

Los Veterinarios Uruguayos en la Investigación y Producción de Vacunas Antiaftosa

Dr. Daniel Abaracón *

En el marco del ciclo de charlas organizado por la Academia Nacional de Veterinaria, referidas especialmente a la actuación de la Profesión Veterinaria en la lucha contra la fiebre aftosa, que tanto éxito está teniendo en nuestro país, se me ha encomendado hablar del tema: "Veterinarios Uruguayos en la Investigación y Producción de Vacunas".

En realidad, el tema Producción de Vacunas no podría ser tratado aisladamente, pues toda producción de vacuna debidamente encarada constituye una trilogía inseparable constituida por: Investigación, Proceso de Producción propiamente dicho y Control.

La investigación asociada a la producción no es la investigación fundamental, ni aquella investigación de avanzada que se realiza en institutos especialmente preparados y equipados para este fin, sino la investigación permanente de observación e inquietud puesta siempre al servicio de una mejor producción.

El control es otra constante en todo proceso productivo serio. Control de materia prima, control y monitoreo de proceso, de producto

intermedio y de producto final. Trabajamos con complejos sistemas biológicos y los hacemos interactuar en delicados procesos.

No siempre el resultado obtenido es aquél que programamos, a pesar del uso de las tan aceptadas buenas prácticas de fabricación (G.M.P.). Sólo la comprobación de la calidad nos dará la certeza del producto obtenido.

Por otra parte, la comprobación regular, a cargo del productor, de la calidad de sus productos, permitirá comparar la producción de hoy con la de ayer, observar tendencias, evaluar innovaciones introducidas, etc.

No me refiero al otro tipo de control, también necesario, realizado por los Organos Oficiales, que tienen una filosofía algo diferente. En estos controles oficiales se prueba cada partida de vacunas, y si supera el nivel de calidad mínimo preestablecido, se autoriza su comercialización y si no alcanza ese nivel se rechaza la partida.

Sobre el proceso de producción hablaremos más adelante.

Vivimos una era de grandes cambios y enorme desarrollo tecnológico. Mi padre, fallecido en

1970, solía decir que sin duda, ninguna generación en la historia de la humanidad tuvo la oportunidad de ver los cambios que la suya observó. En efecto, habiendo partido de una época en que la diligencia era el medio de transporte para ir al campo, ya que no existían aviones ni automóviles y los ferrocarriles recién estaban comenzando, él alcanzó a ver en la televisión el momento en que los astronautas americanos desembarcaron en la luna.

Esa afirmación de mi padre, que me quedó tan presente, me ha hecho pensar que también nuestra generación, es decir, la mía, que es la misma de varios de mis compañeros de la Academia que hoy nos acompañan, también ha observado cambios que se suceden con una velocidad vertiginosa, luego de varios siglos de evolución lenta. Naturalmente esto también vale para las generaciones más jóvenes aquí presentes, ya que la evolución acelerada continúa, pero tal vez el contraste no sea tan evidente.

El primer diagnóstico de la fiebre aftosa en Uruguay, como consta en la excelente recopilación del Dr. Nelson Magallanes, data de junio de 1870 y fue hecha por el

* Miembro de la Academia Nacional de Veterinaria
Ex Jefe de Producción de vacuna aftosa del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS

Dr. Bertrand Duprat.

Para observar el camino recorrido por la Veterinaria Uruguaya, propongo fijar el período que va, de aproximadamente hasta la fecha.

Ahora bien, ¿cuál era la realidad de campo?, ¿cuáles eran las opciones que tenía el ganadero frente a la aparición de un foco de fiebre aftosa en sus ganados? Se estilaba juntar los ganados para que enfermando todos a la vez el mal pasara más rápido. Para algún animal de cabaña de alto valor, o que debiera concurrir a exposiciones, se podía hacer un uso muy limitado del suero hiperinmune, conocido como suero Loeffler o con suero de convalecientes, caros y escasos que inducían una breve inmunidad pasiva.

A algunos animales mansos, bueyes, lecheras, se les podía hacer tratamiento de las lesiones bucales, a base de sal, vinagre, limón, soluciones fenoladas, etc. A este respecto, permítaseme leer un párrafo de una publicación del Dr. Karl Federer, que dice así:

"Medicamentos.- El remedio más probado que se usa con mucha eficacia es el de frotar la lengua y de eliminar las vesículas y pápulas, hasta que salga sangre; se debe procurar que no queden restos de las vesículas, y esto se debe hacer con una planchuela de plata aserrada, sujeta a un instrumento de hierro. Después se toma una Mass (medida antigua, aproximadamente un litro) de vinagre bueno y fuerte, un puñado de ajo, un puñado de sal, una cucharada de pimienta, hollín de chimenea, caparrosa azul y alumbre, en cantidad del tamaño de una nuez moscada cada uno, todo esto se debe machacar y mezclar bien con el vinagre. Con esta mezcla se lavan las vesículas diariamente, así como

toda la lengua hasta su completa curación" pero, ese tratamiento transcrito por el Dr. Federer, es el recomendado por la Universidad de Friburgo en 1680. Es decir, que en 260 años prácticamente nada se había avanzado.

