

XLI CONGRESO NACIONAL · XVII CONGRESO INTERNACIONAL

SEOC 2016



14, 15 y 16 de septiembre TALAVERA DE LA REINA (TOLEDO)



EFFECTOS DE LA VACUNACIÓN FRENTE A PARATUBERCULOSIS ANTES O DESPUÉS DE LA INFECCIÓN. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN LA ESPECIE CAPRINA.

ROYO, M.¹, SECO, J.¹, FUERTES, M.¹, FERNÁNDEZ, M.¹, SEVILLA, I.A.², ARRAZURIA, R.², SERRANO, M.², CASTAÑO, P.¹, FERRERAS, M.C.¹, BENAVIDES, J.¹, ELGUEZABAL, N.², PÉREZ, V.¹

¹Dpt de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña. Facultad de Veterinaria. (CSIC-Universidad de León). 24007 León.

²NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. 48160 Derio (Bizkaia).

RESUMEN

La vacunación es el procedimiento más eficaz para el control de la paratuberculosis. El objetivo de este estudio es valorar la eficacia de la vacunación tras su administración antes y después de la infección, en un modelo experimental en cabras. Se empleó un total de 35 cabritos de 1-2 meses de edad, ocho de los cuales fueron vacunados y posteriormente infectados con la cepa K-10 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Parte de los animales se sacrificaron a los 150 días post-infección (dpi) para comprobar el establecimiento de la infección, y posteriormente 5 cabritos previamente infectados se vacunaron a los 180 dpi. A los 360 dpi se sacrificaron todos los animales, en los que se realizaron estudios histopatológicos, de valoración de la respuesta inmune periférica y aislamiento de Map de heces y tejidos. La vacuna indujo la producción de niveles elevados de IFN- γ , pero menores en los animales vacunados tras la infección (IV). Se observó una reducción en el número y gravedad de las lesiones en el grupo de cabras vacunadas antes de la infección (VI), que fue progresiva a lo largo del estudio. Sin embargo, los animales vacunados tras la infección (IV) mostraron una variabilidad individual marcada, apareciendo cabras sin lesiones, con formas focales e incluso una con lesión difusa, siendo en conjunto la intensidad lesional superior a la del grupo infectado. Solo se aisló Map de dos animales, uno del grupo IV y otro infectado. La vacunación frente a paratuberculosis tendría un efecto claramente protector en cabras si se aplica previamente a la infección, mientras que si se hace después, su efecto terapéutico no tendría lugar en todos los animales, existiendo diferencias individuales en la respuesta.

Palabras clave: Paratuberculosis. Vacunación. Lesiones. Respuesta inmune. Efecto terapéutico.

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa, producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) que afecta a los

rumiantes, tanto domésticos como salvajes, en los que ocasiona una pérdida progresiva de condición corporal, en ocasiones acompañada de diarrea, asociadas a una enteritis y linfadenitis granulomatosas. Es una enfermedad de distribución mundial que provoca cuantiosas pérdidas económicas. En España, se encuentra ampliamente difundida en las especies ovina, caprina y bovina.

El procedimiento más eficaz para el control de esta enfermedad es la vacunación. Actualmente, existe una vacuna inactivada que ha demostrado su eficacia y que si bien no protege de la infección, reduce el número de casos clínicos y la excreción fecal de Map (Juste y Pérez, 2011). La vacuna se administra habitualmente en los primeros meses de vida del animal, para que esté protegido frente a posteriores contactos con Map. Existen estudios previos, realizados en campo, tanto en la especie caprina (Corpa et al., 2000) como ovina (Crowther et al., 1976; Pérez et al., 1995) donde se ha llevado a cabo la vacunación, en rebaños con paratuberculosis, de animales adultos, presumiblemente ya infectados y en los que se ha demostrado también una reducción en la aparición de nuevos casos clínicos, sugiriendo que la vacunación pudiera tener un efecto terapéutico.

