

DICIPLINA: ENFERMEDADES INFECCIOSAS

DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA LA PARATUBERCULOSIS BOVINA

COLOMBATTI OLIVIERI, M. Alejandra¹; MOYANO, Damián¹; MON, M. Laura¹, TRAVERIA, Gabriel², DELGADO, Fernando³, SANTANGELO, Paz¹; ROMANO, M. Isabel¹

E-mail: colombatti.alejandra@inta.gob.ar

¹ Inst. de Biotecnología, INTA Castelar. ² Centro de Diagnóstico e Investigación Veterinaria (CEDIVE), UNLP, Chascomús. ³ Inst. de Patobiología, INTA Castelar.

INTRODUCCIÓN: La Paratuberculosis (PTB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Los rumiantes se infectan por contacto con materia fecal contaminada. Causa enteritis granulomatosa crónica. Los esfuerzos para controlar la propagación de la enfermedad en ganado doméstico han sido en gran medida ineficaces y la enfermedad ahora se reconoce en todos los países del mundo y en Argentina la seroprevalencia varía entre el 7.2 y 19.6% en la provincia de Buenos Aires.

La enfermedad produce importantes pérdidas económicas, por la reducción en la producción y la prematura eliminación de los animales enfermos. Para su control se ha aplicado, entre otras, la vacuna comercial para bovinos (Silirum®), compuestas por la cepa 316F inactivada de *Map*, que disminuyen la sintomatología clínica y la eliminación de *Map* por materia fecal, pero no evita que los animales se infecten. En el trabajo de *Uzonna et al. (2003)* y *Singh et al. (2015)* las cepas locales han demostrado mejor protección que la conferida por las vacunas comerciales.

Los miembros del Programa Integrado de la Enfermedad de Johne han llegado a la conclusión de que la mejor manera de evaluar y desarrollar las vacunas contra paratuberculosis es una estrategia de tres fases: primero se realiza la evaluación en un modelo *in-vitro* de macrófagos, se continúan con ensayos de virulencia y protección en el modelo murino, y por último se realiza la evaluación en el huésped nativo (bovino, ovino, caprino) (*Bannantine et al., 2014, Park y Yoo, 2016*).

El objetivo del trabajo es evaluar la protección conferida por cepas locales en el modelo murino, para seleccionar la candidata vacunal, con el que luego se evaluó la respuesta inmune inducida por la vacuna en bovinos y su posible interferencia con el diagnóstico oficial de tuberculosis

MATERIALES Y MÉTODOS: Para el 1^{er} ensayo de protección en el modelo murino se prepararon los inóculos de una cepa virulenta para el ratón (6611) y una poco virulenta (1543/481) eliminando los grumos bacterianos por pasaje en aguja 25G. La cepa 6611 se evaluó viva e inactivada por calor, la cual se administró con adyuvante incompleto de Freund. La cepa 6611 viva, al igual que la 1543/481 viva se administraron con PBS. Se inocularon en una concentración de 3×10^5 bact/ratón por vía subcutánea a 38 ratones hembra BALB/c de 5-6 semanas de edad (10 animales por vacuna y 8 controles inoculados con PBS) y se les dio un refuerzo a los 17 días.

Luego se realizó un 2^{do} ensayo de protección en ratones para evaluar la cepa local, con mayor protección seleccionada del 1er ensayo (6611), vs la vacuna comercial Silirum. Para ello se utilizaron 3 grupos de 15 ratones hembras BALB/c de 7 semanas de edad. Los grupos fueron: A) control no vacunado, B) 2 dosis de vacuna comercial Silirum y C) 2 dosis de cepa local inactivada con adyuvante incompleto de Freund. Las vacunas fueron aplicadas vía subcutánea (2,5mg bacteria/ratón) con una diferencia de 15 días.

En ambos ensayos se realizó el desafío al mes de la última dosis vacunal por vía intraperitoneal con 1×10^8 bact/ratón de una cepa virulenta (1347/498). Se sacrificaron 5-4 animales/grupo a los 34 días post-vacunación (pre-desafío) y 11 semanas post-desafío (spd) en el 1^{er} ensayo y a las 6 y 12 spd para el 2^{do} ensayo. Se procedió a la extracción del bazo, para recuento de UFC en placas de Middlebrook 7H10 suplementado, y del hígado para evaluación histopatológica.

