



Estudio comparativo de la capacidad inmunogénica de dos adyuvantes de uso en vacuna contra influenza equina

Comparative study of the immunogenic capacity of two adjuvant used in equine influenza vaccine

Montenegro, JL^{1,2}; Gastaldo, MF¹; Álvarez Rubianes, N¹; Meglia, GE¹; Montenegro, JM.³

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 y 116 (6360). General Pico. La Pampa. ²Veterinario Militar. ³Estudiante Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa.

cnlmontenegro@hotmail.com

Resumen

Las vacunas inactivadas de producción nacional, de uso en el equino, llevan mayoritariamente en su formulación como adyuvante, hidróxido de aluminio Al(OH)₃. Actualmente existen nuevos productos adyuvantes potencialmente superiores a los tradicionales respecto al aumento del tiempo de permanencia del antígeno en el animal huésped y a la respuesta inmune que inducen. En el presente trabajo se comparó la acción adyuvante de Emulsigen respecto al hidróxido de aluminio, los que fueron usados en una vacuna contra influenza equina. A tal efecto se establecieron dos modelos de prueba, equinos y cobayos y la respuesta inmune inducida se evaluó por medio de la determinación de los títulos de anticuerpos. Los resultados demostraron mayores títulos de anticuerpos y persistencia de los mismos en el tiempo inducidos con la vacuna adyuvada con Emulsigen, respecto a la vacuna adyuvada con Al(OH)₃, no observándose reacción adversa en el sitio de inoculación.

Palabras claves: vacuna, adyuvante, influenza equina, respuesta inmune.

Abstract

Inactivated vaccines of national production, for use in the equine, carried mostly in its formulation as an adjuvant, aluminum hydroxide Al(OH)₃. Nowadays there are new adjuvants potentially superior to the traditional, either with respect to an increase in the time of

permanence of the antigen in the host, and the immune response that induce. In the present work was compared the action of adjuvant Emulsigen respect aluminum hydroxide, which were used in a vaccine against equine influenza. For this purpose were established two test models, horses and guinea pigs, and the immune response induced was assessed by means of the determination of antibody titers. The results showed higher titers and extended serum antibodies persistence with the vaccine adjuvanted with Emulsigen, in relation to that adjuvanted with Al(OH)₃, likewise were not observed adverse reaction in the site of inoculation.

Key Words: vaccine, adjuvant, equine influenza, immune response.

Introducción

Los adyuvantes son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos (Roitt, 1991).

El mecanismo de acción de estas sustancias ha sido objeto de numerosos estudios y, al parecer, existen diversos factores que explican su modo de acción. El antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, y una de sus funciones importantes de los adyuvantes es crear un reservorio o



depósito del antígeno de larga vida. Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos (Guerrero y Gattas, 1982); éstos cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera factores solubles estimulantes, que amplifican la proliferación de los linfocitos. Por otro lado, algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar específicamente sobre los linfocitos (Wagnerova y Ferencik, 1993).

En el campo de la salud veterinaria el uso de adyuvantes se mide en eficacia como elemento de gran importancia y se toleran ciertos niveles de efectos colaterales.

Los adyuvantes más ampliamente utilizados en las vacunas veterinarias son las emulsiones de aceite mineral (del tipo aceite en agua o agua en aceite) y los adsorbentes (hidróxido y fosfato de aluminio). En algunos casos, se emplean liposomas, saponinas, vitamina E, complejos inmunoestimulantes (ISCOM_s), así como diferentes emulsiones de aceites de origen vegetal o animal. Las emulsiones de aceite mineral, especialmente las del tipo agua en aceite, si bien inducen una fuerte respuesta inmune, pueden provocar riesgos y efectos no deseados, a causa posiblemente de su limitada biodegradabilidad y biocompatibilidad (Straw et al., 1985). Por tal razón, se han realizado numerosos intentos para desarrollar adyuvantes eficaces y a la vez seguros.

Emulsigen (marca comercial) es una emulsión estéril de aceite en agua, libre de ingredientes de origen animal, que agregada a antígenos de uso veterinario genera una mezcla suave y uniforme. Este producto está diseñado para ser mezclado directamente a antígenos de vacunas, sin más procesamiento, para acrecentar la

inmunogenicidad del producto final. Este adyuvante contiene, uniformemente dispersadas microgotas de aceite, lo que asegura máxima estabilidad a la emulsión y viscosidad reducida. Las microgotas incrementan el área disponible para el antígeno reduciendo a su vez la cantidad de aceite requerido en la composición de la vacuna final (Emulsigen Technical Bulletin).