El objetivo de este trabajo es estudiar la eficacia de la vacunación en un modelo experimental en cabras, analizando sus efectos cuando se administra antes o después de la infección con Map, empleando para ello la evaluación de la respuesta inmunitaria periférica (celular y humoral) y la valoración histopatológica de las lesiones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 35 cabritos de 1-2 meses de edad, de raza Murciano-Granadina, que fueron divididos en varios grupos: VI, formado por 8 cabritos que se vacunaron un mes antes de la infección; I, 14 animales que únicamente se infectaron; dos grupos control (V y C) de la vacunación y de la infección respectivamente. La infección se llevó a cabo por vía oral, de forma que cada animal recibió una dosis total de $1,2 \times 10^{10}$ ufc de la cepa de referencia K-10 de Map. A los 150 días post-infección (dpi), se sacrificaron 5 cabritos del grupo I, 3 del VI y 4 controles (2 de cada grupo), con el objetivo de comprobar la instauración de la infección y el efecto de la vacunación en las fases tempranas de la infección. Posteriormente, se llevó a cabo la vacunación (180 dpi) de 5 animales infectados (grupo VI) y dos controles, manteniéndose cabritos en el resto de los grupos hasta el final del experimento (360 dpi), donde se procedió al sacrificio de los individuos restantes. Se empleó la vacuna inactivada Silirum®, administrándose una única dosis de 1ml por vía subcutánea.

La respuesta inmune periférica se valoró en muestras de sangre completa y suero que fueron tomadas mensualmente, desde los 0 hasta los 360 dpi. La respuesta inmunitaria celular se evaluó mediante la técnica de liberación del IFN- γ , en la cual las muestras de sangre heparinizada se incubaron con PPD aviar y bovina (CZ Veterinaria). Tras la estimulación durante 22 horas, la producción de esta citoquina se valoró mediante el kit comercial Bovigam® (Prionics). La respuesta inmune humoral se estudió empleando un ELISA

indirecto de elaboración propia, utilizando el antígeno protoplasmático PPA-3 de *Map* (Allied Monitor).

Tras realizar la necropsia completa y sistemática de todos los animales, se tomaron muestras de diferentes tramos de intestino (válvula ileocecal, íleon y yeyuno, con o sin placa, de tres regiones: distal, media y proximal), así como nódulos linfáticos regionales. Tras su procesado histológico convencional, se valoraron las lesiones y se realizó un recuento de los granulomas presentes en cada una de las localizaciones examinadas. Además, en muestras de heces a los 30, 80 y 360 dpi, así como de tejidos (válvula ileocecal, yeyuno y nódulos linfáticos) se realizó el aislamiento bacteriológico de *Map*, mediante su siembra en medio de Middlebrook 7H9 y de Herrold. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba estadísticas de t de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 60 días post-vacunación (dpv), en todos los grupos vacunados se pudo detectar una respuesta inmune periférica de tipo celular, medida por la producción de IFN- γ , superior al resto de grupos. Dicha producción fue más elevada en los cabritos del grupo VI que en el grupo IV (Fig 1). En todos los muestreos y animales vacunados, la producción de IFN- γ fue siempre superior tras la estimulación de la sangre con PPD aviar que con PPD bovina. A los 90 dpv, también fue detectable una respuesta serológica en los animales vacunados, sin que en este caso se observaran diferencias según el momento de la vacunación (Fig 2).

Tras el estudio histológico, las lesiones intestinales se clasificaron en cuatro categorías, de acuerdo a su localización e intensidad: lesiones *focales*, constituidas por granulomas localizados exclusivamente en el tejido linfoide intestinal; *multifocales A*, además de presentar lesiones granulomatosas en el tejido linfoide, éstas se extendían hacia la lámina propia asociada; *multifocales B*, se observaban granulomas, de pequeño tamaño, en zonas de intestino sin tejido linfoide, además de mostrar lesión en esta última localización; *difusas*, caracterizadas por una enteritis granulomatosa que afectaba a zonas amplias del intestino, provocando el engrosamiento de las vellosidades intestinales. Estas últimas formas se suelen asociar a signos clínicos, mientras que las anteriores serían formas subclínicas.