Volviendo a nuestro ganadero con sus animales enfermos de aftosa sólo se dedicaba a curar las "bicheras" en verano, a cuerear los animales que morían, y a esperar que pasara la enfermedad. Pero quedaban las secuelas, animales mancos y rengos, con desprendimiento de pezuñas, particularmente grave en los toros y bueyes, que los inhibía de prestar su servicio y los clásicos animales "asoleados", variables en cantidad según el tipo de aftosa, pero que constituían una constante, casi una categoría de ganado en nuestra campaña.

Mientras esa era la realidad de campo, ¿cuál era la realidad de laboratorio? Cuando éramos estudiantes los virus se definían como agentes que podían producir enfermedades, invisibles, no cultivables en laboratorio, no retenidos por los filtros y de naturaleza desconocida. Eso es lo que se sabía, pero no quiere decir que nada se hubiera hecho hasta ese momento. Desde Jenner (1796), Pasteur (1880-1890), Von Behring y Kitasato (1890), Ehrlich's (1900) y otros, ya se tenían claros conceptos de vacunación e inmunidad.

En el campo específico que nos ocupa y de acuerdo al viejo aforismo de Claude Bernard que dice: "Podemos más de lo que sabemos" ya bastante camino había sido recorrido. Loeffler y Frosch, en 1897, demostraron la filtrabilidad del virus aftoso, siendo el primer virus animal en el que se demostró esta característica.

En la década 1920 a 1930 Vallée y Carré, en Francia demostraron la

pluralidad del virus aftoso, identificando 2 cepas inmunológicamente diferentes, el virus O aislado en el departamento del Oise y el virus A de Ardennes. A su vez, el profesor Waldmann en Alemania aisló 3 tipos de virus diferentes que llamó A, B y C, siendo que los tipos A y B correspondían a los virus O y A de Vallée y Carré, sólo el virus tipo C era nuevo y conservó su nombre.

También Vallée, Carré y Rinjar intentaron producir vacunas contra la fiebre aftosa usando virus de epitelio lingual tratado por formalina al 0,5% y 20°C de temperatura. En 1936 Schmidt, en Dinamarca, produjo una vacuna por adsorción de virus sobre Hidróxido de Aluminio.

Tanto en el caso de Vallée y Carré como en el caso de Schmidt, las vacunas demostraron cierta eficacia, pero errática y produciendo a veces la enfermedad.

En 1938, Waldmann y colaboradores, trabajando en la isla de Riems, hicieron una feliz asociación de los dos métodos y produjeron una vacuna inactivada, eficaz contra la fiebre aftosa, usando virus replicado in vivo en epitelio lingual de bovino, adsorbido sobre Hidróxido de Aluminio a pH 9,5 e inactivado por acción de la formalina a 0,05% a la temperatura de 25°C durante 48 horas. Esta fue la primera vacuna inactivada, inocua y eficaz contra la F.A. y quedó conocida como vacuna Schmidt-Waldmann. La formulación de Schmidt-Waldmann era de un volumen relativamente grande, pudiendo llegar a 50 y 60 ml. en animales de mucho peso, pero luego fue modificada por el Prof. Silvio Torres, en 1943, quien logró reducir el volumen de la dosis, sin afectar la eficacia de la vacuna.

La década del 40 fue rica en

realizaciones y acontecimientos relacionados a la lucha contra la F.A.

En el año 1943 los doctores Rubino y Tortorella ensayaron una técnica de hemoftización, consistente en la utilización de sangre de ovinos jóvenes inoculados con virus de F.A. replicados más de 150 veces en cobayos.

En 1945 se comenzó también en el laboratorio Miguel C. Rubino la producción de partidas pequeñas de vacunas inactivada del tipo Waldmann-Torres que fueron usadas por vía subcutánea e intradérmica.