Las emulsiones aceite en agua, usadas como adyuvantes, actúan formando un depósito móvil de antígeno el que puede dirigir la producción de células inmunes efectoras. El efecto depósito con liberación lenta del antígeno aumenta la presentación del antígeno y como consecuencia genera un aumento significativo de la respuesta inmune y eficacia de la vacuna.

Hay referencias en la literatura técnica veterinaria del uso de Emulsigen como adyuvante de vacunas de uso tanto en animales grandes como pequeños (Manpreet et al., 2010; Hyszczynska-Sawicka et al., 2009; Ioannou et al., 2001; Wedlock et al., 2005; McGonigle et al., 2008).

En el presente trabajo se evaluó la acción inmunológica del adyuvante "Emulsigen" (MVP Laboratorios Inc.) compuesto de una emulsión oleosa en agua (parafina micronizada), en comparación con el uso de Al(OH)₃ como adyuvante.

Las vacunas de prueba se realizaron usando antígenos inactivados de influenza equina (H7N7 y H3N3) elaborados por el Laboratorio 601 de Remonta y Veterinaria, con el agregado de Al(OH)₃ o Emulsigen a una concentración del 20% v/v. La respuesta inmune inducida, tanto en equinos como en el modelo cobayo se evaluó midiendo la concentración de anticuerpos por las técnicas de inhibición de la hemoaglutinación (IHA).

Materiales y Métodos

Se utilizaron antígenos de influenza equina (AEqui1 y AEqui2), propagados en huevos embrionados e inactivados con formol,



usados de rutina para la fabricación de vacunas en el Laboratorio de Remonta y Veterinaria y 601, del Ejército Argentino. A partir de los mismo se conformaron dos vacunas de prueba con la misma concentración de antígenos a las cuales se les adicionó $Al(OH)_3$ o Emulsigen como adyuvantes, a una concentración final del 20% v/v de tal manera que toda variabilidad en la respuesta inmune pueda ser relacionada al efecto de los adyuvantes usados.

La respuesta inmune fue evaluada usando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IHA), para medir la concentración de anticuerpos generados por las vacunas de prueba contra influenza equina en dos modelos biológicos, equinos y cobayos, según los siguientes protocolos. Protocolo N° 1:

Se inocularon diez equinos con 2 mL., vía intramuscular de la vacuna de prueba contra influenza equina adyuvada con Emulsigen y diez equinos con su contraparte adyuvada con $Al(OH)_3$. Se realizaron seis extracción de sueros, comenzando desde el día cero hasta el 196, a efectos de evaluar, por la técnica de IHA, la concentración de anticuerpos generados. Protocolo N° 2:

Veinte cobayos de 300 gr. se dividieron al azar en dos grupos de diez cobayos cada uno. El grupo 1 se inoculó con 1 mL vía intramuscular con la vacuna de prueba contra influenza equina, con el agregado del 20% de Emulsigen, como adyuvante y el grupo 2 se inoculó con la misma dosis y vía, con la vacuna homónima, adyuvada con el 20% de $Al(OH)_3$. Se estableció un plan de vacunación de dos dosis, los días 0 y 21, siguiendo los estándares de la prueba de potencia en cobayos, para este tipo de vacuna.

Se obtuvo sangre de cada animal por punción cardíaca, para la obtención de suero y se determinó el título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación por la técnica IHA, a los

días 42, 101, 163 y 285 post primo vacunación.

Análisis Estadístico:

Los datos obtenidos, tanto en el modelo equino como en el modelo cobayo se evaluaron, para determinar su significancia, por Test de Student mediante un contraste de los valores medios de las unidades de IHA.

Resultados

Se observó que al día 196 post vacunación, el 70% de los equinos vacunados con la vacuna adyuvada con Emulsigen, demostró presencia de anticuerpos en valores que iban de 16 a 128 unidades IHA, con un valor medio general de 39,2. Respecto a la vacuna adyuvada con $Al(OH)_3$ la concentración de anticuerpos medidos al mismo tiempo no superó, en el 80% de los equinos, un título de 8 unidades IHA, y un valor medio general de 9,6 motivo por el cual el SENASA promueve una vacunación obligatoria cada 90 días con este tipo de vacuna (Ver Gráficos N° 1 y 2).

