

PERSPECTIVA DEL DESARROLLO DE VACUNAS EFECTIVAS
CONTRA LAS INFECCIONES POR PASTEURELLA

C. J. Cameron¹

RESUMEN

El obstáculo principal para la formulación de una vacuna efectiva contra *P. multocida* es la existencia de una gran variedad de cepas inmunológicas diferentes. Complicando este hecho está el de que no existe correlación entre la clasificación serológica y la relación inmunológica de las cepas. Más aún parece que ninguno de los antígenos prontamente detectables son responsables para la inducción de inmunidad. Los problemas no pueden ser solucionados por el uso de extractos antigénicos como vacunas o por la formulación de productos polivalentes. Sin embargo existe la posibilidad de que la *P. multocida* posea un inmunógeno común. Investigaciones ulteriores deberían ser dirigidas al hallazgo de cepas o mutantes que contengan este antígeno y a la definición de las condiciones que promuevan la separación del mismo *in vitro*, las limitaciones de los modelos experimentales corrientes deberían ser apreciados.

INTRODUCCION

Se me ha dicho que la pasturelosis se da muy esporádicamente en el Uruguay. En sus variadas formas es, sin embargo, una enfermedad universal por lo que yo creo que es más que apropiado tener algún conocimiento sobre la misma debido a su significación actual. Mi exposición se centrará primariamente en los problemas para la formulación de una vacuna efectiva que sirva como modelo para ilustrar los problemas de investigación que los microbiólogos veterinarios afrontan. Creo que a pesar de que esta exposición no es de naturaleza clínica ustedes la encontrarán interesante y para algunos hasta estimulante.

¹Veterinary Research Institute
Onderstepoort - Sudáfrica

Para seguir los argumentos y problemas a ser presentados, es antes que nada necesario, comprender la patogenicidad y clasificación de los microorganismos de marra.

Como se muestra en la tabla 1 tanto la *P. multosida* y *P. haemolytica* pueden estar involucradas a menudo simultáneamente.

P. haemolytica es un patógeno en si y amerita una revisión independiente. Me remitiré a *P. multosida*.

Puede ser clasificada en cuatro grandes serotipos sobre la base de sus antígenos capsulares por medio de la prueba de hemo-aglutinación. Los tipos B y E son primariamente patógenos y causan septicemia hemorrágica en Asia y Africa del Este respectivamente. Se pueden producir buenas vacunas contra ellas necesitándose el cultivo de cepas apropiadas. Los tipos A y D son más comunes y cierto número de subtipos basados en sus antígenos somáticos han sido identificados. Pueden ser primariamente patógenos, pero particularmente en los bovinos, están generalmente asociados con una gama de virus que incluyen IBR y PI3.

Para estudiar cuantitativamente las relaciones inmunológicas, se ha desarrollado un modelo en ratón. La base de este modelo es inmunizar un grupo de 36 ratones y subsecuentemente administrar una suspensión de desafío de estas bacterias en los inmunizados y a los no inmunizados del grupo de control. La DL50 para ambos grupos se calcula y la diferencia se toma como índice de protección. En el ejemplo mostrado en la tabla 2 el índice de protección es por lo tanto 6,34. El mismo sistema se usa para los test de protección activa y pasiva. Debe ser notado sin embargo, que no siempre hay una correlación directa entre los dos procedimientos

Uno de los primeros problemas encontrados cuando varias cepas fueron examinadas fue que aunque la inmunidad homóloga era generalmente (pero no siempre -ver T88 - (A;5) buena, podía ser demostrada muy pequeña - si es que había alguna - protección cruzada entre cepas que tenían el mismo antígeno somático (ejemplo antígeno 3) - tampoco protegían en formas cruzada (tabla 4). Más aún las cepas que tienen antígenos extraíbles por fenol o que pertenecen al mismo tipo de Rhoades (basado en los antígenos extraíbles por calor) tampoco tenían protección cruzada (tabla 5).

Los resultados mostrados en la tabla 6 ilustran que la protección lograda por un antisuero particular no está correlacionada con el título de aglutinación ni por el de hemoaglutinación. Como fue ilustrado el suero de la prueba tenía un título de hemoaglutinación de 1:16 solamente pero lograba una protección de 5,0 logs - mientras que tenía un título de hemoaglutinación heteróloga de 1:256 para la cepa SI pero solamente daba 0,5 logs de protección. De igual forma aunque tenía un título de aglutinación heteróloga de 1:4096 para la cepa 125, dió solamente 0,9 logs de protección para esta cepa.