En 1943 Traub y Mohlmann desarrollaron la técnica de Fijación de Complemento que permitió tipificar los virus de la F.A. sin usar las complejas, lentas y onerosas pruebas de inmunidad cruzada. Esta técnica de Fijación de Complemento, que luego fue perfeccionada para estudio y clasificación de subtipos y titulaciones de virus, estaba llamada a tener una enorme utilidad en el diagnóstico y todo estudio de la fiebre aftosa, siendo una herramienta fundamental en la producción de vacunas.

La técnica de Fijación de Complemento se comenzó a usar en el Servicio de la F. A. del laboratorio Miguel C. Rubino en el año 1949.

En 1946 Uruguay comenzó a importar vacunas contra la fiebre aftosa, producida por el Prof. Silvio Torres, con lo que se amplió y popularizó el uso de vacunas.

En el mismo año, 1946, se presentó en México una severa epizootia de fiebre aftosa. La lucha contra la enfermedad fue realizada por las autoridades sanitarias de México y de E.E.U.U. actuando en conjunto. En esa lucha, que duró varios años, mucho fue lo que se

aprendió sobre el comportamiento de la fiebre aftosa, y la forma de luchar contra ella, por medio de vacunas y el rifle sanitario para su erradicación.

En el año 1947 el Prof. Waldmann y su equipo fueron contratados por el Gobierno Argentino y enseguida comenzaron las investigaciones y producción de vacunas.

En el mismo año, 1947, el Prof. Frenkel en Holanda, culminando una larga serie de trabajos pioneros sobre la replicación de virus en tejidos animales "in vitro" publicó la técnica de producción de antígenos en explantados de epitelio lingual bovino, mantenidos en sobrevida artificial en el laboratorio de 24 a 48 horas después de la muerte del animal. Esta técnica significó un gran paso adelante y rápidamente se extendió por todo el mundo.

Así llegamos a comienzos de la década del 50, donde estaban dadas las condiciones para pensar en producción industrial de vacunas en Uruguay. Esto era un nuevo desafío para la profesión veterinaria.

Cabe a esta altura hacer una reflexión. ¿Qué formación teníamos los veterinarios para esta tarea? De la Facultad salíamos con una buena formación médico veterinaria para la época. Teníamos buena formación básica para enfrentar el caso clínico, sea de grandes o pequeños animales, para hacer un diagnóstico de enfermedad infecciosa, carbunco, mancha, brucelosis, etc., teníamos una buena formación bacteriológica.

Estábamos en buenas condiciones de enfrentar la enfermedad parasitaria por ecto y endoparásitos con los recursos de la época, etc.

Pero valga la redundancia, producción industrial significa

INDUSTRIA, y eso es otro mundo que no conocíamos y que involucra:

Planta de Producción - Diseño y montaje.

Equipos - Selección, diseño, manejo, mantenimiento.

Materia prima - Selección, importación, compra de local.

Noción de costos de producción - Costo directo, costo industrial, costo financiero, costo total, etc.

Noción de mercado - Comercialización, distribución, cobranzas, etc.

Personal - Profesional, técnicos, personal general, etc.

Para todo eso no estábamos preparados. Naturalmente, no es el veterinario que atiende todo, en un equipo multidisciplinario que incluye profesionales de la Química, Ingenieros Químicos, Bioquímicos, Químicos Farmacéuticos, Contadores, empresarios, administradores, vendedores, personal de mantenimiento, etc.; pero el motor del conjunto es el Veterinario, responsable de todos los sistemas biológicos que hay que manejar y con los cuales debemos mantener el equilibrio adecuado para llegar al producto final de la mejor calidad. Para cumplir todas estas tareas el Veterinario debió ampliar mucho su horizonte. También el Veterinario es el responsable del comportamiento de la vacuna en el campo, donde la realidad epidemiológica puede ser muy cambiante y así lo ha sido durante varias décadas.

En la producción de vacunas fueron considerados dos tipos diferentes:

1) *Vacunas de virus atenuados*
Basadas en el mismo principio que la vacuna de Jenner, que el ensayo del Dr. Rubino, que la vacuna de Sabin, etc.. Virus de virulencia atenuada natural o artificialmente, cuando son inyectados al organismo replican en el mismo,

aumentando así el material antigénico inyectado. Como el virus está activo, puede salir del animal pasando a otros de la misma o diferente especie. En el año 1960 todo el mundo se hizo eco de una campaña muy exitosa realizada en Israel frente a un virus de tipo O. La vacuna usada era de virus vivo atenuado, desarrollada por el Profesor Komaroff, que luego cambió su nombre por el nombre hebreo de Kemron. El principio de modificación o atenuación fue la replicación durante muchos pasajes en embriones de pollo, y luego replicados en ratones lactantes o cultivos de tejidos.