Estadísticamente estos resultados, analizados por contraste de valores medios demostraron un t: 8,34, significativo para un α : 005 y muy significativo para un α : 001.

En el modelo cobayo los valores de anticuerpos alcanzaron valores de 1024 unidades IHA, en el 70% de los cobayos vacunados con la vacuna adyuvada con Emulsigen, y un valor medio general de 819,2 unidades IHA, evaluados a los 285 días post primo vacunación, mientras que solo 128 unidades IHA en el 70% de los vacunados con la vacuna adyuvada con hidróxido de aluminio, y un valor medio general de 166,4 unidades IHA, evaluados al mismo tiempo (Ver Tablas N° 1 y 2 y Gráfico N° 3). Estos resultados, analizados por contraste de valores medios demostraron un t: 9,63 significativo para un α : 005 y muy significativo para un α : 001.



Conclusiones

Se observó una mejor respuesta inmune, tanto en la concentración de anticuerpos como en la permanencia de los mismos en el tiempo, en los equinos y cobayos vacunados con vacuna contra influenza equina adyuvada con Emulsigen en comparación con la homónima adyuvada con hidróxido de aluminio, con un nivel de significancia del 95% y 99%. Este resultado alentaría la posibilidad de generar vacunas más eficientes para uso en el equino que permitan extender los tiempos entre las dosis recomendadas.

No se observó en ninguna de las dos especies utilizadas en el ensayo, reacción adversa en el punto de inoculación de las vacunas, por lo que se puede concluir que tanto el Emulsigen como el hidróxido de aluminio no afectarían la performance equina cuando se inoculan vía intramuscular.

A través de los presentes resultados se sientan las bases para evaluar la acción de nuevos adyuvantes en el desarrollo de la respuesta inmune de otros antígenos de uso en la prevención de enfermedades de los equinos.

Bibliografía

Emulsigen Technical Bulletin
www.mvp-technologies.com

Guerrero J, Gattas CR. 1982. Immunomodulating substances: an overview. *Rev Microbiol* 1982;13(2):110-5.

Hiszczyńska-Sawicka E, Li H, Xu JB, Oledzka G, Kur J, Bickerstaffe R, Stankiewicz M. 2010. Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations. *Exp Parasitol.* Apr;124(4):365-72. Epub 2009 Dec 3.

Ioannou XP, Griebel P, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. 2002. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are

increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *J Virol. Sep;* 76(18):9002-10

Manpreet Kaur, Ankur Saxena, Anant Rai, and Rakesh Bhatnagar. 2010. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice *FASEB Journal* January Vol. 24 no. 1 173-183.

McGonigle, JD, BC Lin, KK Brown, RG White, LM Siedlik, CM Hrabik. 2008. Comparison of adjuvants for stimulation of HI antibody to SIV. Abstract No: P.09-11, 20th International Pig Veterinary Society Congress – Durban 2008.

Roitt, IM. 1991. *Essential Immunology.* 7 ed. Oxford: Blackwell Scientific, 326

Straw BE, Maclachlan NJ, Cobertt WT, Carter PB, Schey HM. 1985. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can J Comp Med* 49:149-51.

Wagnerová J, Ferencík M. 1993. Secretory and regulatory products of macrophages in the immune and inflammatory reactions. *Biol Bratislav* 48(6):709-17

Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Vordermeier HM, Hewinson RG, Hecker R, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA, Buddle BM. 2005.

Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and CpG oligodeoxynucleotides induces protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* Jun 15;106(1-2):53-63.

Gráfico N° 1 Dinámica temporal (días 0 a 196 post vacunación) en la producción de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación anti influenza equina, evaluados en sueros equinos vacunados con vacuna adyuvada con Emulsigen.

