



DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE VACUNAS INACTIVADAS EXPERIMENTALES CONTRA ROTAVIRUS BOVINO

Escobar, T.¹; Acuña, P.²; Reolon, E.²; Arbiza, J.¹; Berois, M.¹

“Producción y evaluación de una vacuna inactivada contra rotavirus bovino”

Facultad de ciencias, Universidad de la República, Maestría en Biotecnología. Reina Tibusay Escobar Ladrón de Guevara. Tutor: Dra. Mabel Berois; Cotutor: Dr. Juan Arbiza.

¹Sección Virología. Facultad de Ciencias, UDELAR.

²Laboratorios Santa Elena S.A.

Resumen

La inmunidad pasiva obtenida vía calostro en terneros es la primera respuesta protectora desarrollada contra los patógenos generadores del síndrome de la Diarrea Neonatal Bovina, donde el Rotavirus Bovino (RVB) es uno de los principales agentes causales. Es por ello que la inmunización de las madres en el último tercio de la gestación, es una de las principales estrategias para la prevención y disminución de esta patología. El objetivo de este trabajo fue la producción y evaluación de la primera vacuna inactivada contra RVB en Uruguay. Se realizaron formulaciones con diferentes diseños y tipos de adyuvante para poder conocer la influencia de cada uno de estos factores en el desarrollo de la respuesta inmune. Se generaron tres formulaciones diferentes empleando la cepa RVB WC3: una vacuna monovalente Acuosa (VMA) una vacuna monovalente Oleosa (VMO) y una vacuna polivalente Oleosa (VPO). Las tres formulaciones superaron el límite de potencia establecido en el modelo cobayo para ser consideradas como satisfactorias. En el ensayo realizado en bovinos, la vacuna logró inducir altos títulos de Anticuerpos a nivel de suero, calostro y leche en las madres inmunizadas. Los terneros hijos de madres vacunadas no presentaron sintomatología diarreica ni se detectó antígeno de RVB en sus heces. Los dos terneros del grupo hijos de madres no vacunadas presentaron sintomatología diarreica y se detectó antígeno de RVB en heces a los días 15 y 21 PN. Se puede concluir en términos generales, que se obtuvo un resultado muy satisfactorio a nivel de calidad, inocuidad y potencia en la producción de la vacuna inactivada contra RVB.

Summary

Passive immunity obtained via colostrum in calves is the first protective response developed against pathogens, which cause the syndrome of the bovine neonatal diarrhea, where the bovine Rotavirus (BRV) is one of the main agents. Immunization of mothers in the last third of pregnancy is one of the actions carried out for prevention and reduction of this pathology. The objective was the production and evaluation of the first inactivated vaccine against RVB in Uruguay. Three different vaccine formulations with different adjuvant were developed: a monovalent aqueous vaccine (VMA), a monovalent oil based vaccine (VMO) and a polyvalent oil based vaccine (VPO), using the WC3 BRV strain. The three BRV vaccines achieved the level of antibody production in the

guinea pig model, to be considered as satisfactory. The vaccine induce high titers of antibodies in serum, colostrum and milk in cows immunized. None of the calves from vaccinated group showed diarrheal symptoms, in their feces samples was not detected BRV antigens. Two calves from unvaccinated mothers presented diarrheal symptoms and BRV antigens in feces were detected on 15 and 21 days post birth. At the level of quality, safety and power in the production of inactivated vaccines against BRV there were achieved satisfactory results.

Objetivos

Nuestro objetivo general fue realizar la primera producción en Uruguay de una vacuna contra RVB empleando una cepa de referencia que alcance el límite de potencia satisfactorio independientemente del tipo de la formulación y del adyuvante utilizado. Para ello, nos planteamos la elaboración de formulaciones diferentes de una vacuna inactivada contra RVB utilizando la cepa WC3 (*WistarCalf 3*) G6 P[5] y posteriormente evaluar su potencia y eficacia.

Materiales y Métodos

Se utilizó la cepa de Rotavirus bovino (RVB) WC3 (ATCC, VR-2101) la cual fue cultivada en la línea celular MA104 (ATCC CRL-2378), en medio Mínimo de Eagle (MEM) en presencia de tripsina (5 ug/ml) sin suplemento de suero fetal bovino a 37°C y atmosfera de CO₂ al 5% para el cultivo, durante 48 horas. Para la inactivación se utilizó bromhidrato de 2- bromo etilamina y fue realizado a partir una suspensión viral cuyo título era como mínimo 10⁷/mL DITC50. Se realizaron 3 formulaciones: una vacuna monovalente acuosa (VMA) adyuvada con hidróxido de aluminio, una monovalente oleosa (VMO) y una polivalente oleosa (VPO) con adyuvante Adjuvac50 propio de Laboratorios Santa Elena S.A. La vacuna VPO contuvo además de la cepa de RVB, los Antígenos Diarrea Viral Bovina tipo 1 y 2, Salmonella Entérica, E coli cepas K99 y J5.