En un cierto momento, a comienzo de la década del 60, parecía que las vacunas de virus vivos modificados constituían el gran futuro. En algunos casos hubo vacunas de V.V.M. que protegieron contra subtipos diferentes (A24 frente al A 18 Zulia) y se pensó que eso sería característica de los V.V.M. En esa época me correspondió viajar a Israel para adquirir la técnica y adoptarla en Uruguay. Luego en Uruguay logramos modificar las 3 cepas de virus uruguayas hasta un grado de no ser más virulentas para el bovino y que inducían un razonable grado de inmunidad, pero todavía eran virulentas para el cerdo, lo que constituía un peligro de reversión de virulencia. Los epidemiólogos consideran al cerdo como un multiplicador de virus. Los ensayos debieron ser abandonados por la decisión del Mercado Común Europeo de no comprar carnes de países donde se usaran vacunas de V.V.M. En otras partes del mundo también las vacunas de V.V.M. fueron abandonadas por varias causas, como: diferentes grados de atenuación requeridos para diferentes poblaciones animales,

alta sensibilidad de los cerdos, etc.

El país donde fueron usadas por más tiempo fue Venezuela, sin obtener en general resultados satisfactorios. Mucho fue el esfuerzo realizado en el mundo con este tipo de vacunas, pero en materia biológica no siempre se logran los resultados esperados, por más ahínco y esfuerzo que se dediquen al tema.

No podemos considerar que se ha dado vuelta la página definitivamente. Las nuevas técnicas de biología molecular pueden todavía depararnos alguna sorpresa en el campo de las vacunas a virus vivos modificados o atenuados.

Llegamos ahora al segundo tipo de vacunas:

2) Vacunas con virus inactivados, llamadas Vacunas Inactivadas

Este tipo de vacunas es el usado en Uruguay y en la mayor parte del mundo y es con el que se han logrado los grandes éxitos en la vacunación y en muchos casos en la erradicación de la enfermedad. En la producción de una vacuna inactivada contra la fiebre aftosa se deben considerar cuatro fases esenciales para la obtención de un producto final eficiente:

1. Producción de un antígeno inmunizante.
2. Correcta inactivación.
3. Uso de buenos adyuvantes.
4. Controles sobre todas las etapas del proceso y sobre el producto final.

El antígeno es el virus inactivado. Hoy sabemos bastante sobre el virus aftoso. Es un virus R.N.A., de simetría cúbica, sin envoltura, forma de icosaedro, con 20 caras triangulares y 12 vértices, Familia PICORNAVIRIDAE, género APHTOVIRUS.

El RNA forma una cadena simple de aproximadamente 8.000

nucleótidos y responde por el 31% del peso molecular del virus, $2,6 \times 10^6$ sobre $8,4 \times 10^6$ que es el peso molecular del virión completo. El cápside proteico está compuesto por 4 proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4, presentando 60 copias de cada una de las tres primeras que están en una posición externa, en los vértices del icosaedro y 30 copias del VP4 que es una proteína interna. El peso molecular de la fracción proteica es de $5,8 \times 10^6$, es decir 69% del total de virión. La fracción más inmunogénica está en el VP1, pero hoy sabemos que no es la única. De esta proteína se conoce la secuencia de sus aminoácidos.

PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO

Ya conocemos la estructura del virus, pero su comportamiento inmunogénico varía mucho de una cepa de virus a otra, aún dentro del mismo tipo y subtipo. La cepa de virus usada para vacunas debe ser representativa de la realidad epidemiológica del área donde serán usadas.

Cuando aparece una cepa de virus nueva en el campo, debe evaluarse el riesgo que esta cepa presentará para las haciendas vacunadas. Existen recursos para esta evaluación, como los bancos de suero y las pruebas de inmunidad cruzada, pero demandan tiempo y trabajo. A veces ha sido necesario usar dos cepas diferentes de un mismo tipo de virus en las vacunas. Aún dentro de los tipos y subtipos hay cepas de virus dominantes inmunogénicamente frente a otras. El virus de la fiebre aftosa posee en su genoma la información genética para su replicación, pero carece de los mecanismos enzimáticos de síntesis para la misma, debiendo usar para

ello la célula animal viva susceptible. Es siempre deseable adaptar el virus al substrato celular que se va a usar, de cualquier naturaleza que sea, en el número más bajo de pasos posible, para evitar los desvíos antigénicos. La cepa de virus que se use para semillas debe ser estable en el sistema en que se hará su replicación y estable también durante el proceso industrial, inactivación del virus y el período de conservación de la vacuna a 4°C. No siempre una cepa de virus adecuada para un sistema de replicación lo será para un sistema diferente.