Los hallazgos arriba indicados dicen que los antígenos que son usados en varios - test serológicos no son los antígenos involucrados en la inducción de inmunidad protectora.

De aquí, la relación inmunológica entre las cepas del tipo A de *P. multosida* no pueden ser predichas sobre la base de sus relaciones serológicas.

Por el contrario, fue hallado que a veces cepas completamente no relacionadas - (ej. A14g y DI) lograban un grado apreciable de inmunidad cruzada (tabla 7) este hallazgo sugiere que la *P. multosida* puede tener un antígeno común inmunizante que no es detectado por los test serológicos convencionales y que no siempre se expresan. Siguiendo estos hallazgos se intentó extraer selectivamente el antígeno "inmunizante". El material inmunológicamente activo podía, entre otros, ser extraído con un buffer de veranol pero sobre una base cuantitativa no es más inmunogénico que las células enteras (tabla 8).

Una de las posibles soluciones de alternativa a la falta de inmunidad universal entre las cepas de tipo A de *P. multosida* sería componer una vacuna polivalente. Sin embargo se encontró que si se usan más de 4 cepas la vacuna resultante es esencialmente inútil (tabla 9).

Una vacuna que contenga 4 cepas solamente logrará una buena inmunidad homóloga pero como se muestra en la tabla 10 virtualmente no logra protección hacia un número de cepas tipo y a una amplia selección de aislamientos de campo.

Un paso posterior fue conducir un extenso relevamiento de los inmunotipos que se dan en Sudafrica. Para este propósito fueron preparados sueros hiperinmunes en ovejas y su habilidad para proteger contra una selección de cepas de campo. A partir de los resultados dados en la tabla 11 se pueden ver que a excepción del suero A:1 todos daban una buena inmunidad homóloga. Ninguno de los antisueros tipo A, fueron sin embargo capaces de proteger contra cualquiera de las cepas heterólogas tipo A. Las cepas del tipo D, por otro lado no protegen contra cepas heterólogas.

El antisuero tipo D4 también protegía contra dos de las tres cepas tipo A y puede ser un buen candidato a partir del cual se pueda aislar el antígeno universal que fue propuesto previamente.

A pesar de los obstáculos principales que han sido subrayados más arriba hay otros caminos de investigación que pueden seguirse todavía (tabla 12). En un trabajo reciente de Kucera (1981), apoya la idea de que la *P. multocida* posee un inmunógeno común. La selección de mutantes o cepas de campo a este respecto pueden ser por lo tanto de valor.

La separación de este antígeno probablemente requiera muy exactas características culturales. Rimley-Rhoades (1981), encontraron que solamente las bacterias que crecen in vivo desarrollan protección cruzada y que los requerimientos culturales de la *P. multocida* para producir su citotoxina apoyan este hallazgo.

La posibilidad de usar bacterias vivas como una vacuna para los mamíferos no debería ser descartada. Este método ha sido satisfactoriamente usado en gallinas y pavos.

Los modelos actuales usados para la investigación sobre *P. multocida* son también inadecuados (tabla 13). Como fue señalado antes (tabla 7) los rumiantes no responden a la inmunización con *P. multocida* de la misma forma en que lo hacen los ratones. Un test de protección pasiva en el ratón (como el usado en las últimas experiencias) es preferible. Sin embargo tal modelo septicémico no es necesariamente un criterio resaltable para la inmunidad pulmonar donde otras clases de anticuerpos (Ej. IgA) pueden ser importantes. Tampoco toma en cuenta el posible rol de la inmunidad celular. Finalmente el complicado rol de otros patógenos tales como IBR, PI3, Chlamydia y Mycoplasma no debería ser dejado de lado.

SUMMARY

The mayor obstacle in the formulation of an effective vaccine against *P. multocida* type A is the existence of a great variety of immunological correlations. To complicate the issues, no correlation exists between the serological classification and the immunological relationship of strains. Furthermore, it appears that none of the readily detectable antigens are responsible for the induction of immunity. The problems could not be overcome by using antigen extracts as vaccines or by the formulation of polyvalent products.

The possibility does, however, exist that *P. multocida* possesses common immunigen further research should be directed towards finding strains or mutants that contain this antigen and to define in vitro conditions that promote its expression.

The limitations of the current experimental models should be appreciated.

