgA de origen local.

Nuevas Vacunas contra Brucelosis:

Vacunas Subcelulares:

Vacuna Delta-pgm: en experimentación para bovinos.

Se trabajó identificando y caracterizando un gen que codifica la enzima fosfoglucomutasa (pgm) de *B. abortus*, la cual cataliza la interconversión reversible de glucosa -6-fosfato a glucosa -1-fosfato. Se generó una mutante por delección no marcada en dicho gen. La cepa generada es de fenotipo rugoso, incapaz de sintetizar el glucano β 1,2 cíclico, importante factor de virulencia. Se hicieron pruebas piloto en bovinos.

Vacunas de proteína recombinantes:

Estudiaron dos proteínas por técnicas biomoleculares y observaron que, las que más protegían eran la brucella lumazina sintetasa (BLS) y OMP31, por inserción de un péptido de la OMP31 en la estructura de la BLS construyeron una proteína quimérica entre las dos. Aún en experimentación.

Otra Vacuna es a ADN: consiste en inocular en los animales que se desea proteger el gen de la bacteria que codifica para la proteína de interés, de esa forma se logra que el animal vacunado produzca por sí mismo la proteína. Esta vacuna está en experimentación en nuestro país.

Programa de Brucelosis bovina

Define estrategias y acciones a desarrollar en todo el territorio nacional, en el marco del Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina (Resolución SENASA 150/2002), con el objetivo de consolidar en forma progresiva la condición de áreas libres de enfermedad.

Las actividades del Programa incluyen:

Vacunación

Control de Egresos

Vigilancia Epidemiológica

Estatus sanitario de los establecimientos.

Vacunación en caprinos

Vacuna REV-1: la cepa fue aislada de una placenta de un aborto de una oveja. Se recomienda vacunar en los períodos de cría o durante la lactancia para prevenir abortos. Es una vacuna viva atenuada, estable, produce abortos si es aplicada en hembras gestantes, se excreta en leche e interfiere con la serología. Es una cepa mutante estreptomycin dependiente, proviene de la cepa *Brucella melitensis* 6056, produce cuando se inocula, al igual que la cepa 19 una infección controlada.

Se usa solamente en zonas endémicas como Mendoza, San Juan, Catamarca, y el este de Salta, que adhirieron al plan de vacunación coordinado por SENASA.

A partir del 14 de junio de 2017, por Resolución 372-E/2017, se aprobó el **Plan Nacional de Control de Brucelosis Caprina en la República Argentina**, donde quedan explicitadas todas las condiciones para el manejo de los hatos, aplicación de la vacuna REV-1, movimientos y todo lo relacionado al Control.

Para las zonas endémicas del país, se establece la aplicación de la vacuna B. melitensis Rev-1 de manera masiva y sistemática en la población caprina y ovina, por vía conjuntival, cada dos años en cada establecimiento. (Boletín oficial).

Referencias

- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. and Verger J.M., (1988). Techniques for the brucellosis. Laboratory. INRA, Paris.
- Castro, AH; Gonzalez,SR; Prat, MI. Brucelosis: una Revisión Práctica ..Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 39 (2), 203-16 . 2005.-
<http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v39n2/v39n2a08.pdf>
- Comerci,D;Ugalde,J,Del Vecchio,V.Delta-pgm: Vacuna contra Brucelosis. Universidad de San Martín.11B.Intech.
- Esteyn, SM; Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Revista Electrónica de Veterinaria. (REDVET). Vol. VII, N° 5. 1-25.Mayo 2006.-
<http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Documentos%20novedades/Senasa/Documentos/apunte%20curso1.pdf>
- Favero,V, Spirito,MF,Zappa,V. Brucelosis bovina. Revista científica eletrónica de Medician Veterinaria. ISSN:1679-7353.Ano VI. N°11 julho 2008.-
- Garcia-Carrillo,C., . La brucelosis de los animales en América y su relación http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.03.%20Brucelosis%20bovina.pdf la infección humana. O.I.E., Paris.1987.-
- Manual de la OIE sobre animales terrestres. Cap 2.4.3.Brucelosis Bovina. 2008.

- Manual diagnóstico serológico de la brucelosis bovina 2009. SENASA.
[http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Documentos%20novedades/Senasa/Documentos/Manual BrucelosisSENASA202009.pdf](http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Documentos%20novedades/Senasa/Documentos/Manual%20BrucelosisSENASA202009.pdf)
- Nielsen K.H. and Duncan J.R. (eds.) (1990). Animal brucellosis. C.R.C. Press, Boca Ratón.
- Paolicchi, F. Epididimitis del carnero por *Brucella ovis* INTA Balcarce. 2005<http://www.ovinos-caprinos.com.ar/SANIDAD/Brucelosis%20Ovina%20-%20INTA.pdf>
- Paulin, LMS; Andrade-Pacheco. WA, Castro, V. Federsoni, ISP. (2009). Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *Brucella abortus* en bovinos. *Arq.Inst.Biol.Sao Paulo*, v.76,n1,p9-15.Jan/mar. 2009.
- Saldarriaga,O, Rugeles, MT. Inmunobiología de la infección por *Brucella* spp: Fundamentos para la estrategia vacunal. *Rev.Col.Cienc.Pec.* Vol 15:2, 2002.
- SENASA. Boletín Oficial, versión electrónica. Resolución 372-E/2017.Plan Nacional de Control de Brucelosis caprina. (<https://www.boletinoficial.gob.ar>).

Capítulo 7

Vacuna para Rabia Paresiante

Graciela S. Miceli

Introducción

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda que afecta al hombre y todos los animales de sangre caliente. Es zoonótica, de alta mortalidad y de difícil control debido a que está presente y circulante. Su denuncia es obligatoria y la vacunación es la herramienta más eficaz para prevenir esta enfermedad.

Agente etiológico

Es un virus ARN, neurotrópico, de forma alargada cilindro-cónica “parecido a una bala de fusil”. Pertenece al género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae*, se transmite a todos los mamíferos, y afecta al Sistema Nervioso Central. La transmisión al humano es por inoculación o inhalación de virus infeccioso. El virus tiene cinco proteínas estructurales: la G (glicoproteína) que alterna con proteínas M1 y M2 (proteínas de matriz); en la nucleocápside se encuentran las proteínas N (nucleoproteína), NS (nucleocápside) y L (transcriptasa). La glicoproteína es el mayor componente antigénico, responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes, que son los que confieren inmunidad; también tiene actividad hemoaglutinante.

En el género *Lyssavirus* se pueden distinguir siete líneas genéticas(G), las que fueron determinadas por pruebas de protección cruzada y biología molecular. El virus de la rabia clásico (RABV G1) es el que está presente en Argentina, el virus murciélago de Lagos (LBV G2), el virus Mokola (MOKV G3), el virus Duvenhage (DUUV G4), G5 a G7 corresponden a virus de murciélagos europeos y australianos.

El virus G1 presenta diferencias estructurales en su proteína N (nucleoproteína), al ser detectados por anticuerpos monoclonales permite establecer variantes antigénicas (Tabla 1) cada una de las cuales está adaptada a determinados reservorios y conforma un ciclo de rabia (se define como tal a la circulación del virus en un determinado ámbito a partir de reservorios naturales), el hecho que cada variante tenga un reservorio natural, no excluye que pueda infectar a una especie no reservorio, fenómeno que se denomina “spillover”. Ej:

el murciélago insectívoro (*Tadarida brasiliensis*), reservorio de la variante 4 (ciclo aéreo) puede infectar a un perro o gato, pero no significa que se hayan adaptado a ellos, sino que son huéspedes finales y no un nuevo reservorio.

V1	Perro-Gato-Ciclo Terrestre-urbano
V2	Perro-Cánidos silvestres. Ciclo terrestre-rural
V3	Quirópteros hemtófagos(<i>Desmodus rotundus</i>)-Ciclo aéreo-rural
V4	Quirópteros insectívoros(<i>Tadarida brasiliensis</i>) Ciclo aéreo-urbano
V6	Quirópteros insectívoros (<i>Lasiurus cinereus</i>)-Ciclo aéreo-rural-urbano
Otras	<i>Myotis</i> spp/ <i>Eptesicus</i> spp/ <i>Histiotus montanus</i> -ciclo aéreo

Tabla 1. Variantes antigénicas de virus rábico. Fuente: Programa Nacional de Control de Enfermedades Zoonóticas. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud Pública.