La selección y manejo de virus para la producción de vacuna tiene mucho de arte.

¿Cuáles son los métodos de replicación industrial?

El primero, el método de Waldmann, ya fue mencionado. Los animales de abasto son inoculados con virus de 18 a 24 horas antes del sacrificio. Luego de sacrificado el animal separa la lengua y se colecta el epitelio y la linfa de las aftas, lo que constituye un excelente antígeno. Este procedimiento se usó mucho en el mundo y por mucho tiempo fue el único disponible.

Como críticas al procedimiento cabe mencionar:

- a) Sufrimiento de los animales,
- b) Riesgos de desvíos antigénicos por la inmunidad parcial de los animales inoculados y
- c) Serios peligros de escapes de virus.

En Uruguay nunca fue autorizado este sistema de inoculación en planta, pero en la década del 50 fueron producidas industrialmente vacunas con materiales recogidos en otros países, de animales inoculados con cepas de virus uruguayos. La necesidad de contar con substratos

celulares o tejidos susceptibles para la replicación viral, aguzó el ingenio de nuestros colegas de todo el mundo. Mencionaremos algunas técnicas que tuvieron su momento y su significación industrial, aunque fueron superadas por otras que son usadas hoy en día.

El Profesor Thomaz, en Francia, describió una técnica en la cual replicaba el virus de aftosa en embriomas artificiales obtenidos mediante el injerto de tejidos embrionarios por vía subcutánea en bovinos.

El Profesor C. Belin, también e ingeniosa técnica consistente en replicación de virus aftoso sobre la piel de bovinos jóvenes, que después de rasurados eran inoculados con virus de variola. Esta técnica tuvo más desarrollo industrial que la técnica de Thomaz.

El uso de neonatos tuvo gran expresión en muchas partes del mundo. Fueron descritos y usadas técnicas de replicación viral en terneros de 1 día, a los cuales no se les permitía tomar calostro, en ratones lactantes y se hicieron experimentos hasta en potrillos. Dentro de estas técnicas la que tuvo verdadera expresión industrial fue la replicación viral en gazapos de 3 a 5 días de edad. A comienzos de los años 70, esta técnica era usada en Brasil en un 80% de su producción industrial de vacunas.

Las tres últimas técnicas mencionadas no fueron usadas en Uruguay para producción de vacunas.

Ya mencionamos antes la técnica de Frenkel, consistente en la replicación de virus en explantados epiteliales de lengua de bovino mantenidos en sobrevivida artificial en medios especiales. Esta técnica tuvo aceptación mundial, permite producir un excelente antígeno y es hoy en día una de las técnicas más

usadas. Comparada con la técnica de Waldmann que también usa epitelio bovino, la técnica de Frenkel, tiene la que no hay que llevar el virus fuera del laboratorio. En Uruguay tuve el gusto de trabajar en el laboratorio que utilizó esta técnica por primera vez en Sud América.

En el año 1955 dos destacados investigadores, el Dr. Howard Bachrach del Plum Island Animal Disease Center (P.I.A.D.C.), de E.E.U.U., y Robert Seller del Animal Virus Research Institute (A.V.R.I.) de Pirbright, Inglaterra, informaron que el virus aftoso desarrollaba sobre cultivos primarios de células renales de cerdos y bovinos produciendo claro efecto citopático. Ese efecto era neutralizado por sueros hiperinmunes antivirales. Es interesante que los dos autores trabajaron simultáneamente en forma independiente, llegando a las mismas conclusiones. Aquí nació una nueva posibilidad industrial de producción de vacunas. En el año 1961 tuve oportunidad de visitar el Instituto Zooprofilático de Brescia, donde pude admirar el desarrollo industrial ya logrado con esta técnica de cultivos primarios.

En el año 1962 Mowat, en Pirbright, describió que el virus aftoso replicaba produciendo efecto citopático, sobre una línea de células fibroblásticas de riñón de hamster, la línea BHK que había sido establecida por Mc. Pherson y Stoker en la Universidad de Glasgow.

Al año siguiente Paul Capstick también en el A.V.R.I., de Pirbright, logró cultivar esta línea celular en cultivos en suspensión. Estos hallazgos abrieron la puerta para una nueva tecnología llamada a tener el mayor desarrollo en todo el mundo.

Una vez más Uruguay fue el

primer país en Sudamérica en implantar esta nueva técnica. Industrialmente presenta la ventaja de que el laboratorio puede planificar su programa de producción sin depender de terceros, que lo abastezcan de lenguas o riñones.