Por último se realizó un 3^{er} ensayo, de 10 meses de duración, en bovinos donde se vacunaron 5 terneros por grupo (mestizos de Aberdeen Angus) entre los 1-2 meses de edad: 1- Vacunados con la vacuna comercial Silirum®, 2- Vacunados con la cepa local virulenta 6611 inactivada administrada con adyuvante Montanide ISA 50 V2 (Seppic S.A.) y 3- Grupo control:

solo con el adyuvante. Se tomaron muestras de suero a los 15 días post-vacunación (dpv) y mensualmente para la medición de IgG por ELISA. A los 1, 3, 5, 7 y 9 meses post-vacunación (mpv) se realizó extracción de sangre entera para medir IFNg con el kit BOVIGAM. Además se hizo intradermorreacción cervical doble comparativa con PPDa y PPDb a los 1, 3, 5, 7 y 10 mpv e intradermorreacción ano-caudal simple con PPDb a los 5, 7 y 10 mpv.

RESULTADOS: En el 1^{er} ensayo en ratones, el recuento de UFC en bazo en el tiempo pre-desafío se observaron entre 100-200 colonias en los animales vacunados con la cepa 6611 viva pero no se observaron en los inoculados con la cepa 1543/481 viva. Al tiempo 11 spv, en los vacunados con la cepa 6611 inactivada se produjo una reducción significativa del recuento de UFC de $84 \pm 13\%$ con respecto a los animales sin vacunar, en cambio la cepa 1543/481 solo redujo un $2,5 \pm 4\%$. Con respecto a la histopatología de hígado solo la vacunación con la cepa 6611 inactivada logro disminuir el grado de lesión de manera significativa. Esta cepa inactivada se selecciona como la cepa local para utilizar en los próximos ensayos.

Si analizamos los resultados de UFC del 2^{do} ensayo, comparado al grupo sin vacunar, se observó a las 6 spd una reducción en el recuento de UFC de $51 \pm 19,6\%$ para el grupo Silirum y $63 \pm 15\%$ en el grupo vacunado con la cepa 6611. A las 12 spd la reducción del recuento de UFC fue del $40 \pm 16\%$ grupo Silirum y $38 \pm 17\%$ grupo 6611. En el estudio histopatológico solo la vacuna con 6611 logró reducir de manera significativa el grado de lesión en ambos tiempos.

En el ensayo de vacunación en terneros (3^{er} ensayo) se detectó, a partir de los 3 mpv, producción significativa de IgG en los animales vacunados y se observó que los vacunados con la cepa local tienen valores ligeramente superiores al grupo Silirum y que persisten hasta el último tiempo evaluado (10 mpv). La producción de IFNg frente al estímulo de PPDa se observó en el grupo 6611 a 1 mpv (con mayores valores que el grupo vacunado Silirum), 5 mpv, 7 mpv y 9 mpv siendo significativamente mayor que el grupo sin vacunar. La intradermorreacción doble comparativa dio positiva a PPDa en los animales vacunados para todos los tiempos evaluados mientras que la simple ano-caudal con PPDb fue negativa para todos los animales.

DISCUSIÓN: En el 1^{er} ensayo en ratones se seleccionó a la cepa 6611 inactivada como candidata vacunal por producir una reducción significativa del recuento de UFC y del grado de lesiones, y además al estar inactivada es fácil de conservar y no significa un riesgo biológico. Esta candidata fue comparada con la vacuna comercial Silirum en el 2^{do} ensayo y solo la vacuna local logro una reducción significativa del grado de lesión, en hígado, en ambos tiempos post-desafío superando de esta manera a los resultados de protección obtenidos con la vacuna comercial. Además observamos en el ensayo en bovinos (3^{er} ensayo) que la respuesta inmune inducida por las vacunas fue humoral y celular (producción significativa de anticuerpos e IFNg), pero los valores fueron mayores con la cepa local. Ningún animal reacciono de manera positiva a la PPDb en la intradermoreacción por lo que hay baja probabilidad de que la vacuna interfiera con el plan de erradicación de tuberculosis bovina.

CONCLUSIONES: consideramos que la vacuna con la cepa local 6611 inactivada es una buena candidata vacunal ya que protegió a los animales infectados (modelo murino) y en los bovinos tuvo una mayor respuesta inmune que la vacuna comercial sin interferir con el diagnostico de tuberculosis bovina. Faltaría evaluar la eficiencia de la misma en rodeos con paratuberculosis bovina.

BIBLIOGRAFÍA:

UZONNA et al. Efficacy of commercial and field-strain *Mycobacterium paratuberculosis* vaccinations with recombinant IL-12 in a bovine experimental infection model. Vaccine, 2005. 21(23), Págs. 3101-9.

SINGH et al., 2015. Evaluation of goat based «indigenous vaccine» against bovine Johne's disease in endemically infected native cattle herds. Indian journal of experimental biology 2015. 53(1), Págs.16-24.

BANNANTINE et al. A rational framework for evaluating the next generation of vaccines against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Front Cell Infect Microbiol 2014. 4, Pág. 126.

PARK & YOO, 2016. Development of vaccines to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Clinical and Experimental Vaccine Research 2016. 5(2), Pág.108.