Fig. 1.- Evolución de la producción de IFN- γ a lo largo del estudio, en los distintos grupos experimentales.

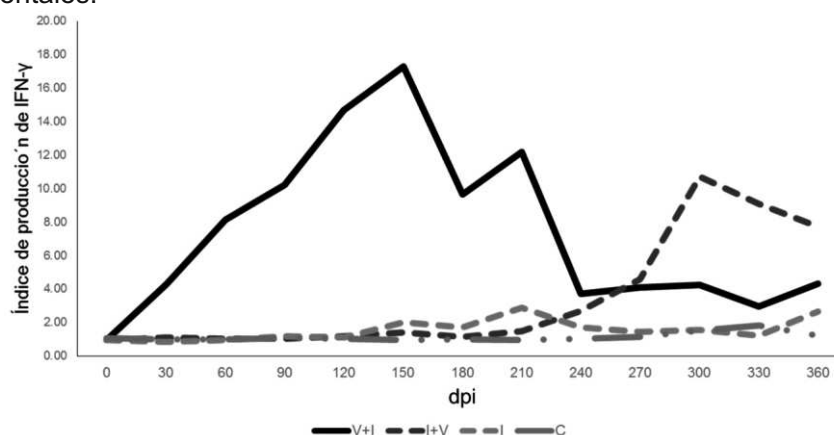
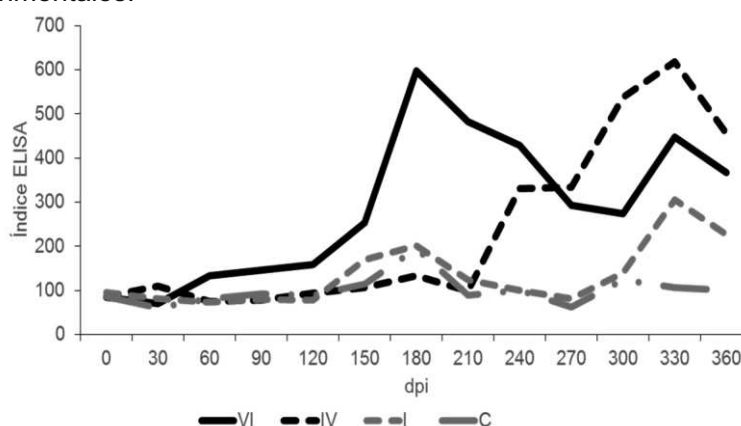


Fig.2.- Evolución de la producción de anticuerpos a lo largo del estudio, en los distintos grupos experimentales.



En la tabla 1 se muestra la distribución de los animales según el tipo de lesión que presentaban. Todos los animales infectados y sin vacunar mostraron lesiones, que fueron más graves en los sacrificados a los 360 dpi. En los animales del grupo VI la gravedad de las lesiones se redujo significativamente, mientras que en el grupo IV, hubo una marcada variabilidad individual, al aparecer cabritos con lesiones graves (difusas), junto con un animal sin lesión. Además, los granulomas en el grupo de cabritos infectados estaban poco delimitados y tenían un carácter infiltrante, mientras que en los animales del grupo VI, eran pequeños, bien delimitados y con y una mayor cantidad de tejido conjuntivo, sugiriendo su carácter regresivo.

Tipo de lesión / Grupo	1º sacrificio (150 dpi)		2º sacrificio (360 dpi)		
	I	VI	I	VI	IV
Sin lesión	0	1/1	0	2/2	1/5
Focal	1/4	1/1	0	2/2	1/5
Multifocal A	2/4	1/1	1/3	0	0
Multifocal B	1/4	0	2/3	0	2/5
Difusa	0	0	0	0	1/5

Tabla 1: Distribución de los animales examinados en cada sacrificio, según el grupo y tipo de lesión. Numerador= nº de animales con el tipo de lesión indicado; denominador= nº animales examinados en el grupo.