Los cultivos celulares son realizados ya sea en suspensión, donde se usan tanques de hasta 4.000 litros de capacidad o en botellas roller. En el Instituto Zooprofilático de Brescia, cuentan con un sistema que permite operar hasta 22.000 botellas roller de 1,0 litro por partida. Una vez que el virus ha sido replicado, cosechamos una suspensión vírica, sobre la cual debemos evaluar la calidad del virus obtenido. Las pruebas más corrientes son: titulaciones de infectividad, Pruebas de Fijación del complemento que comprenden tipificación, subtipificación y título fijador de complemento, determinación de masa antigénica, pH, pureza bacteriológica etc.

La suspensión vírica en general es tratada por cloroformo y clarificada por centrifugación, pudiendo luego ser concentrada por adsorción sobre hidróxido de aluminio, precipitación por Polietilene glycol o ultrafiltración. La inactivación puede ser hecha antes o después del virus ser adsorbido o concentrado.

INACTIVACIÓN DEL VIRUS

Inactivación del virus significa la supresión de su poder de replicación por acción sobre su genoma de agentes químicos o físicos, o ambos a la vez. El capsídeo proteico por el contrario debe ser preservado intacto ya que en él se encuentran los determinantes antigénicos.

Si bien durante muchos años se

usó el formol como agente inactivante, hoy en Uruguay sólo se pueden usar los inactivantes llamados de primer orden, es decir aquellos cuya línea de regresión de infectividad es una recta durante todo el proceso de inactivación. Creemos que el inactivante más usado hoy en día es la etilenimina binaria BEI descrita por Bahnemann en 1974.

Aparte de la buena calidad de los reactivos, en una inactivación de virus es muy importante que se cuiden todos los detalles, temperatura, uniformidad de toda la masa vírica, tanques que no dejen fondos de saco, virus que puedan quedar en las tuberías, etc.

A la inactivación siguen las pruebas de control de inactivación o de no infectividad, llamadas en general pruebas de inocuidad. Estas pruebas son de fundamental importancia así como todo lo vinculado al proceso de inactivación, por razones muy fáciles de comprender.

Las pruebas de no infectividad más conocidas son aquellas que usan ya sea bovinos vírgenes por inoculación intradermolingual, o la inoculación de no menos de 100 ratones lactantes y las que usan pases seriados de la muestra sobre cultivos celulares de alta sensibilidad, constantemente controlada. El productor, en general, prefiere las pruebas sobre cultivos celulares, que si son bien realizadas y las células frecuentemente controladas, son muy satisfactorias.

De cualquier manera no podemos olvidar que son pruebas realizadas sobre muestras pequeñas, que nos esforzamos para que sean representativas de un total homogéneo, pero siempre serán muestras pequeñas de cuyo resultado se inferirá cual sería el comportamiento del total. Estadísticamente sólo probabilidades.

ticamente sólo probabilidades.

En este trabajo de inactivación y sus controles cobra la mayor importancia la utilización de técnicas G.M.P., de buenas prácticas de fabricación.

ADYUVANTES

El virus de la fiebre aftosa no es de por sí un buen inmunógeno. Para potenciar su acción se necesita de adyuvantes de la inmunidad.

Adyuvante es por definición una substancia que, en forma inespecífica potencia en intensidad y duración la respuesta inmunitaria contra el antígeno al cual está asociado en la formulación de la vacuna.

Los adyuvantes pueden actuar sobre el antígeno o sobre el sistema inmunogénico por ellos mismos, ni provocar reacciones indeseables en los animales vacunados. Muchos adyuvantes han sido ensayados en las vacunas contra la fiebre aftosa. Los más ampliamente usados son Hidróxido de aluminio que es además usado como elemento concentrador de virus, Saponina, descrita por Espinet en 1951 que debe ser cuidadosamente seleccionada y en los últimos años el adyuvante oleoso, que induce una inmunidad de más larga duración y que es el único usado hoy en día en el Uruguay.

El uso de adyuvante oleoso en vacunas antiaftosa fue descrito por primera vez por Cunliffe y Graves en 1963 y luego por Mc. Kercher y colaboradores en 1967.

El verdadero desarrollo de la técnica, la demostración de su viabilidad industrial, así como la extensa aplicación en el campo e innumerables estudios sobre inmunidad a corto y largo plazo en bovinos y porcinos fue hecho por el Centro Panamericano de la Fiebre Aftosa

(CPFA), Brasil, que en muchos casos contó con valiosas colaboraciones, sobre todo de los institutos oficiales de Brasil y países vecinos.