Dentro de los virus rábico clásicos, debe señalarse la diferencia entre “virus calle”, que se refiere al recientemente aislado de un animal, que no ha sufrido modificación en el laboratorio, las cepas de éste virus se caracterizan por un período variable de incubación, que a veces es muy prolongado y por su capacidad de invadir las glándulas salivales y el “virus fijo” que son cepas adaptadas al laboratorio por pasajes intracerebrales en serie y que tienen un período de incubación de 4 a 6 días y no invaden las glándulas salivales.

Dato histórico

La rabia como tal data de 4000 AC, lo consideraban un castigo divino, Demócrito, filósofo griego, junto con Aristóteles, hicieron una descripción detallada de la enfermedad y manifestando que se transmitía a través de la mordedura, Celsius identificó la hidrofobia como síntoma. Los ingleses la introdujeron en América, aunque se sospecha que por los murciélagos ya existía. Entre 1514-27 en México se produjo la aparición de varios casos, en 1800 en Europa comenzó aparecer una gran cantidad de casos humanos, mordidos por zorros y perros, es aquí cuando Pasteur, Roux y Chamberland realizaron la primera experiencia de una “vacuna” producida con virus propagado en tejido nervioso, médula desecada y que aplicando varias dosis, lograron salvar la vida de un niño de 9 años. En 1911 Semple produjo una vacuna “in vivo” inactivada con fenol, 30 años más tarde se adaptaron al cultivo en huevo embrionado, 20 años después las vacunas comenzaron a producirse en cultivo y hoy se utilizan sólo las que resultaron más eficaces y seguras.

Distribución geográfica

Se encuentra en todos los continentes con excepción de la Antártida, pero no hay datos documentados sobre estudios en esa población, que demuestre la ausencia de ésta enfermedad. Hay países libres y otros, como Argentina, que es país catalogado como país con rabia controlada con vacunación.

Patogenia y sintomatología de la Rabia Paresiante

Es una enfermedad mortal, epidémica, regional, focal y cíclica. Se debe prevenir por vacunación a los animales, en los meses previos al verano, ya que en esa época es cuando hay más circulación de vampiros. La mortalidad en el ganado puede superar el 75%, según datos de SENASA, el área endémica se muestra en el mapa (Figura 1), a partir de 1986 se incorporó el estudio de aspectos epidemiológicos y ecológicos del vampiro, que actúa como el transmisor de la enfermedad. El virus es el mismo que causa la enfermedad en caninos y felinos, el período de incubación (PI) es de 25 a 150 días; cuando comienzan los síntomas pueden morir dentro de los 2 a 10 días; el cuadro se presenta con decaimiento, falta de apetito, temperatura, cese de producción de leche en los animales de tambo, se alejan, no son agresivos, sí tienen períodos de excitación, golpean con los cuernos el suelo, mirada perdida, instinto sexual exacerbado, aparece luego parálisis de la glotis, salivación, parálisis del tren posterior denominado paresia, de ahí el nombre de paresiante, se tambalea, mal de las caderas, camina derrengado (derriengue), el mugido en el bovino como el relincho en el caballo es anormal, por la encefalitis, pierde la conciencia. No se transmite en forma horizontal porque no se muerden entre ellos, se comportan como “huéspedes finales” o “fondo de saco”, no la transmiten en forma activa.

En los bovinos rabiosos el virus puede aislarse del cerebro, ojo, lágrimas (tener cuidado con las maniobras de volteo), se aísla con poca frecuencia de glándulas salivales y tejido periférico, (para todas las maniobras que se realizan en la boca o tejidos adyacentes, deben usarse medios de protección adecuados).

La enfermedad en equinos, ovinos y caprinos es semejante a bovinos.

En porcinos induce: excitación muy violenta, semejante a la furiosa del perro.

En aves la enfermedad es de carácter excepcional

En fauna silvestre (ciervos, carpincho, venado, zorro) es semejante a perros.

Dispersión del vampiro común (*Desmodus rotundus*) y de la rabia paralítica en la Argentina



Figura 1: Dispersión del vampiro común (*Desmodus rotundus*) y de la rabia paralítica en Argentina. Fuente: SENASA

Transmisión

En nuestro país se transmite por la mordedura del vampiro (*Desmodus rotundus*), que habita en huecos de árboles, cavernas, entretechos, se reconocen los lugares donde habita el animal por la gran cantidad de materia fecal alrededor del área, semilíquida y de fuerte olor, viven en colonias de hasta 500 individuos (foto 1).

El principal vector es el vampiro, pero también especies insectívoras y frugívoras pueden transmitirla.

El vampiro común tiene características que lo diferencian en su rostro de los demás murciélagos, el hocico recuerda el de un cerdo, la dentadura está adaptada a la alimentación hematofaga: incisivos centrales superiores son triangulares, los inferiores bilobados y chicos (foto 2), el pulgar de sus alas está muy desarrollado y se observan plantillas palmares bien diferenciadas (foto 3). La mayor población de vampiros se ubica cerca del ganado, que es su fuente de alimentación. A medida que progresa la enfermedad, la población disminuye, hasta quedar en niveles bajos y el brote de rabia cede. La tasa de reproducción de los vampiros es baja, lo que explica los largos períodos interepidémicos (sin rabia); tienen una cría por año, el amamantamiento dura alrededor de 9 meses, las crías están en el refugio hasta los 12 meses cuando comienzan alimentarse solas; la expectativa de vida es larga, pueden llegar a 10 años o más. Se alimentan cerca del refugio ya que por la cantidad de sangre que consumen se les dificulta el vuelo, muerden como en sacabocado y lamen hasta por 20-30 minutos, el efecto anticoagulante de la saliva, que contiene proteínas anticoagulantes y fibrinolíticos inhibidores de la coagulación, activadores del plasminógeno e inhibidores de la agregación plaquetaria, ayudan a mantener el sangrado mientras se alimenta lo cual hace persistente la hemorragia.



Figura 2: A: refugio de vampiros. B: dentadura característica., C:dedo pulgar del ala del vampiro.
Manual de Procedimientos de rabia Paresiante. (SENASA)

El *D. rotundus* muerde a los animales en zonas donde no pueden espantarlos: base del cuello, detrás de las orejas, alrededor de los ojos, base de la cola, mamas (más común en las cerdas). Las complicaciones de las heridas, por infecciones y miasis, en los animales jóvenes, producen muchas pérdidas económicas.

El control del vector puede realizarse a través de la utilización de vampiricidas a base de sustancias anticoagulantes, se aplican en el dorso y vientre de los murciélagos previamente atrapados, al acicalarse entre ellos consumen dicha sustancia que les causará una hemorragia interna y la posterior muerte, éste es un método selectivo y se aprovechan los hábitos de limpieza del murciélago. Tienen transmisión intraespecífica, se muerden entre ellos y adquieren la rabia, van a otro refugio y retransmiten la enfermedad, eliminan virus por saliva, antes de manifestar los síntomas, cuando los evidencian mueren a los pocos días.

Vacunas para rabia Paresiante:

Las vacunas son inactivada con BEI, se realizan con la cepa viral ERA en cultivos celulares de la línea BHK, con el agregado de adyuvante de gel hidróxido de aluminio. También puede emplearse la cepa viral PV (virus Pasteur).

Antes de ser aplicada la vacuna se deberá comprobar:

- Vigencia del producto, constatar la fecha de vencimiento del mismo.
- Conservación adecuada: entre 4-8°C, según laboratorio productor.
- Aplicación: vías y dosis respetando las indicaciones del laboratorio productor.

Producción y Control de la Vacuna:

Siguen los lineamientos de las vacunas virales inactivadas, las de uso en el país (Cap. 1).

Áreas Endémicas: Regímenes de Vacunaciones Especiales.

La vacunación es obligatoria en bovinos, en aquellos establecimientos de engorde a corral, debiendo vacunarse al ingreso de los animales. En el caso de equinos, se debe considerarla obligatoriedad de la vacuna en aquellos animales que son utilizados en eventos deportivos, pues circulan por distintas provincias; o en cabañas y haras donde puede haber presencia de rabia pasesante; también se debe realizar la vacunación antes del envío de animales a exposiciones o remates. En todos los casos son dos dosis de vacuna, la 1^{ra} entre 80 y 60 días y la 2^{da} entre 50 y 30 días antes del traslado.

Respuesta Inmune a la vacuna:

Esta respuesta es humoral, con producción de anticuerpos neutralizantes fundamentalmente contra la glicoproteína (G).

La duración de la respuesta inmune, considerando el valor antigénico de la vacuna, dependerá de las indicaciones expuestas por el laboratorio productor. La revacunación es anual o por períodos mayores y es determinado por pruebas de seguimiento y validación del laboratorio productor.