Para las producciones de las vacunas se siguieron procedimientos operativos estándares de producción y control de cepario y producción a escala industrial que cumplen con la normativa de Buenas Prácticas de Manufactura.

Para el estudio de la potencia de las vacunas, se utilizó el modelo cobayo (*Cavia Porcellus*). Se utilizaron grupos de 10 cobayos. La vacunación se realizó por vía subcutánea con 0.6 mL. Se administraron dosis al día 0 y 21 post primo vacunación (PV). Se obtuvieron muestras



de suero al día 0, 30 y 60 PV.

Para el estudio de en la especie destino se utilizó la formulación PVO. Se utilizaron cinco hembras raza Holando y cruza Holando –Jersey, que se encontraban en el último tercio de la gestación. Se generaron dos grupos, uno vacunado y otro control. Se inmunizaron 20 días antes del parto (día 0) con una dosis subcutánea de 3 mL. No hubo revacunación. Se extrajo suero de todas las hembras preñadas al día 0, 24 a 48 horas después del parto (día 21 o 22 PV) y 21 días después del parto (día 43 PV). Se toman muestras de calostro entre las 24 y 48 horas posteriores al parto (PP) y leche a los 7, 15 y 21 días PP. En los terneros: se realizó una toma de suero y heces a las 48 horas, 7, 15 y 21 días de nacido.

Para la detección del Antígeno viral e IgG totales anti RVB se utilizó la técnica de ELISA la cual fue implementada en base a metodología validada para tal propósito por la sección de Virus Entéricos, Instituto de Virología del INTA – Argentina.

Resultados y Discusión

Con respecto al estudio de potencia en cobayos, al analizar el promedio del log₁₀ de los títulos de IgG totales, el grupo inmunizado con VMA fue el que presentó mayor valor (5,68) al día 30 PV, y el grupo VPO tuvo el menor (5,49). Para el día 60 PV el mayor promedio ocurrió en el grupo VMO (5,95), seguido por el grupo VPO (5,89) y VMA (5,66). De acuerdo a lo establecido por el INTA, los cobayos vacunados deben alcanzar títulos de IgG totales mayores o iguales a 4.47 log₁₀, para considerar la potencia de la vacuna satisfactoria. Todos los valores obtenidos para cada grupo superaron el límite establecido. En el ensayo realizado en bovinos, el promedio de los títulos de IgG totales anti-RVB en las muestras de calostro en las hembras vacunadas (196608), fue 12 veces mayor al obtenido en las hembras no vacunadas (16384).

Se observaron diferencias a nivel de secreción de IgG en la leche. El título de Anticuerpos de las madres vacunadas fue superior para el día 15, 26 veces y para el día 21, 19 veces, con respecto a las madres del grupo control.

En las muestras de sueros de las madres vacunadas se observó un nivel de seroconversión 18 veces mayor entre el título de IgG pre vacunación (PrV) y al día 45 post vacunación (PV), obteniendo un valor de 1,4 en el nivel de seroconversión, el doble del valor mínimo establecido por el INTA de 0,75.

Los terneros hijos de las madres vacunadas tuvieron

mayores títulos de IgG a las 48 horas y a los 7 días PN, tanto en el suero como en materia fecal. Los terneros hijos de madres vacunadas disminuyeron entre 4 a 8 veces, sus títulos de IgG, en la primera semana y en las dos semanas posteriores este título se mantuvo estable. En el suero de los terneros de madres no vacunadas, posterior a la disminución de los títulos de IgG en la primera semana de vida, ésta aumentó entre 16 y 64 veces al compararlos con los títulos disminuidos del día 7 PN.

Con respecto al nivel de IgG en materia fecal, en el día 15 PN los terneros del grupo control presentaron niveles bajos de IgG. Los terneros de madres vacunadas, para el día 15 PN presentaron títulos de IgG 16 veces mayores que los del control. Se detectó Antígeno de RVB en las heces de los terneros del grupo control, a los días 7 y 15 PN, concordando con la disminución de títulos de IgG que presentaron y la aparición de la enfermedad en estos animales.

Conclusiones

En el ensayo de potencia en el modelo cobayo, las tres formulaciones vacunales superaron el límite establecido para considerar la vacuna satisfactoria. En el ensayo de eficacia, la vacuna logró inducir altos títulos de anticuerpos en suero, calostro y leche de las madres inmunizadas en comparación con el grupo control.

Como conclusión final se puede decir, que se obtuvo un resultado muy satisfactorio en la producción de la vacuna inactivada contra el RVB tanto a nivel de los cobayos como a nivel de los bovinos, siendo un importante aporte germinal para la optimización de nuevos desarrollos en esta área.

Bibliografía

- Mebus C. A.; Underdahl N. R.; Rhodes M. B. y Twiehaus M. J. 1969. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from field outbreak. *Nebraska Agricultural Experimental Station Research Bulletin*. 233: p. 1-16.
- Parreño, V.; Marcoppido, G.; Vega, C.; Garaicoechea L.; Rodríguez, D.; Saif, L.; Fernández F. 2010. Milk supplemented with immune colostrum: Protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 136: p. 12–27.