

## VACUNACION Y VACUNAS

I.R. Tizard

Universidad de Texas A & M, U.S.A.

### TIPOS DE PROCEDIMIENTOS DE INMUNIZACION

Existen dos métodos básicos por los cuales un animal puede ser inmune a una enfermedad infecciosa. Un método, llamado Inmunización Pasiva produce una resistencia temporal por la transferencia de anticuerpos de un animal resistente a uno susceptible. Estos anticuerpos transferidos pasivamente proporcionan protección inmediata, pero mientras ellos son gradualmente catabolizados, esta protección decrece y el receptor eventualmente se vuelve susceptible a una infección.

La inmunización activa involucra la administración del antígeno a un animal para que éste responda montando una respuesta inmune protectora. Esta respuesta puede ser cualquiera, ya sea mediada por anticuerpos, o células o ambas. La reinmunización o exposición a la infección resultará en una respuesta inmune secundaria. La desventaja de la inmunización activa es que la protección no es conferida inmediatamente. Sin embargo, una vez establecida ésta es de larga duración y capaz de reestimulación.

### INMUNIZACION ACTIVA

La ventaja más importante de la inmunización activa comparada con la protección pasiva es el período prolongado de protección alcanzada y el recordar y promocionar esta respuesta protectora por las inyecciones repetidas de antígeno o por la exposición a la infección. Una vacuna ideal para la inmunización activa debiera por consiguiente, proporcionar fuerte inmunidad prolongada. Esta inmunidad debería ser conferida en el animal inmunizado y cualquier feto llevado por ella. Para la obtención de esta fuerte inmunidad, la vacuna deberá ser libre de efectos secundarios adversos. La vacuna ideal debería ser barata, estable, adaptable para vacunaciones masivas e idóneamente deberá estimular una respuesta inmune distinguible de aquellas debidas a una infección natural de manera que la inmunización y la erradicación puedan proceder simultáneamente.

### CUATRO REQUERIMIENTOS PARA UNA VACUNA

Una vacuna efectiva tiene cuatro propiedades críticas. La primera, las células presentadoras de antígeno deberán ser estimuladas para que ellas procesen eficientemente el antígeno y liberar las interleucinas apropiadas. Segundo, ambas células T y B deberán ser estimuladas para que ellas generen grandes números de células de memoria. Tercero, células T efectoras y cooperadoras deberán ser generadas para muchos epítomos en la vacuna así que las variaciones en el polimorfismo de la clase dos en el CPH y las propiedades del epítomo sean agotadas. Finalmente, el antígeno debe persistir en sitios apropiados en el tejido linfóide para que las células productoras de anticuerpos sean generados durante un período de tiempo

## Vacunación y Vacunas

y la protección persistirá por un largo período. Muchas de las fallas en la eficacia de las vacunas puede ser atribuido a una inhabilidad de conformar uno ó más de estos requerimientos.

Vacunas vivas e inactivadas ("muertas"). Desafortunadamente dos de los pre-requisitos de una vacuna ideal, alta antigenicidad y ausencia de efectos secundarios adversos, parecen ser incompatibles mutuamente. Aquellos organismos vivientes estimulan la mejor respuesta inmune pero pueden presentar peligros como un resultado de virulencia residual, mientras organismos inactivados son comúnmente inmunógenos pobres pero pueden ser muy seguros.

Las ventajas de las vacunas que contienen organismos inactivados, son que ellas son seguras con respecto a la virulencia residual y son relativamente fáciles de almacenar, puesto que los organismos ya están muertos. Estas ventajas de las vacunas inactivadas corresponden a las desventajas de las vacunas vivas tal como la cepa 19. Esto es, algunas vacunas vivas pueden poseer virulencia residual, no solo para el animal para el cual la vacuna fue hecha sino también para otros animales. Ellas pueden revertir a un tipo virulento completo o diseminarse en animales no vacunados, un hallazgo no observado es cuando se utiliza la cepa 19. Las vacunas vivas siempre corren el riesgo de contaminación con organismos no deseados; por ejemplo, los brotes de retículo endoteliosis en pollos en el Japón y Australia han sido relacionados con vacunas contaminadas de la enfermedad de Marek. Un brote más grande de la leucosis bovina en Australia resultó de la contaminación de una partida de vacunas de babesiosis conteniendo sangre completa de becerros. Se ha sugerido que adenovirus aviar EDS 76 (Síndrome de baja postura 1976) y el parvovirus canino pueden haber sido distribuidas en vacunas contaminadas. El mycoplasma contaminante puede también estar presente en algunas vacunas. Finalmente, vacunas conteniendo organismos vivos atenuados requieren cuidado en su preparación, almacenaje y manejo para evitar la destrucción de los organismos. Hasta hoy el mantenimiento de "La cadena fría" puede costar de un 20 a un 80% del costo de una vacuna en los trópicos.