Muchos ensayos fueron realizados en Uruguay, entre ellos un programa piloto de vacunación, convenido con Conaprole, de excelentes resultados, al cual se referirán otros colegas en este ciclo de charlas.

El adyuvante oleoso, consiste básicamente en el adyuvante incompleto de Freund, en el cual se emulsiona el antígeno por medio de agentes emulsificantes y acción mecánica, formando una emulsión primaria agua en aceite. Sobre ese principio básico hoy varias formulaciones que usan diferentes aceites y emulgentes y que usan o no otros adyuvantes en la fórmula. También la emulsión puede ser primaria tipo, agua en aceite o de tipo doble o mixto, agua en aceite en agua.

De un modo general podemos decir que el uso del adyuvante oleoso ha permitido espaciar más las vacunaciones.

El principio de acción está basado en tres efectos principales:

a) acción de depósito con entrega lenta del antígeno,

b) actuando como cuerpo extraño forma un granuloma que atrae los elementos de defensa del sistema inmunológico, y

c) por su migración por vía linfática crea otros puntos de estímulo, llamados organelles, dentro del sistema retículo endotelial.

Otros adyuvantes modernos están entrando en la formulación de vacunas antiaftosa.

En Brasil se está usando un amino-lípido sintético conocido como AVRIDINE, desarrollado por la firma Pfizer, que parece aumentar la duración de la inmunidad

vacinal.

Se están ensayando otros adyuvantes basados en extractos de esqueleto de pared celular de varias especies de Mycobacterium, cuyos principios activos son principalmente el muramil depéptido y la dimetil y trimetil trehalosa. Estos adyuvantes se describen como fuertes estimulantes de la cascada inmune, actuando como activadores de monocitos y macrófagos que mediante su interacción con los linfocitos T producirán una expansión clonal de los linfocitos B y de los linfocitos T, de tipo colaboradores, citotóxicos y supresores. Así serán inductores de la respuesta humoral y de la respuesta mediada por células al mismo tiempo.

Si bien se están haciendo muchos ensayos, hasta donde estoy informado, aún no hubo una respuesta concluyente con vacunas antiaftosa.

Antes de terminar esta referencia a las diversas técnicas de producción de vacunas antiaftosa, debo mencionar las técnicas modernas que usan como inmunógeno no el virión completo sino la fracción que ha demostrado ser la más inmunizante del mismo, dentro del VP1, cuya secuencia de aminoácidos, como ya dijimos, es conocida.

Actualmente se aborda el problema por dos técnicas diferentes.

a) Ingeniería genética:

Técnica del ADN recombinante. Se usa el RNA del virus del cual por medio de una enzima restrictiva se corta el segmento que codifica la síntesis del VP1. Con la obtención de ese segmento y por acción de otra enzima, una transcriptasa reversa, se obtiene el segmento correspondiente del ácido ribonucleico (ADN) complementario,

llamado ADNc.

Mediante el uso de enzimas especiales se inserta este ADNc en el material genético (Plasmidio) de una bacteria, Escherichia coli, Cepa K 12 que así informada genéticamente pasa producir la proteína vírica. El cultivo de bacterias es fácil y así se puede producir grandes cantidades de VP1.

Hasta ahora los resultados positivos obtenidos al hacer vacunas con este material han sido limitados a una sola cepa de virus, tipo A 12, cepa antigua que no se encuentra más en la naturaleza y se necesitaron dos dosis de vacuna para inducir una respuesta.

b) La otra técnica de producción de antígeno es la síntesis proteica propiamente dicha. Esta técnica permite producir el fragmento peptídico de mayor poder inmunogénico y que va del aminoácido 141 al 160 del VP1 que consta de 213 aminoácidos. El segmento así producido, conjugado con un soporte especial, la hemocianina extraída de un caracol y con la adición de un adyuvante puede inducir una respuesta inmunitaria en animales.

Tanto el sistema de síntesis proteica como el de ADN recombinante, tienen la ventaja de trabajar con fracciones no infectantes del virus, por lo que no se requiere el proceso de inactivación, y el antígeno es tan estable que no se requeriría el manejo cuidadoso y la cadena de frío inevitable en las vacunas convencionales.

Sin embargo, tienen la desventaja de que su capacidad inmunogénica es menor que la que posee el virión intacto de la fiebre aftosa.

Sobre el futuro industrial de esta técnicas en desarrollo nada se puede afirmar. Hoy estamos en un

momento de desánimo por el bajo poder inmunizante que han demostrado, pero la biología y la vida nos han enseñado que lo imposible de hoy es muchas veces la realidad del mañana.