* * *

ASSOCIATION AND PATHOGENICITY OF PASTURELLA SPECIES

P. CALICUVA
(VARIETAL FORMS SUB-TYPES)

PNEUMONIA IN CATTLE,
PIGS AND RABBITS.
CHILERA.

P. D

HAEMORRHAGIC SEPTICAEMIA ASIA

P. SUB-SPONTIC SUB-TYPES

PRESENT

P. TOLLANA

HAEMORRHAGIC SEPTICAEMIA AFRICA

P. SYMBIOTICA

PNEUMONIA IN CATTLE AND SHEEP
AFRICA AND SYNDROME.

15. OTHER TYPES

AVIRULENCE

DILUTION	CHALLENGE STRAIN	IMMUNIZED RICE		NON-IMMUNIZED CONTROL RICE	
		DEATHS	COG.	DEATHS	COG.
2		0	0	0	0
10^{-2}		6	11	6	0
10^{-3}		3	7	13	0
10^{-4}			4		
10^{-5}		10			0
10^{-6}		9	3	28	2
10^{-7}		2	2	17	2
10^{-8}			0		
10^{-9}		0	10	0	17
TOTAL		29	34	69	33

PROTECTION

CAMERON ET AL. 1978

TABLE 4 LACK OF ACTIVE CROSS-IMMUNITY IN MICE AMONG P. MULTICIDA TYPE A13 STRAINS

STRAIN	T	LOGS PROTECTION	
		CHALLENGE STRAIN	
14 (A13)	1	A14 (A13)	7477 (A13)
		9009 (A13)	SI (A13)
14009 (A13)	1	4.0	0.6
		2.6	1.3
SI (A13)	1	1.5	0.0
		2.1	0.9
7477		0.0	0.0
			5
			2.3
			0.5
			6.0

TABLE 5 FAILURE OF P. MULLIGANA A.14 (TYPE A:3) ANTISERUM (SHEEP 8121) TO PROTECT AGAINST STRAINS WITH IDENTICAL PHENOL EXTRACTABLE ANTIGENS OR WHICH ARE SEROLOGICALLY IDENTICAL, ACCORDING TO RHOADES (PERSONAL COMMUNICATION, 1979)

LOS PROTECTION AFFORDED BY A.14 (A:3) ANTISERUM	CHALLENGE STRAINS	
	CHALLENGE STRAIN	RELATIONSHIP AMONG ANTIGENS
9	(A:3)	(A:3)
9	5	LIVER P-1059
0.9	(A:8)	(A:8)
0.1	(A:9)	(A:9)
0.0	(A:5)	(A:5)

ANTIGENIC IDENTICAL PHENOL RELATIONSHIP AMONG ANTIGENS STRAINS

ALL RHOADES TYPE

CAMERON, ET. AL. 1980

SPECTRUM OF PROTECTION AFFORDED BY P. MULTICIDA P-1059 (TYPE A18) SHEEP
 ANTISERUM AGAINST HETEROLOGOUS P. MULTICIDA TYPE A STRAINS

CHALLENGE STRAIN

CHALLENGE STRAIN	NO. OF SHEEP	NO. OF SHEEP	NO. OF SHEEP	NO. OF SHEEP	NO. OF SHEEP
	CHALLENGED	PROTECTED	PROTECTED	PROTECTED	PROTECTED
P-1059 (A18)	16	14	100%	74/77	100%
4096	10	4	40%	64	64%

PROTECTIVE INDEX 100

CAMERON, E. AL., 1950

TABLE 7. *U.V.* PROTECTION AFFORDED BY *P. MULLIGIDA* BACTERINS TO HOMIOLOGOUS AND HETEROLOGOUS CHALLENGE IN MICE.

CHALLENGE STRAIN	A146	B921	VACCINE STRAIN	PI
A146	4/6	1/2		2/0
B921	N.D.	N.D.		N.D.
D1	2/1	1/1		3/5

CAMERON, ET. AL., 1972

TABLE 7. COMPARISON OF THE IMMUNOGENICITY OF P. MBLICIDA STRAIN AL-4133 WHOLE CELLS AND EXTRACTS IN MICE

ANTIGEN	ADJUVANT	ANTIGEN CONCENTRATION	LOSS PROTECTION
WET CELLS	ALUM-PRECIPIITATED	PACKED CELLS	4.0
WET CELLS	EMULSION	1% PACKED CELLS	3.7
DRY CELLS	ALUM-PRECIPIITATED	2.5 mg/ml	3.4
DRY CELLS	OIL EMULSION	2.5 "	3.0
WON EXTRACT	ALUM-PRECIPIITATED	2.5 mg/ml	0.5
WON	OIL EMULSION	2.5 "	0.6
VERONAL	ALUM-PRECIPIITATED	2.5 "	4.0
VERONAL EXTRACT	EMULSION	2.5 mg/ml	3.6
MEDIUM ONLY	ALUM-PRECIPIITATED		0.8
MEDIUM ONLY	OIL		0.3