Las desventajas de las vacunas inactivadas corresponden a las ventajas de vacunas vivas. Hasta ahora el uso de adyuvantes para incrementar la antigenicidad efectiva pueden ocasionar reacciones locales severas, mientras la dosificación múltiple o dosis individuales altas de antígeno incrementan el riesgo de producir reacciones de hipersensibilidad así como costos que afectan adversamente. Históricamente, las vacunas que contienen organismos vivos tienden a inducir una mejor inmunidad, que las vacunas que contienen organismos inactivados. Una razón para esto es que el virus vivo vacunal puede invadir células del huésped e inducir la producción de interferón, así confiriendo protección temprana en los animales susceptibles. Los virus son procesados en forma diferente que los organismos inactivados. Así los virus vivos que invaden una célula serán tratados como antígenos endógenos, uniéndose a los antígenos de clase uno del CPH y accionar el ataque por células CD8+. Los organismos inactivados serán tomados por una célula presentadora de antígeno y se unen a los antígenos de clase dos del CPH accionando una respuesta de células CD4+. La mayor eficacia de las vacunas vivas es probablemente también debido a la distribución de los organismos vivos dentro del cuerpo así como los cambios causados por el proceso de destrucción.

## INACTIVACION

Si los organismos son inactivados para su uso en vacunas, es deseable que esos organismos inactivados sean antigénicamente similares en lo más posible a aquellos organismos vivos. Por lo tanto, un rudo método de destrucción de organismos como lo es el calentamiento, el cual causa desnaturalización extensiva de proteínas o la oxidación de lípidos no es satisfactoria comunmente. Si los químicos son usados es esencial que éstos no alteren los antígenos responsables de la estimulación de la inmunidad protectora. Un químico utilizado en esta forma es el formaldehído, el cual actúa en los grupos amino y amida en las proteínas y en los grupos amino no unidos al hidrógeno en las bases purina y pirimidina de los ácidos nucleicos que forman enlaces cruzados y también confieren rigidez estructural. Las proteínas pueden también ser desnaturalizadas moderadamente por el tratamiento de alcohol y acetona. Agentes alquilantes que enlazan cruzando las cadenas de ácidos nucleicos son también apropiados para destruir organismos, puesto que dejan las proteínas de superficie de los organismos sin modificar, ellos no interfieren con la antigenicidad. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen óxido de etileno, etileneimino, acetiletileimino y B-propiolactona, todas las cuales han sido utilizadas en vacunas para veterinaria.

## ATENUACION

Los organismos vivos virulentos no pueden ser normalmente usados en vacunas. Su virulencia debe ser reducida para que, si bien continúan viviendo ellos no puedan ya más ocasionar enfermedad. Este proceso de disminución de la virulencia es conocido como atenuación. Métodos simples de atenuación incluyen el calentamiento de los organismos hasta justo antes de su punto térmico de muerte o exponiendo los organismos a una concentración marginal subletal de químicos inactivadores. Presumiblemente, los organismos dañados por estos procesos están en desventaja cuando son inoculados a un animal y en lugar de multiplicarse rápidamente y ocasionar la enfermedad pueden ser fagocitados y procesados por la respuesta inmune.

Los métodos más comunes de atenuación implican la adaptación de organismos a crecer en condiciones no comunes así que ellos pierden su adaptación a su hospedero común. Por ejemplo, el BCG (bacilo Calmette-Guérin) cepa de *Mycobacterium bovis* fue hecho avirulento haciéndolo crecer por 13 años en un medio saturado de bilis. La cepa de antrax actualmente usada en vacunas fue hecho avirulento por el crecimiento en 50% de agar suero bajo una atmósfera rica de CO<sub>2</sub> así que perdió su habilidad para formar una cápsula. La vacuna original de cólera aviar de Pasteur (*Pasteurella multocida*) creció bajo condiciones en las cuales había carestía de nutrientes.

Considerando que la bacteria puede hacerse avirulenta por su cultivo largo bajo condiciones anormales, los virus pueden ser atenuados por crecimiento en células o especies para los cuales no están adaptados naturalmente. Por ejemplo, el virus de la peste bovina el cual es normalmente un patógeno del ganado, fue primero atenuado por crecimiento en cabras. Este virus "Caprinizado" sin embargo, retuvo su virulencia para algunas razas de ganado. Para tratar de solucionar este problema, se introdujo una vacuna adaptada en conejo ("Lapinizada"), la cual tiene menos virulencia residual. Eventualmente, una vacuna muy

exitosa de tejido adaptado a cultivo para la vacuna de peste bovina exenta de virulencia residual fue desarrollada. Ejemplos similares incluyen la adaptación del virus de la enfermedad africana del caballo en ratones y el virus del moquillo canino en hurones.