Ciclos Epidemiológicos

En Argentina se mantienen por dos ciclos:

Ciclo urbano:

-Terrestre: (variante 1) principal reservorio, son perro y gato. Poblaciones callejeras no vacunadas.

-Aéreo:(variantes 4,6 y otras) los reservorios son los murciélagos insectívoros.

Ciclo Rural:

-Terrestre:(variante 2) reservorios son perros y animales silvestres (zorros).

-Aéreo: (variantes 3,4,6 y otras),el vampiro es el reservorio de la variante 3 y los murciélagos del resto de las variantes aéreas.

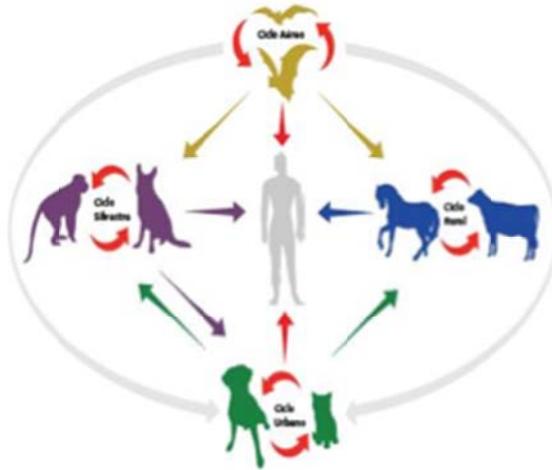


Figura 3: representación gráfica de la transmisión de la rabia. Fuente: *l'Associació Biotecnòlegs Catalunya*

Plan de Control

En plan de control incluye la vigilancia epidemiológica, el combate del vampiro y la vacunación del ganado.

Vacunación: No es obligatoria, el costo económico sería mayor que las pérdidas por la enfermedad; la exigencia de la vacunación obligatoria no vale como estrategia, pues la rabia continúa con el vampiro; sólo se vacuna en el establecimiento del brote y sus linderos (ver control de foco); siempre se debe completar la planilla de brote del SENASA.

Definiciones de foco

Foco de rabia: es en el escenario urbano y silvestre, con presencia de 1 ó más casos.

Foco notificado: es el foco identificado, registrado e informado a la autoridad competente.

Foco investigado: es sobre el que se hecho la investigación epidemiológica.

Foco controlado: luego de intervenido no ha presentado nuevos casos.

Focos en Rabia Paresiante: se recomienda vacunar todos los animales susceptibles del establecimiento con el brote y su lindero en un radio de 10km, caninos, felinos y animales en producción, según lo establecido por SENASA.

Al efectuar el control, hacer tareas de seguimiento y vacunación considerando la dimensión espacial, que depende de la especie que originó el foco: 200m a la redonda si se originó por murciélago frugívoro, 10km si se trata de hematófago, 500m en el caso de gato, en perros 500m en un animal estable o determinando, si es vagabundo, con un corredor de 100m a cada lado del trayecto.

En el Brote:

¿Cómo se debe actuar para poder tomar las medidas cuarentenarias?

Los establecimientos son interdictados, para evitar la faena y consumo; en cada lugar se procederá a extraer material de un animal sospechoso o con sintomatología de rabia, para enviar al laboratorio de diagnóstico, **las muestras solo deben ser extraídas por el Médico Veterinario o paratócnico acreditado para tal fin**, se remitirán las muestras en frasco hermético o bolsa, sin agregado de ningún tipo de sustancia, correctamente rotulado, se mantendrá refrigerado y se enviará, perfectamente cerrado y sellado.

Se mantienen medidas de restricción sobre los animales, por un periodo de 30 días después de la vacunación.

Se deben incinerar los cadáveres o enterrarlos, de no ser posible completo, se debe realizar la incineración de la cabeza.

Si hubo contacto por parte del personal, con los animales sospechosos, tomar las medidas sanitarias correspondientes para la protección del personal.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico presuntivo se basa principalmente en la presencia del vampiro y sus ataques, como se sabe, la rabia es multiespecífica (con respecto a los huéspedes), teniendo conocimiento de esto, se debe realizar en el laboratorio, el diagnóstico diferencial con botulismo en el bovino o encefalitis en el equino, ya que ambas se presentan con sintomatología nerviosa.

Disponibilidad

Vacunas Comerciales

Referencias

Acha, P; Zifres, B, OPS. Publicación científica N°503.1989. 2^{da} Ed. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.

Manual OIE sobre animales terrestres. (2004).Cap.2.1.13.Rabia.

Manual de Normas y procedimientos para la vigilancia y control de la rabia.2007. Ministerio de salud. Presidencia de la Nación. República Argentina.

Normas y Recomendaciones Nacionales para la Vigilancia, Prevención y Control de la Rabia en Argentina.2015. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación.

Manual de procedimientos Rabia Paresiante.2004. Dirección de Lucha Sanitaria. Dirección Nacional de Sanidad Animal.Nº8.

Simposio Argentino sobre Rabia. Rabia: una enfermedad vigente.30 de junio y 1 de julio de 2016.Fundación Pablo Cassará. Buenos Aires.-

Manual de Procedimientos en Rabia Paresiante. 2011. Delpietro, H; Russo, G.1ª ed. Buenos Aires.

Delpietro,H,Russo, G.2009.Acquired resistance to saliva dam Anticoagulants fe don by vampire bats (*Desmodus rotundus*): Evidence for Immune Response,.J. Mammalogy 90(5).1132-1138.-

La importancia de prevenir la Rabia Paresiante. Revista Electrónica de Veterinaria: RED-VET.ISSN1695-7504.Vol.VI Nº10.Octubre 2005.

CAPÍTULO 8

Vacunas clostridiales en rumiantes

Lais Luján Pardini

Las enfermedades clostridiales de los bovinos y ovinos son toxi-infecciones causadas por bacterias anaerobias del Género *Clostridium*. Las manifestaciones clínicas que desarrollan los animales pueden variar de acuerdo a la especie afectada como así también a la categoría involucrada, las toxinas producidas por el agente causal pueden generar desde trastornos digestivos, neuromusculares, disnea, depresión hasta incluso la muerte repentina. La forma más efectiva de prevenir su aparición es principalmente la vacunación de los rodeos en las zonas enzoóticas y la implementación de las medidas de prevención en las situaciones que puedan favorecerlas.

Agente etiológico

Algunas bacterias del género *Clostridium* pueden causarlas en ovinos, caprinos y bovinos aunque también pueden verse afectados cerdos y equinos. Son bacilos Gram positivos anaerobios estrictos por lo que producen energía por fermentación, en su mayoría no poseen cápsula y forman endosporas como forma de supervivencia. Su principal hábitat es el suelo y el tracto intestinal de los mamíferos.

En su forma vegetativa poseen diversos factores de patogenicidad que forman parte de la estructura del agente como por ejemplo las fimbrias que le otorgan adherencia; los flagelos, movilidad; la cápsula que les permite evadir la fagocitosis, todos ellos con actividad inmunogénica. Por otro lado las toxinas: mayores, preponderantes en la patogenia y generalmente letales y las menores, secundarias o complementarias siendo en general no letales “per se”, pero si todas con capacidad inmunogénica.

Entre los más frecuentes en veterinaria que nos enfocaremos en este capítulo son:

Cl. chauvoei

Cl. septicum

Cl. novyi

Cl. perfringens

Cl. botulinum

Cl. tetani

Datos históricos

Los bacilos anaerobios comenzaron a ser investigados por Pasteur en 1863, en 1877 describió por primera vez a *Clostridium septicum* (en ese momento denominado “vibrión septique”), en 1894 *Bacillus oedematiens* por Novyi (*Clostridium novyi oedematiens*), *Clostridium perfringens* fue descrito por Welch y Nuttal en 1892 identificado como *Bacillus aerogenes capsulatus* y también como *Clostridium welchii* en Gran Bretaña.

Epidemiología y características de la enfermedad

Las enfermedades clostridiales son toxo-infecciones que pueden afectar a un amplio rango de hospedadores con diversas manifestaciones y gravedad de acuerdo al órgano afectado y al agente involucrado determinadas por el tipo de toxinas producidas por el mismo.