En las figuras 3 y 4 se muestran los resultados del recuento de granulomas, observándose que en los cabritos del grupo VI, hay una reducción de su número a lo largo del experimento. Sin embargo, en el segundo sacrificio, los cabritos del grupo IV muestran un mayor número de lesiones.

Fig. 3.- Número medio de granulomas por animal en los grupos I y VI, en el primer sacrificio (150 dpi).

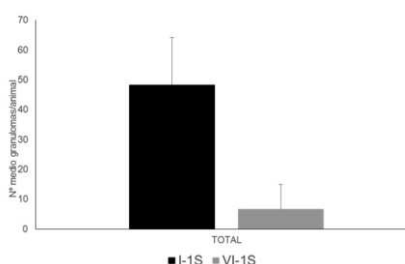
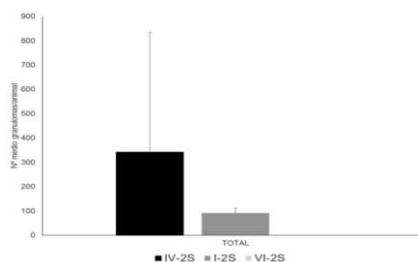


Fig. 4.- Número medio de granulomas por animal en los grupos de cabritos sacrificados a los 360 dpi.



Únicamente se pudo aislar Map en dos animales, uno del grupo IV y otro únicamente infectado, ambos sacrificados a los 360 dpi.

CONCLUSIONES

La vacunación de cabras frente a paratuberculosis sí tiene un efecto claramente protector cuando se administra antes de la infección, ya que se observa una reducción en la intensidad de las lesiones, que además muestran un carácter regresivo. Sin embargo, no se ha podido demostrar un efecto terapéutico claro de la vacunación tras la infección, ya que en ese grupo han coexistido animales con lesiones graves y numerosas micobacterias, con otros sin lesiones o con lesiones leves, sugiriendo una gran variabilidad individual en la respuesta a la vacuna.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2012-39818-C02-01, del MINECO.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORPA JM, PÉREZ V, SÁNCHEZ MA, *et al.*. 2000. Control of paratuberculosis (Johne's disease) by vaccination of adult animals. *Vet Rec* 146/7:195-196.

CROWTHER RW, POLYDOROU K, NITTI S, *et al.*, 1976. Johne's disease in sheep Cyprus. *Vet Rec* 98:463.

JUSTE RA, PÉREZ V. 2011. Control of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food An Pract* 27:127-138.

PÉREZ V, GARCÍA MARIN JF, BRU R, *et al.*, 1995. Resultados obtenidos en la vacunación de ovinos adultos frente a paratuberculosis. *Med Vet* 12:196-201.

EFFECTS OF VACCINATION AGAINST PARATUBERCULOSIS BEFORE AND AFTER INFECTION. AN EXPERIMENTAL STUDY IN GOATS.

SUMMARY

Vaccination is the most efficient paratuberculosis control method. This study is aimed to assess the efficacy of vaccination before and after infection, in a goat experimental model. A total of 35 1-2 month-old goat kids were employed. Eight of them were vaccinated 1 month before infection with the K-10 strain of *M. avium paratuberculosis* (Map). Some goat kids were euthanized at 150 days post-infection (dpi) for checking the infection establishment. Then, 5 goat kids, previously infected, were vaccinated at 180 dpi. At 360 dpi all the animals were killed and histopathological studies, peripheral immune response evaluation and Map isolation from faeces and tissues were carried out. Vaccination lead to the production of high levels of IFN- γ that were lower in animals vaccinated after infection (IV). A decrease in the number and severity of the lesions was observed in kids vaccinated before infection (VI). However, a great individual variation was seen in goats from IV group, with some animals showed focal or no lesions while others have diffuse and severe forms. Map isolation was only achieved from two animals, from groups IV and only infected, at 360 dpi. Vaccination against paratuberculosis prior to infection would have a clear protective effect, while its therapeutic effect, when immunization is performed after infection, would not occur in all the animals that show a great individual variation in their response.

Keywords: Paratuberculosis. Vaccination. Pathology. Immune response. Therapeutic effect.