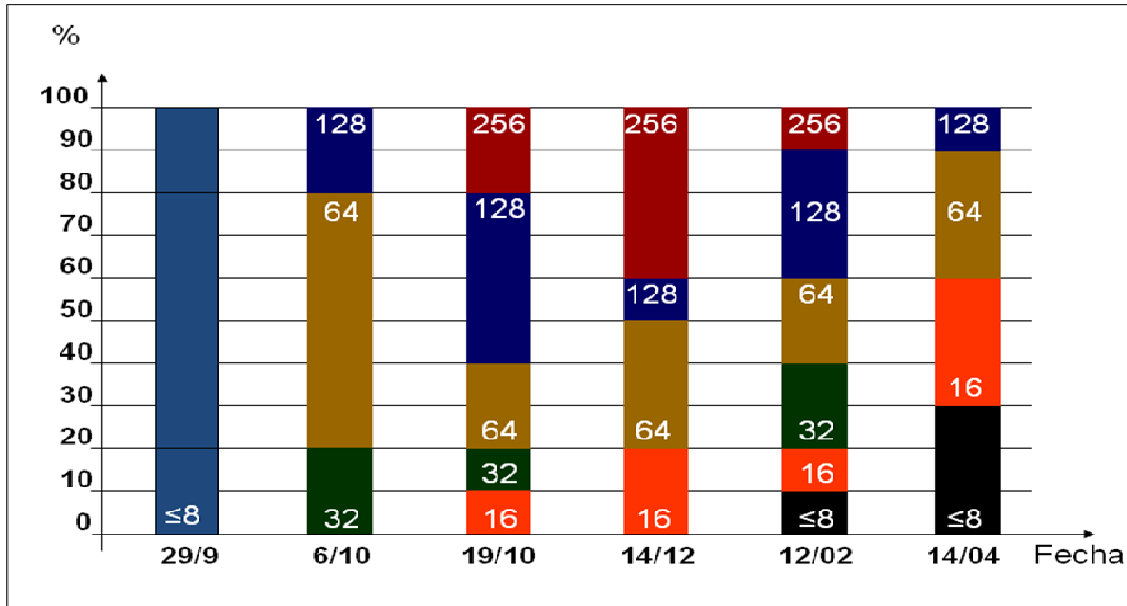


Gráfico N° 2 Dinámica temporal (días 0 a 196 post vacunación) en la producción de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación anti influenza equina, evaluados en sueros equinos vacunados con vacuna adyuvada con hidróxido de aluminio.