Volviendo al título de la charla "Veterinarios Uruguayos en la Investigación y Producción de Vacunas Antiaftosa" debemos mencionar que varios profesionales uruguayos, casi todos dirigiendo plantas de producción de vacunas en otros países y también muchos técnicos no universitarios pero que aprendieron las técnicas en Uruguay, hoy están también ocupando cargos de alta responsabilidad en laboratorios de otros países.

Varios veterinarios uruguayos vinculados a la lucha contra la fiebre aftosa, en el área de producción de vacunas u otras áreas, fueron contratados por organismos internacionales. Sólo permítanme hacer mención de uno, el Dr. Raúl Casas Olascoaga, que ocupó la dirección del Centro Panamericano de la Fiebre Aftosa, durante 15 años, siendo del Director que ocupó ese cargo por mayor tiempo, cumpliendo una brillante gestión cuyos resultados son hoy evidentes y por todos reconocidos.

En cuanto a la aceptación de las vacunas que, como decía al principio, aprendimos a hacer los veterinarios uruguayos, diremos que han sido exportadas a muchas partes del mundo, colaborando en las campañas de otros países. Sólo voy a mencionar tres casos:

1) La erradicación de la fiebre aftosa en Chile fue lograda, en la parte que les correspondió a las vacunas, con vacunas uruguayas.

2) Cuando la última epizootia de fiebre aftosa en Inglaterra, donde se sacrificaron más de 420.000 cabezas de ganado, el Gobierno

Británico fijó una fecha límite, después de la cual comenzarían a vacunar si no hubieran logrado controlar la enfermedad.

Para ello formaron un stock de vacunas, una buena parte del cual eran vacunas uruguayas, que fueron probadas y aprobadas. Felizmente como lograron controlar la enfermedad antes de la fecha límite fijada, no fue necesario vacunar.

3) También un año después Alemania adquirió, controló y usó vacunas uruguayas en gran escala.

Si terminara la charla en este momento, podría dejar una impresión de que valoro tanto las vacunas y a sus fabricantes, que estaría sufriendo una suerte de deformación profesional, al pensar que la vacuna es todo, pero no es así.

Si bien es cierto que la vacuna es una herramienta fundamental en esta campaña, recordemos que debe ser bien aplicada, y hacer que sea posible su aplicación por convicción de la comunidad. Esa ha sido tarea de nuestros colegas de campo.

El Control oficial de todas las partidas de vacunas dio confianza al usuario de que toda serie autorizada para venta poseía una calidad uniforme. Se debió ejercer una continua vigilancia epidemiológica y organizar un buen sistema de información. Hubo que lograr que todo esto fuera posible mediante el apoyo de las autoridades.

Aquí la labor de nuestros colegas epidemiólogos del área oficial.

Como el virus de la fiebre aftosa no reconoce fronteras políticas, hay que encarar la lucha considerando áreas geográficas y aquí es fundamental la participación de los Gobiernos de los países y de los

organismos internacionales.

Sobre estos aspectos se hablará en otra charla de este ciclo.

Por último recordemos que muchos años atrás, cuando la vacunación aún no era obligatoria, ya era común escuchar decir a muchos ganaderos uruguayos cosas como: hace siete años, hace once años que no tengo aftosa.

Por su propia cuenta y conciencia los ganaderos vacunaban regularmente. Aquí también se ve la mano de nuestros colegas de campo.

Permítanme ahora terminar con una breve anécdota.

Se cuenta que en un pueblito de los Alpes italianos había una pequeña iglesia construida con mucho esfuerzo a lo largo de muchos años.

En cierto momento los modestos campesinos de la zona resolvieron hacer construir para esa iglesia una gran campana que la embellecería. Así todos los vecinos contribuyeron con los aportes que les fue posible hacer, una cabra, una yunta de patos, cajones de fruta, algún dinerito ahorrado, etc.

Se construyó y colocó una hermosa campana, la más linda de la zona, que pasó a ser el orgullo del pueblito. Se cuenta también que en los atardeceres, al toque del Angelus, con su momento de recogimiento, cada campesino pensaba con alegría, "Aquí hay algo de mí".

En este momento en que se echan a vuelo las campanas por el éxito que Uruguay está logrando en la lucha contra la fiebre aftosa, los veterinarios uruguayos, como los campesinos del cuento, podemos decir:

"Si no fuera por nuestra profesión las campanas no repicarían. ¡Aquí hay mucho de nosotros!"