Mancha, gangrena enfisematosa, miositis necrótica (black leg, carbunco sintomático, mal de cuisse, boutvuur)

Es una infección endógena, no contagiosa enzoótica causada por *Clostridium chauvoei*. En zonas donde hubo inundaciones con posteriores sequías o donde estuvieron enterrados animales muertos por la enfermedad y existen posteriormente movimientos de tierra se dan las condiciones para la transmisión del agente. Puede afectar a bovinos jóvenes de 3 meses a 2 años preferentemente durante la estación cálida (los menores de 3 meses están protegidos por la inmunidad calostrual). Luego de que los esporos son ingeridos con la pastura, heno o silaje pueden ingresar por lesiones en la boca, como cambio de dientes o algún traumatismo en los pre-estómagos y así pasar al torrente sanguíneo y localizarse en los músculos esquelético o cardíaco a la espera de las condiciones adecuadas para pasar a su forma vegetativa capaz de producir toxinas y gas. Suele presentarse asociada a lesiones musculares por golpes que generarían un ambiente hipóxico que favorece la desesporulación y el desarrollo de la enfermedad por la producción de toxinas que impiden los procesos de defensa inmune, aumentan la permeabilidad vascular, causan necrosis y lisis tisular que se manifiestan en forma hiperaguda o aguda con hinchazón local, trastornos locomotores (temblores), afección del estado general, disnea, caída en decúbito, coma y muerte.

Diagnóstico diferencial:

Edema maligno, gangrena gaseosa. También con septicemia hemorrágica, enterotoxemia, hemoglobinuria bacilar, y otras no infecciosas como electrocución o fulguración por rayos. Puede realizarse el diagnóstico definitivo por cultivo y tipificación del agente *Cl. chauvoei* por aspiración del centro de la lesión en el animal vivo o durante la necropsia. Los animales no pueden ser consumidos, prohibido enviarlos al matadero.

El tratamiento: con penicilina o sueros hiperinmunes en altas dosis podría realizarse en animales de alto valor.

Clostridiosis, enterotoxemia:

Es una enfermedad entérica endógena y generalizada causada por distintos tipos de *Clostridium perfringens* principalmente tipo D en ovinos y caprinos y tipo A en bovinos que es de baja patogenicidad para esta especie. El desarrollo de la enfermedad suele estar condicionado por cambios bruscos en la dieta, alto grado de parasitismo intestinal y sobredosificación con productos farmacéuticos. En algunos brotes la morbilidad alcanza el 50%. Es más frecuente en neonatos de hasta 10 días de vida y terneros de entre 1-4 meses pero puede afectar a ovinos de hasta 12-18 meses.

Tabla 1: Tipos de *Cl. perfringens*, toxinas y efectos sobre los tejidos del hospedador

Tipo	Toxina principal	Efectos
A	α	Hemólisis
B	β (α , $\alpha\epsilon$)	Necrosis de la mucosa intestinal
C	β (α)	Necrosis de la mucosa intestinal
D	ϵ (α)	Aumento de la permeabilidad vascular, toxicidad del sistema nervioso central
E	I (α)	Diarrea, necrosis cutánea

En el calostro existe un inhibidor de la toxina β y por lo tanto en terneros puede haber destrucción de las microvellosidades intestinales, adhesión de los microorganismos, necrosis, hemorragia. A través de la mucosa dañada pueden ingresar toxinas a la circulación sanguínea ocasionando rápidamente la muerte y en el curso agudo timpanismo, cólicos y diarrea hemorrágica. Antes de la muerte pueden presentarse signos nerviosos como excitación, incoordinación y opistótonos. En animales adultos los cambios en la alimentación pueden generar un desequilibrio microbiano que favorece la aparición de la enfermedad.

Puede realizarse el diagnóstico *postmortem* en busca de las lesiones y toxinas. Sin embargo la toxina β se destruye rápidamente.

Diagnóstico diferencial: Otras sepsis por enterobacterias Gram negativas como *Escherichia coli* o *Salmonellas sp* y en terneros mayores por coccidiosis.

Puede realizarse el tratamiento con antibióticos como cefalosporinas, tetraciclinas y macrólidos.

Edema maligno (gangrena traumática, carbunco parasintomático)

Si no existe el aislamiento del agente se agrupa junto con la mancha como “Flemón gaseoso o miositis clostridial”). En el bovino es de aparición esporádica pudiendo afectar también a equinos, ovinos y porcinos. Es una infección exógena causada por la contaminación de heridas perforantes profundas a consecuencia del parto o por intervenciones quirúrgicas o por administración parenteral con materiales contaminados con *Cl. septicum* u otros clostridios como *Cl. sordelli*, *Cl. novyi* o *Cl. perfringens* tipo A. En la zona afectada se dan las condiciones óptimas para que los esporos pasen a su forma vegetativa desarrollando rápidamente y produciendo toxinas, exudado y gas con el consecuente daño de los tejidos conectivos y musculares provocando alteraciones locomotoras, y muerte. Puede ocurrir la muerte inesperada o en 1-5 días posteriores hinchazón edematosa intramuscular o subcutánea con calor y dolor, gas a la palpación que se extiende rápidamente a una región del cuerpo por ejemplo lengua-faringe, faringe-cuello, periné-ubre-bajo vientre. Si hay una herida visible habrá exudado visible espumoso, gris rojizo y fétido. Por la sepsis hay aumento de temperatura corporal a 41°C y finalmente en 2-5 días muerte con previa anorexia, cese de la producción láctea y debilidad general.

Hemoglobinuria bacilar (icterohemoglobinuria bacilar bovina, redwater)

Es una enfermedad enzootica causada por *Cl. haemolyticum* (*Cl. novyi* tipo D) telúrico, en la vías digestivas del bovino que produce una toxina altamente hemolizante, necrotizante y letal. Es de curso agudo y mortal, caracterizada por la aparición de fiebre alta, decaimiento, ictericia, hemoglobinuria y anemia.

Afecta a bovinos jóvenes y adultos, raramente terneros, también ovinos y ocasionalmente cerdos.

Las zonas pantanosas con suelos poco drenados y pH alcalino predisponen a la aparición de la enfermedad. Las esporas ingresan con el agua o alimentos contaminados y por la circulación sanguínea llegan al hígado donde quedan latentes. El agente desarrolla en condiciones predisponentes como necrosis tisular por *Fasciola*, necrobacilosis, teleangiectasia, alimentación rica en nitratos o biopsia hepática, genera grandes volúmenes de toxinas con formación de trombos en la vena porta, infarto local y toxemia, con hemólisis intravascular y bacteriemia. Algunos animales pueden desarrollar la infección en forma subclínica y quedar inmunes actuando como diseminadores. Luego de una semana a meses de incubación, la enfermedad aparece repentinamente en animales bien nutridos encontrándolos muertos de forma súbita, en otros casos puede manifestarse más lentamente con anorexia, disminución de producción láctea, adinamia, rechinar de dientes, taquipnea, fiebre alta y orina espumosa, color rojizo por la hemoglobinuria también heces diarreicas, mucosas pálidas (anemia), ictericas, deshidratación, aborto. Si no reciben tratamiento mueren en 12hs en el 95% de los casos.

Diagnóstico diferencial: carbunco, leptospirosis, anaplasmosis, babesiosis o de otros orígenes. Puede realizarse tratamiento con penicilina o tetraciclinas y sueros específicos. Transfusión sanguínea y reposición de fluidos por vía endovenosa.

Botulismo (mal de Aguapey, parálisis bulbar flácida)

Es una parálisis progresiva del músculo estriado casi siempre mortal causada por la exotoxina de *Cl. botulinum* en general tipo C o D, raramente tipo B (excepcionalmente A). En general la presentación es enzótica por osteofagia en vacas que se encuentran en gestación avanzada con altos requerimientos de fósforo.

Cl. botulinum se desarrolla en pH neutro por lo que se distribuye en el suelo, vegetales en descomposición y ambientes acuáticos. Posee una neurotoxina protoplasmática (se localizan en el citoplasma y se liberan cuando hay lisis celular). La toxina puede ingerirse preformada con el alimento como heno, silaje, concentrado o aguas contaminados por restos cadavéricos o jugos de cadáveres que gotean sobre ellos, o desarrollar como una toxi-infección. La escasez de alimento o fósforo puede favorecer su aparición. La toxina se une a receptores del sistema nervioso a nivel de la unión presináptica neuromuscular alterando la función de los músculos estriados por inhibición de la liberación de acetilcolina resultando en parálisis flácida (pérdida de tono de músculos estriados de la lengua, cola, esfínter anal, aumento de salivación y dificultad respiratoria hasta quedar recostados). A partir de los 3 días de consumida la toxina se inician los signos, en los brotes en general se presenta subclínica en la mayoría de los animales hasta que aparecen con marcha inestable o caídos en forma repentina. La profilaxis consiste en higiene de los alimentos y vacunación con el toxoide (toxina inactivada con formol a 42°C 1 mes) en zonas endémicas.