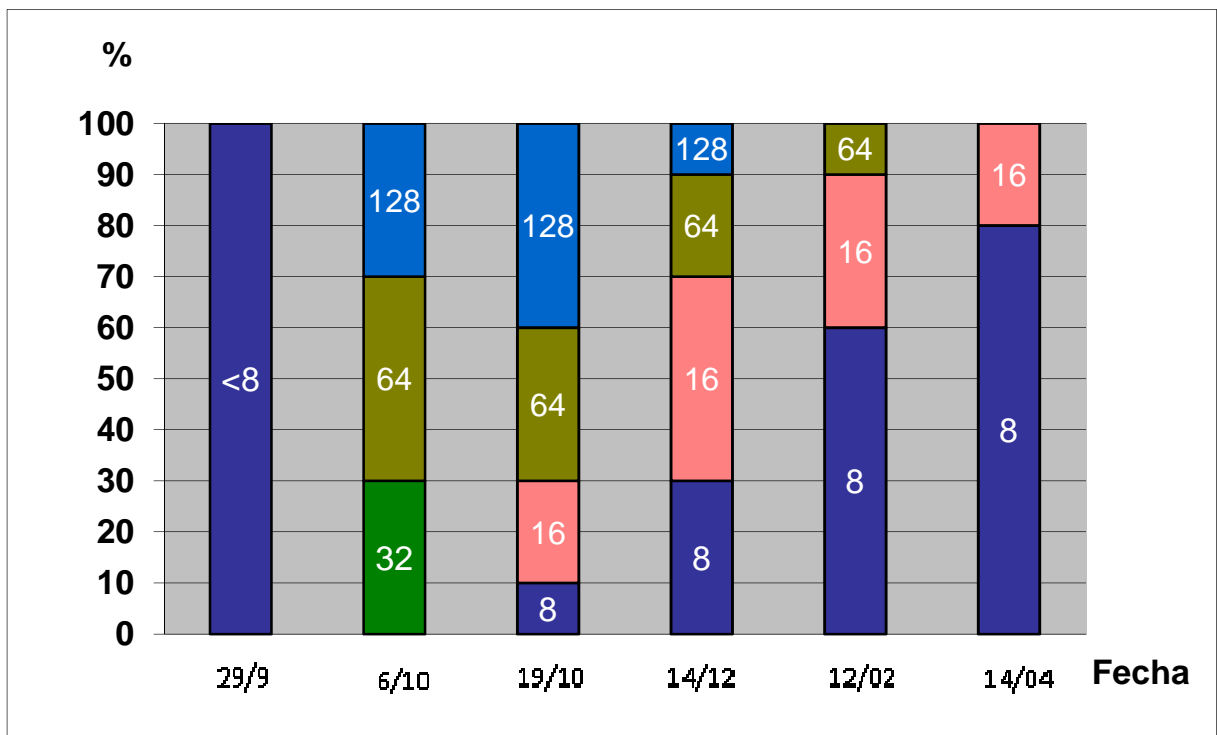




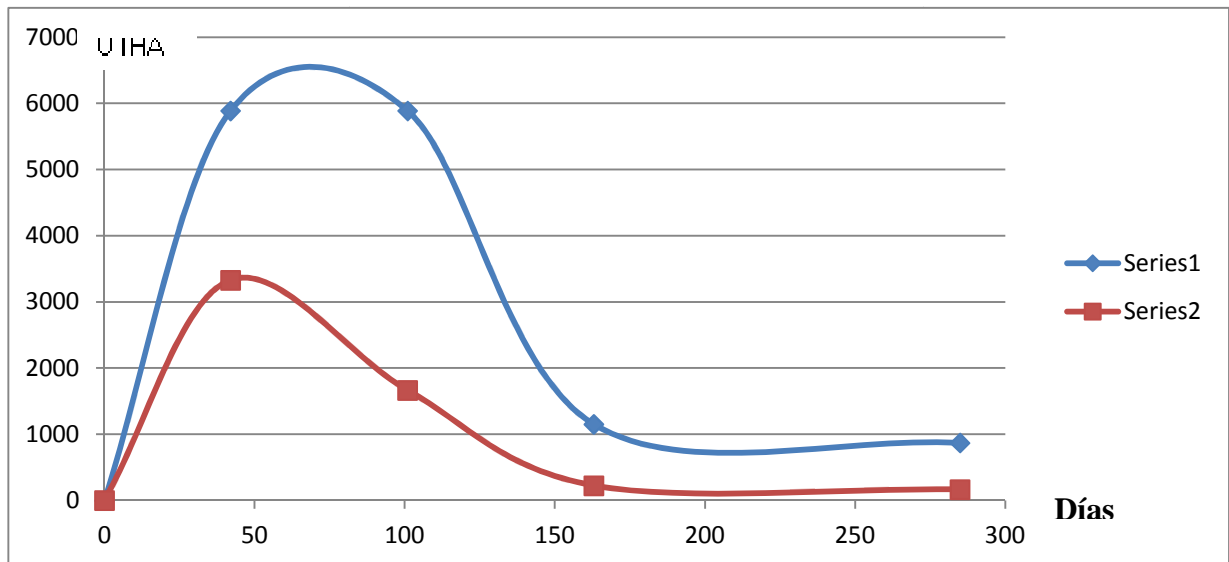
Tabla N° 1 Distribución temporal de títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación anti influenza equina, evaluados por la técnica de IHA, en sueros de cobayos (n:10) vacunados con una vacuna adyuvada con Emulsigen.

VACUNA	COBAYO N°	DIAS POST PRIMO VACUNACION			
		42	101	163	285
INFLUENZA EQUINA CON EMULSIGEN	1	8192	4096	1024	1024
	2	8192	4096	1024	1024
	3	4096	4096	1024	1024
	4	8192	8192	1024	1024
	5	1024	2048	512	512
	6	8192	8192	1024	1024
	7	2048	2048	512	512
	8	4096	4096	1024	1024
	9	8192	8192	1024	512
	10	2048	2048	1024	1024

Tabla N° 2. Distribución temporal de títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación anti influenza equina, evaluados por la técnica de IHA, en sueros de cobayos (n:10) vacunados con una vacuna adyuvada con Al(OH)₃.

VACUNA	COBAYO N°	DIAS POST PRIMO VACUNACION			
		42	101	163	285
INFLUENZA EQUINA CON Al(OH)₃	11	2048	1024	256	128
	12	2048	1024	128	128
	13	4096	2048	256	128
	14	4096	2048	256	256
	15	2048	1024	128	128
	16	2048	1024	256	256
	17	2048	1024	128	128
	18	2048	1024	128	128
	19	2048	1024	128	128
	20	4096	2048	256	256

Gráfico N° 3: Comparación de títulos promedio de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra influenza equina evaluados en sueros (días 0 a 285) de cobayos (n: 20), vacunados con dos tipos de vacuna.



Serie1: vacuna contra influenza equina adyuvada con Emulsigen (n:10).

Serie2: vacuna contra influenza equina adyuvada con Al(OH)₃ (n: 10).