CAMEROON BEESTEL 1983

TABLE 1. INTENSITY IN SHEEP INDUCED BY VARIOUS VACCINES AS DETERMINED BY PASSIVE HOUSE PROTECTION TESTS

VACCINE	CONCENTRATION	LOGS PROTECTION	LOGS PROTECTION
STRAIN	PER STRAIN	AS	PI01
	VACCINE	(3)	(5:3)
	MULTIPLE		(1:5)
ALUM-PRECIPIITATED	0.15-20		0.7
ALUM-PRECIPIITATED	0.1-100		0.5
ALUM-PRECIPIITATED	0.2		0.6
ALUM-PRECIPIITATED	0.2		0.8
0.01	0.1-20		1.0
0.01	0.05-20		1.0

UNIVERSITY OF MARYLAND, 1983

STRUCTURE OF IMMUNITY INDUCED BY VACCINE COMPOSED OF 4 STRAINS OF PASTEURILLS

VACCINE COMPOSITION		CHALLENGE STRAIN					
AVG (A)	PH (B)	ISS (A15)	ALL (A17)	DISS (A18)	"LIVER" (A19)	WZ (A14)	WZ (B,6)
LOSS PROTECTION							
D. MULLERII AL4(A-2)							
		2.0	0.3	0.0	0.6		
E. COLIFORM VII							
HEBERNILLA 12011							
HABDO. YILICA 12212							
CHALLENGE STRAIN							
S)	75754	4019	1676	74	1785	8067	8473 NM
(A)	(NT)	(NT)	(NT)	(NT)	(NT)	(A)	(A) (A)
P		0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0 0.0

CAMERON & BOSTER, 1983

TABLE 14 PROTECTIVE PROPERTIES OF P. MULLICIDA HYPERIMMUNE SHEEP ANTISERA AGAINST HETEROLOGOUS FIELD STRAINS

TYPE STRAIN ANTIGEN	HYOLOGOUS PROTECTIVE INDEX	HETEROLOGOUS PROTECTIVE INDEX		
		4009 (A)	158	1122
A:5	0.	0.4	0.7	3
A:5	1.5	0.0		
A:7	1.2	3.5	0.6	0.0
A:7	1.5	3.1	0.4	0.0
A:8	1.2	0.0	0.6	0.3
A:9	2.8	1.1	0.0	0.0
B:2	5.0	0.0	0.0	NT
B:6	4.0	0.0	3.0	NT
B:2	4.0	2.6	0.0	
D:4	1.7	3.1	0.0	1.9
	1.6	5.2	0.4	0.0
D:12	3.5	0.0	0.0	NT

CAMERON & BESTER, 1925

TABLE 12 FURTHER AREAS OF RESEARCH IN PASTEURIELLA IMMUNITY

IDENTIFICATION OF NATURAL STRAINS OR MUTANTS POSSESSING COMMON IMMUNOGEN (MILLER, 1981)

2. DEFINITION OF CONDITIONS REQUIRED FOR EXPRESSION OF COMMON IMMUNOGEN.

IN VITRO SITUATIONS (TURKEYS) RIMLER & RUCKLES, 1981

IN VIVO HEMOLYTIC CYTOTOXIN

3. LIVE VACCINES TRY

TABLE 13 LIMITATIONS AND SHORTCOMINGS OF CURRENT RESEARCH

1) INADEQUATE RESEARCH MODELS

 A) ROLE OF CELLULAR IMMUNITY NOT ASSAYED

 B) NICE AND RUMINANTS RESPOND DIFFERENTLY

 C) SEPTICAEMIC MODEL NOT ADEQUATE TO ASSAY PNEUMONIC IMMUNITY

2. OTHER PATHOGENS E.G. ISR, PI III ETC. NOT TO BE OVERLOOKED.