Tétanos (Trismo, mal de quijada)

Es una enfermedad exógena de mayor importancia en ovinos y caprinos asociada a heridas por descole, castración y esquila aunque puede presentarse en vacas al posparto con retención de placenta y en terneros posterior a la castración.

Se encuentra en el intestino de los animales excepcionalmente en los humanos, los herbívoros favorecen su diseminación con la materia fecal. La tetanospasmina (neurotoxina) a diferencia de lo que ocurre con otras toxinas que ingresan por vía oral, es degradada por acción de las enzimas intestinales por lo que es necesaria su producción en un lugar del organismo con las condiciones adecuadas, dada su potencia puede actuar a distancia. Al unirse a las membranas sinápticas impide la exportación de neurotransmisores de la sinapsis causando hiperexcitabilidad de las neuronas motoras con contractura generalizada (opistótonos, temblores, meteorismo secundario) y permanente del músculo estriado, pudiendo ocasionar la muerte por afección de los músculos respiratorios. Este microorganismo también produce una tetanolisina (hemolisina) sin significancia patógena importante.

Diagnóstico: en general es clínico ya que para el aislamiento son tiempos más prolongados.

El tratamiento consiste en administrar suero antitetánico, también se puede realizar antibioticoterapia con penicilina o tetraciclina para evitar la multiplicación del microorganismo en el sitio de ingreso. La prevención consiste en la vacunación con el toxoide obtenido por mantenimiento durante 1 semana a 38°C.

Producción de las vacunas

Las vacunas elaboradas son anavacunas es decir que contienen el microorganismo completo inactivado y sus productos metabólicos (las toxinas inactivadas o toxoides), las cepas empleadas provienen de organismos de referencia nacionales como el SENASA, INTA o internacionales como el ATCC. Las cepas pueden conservarse por repiques sucesivos en medios de cultivos específicos, congelación con DMSO, glicerina o liofilización. Poseen en su mayoría hidróxido de aluminio como adyuvante.

Respuesta inmune

La respuesta inmune protectora contra clostridios es predominantemente humoral sistémica con producción de IgG frente a una variedad de inmunógenos como la cápsula, soma, flagelos, toxinas mayores y menores. Los anticuerpos producidos ante la infección o vacunación son capaces de neutralizar toxinas bloqueando la fijación a las células o receptores (*C. perfringens*, *Cl. botulinum*, *Cl. tetani*) y en el caso de anti-somáticos o anti-flagelares bloqueando la movilidad, adherencia y opsonización facilitando la fagocitosis (*Cl. chauvoei*) y ambos mecanismos para *Cl. septicum*, *Cl. novyi* y *Cl. sordelli*. Si se aplica una única dosis los anticuerpos empiezan a decaer a partir de las 7 semanas post-inoculación por lo que es esencial la aplicación de dos dosis ya que los anticuerpos alcanzan niveles elevados recién 15 días después de esta y empiezan a descender al año brindando protección por un tiempo más prolongado que con una única dosis.

Planes de vacunación

El veterinario es quien debe tomar la decisión de cuando vacunar, con que vacuna y cuales animales. Sin embargo, la bibliografía y laboratorios productores sugieren el siguiente calendario:

En bovinos primovacunados: Terneros: deben recibir dos dosis con un intervalo de 4-6 semanas a partir de los 3 meses de edad y una revacunación anual, siendo igual en los animales adultos, en la hembras gestantes dos dosis a los 60 y 30 días pre-parto para asegurar una buena transferencia de anticuerpos al neonato y protección de la madre al parto.

En los animales con un plan previo de vacunación: Adultos: Una dosis anual y en hembras gestantes 30 días pre-parto.

En zonas con mayor riesgo pueden realizarse revacunaciones al inicio del verano, otoño y primavera.

En los ovinos: La primera dosis a los 3 meses de vida con la señalada y una segunda dosis 3-6 semanas después de la primera, luego se sugiere revacunar 30 días pre-parto para asegurar una buena transferencia de anticuerpos por el calostro a los corderos. En los establecimientos con serios problemas se recomienda una tercera dosis a los 5 meses de la segunda.

Cuando se realizan reposiciones de animales lo más recomendable es considerarlos como no vacunados y realizar un plan sanitario completo previo a su incorporación al rodeo o majada.

En todos los casos es importante controlar la presencia de factores condicionantes, realizando desparasitaciones regulares en las zonas de riesgo, implementando correctas medidas de manejo durante la esquila, descole, etc. y la aplicación de medicamentos con materiales en buenas condiciones de higiene, conservación y esterilidad, como así también evitar los cambios dietéticos bruscos.

En los casos de brotes es conveniente vacunar a todos los animales en situación de riesgo y administrar los antibióticos adecuados a los que presenten signos compatibles aunque esto no garantiza buenos resultados.

Vacunas disponibles en Argentina

Existen en el mercado una gran variedad de vacunas contra uno o combinaciones de los agentes causales de las enfermedades clostridiales que afectan a los ruminantes, ovinos y bovinos, la mayoría de ellas polivalentes combinadas con hidróxido de aluminio como adyuvante, producidas con cepas de referencia locales o regionales obtenidas de laboratorios nacionales o internacionales. En el caso de la vacunación contra Mancha, Gangrena Gaseosa, Enterotoxemia, Hepatitis necrótica y Edema maligno y Endotoxemias vienen presentaciones combinadas de bacterinas como *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum* y de bacterinas y toxoides de *Cl. perfringens* A y D y *Escherichia coli* (BIOCLOSTRIGEN® J5, CLOSTRIMIQU, COVEXIN 10, IBSACLOS VACUNA ANTI CLOSTRIDIAL POLIVALENTE BOVINO LANAR TRADICIONAL). En algunas presentaciones también se incorpora *Cl. haemolyticum* para proteger contra la hemoglobinuria bacilar (CLOSTRIMIQU PH) y *Cl. sordelli* para ampliar la protección. En los ovinos se pueden encontrar vacunas exclusivas contra tétanos o combinadas con otros clostridios (ANATOXINA TETANICA FUERTE, CLOSTRIMIQU OVNI-T, LANARES 5) o las mismas combinaciones empleadas en bovinos en diferentes dosis de acuerdo al laboratorio productor.

Referencias

- Campero, CM. Vacunación en bovinos (Parte 1 y Parte 2). *Visión Rural* 2010, 1 (81): 26-29. Patología Veterinaria, INTA EEA Balcarce.
- Dirksen, Gerrit, Gründer, Hans-Dieter, Stöber, Matthaeus. 2003 Volumen 1 y 2. 4^{ta} edición Medicina Interna y Cirugía del Bovino. Parey Buchverlag in MVS, 2005. Editorial Inter-Médica SAICI Visor graphics SRL. ISBN 950-555-288-2.
- Haagsma. J. Pathogenic anaerobic bacteria and the environment. *Rev. sCi. tech. Off. int. Epiz.*, 1991, 10 (3), 749-764.
- Walter Ledermann D. Historia del *Clostridium botulinum*. *Rev chil infect.* 2003; 39-41
- Ledermann Dehnhardt, Walter. 2007. Una historia personal de las bacterias. Santiago. RIL Editores. ISBN 978-956-284-538-0.
- Madigan, Michael T., Martinko, John M., Parker, Jack. 1999. 3ra reimpresión 2000. Brock. Biología de los Microorganismos, 8^{va} edición. Madrid España. Prentice Hall. ISBN 84-89660-36-0.
- Morris, W. E., Fernández-Miyakawa, M. E. Artículo especial. Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 2009, 41: 251-260.
- OIE. Terrestrial Manual. Los bancos de vacunas (capítulo 1.1.10). 2016.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.10_VACCINE_BANKS.pdf. Acceso 13-03-2017.
- OIE. Pruebas para comprobar la esterilidad y la ausencia de contaminación de los Productos biológicos (capítulo 1.19). 2008.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.09_Pruebas_esterilidad.pdf. Acceso 13-03-2017.
- OIE. Principios de producción de vacunas veterinarias (capítulo 1.1.8). 2015.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.08_Principios_produccion_vacunas_veterin.pdf. Acceso 13-03-2017.
- Robles, Carlos A. 1998. Enfermedades Clostridiales del Ganado. Clostridial diseases of livestock. *Epidemiología*. 1^{ra} edición. Argentina. ISBN N° 950-43-9347.
- Robles, Carlos. 2008. Cómo prevenir las enfermedades clostridiales en ovinos y caprinos en la patagonia. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Presencia, N° 52, pág. 34-39.
- SANI. *Vademecum Veterinario*. <http://www.sani.com.ar/>. Acceso 13-03-2017.
- Stanchi, Nestor O. y col. 2007. *Microbiología Veterinaria*. 1^{era}. edición Buenos Aires. Intermédica. ISBN 978-950-555-321-1.
- Steinman, A., Chaffer, M., Elad, D., and Shpigel, N. Y. (2006). Quantitative Analysis of Levels of Serum Immunoglobulin G against Botulinum Neurotoxin Type D and Association with Protection in Natural Outbreaks of Cattle Botulism A. *Clinical and vaccine immunology*, 13: 8, 862–868.