Alternativamente, los virus de mamíferos pueden ser atenuados por crecimiento en huevos. Esto se ha hecho para el moquillo del perro, lengua azul y vacunas de rabia. Por ejemplo, la cepa Flury de rabia fue atenuada por 178 pasajes en huevos y perdió su virulencia para perros y gatos normales. En el caso de algunos virus aviares, la atenuación puede ser ocasionada por el crecimiento de huevos de otras especies; por ejemplo, el virus de la influenza aviar puede ser atenuado en huevo de paloma.

El método más comunmente usado en la atenuación es por el cultivo prolongado en tejido. Es común el utilizar cultivos de células de las especies que serán vacunadas para reducir los efectos secundarios resultantes de la administración de tejidos extraños. En estos casos la atenuación viral es completada por la cultivación del organismo en tipos de células para los cuales ellos no están adaptados. Por ejemplo, el virus virulento del moquillo canino preferentemente ataca las células linfoides para propósitos vacunales, por consiguiente, este virus fue cultivado repetidamente en células de riñón canino y como resultado por el cual éste perdió su virulencia.

Algunas vacunas usan en lugar de organismos artificialmente atenuados, organismos antigénicamente relacionados normalmente adaptados a otras especies. Por ejemplo, el virus del sarampión puede ser usado para proteger perros contra el moquillo y el virus de diarrea bovina puede proteger a porcinos contra el cólera porcino.

Bajo algunas circunstancias es posible el utilizar organismos completamente virulentos en los procedimientos de inmunización tal como los chinos lo hicieron con la viruela, sin embargo, esto es hecho solamente si una mejor técnica no está disponible. La vacunación contra el ectima contagiosa del ovino es de éste tipo. El ectima contagioso (ORF) es una enfermedad viral de carneros que ocasiona la formación masiva de costras alrededor de la boca, evita la alimentación y resulta en una falla de contagio. Esta enfermedad tiene un efecto sistémico pequeño. Los corderos se recuperan completamente en unas pocas semanas y son inmunes de ahí en adelante. Es común el vacunar corderos frotando material seco de costras infectadas y secas en rasguños hechos para ese propósito en el muslo. La infección local en ese sitio no tiene efectos consigo en los corderos y ellos se vuelven inmunes sólidamente. Debido a que los animales vacunados pueden diseminar la enfermedad, sin embargo, es necesario separarlos de los no vacunados por unas pocas semanas.

## OTROS METODOS DE PRODUCCION DE VACUNAS

Si bien las vacunas convencionales han sido muy exitosas al controlar enfermedades infecciosas, siempre hay necesidad de mejorar. Muchas nuevas técnicas están siendo estudiadas en intentos por hacer nuevas vacunas más efectivas, seguras y baratas.

## ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

La atenuación puede ser considerada ser una forma primitiva de ingeniería genética. El resultado deseado es el desarrollo de un agente el cual en alguna forma decrece la habilidad de ocasionar enfermedad. Esto puede ser difícil de llevar a cabo y la regresión a virulencia es un riesgo siempre presente. Las nuevas técnicas de ingeniería genética, sin embargo, lo hacen posible al modificar los genes de organismos deliberadamente así que ellos se tornan atenuados irreversiblemente. Por ejemplo, vacunas de ingeniería genética son ahora disponibles contra el herpes virus que ocasiona la pseudorabia en el cerdo. La timidina kinasas (TK) es requerida por los herpes virus para replicarse en células que no se dividen como las neuronas. Los virus para los cuales el gen TK ha sido retirado son capaces de infectar células nerviosas, pero no pueden replicarse y no puede, por consiguiente, ocasionar enfermedad. Como un resultado, estas vacunas no solamente proveen protección efectiva, sino por el bloqueo de células a la invasión por virus virulento de pseudorabia, también previene el desarrollo de un estado de portador persistente.

El virus de la pseudorabia también sintetiza dos glicoproteínas principales llamadas gX y gI. Ninguna de esas son esenciales para el crecimiento o virulencia, no obstante éstas son encontradas en todos los aislamientos de campo de este virus. Animales infectados con aislamientos de campo producen anticuerpos para gX y gI. Si los genes gX y gI son eliminados, el virus de pseudorabia aparenta que funciona normalmente. El virus de la pseudorabia atenuado que carece de cualquier gX y gI puede ser usado como vacuna en programas de erradicación dado que éste no causará reacciones serológicas positivas en una prueba diagnóstica de eliminación específica. La presencia de anticuerpos para gX y gI en el cerdo evidencia que el animal ha sido expuesto a las cepas de campo del virus de pseudorabia.