CAPITULO 9

Vacuna contra el Ectima Contagioso ovino

Eduardo Mortola

Introducción

El ectima contagioso (EC) también conocido como boquera, boca costrosa y dermatitis pustular contagiosa; es una enfermedad cutánea viral, zoonótica y altamente contagiosa que afecta a las ovejas, las cabras y algunos otros rumiantes domésticos y silvestres. Causa aftas y ampollas en los labios, morro, orejas y/o párpados. Los humanos también pueden verse afectados a través del contacto con animales infectados.

El EC es una enfermedad endémica, que en campos contaminados se puede manifestar todos los años. La morbilidad ronda el 20% y la mortalidad es baja entre el 1 y el 3%. Esta enfermedad es autolimitante, resolviéndose de forma espontánea usualmente en un periodo de 1-2 meses. Aunque se considera una enfermedad relativamente benigna, desde el punto de vista económico, puede causar importantes pérdidas. En la Argentina son escasos los trabajos que han podido confirmar el diagnóstico de esta enfermedad. La mayoría de las infecciones en los seres humanos son localizadas y se curan espontáneamente; no obstante, puede producir lesiones con cicatrización deficiente en pacientes inmunosuprimidos.

Agente etiológico

El EC es ocasionado por el Orf virus (Orfv), descrito por primera vez en 1971, pertenece al género Parapoxvirus de la familia Poxviridae. Orfv posee un ADN de doble cadena y un peso de 85- 90 MDa. Presenta una morfología oval con 200- 400 nm de ancho y un largo de 1.2-1.7 veces su ancho, una compleja cubierta externa y la presencia característica de un grueso filamento externo, ordenado en espiral. Los Poxvirus son catalogados como los virus animales de mayor tamaño, tanto así que pueden ser observados mediante microscopía óptica.

Transmisibilidad y patogenia de la enfermedad

El EC es una enfermedad altamente transmisible. El virus se encuentra presente en lesiones cutáneas y costras y se piensa que ingresa en la piel a través de cortes y abrasiones. Se puede transmitir por contacto directo o en fomites. Este virus es altamente resistente en el medio ambiente y se ha descubierto en costras secas después de 12 años. Si bien Orfv tiene afinidad por rumiantes domésticos, tales como ovinos y caprinos, se han reportado casos de infecciones naturales en otras especies como alpacas, camellos, renos, bueyes almizcleros, borregos muflones, ciervos y antílopes americanos. Asimismo existen reportes, aunque poco frecuentes, en perros que se alimentaron de carcasas infectadas.

El período de incubación en las ovejas y cabras es de 2 a 3 días. Los primeros signos clínicos son las pápulas, las pústulas y las vesículas que se encuentran en los labios, la nariz, las orejas y/o los párpados, y ocasionalmente en las patas o en la región perineal. También pueden producirse lesiones dentro de la boca, especialmente en los corderos jóvenes, y estos pueden transmitir el virus a la madre, lo que causa lesiones en la ubre y los pezones. Las lesiones cutáneas se convierten en costras marrones, gruesas y de rápido crecimiento sobre áreas de granulación, inflamación y ulceración. Las lesiones causadas por el EC son dolorosas y pueden provocar anorexia o incluso inanición. Las lesiones en las patas pueden causar cojera. Las infecciones sin complicaciones se resuelven en un plazo de 1 a 4 semanas. Pueden ocurrir infecciones bacterianas secundarias e infestaciones por larvas.

Diagnóstico

Generalmente las infecciones en animales se diagnostican de manera sintomática. Las pruebas diagnósticas, utilizadas con poca frecuencia, incluyen el aislamiento del virus y la serología. Se puede intentar el aislamiento del virus en una variedad de cultivos celulares o huevos embrionados, pero el Orfv se desarrolla lentamente y no siempre puede ser aislado. Las pruebas serológicas incluyen seroneutralización, inmunodifusión en gel de agar, fijación del complemento y aglutinación. A nivel experimental se han desarrollado pruebas ELISA y se puede confirmar el diagnóstico mediante pruebas de PCR.

Respuesta inmune

Las ovejas desarrollan una respuesta inmune celular y humoral específica contra el Orfv después de la infección, pero la duración de la inmunidad es de corta duración y frecuentemente ocurren infecciones repetidas, aunque los signos clínicos son más leves y desaparecen rápidamente. La existencia de anticuerpos específicos contra el virus, así como Linfocitos T CD4+

parecen desempeñar un papel crucial en el mantenimiento de la protección. Como en la mayoría de los poxvirus, el Orfv también codifica proteínas, que son capaces de hacer frente a distintas respuestas inmunes inflamatorias y por lo tanto, podrían ser responsables de la evasión inmune. Es interesante señalar que estas proteínas virales interfieren potencialmente con los mecanismos inmunitarios innatos tempranos, tales como los diferentes efectos de las citoquinas, y podrían facilitar la replicación en el sitio de entrada del virus y la posterior manifestación de lesiones.

La eficacia de las proteínas del virus para contrarrestar la respuesta inmune primaria del huésped sigue sin dilucidarse. Como ya se ha demostrado con el virus del mixoma en conejos, algunos mecanismos de evasión inmune están restringidos en su eficacia al huésped de preferencia, como parece ser el caso del factor inhibidor de crecimiento granulocito-macrófago del Orfv. Además, se han descrito otros genes potenciales de virulencia o evasión inmune del Orfv, incluyendo un gen de resistencia a interferón (IFNR) y un homólogo funcional del gen de la interleucina-10 (IL-10).

Dado que en los ovinos y caprinos los brotes de EC pueden ser masivos y con frecuencia conducen a enfermedades graves en animales jóvenes, existe una demanda de vacunas eficientes. Además, las poblaciones animales que están protegidas por la vacunación reducirían al mínimo el riesgo para la transmisión al hombre.

Después de la recuperación de la infección por Orfv, la inmunidad proyectiva es frágil y de corto plazo, lo que permite re-infecciones regulares de los rebaños afectados. Actualmente no se sabe si las propiedades inmuno-evasivas de Orfv están implicadas en la incapacidad del huésped para montar una inmunidad sólida, duradera y específica. Por otra parte, se ha demostrado en ovejas que después de la recuperación de la infección por una cepa altamente virulenta, la reinfección es mucho más suave en comparación con los animales que han sido infectados con una cepa de Orfv adaptada al cultivo celular primero y luego una re-infección con la cepa viral altamente virulenta.

El conocimiento cada vez mayor de la organización del genoma de Orfv y la identificación de genes de virulencia facilita la selección de componentes de virus que inducen una respuesta inmune protectora. Aunque la Orfv contiene potenciales genes de evasión inmune, la cepa atenuada D1701 posee especialmente una variedad de propiedades inmunoestimulantes.

En este contexto, también es digno de mención que una masiva acumulación de células dendríticas ocurre alrededor de la lesión en el huésped natural, indicativo de una actividad quimiotáctica. Estas propiedades han llevado al empleo experimental de los componentes de envoltura del virus como un inmunomodulador. Similar a la estrategia para determinar antígenos protectores del virus en ovejas, puede ser posible encontrar fragmentos de ADN del virus que contengan genes que codifican para diversas actividades inmunoestimulantes.

Vacunas

La producción de la primera vacuna viva atenuada basada en virus de cultivo celular desarrollada en 1981, fue un paso importante hacia la generación de vacunas más seguras, mejor definidas y producidas en cultivo de tejidos.