Otro método de producir virus avirulentos por ingeniería genética es el reordenamiento de segmentos de gen en los virus que segmentaron genomas tales como son los rotavirus o la influenza. Alternativamente un gen sin sentido tal como es usado para generar mutantes sensibles a la temperatura pueden ser insertados en un genoma viral.

## VACUNAS RECOMBINANTES

### Antígenos recombinantes

Las técnicas de recombinación pueden ser empleadas para aislar el código DNA de un antígeno de interés. Este DNA puede ser entonces insertado a una bacteria, levadura o a otra célula y la recombinación permite la expresión de esa proteína. El primer uso exitoso de clonación de genes para preparar un antígeno involucrado en la fiebre aftosa. Este virus es extremadamente simple. El antígeno protector (VP1) es bien reconocido, y los genes que modifican para este antígeno han sido mapeadas. El genoma RNA del virus de la fiebre aftosa fue aislado y transcrito hacia el DNA por la enzima transcriptasa inversa. El DNA fue después cortado cuidadosamente por restricción de endonucleasas, así que eso solo contenía el gen para VP1. Este DNA fue entonces insertado en un plásmido de *E. coli*, el plásmido se insertó en una *E. coli* y la *E. coli* creció. La bacteria recombinada sintetizó grandes cantidades de VP1 la cual fue cosechada, purificada e incorporada en una vacuna. El proceso es altamente

## Vacunación y Vacunas

eficiente puesto que se pueden obtener ( $4 \times 10^7$ ) dosis de vacuna de patas y boca de 10 litros de *E. coli* creciendo en  $10^{12}$  organismos, ml. Desafortunadamente, la inmunidad que produce es inferior que la que se obtiene por un virus inactivado y requiere de mil veces mayor dosis para inducir protección comparable.

La primera vacuna recombinante en veterinaria comercialmente disponible es una contra el virus de la leucemia felina. La principal proteína de la envoltura del VLFe es llamado gp 70. El gp 70 es el componente responsable ampliamente de producir una respuesta inmune protectora en gatos. Hasta hoy el gen para la gp 70 (Una g/u co-proteína de 70 kDa) más una pequeña porción de una proteína de enlace llamada Pi5e (Una proteína de 15 KDa de la envoltura) es insertada en una *E. coli*. La *E. coli* recombinante sintetiza la p70 en grandes cantidades. La p70 dorada no es glicosilada y tiene un peso molecular de solo arriba de 50 kDa. Una vez donada, la proteína recombinante es purificada, mezclada con un adjuvante de saponina y utilizado como una vacuna.

Otro ejemplo de una vacuna recombinante es uno dirigido contra *E. coli* enteropatógena. La enterotoxina termo-lábil de *E. coli* consiste de dos subunidades. La subunidad alfa de la enterotoxina es toxina mientras la subunidad P es responsable de la unión de la subunidad alfa a las células entéricas. Las subunidades Beta aisladas son inmunogénicas y funcionan como toxoides efectivos. Una vacuna recombinante que consiste en la enterotoxina donada de la subunidad B de *E. coli* ha sido preparada. En este caso, el gen de la subunidad B fue donado, enlazado con un promotor poderoso, y transferido hacia una cepa de *E. coli* no patógena. El pili de adhesión de la *E. coli* enteropatógena, por ejemplo K88 (F4) o K99 (F5), pueden también ser donadas y la proteína purificada del pilus incorporada en bacterinas. Los anticuerpos antipilus hasta aquí provocados protegerán animales por la prevención de adhesión bacteriana a la pared intestinal.

Las técnicas de DNA recombinante son útiles en cualquier situación donde antígenos de proteína pura necesiten ser sintetizados en grandes cantidades. Desafortunadamente proteínas muy puras son frecuentemente antígenas pobres porque ellos no son depositados efectivamente en células sensitivas al antígeno. En suma, ellos pueden ser no eficientes a causa de restricción del CPH. Un método alternativo de depositar un antígeno recombinante es el donar los genes de interés en un organismo portador viviente atenuado.

## ORGANISMOS VIVOS RECOMBINANTES

Los genes codificando para antígenos proteicos pueden ser donados directamente en una variedad de organismos y en vez de ser en seguida purificado, el organismo recombinante por sí mismo, puede ser usado como una vacuna. El organismo que ha sido más ampliamente empleado para este propósito es el virus de vaccinia. El virus de vaccinia es fácil de administrar por raspado dérmico. Tiene un genoma grande que lo hace relativamente fácil de insertar en un gen nuevo y puede expresar altos niveles de un antígeno nuevo. Además, las proteínas recombinantes sufriendo pasos de procesamiento apropiado incluyendo glicosilación y transporte de membrana dentro de la vaccinia. Un buen ejemplo como una vacuna es el virus de vaccinia recombinante que contiene el gen para la glicoproteína de la envoltura en rabia a la proteína G. La glicoproteína G forma los picos característicos en la superficie del virus de