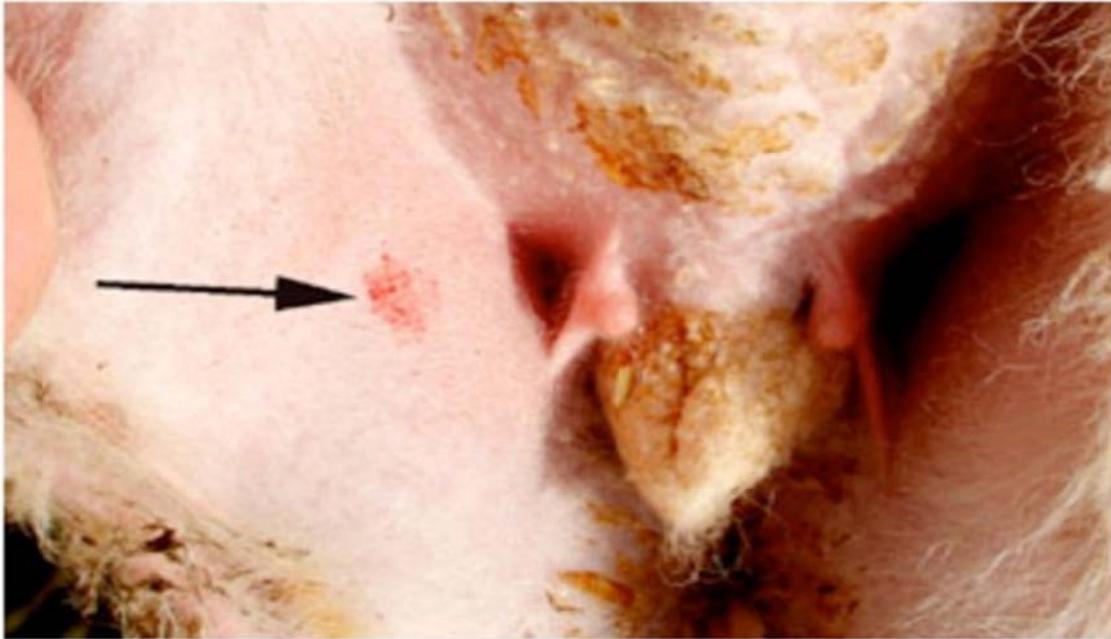
Existen vacunas comerciales para caprinos y ovinos que han empleado satisfactoriamente en determinados contextos epidemiológicos. Son vacunas a virus vivo atenuado (básicamente extraídas de costras molidas o cepas de cultivos de tejidos). Estos productos siempre deben ser utilizados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, especificadas en las etiquetas y administradas por un profesional veterinario. En algunas ocasiones se realizan en forma de autovacunas recolectando material de los propios animales infectados. Al vacunar a un rebaño sano, se está introduciendo el virus al mismo, y debe llevarse a cabo teniendo en consideración este hecho. La aparición de costras en el lugar de la aplicación de la vacuna después de 1 a 3 días indica que la vacuna desencadenó el proceso para desarrollar una respuesta inmune.

En Argentina solo se dispone de una vacuna para la protección contra infecciones de Orfv comercializada bajo el nombre comercial de “vacuna anti- ectima para ovinos y caprinos” del laboratorio Rosenbusch. Se trata de una vacuna a virus vivo atenuado, propagado en líneas celulares estables y liofilizadas. Además contiene penicilina, estreptomycin y anfotericina B. Para su preparación es necesario homogeneizar correctamente el liofilizado junto al solvente, una vez preparada debe ser empleada dentro de las 24 horas.

Su aplicación se recomienda a partir de la segunda semana de vida, únicamente en campos con presencia de la enfermedad; no se debe vacunar en establecimientos sin antecedentes. La vacunación es mediante escarificación, debiendo realizar un raspado en la cara interna del muslo (“verija”) evitando generar sangrado y aplicando una dosis de 0,1 ml. Al ser una vacuna viva, nunca se debe utilizar desinfectante para limpiar la zona, en caso de extrema suciedad se debe limpiar con un paño seco.

Si nunca se ha aplicado la vacuna antes, se recomienda realizar observación directa de la zona inoculada 15-20 días post aplicación y confirmar que exista una reacción similar a las lesiones de EC producidas naturalmente. En caso de vacunar a hembras con cordero al pie se sugiere vacunar en axila, debido a que si se vacuna en “verija”, el cordero al mamar puede tener contacto con la zona vacunada y generar una infección en morro y boca. En la forma de aplicación de este tipo de vacuna, al modificar la vía de entrada del virus en la infección natural, se evita la manifestación clínica de la enfermedad, generando un estado de protección.

En nuestro medio, en algunas ocasiones se descontinúa la producción de la vacuna por parte del laboratorio productor, posiblemente debido a la baja demanda de este producto, en estos casos recurre al uso de la autovacuna.



Vía de aplicación de la vacuna. Foto del laboratorio Rosembusch

En hatos de cabras, es importante vacunar los animales como mínimo seis semanas antes de su comercialización para que las costras de la vacuna hayan desaparecido al momento de la venta. Luego de la vacunación se requieren de dos a tres semanas para que se instale una adecuada protección. La vacuna se aplica en un área protegida, sin pelo, tales como el interior de la oreja, debajo de la cola, y otros. Si bien no sería recomendable la aplicación a hembras preñadas, no se han reportado casos de abortos por vacunar animales preñados. Sin embargo, el estrés del movimiento de animales preñados a los corrales de manejo y de la propia vacunación podría potencialmente inducir el aborto en algunos animales. Los animales vacunados podrían proveer cierta inmunidad con el calostro a sus crías. Sin embargo, esta inmunidad es de corta duración, y la vacunación debe orientarse en vacunar a todos los grupo de cabritos recién nacidos. En algunos programas, la revacunación anual de hembras en avanzada etapa de gestación se lleva a cabo junto con la vacunación del nuevo grupo de cabritos.

La desinfección de los corrales luego de que hayan desaparecido todas las lesiones, es recomendable en el caso de que el dueño de un rebaño infectado escoja no seguir un programa rutinario de vacunación.

Prevención y control

En los primeros estadios del brote se recomienda aislar a los animales afectados y vacunar al resto. Las vacunas se deben utilizar únicamente en los lugares donde las infecciones han ocurrido anteriormente, y se debe separar a los animales recién vacunados de los no vacuna-

dos. La vacunación puede tener escaso valor cuando ya hay un número importante de animales afectados.

Los inconvenientes de la vacuna, al ser viva, puede ocasionar la enfermedad si no se respeta la vía de inoculación y las indicaciones de aplicación. Asimismo, al ser transmisible al hombre es importante prevenir el contagio con el uso de guantes en los operarios.

Para evitar el ingreso del EC a un rebaño no infectado, se debe poner en cuarentena a los animales nuevos. Se deben tomar precauciones para evitar la introducción del virus a través de fomites. Se deben retirar las plantas duras de las pasturas o del alimento para disminuir el riesgo de cortes en la boca o en el hocico.

La duración de la inmunidad vacunal es un tema controvertido; han ocurrido brotes en animales vacunados, pero el fracaso de la vacuna puede deberse a la virulencia de la cepa. El aislamiento de los animales puede ayudar a prevenir la propagación de la enfermedad. La erradicación del virus resulta difícil una vez que el mismo ha ingresado a un hato o rebaño.

Referencias

- Buller, R.M.; Palumbo, G.J. (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiological reviews*. 55 (1): 80–122.
- Cargnelutti, J.F.; Masuda, E.; Martins, M.; DieL, D.; Rock, D.; Weiblen, R.; Flores, E. (2011). Virological and clinico-pathological features of orf virus infection in experimentally infected rabbits and mice. *Microbial Pathogenesis*. 50 (1): 56–62.
- Duchateau, N.C.; Aerts, O.; Lambert, J. 2014. Autoinoculation with Orfv. *International Journal of dermatology*, 53 (1): 60- 62.
- Elzein, E.; Housawi, F. (2009). Drastic cutaneous multi-focal Orf infection in goats, causing severe dysfunctioning. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 28 (3):1025–1029.
- Flores Olivares, C.; Cantón, G.; Peralta, A. Verna A, Lischinsky, L.; Spath, E.; Odeón, A. 2015. Confirmación molecular de un brote de Ectima Contagioso en ovinos del partido de Balcarce. 43° Jornadas uruguayas de Buiatria. Paysandú, 166–168 p.
- Fraser Clarence M. 2012. *El manual de veterinaria: un manual de diagnóstico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades para el veterinario*. Merck & Company. Barcelona, España. 2671 p.
- García, L.; Aceituno, O.; López, F.; Alonso, J.; García, A. (2012). El Ectima contagioso, una enfermedad infravalorada por el sector ovino y caprino. *Producción Animal* N° 275. 10 p.
- Haig, D.; Thomson, J.; McInnes, C.; Mccaughan, C.; Imlach, W.; MerceR, A.; Fleming, S. (2002). Orf virus immuno-modulation and the host immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87 (3): 395- 399.

- Hosamani, M.; Bhanuprakash, V.; Scaliarini, A.; Singh, R. (2006). Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 116(4): 317–324.
- Lederman, ER.; Tao, M.; Reynolds, M.G.; LI, Y.; Zhao, H.; Smith, S.; Damon, I.; 2013. An Investigation of a Cluster of Parapoxvirus Cases in Missouri, Feb–May 2006. *Epidemiologic, Clinical and Molecular Aspects. Animals*. 3 (1): 142-157.
- Nandi, S.; De, U.; Chowdhury, S. (2011). Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep—A global perspective. *Small Ruminant Research*, 96(2): 73-82.
- Tórtora, J. (1985). *Ectima contagioso en ovinos y caprinos*. Tesis Doctoral. Facultad Cuautitlán UNAM, México. 286 p.

Los autores

Coordinadores

Larsen, Alejandra

Medica Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata (FCV.UNLP); Bacterióloga Clínica e Industrial (FCV.UNLP); Magister en Microbiología Molecular; Organizan Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - IIB, UNSAM y CNRL, ANLIS – Malbrán. Doctora en Ciencias Veterinarias (FCV.UNLP). Profesora Adjunta, Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada (FCV.UNLP); Profesora Adjunta Cátedra de Inmunología Ila Parte, carrera de Microbiología Clínica e Industrial (FCV.UNLP). Secretaria de gestión de la Carrera de Microbiología Clínica e Industrial. Directora del Proyecto de extensión Tambo y Cerdos Sanos.

Miceli, Graciela Sara

Bacterióloga Clínica e Industrial. Médica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (FCV.UNLP). Profesor Adjunto de Inmunobiología Animal Aplicada FCV.UNLP. Docente de la Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio FCV.UNLP. Publicaciones:* Calidad de leche: capacitación de capacitadores. Eje Formación de Formadores CD-room, Octubre 2009. Montevideo. *Brucelosis: Una Enfermedad zoonótica que puede ser eliminada con compromiso, tiempo, esfuerzo y cooperación. Contacto Rural. 2015. *Relevamiento serológico de brucelosis en caninos que acudieron a consulta en la ciudad de Bahia Blanca. Rev.Med.Vet. Buenos Aires.2017. Investigación: Diagnóstico y Control de Enfermedades de Rumiantes en su contexto productivo. Estudios de Campo y Experimentales. Extensión: Tambos y cerdos sanos. UNLP. Actividades anteriores: Jefe de Sector Vacunas Virales. LCSP.MSPBA. Laboratorio de Bacteriología DSS.UNLP.

Mórtola, Eduardo

Médico Veterinario - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Doctor en Ciencias Veterinarias, FCV-UNLP. PhD in Veterinary Sciences, University of Tokyo, Japan. Postdoc at The London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. Profesor Titular de Inmunología Veterinaria Aplicada, FCV-UNLP. Director de la Carrera de Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, FCV.UNLP. 34 seminarios, confe-

rencias y cursos dictados, 72 Presentaciones en reuniones científicas, 44 Publicaciones Científicas. Director y participación en 18 proyectos subsidiados de Inmunología y virología

Autores

Bernagozzi, Jorge

Médico Veterinario. Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Bacteriólogo Clínico e Industrial. FCV-UNLP. Profesor Adjunto de la Cátedra Inmunología Veterinaria de la FCV-UNLP y Profesor Titular de la Cátedra de Inmunología Ila Parte de la Carrera de Bacteriología Clínica e Industrial, FCV-UNLP. Director Laboratorio Central de Salud Pública dependiente Ministerio de Salud Provincia de Buenos Aires (MSPBA). Asesor vía Naciones Unidas Subsecretaria Sanitario MSPBA. Subsecretario Bromatología Municipalidad de Berazategui. Publicaciones: *Vacunas en veterinaria. Aspectos generales. 2013. *Carbunco. Prevención de la enfermedad. Analecta Veterinaria, 2014. Director Proyecto, organización y puesta en marcha del Programa de Producción de Medicamentos del MSPBA.

Mórtola, Eduardo

Médico Veterinario - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Doctor en Ciencias Veterinarias, FCV-UNLP. PhD in Veterinary Sciences, University of Tokyo, Japan. Postdoc at The London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. Profesor Titular de Inmunología Veterinaria Aplicada, FCV-UNLP. Director de la Carrera de Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, FCV.UNLP. 34 seminarios, conferencias y cursos dictados, 72 Presentaciones en reuniones científicas, 44 Publicaciones Científicas. Director y participación en 18 proyectos subsidiados de Inmunología y virología

Larsen, Alejandra

Medica Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata (FCV.UNLP); Bacterióloga Clínica e Industrial (FCV.UNLP); Magister en Microbiología Molecular; Organizan Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - IIB, UNSAM y CNRL, ANLIS – Malbrán. Doctora en Ciencias Veterinarias (FCV.UNLP). Profesora Adjunta, Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada (FCV.UNLP); Profesora Adjunta Cátedra de Inmunología Ila Parte, carrera de Microbiología Clínica e Industrial (FCV.UNLP). Secretaria de gestión de la Carrera de Microbiología Clínica e Industrial. Directora del Proyecto de extensión Tambo y Cerdos Sanos.

Barragán, Javier

Médico Veterinario. Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Bacteriólogo Clínico e Industrial. FCV-UNLP. Profesor Adjunto de la Cátedra de Inmu-

nología IIa Parte de la Carrera de Bacteriología Clínica e Industrial, FCV-UNLP. Departamento de Producción de Sueros y Vacunas del Laboratorio Central de Salud Pública dependiente Ministerio de Salud Provincia de Buenos Aires (MSPBA). Publicaciones: *Adyuvantes oleosos: definición, características, tipos de respuesta inmune que engendran, reacciones adversas. 2014 Revista del colegio de Veterinarios de la Prov. de Buenos Aires; *Carbunco, pasado y presente. 2016. Analecta Veterinaria; *Toxicity of venom of *Latrodectus (araneae: theridiidae)* spiders from different regions of Argentina and neutralization by therapeutic antivenoms. 2016, Elsevier Editorial System for Toxicon. Proyectos de Investigación y Extension en Producción de sueros hiperinmunes y vacunas.

Miceli, Graciela Sara

Bacterióloga Clínica e Industrial. Médica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (FCV.UNLP). Profesor Adjunto de Inmunobiología Animal Aplicada FCV.UNLP. Docente de la Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio FCV.UNLP. Publicaciones:* Calidad de leche: capacitación de capacitadores. Eje Formación de Formadores CD-room, Octubre 2009. Montevideo. *Brucelosis: Una Enfermedad zoonótica que puede ser eliminada con compromiso, tiempo, esfuerzo y cooperación. Contacto Rural. 2015. *Relevamiento serológico de brucelosis en caninos que acudieron a consulta en la ciudad de Bahia Blanca. Rev.Med.Vet. Buenos Aires.2017. Investigación: Diagnóstico y Control de Enfermedades de Rumiantes en su contexto productivo. Estudios de Campo y Experimentales. Extensión: Tambos y cerdos sanos. UNLP. Actividades anteriores: Jefe de Sector Vacunas Virales. LCSP.MSPBA. Laboratorio de Bacteriología DSS.UNLP.

Pardini, Lais Luján

Doctora en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Médica Veterinaria, FCV- UNLP. Prof. Adjunta: Cursos Inmunobiología Animal Básica e Inmunoparasitología diagnóstica de protozoos importantes en la salud, FCV-UNLP. Investigadora CONICET. Publicaciones: Lais Pardini, y col. Congenital human toxoplasmosis caused by non-clonal *T. gondii* genotypes in Argentina. 2018/ Andrea Dellarupe, Bruno Fitte, Lais Pardini y col. *T. gondii* and *N. caninum* infections in synanthropic rodents from Argentina. 2019/ Libros: G. Moré, M.C. Venturini, L Pardini, JM Unzaga. Chapter: Toxoplasma: Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. 2018/ Proyectos PICT 2015 Jóv. invest. (Dirección), Integrante PICT e I+D FCV-UNLP desde 2009 hasta la actualidad.

Vacunas en rumiantes domésticos / Eduardo Mortola ... [et al.] ; coordinación general de Eduardo Mortola ; Alejandra Larsen ; Graciela Miceli. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2018.

Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-950-34-1721-8

1. Vacunas. 2. Veterinaria. 3. Inmunología. I. Mortola, Eduardo II. Mortola, Eduardo, coord. III. Larsen, Alejandra, coord. IV. Miceli, Graciela, coord.
CDD 636.08944

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata

47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina

+54 221 427 3992 / 427 4898

edulp.editorial@gmail.com

www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2019

ISBN 978-950-34-1721-8

© 2019 - Edulp

n
naturales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA