EVALUACION DE UNA VACUNA BASACDA EN ANTIGENOS OCULTOS DE HAEMONCHUS CONTORTUS EN URUGUAY

Castells D.[1], Smith D.[2], Newlands G[2], Solari M.A.[3], Gayo V.[3] y Nari A.[4]

[1]Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), castells@adinet.com.uy. [2]Moredun Research Institute Edinburg Scotland U.K. [3]Departamento de Parasitología DILAVE, "Miguel C. Rubino" MGAP.[4]Plan Nacional de Investigación en Salud Animal (PLANISA).

Introducción

La intervención del sistema inmunitario del ovino frente a las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) en ovinos es conocida desde hace muchos años, por un lado con los cambios naturales que se producen en un mismo animal con el transcurso de la edad y por otro con las diferencias genéticas que existen entre individuos en una población. Sin embargo la inmunidad natural en general es notoriamente compleja, a tal punto de que los primeros contactos huésped/parásito se producen a los 15-20 días de edad, pero se consolida recién sobre los 13 meses. La respuesta inmunitaria se considera inespecífica en su efecto pero específica en su inducción ya que luego de inducida por un nematodo en particular puede actuar sobre otras especies, debido a la participación de la inmunidad innata y la adquirida (Lutzelschwab C. 2007).

El sistema inmunitario interviene en sucesivas etapas, primero impidiendo la instalación de los estados inmaduros, luego eliminando los nematodos ya instalados y por último limitando la postura de las hembras. El nivel de respuesta se encuentra influenciado por la genética (razas y líneas resistentes o susceptibles), la nutrición (energía y proteína), la edad (mayor susceptibilidad en jóvenes), el sexo (mayor susceptibilidad en machos) y sobretodo por los niveles de exposición previa a los antígenos parasitarios.

La producción de vacunas eficaces en el control de NGI ha sido uno de los desafíos más importantes de la parasitología en los últimos tiempos y sin duda muchas empresas privadas invirtieron sumas millonarias sin que hasta el momento dispongamos de estas en el mercado.

Antígenos naturales

La inmunidad natural se desarrolla luego de varias infecciones y la mayoría de los ovinos son refractarios luego de 2 estaciones de pastoreo, lo que indica claramente la participación activa del sistema inmunitario y la posibilidad potencial de desarrollar vacunas basadas en antígenos naturales (Piedrafita et al 2011). Por un lado se han identificado moléculas de la superficie larval y por otro, productos de secreción/excreción del parásito adulto. Por la ubicación y relación parásito/huésped la mayoría de los antígenos de un metazoario no están en contacto con el huésped.

Trabajos desarrollados en conjunto entre la Universidad de Monash (Victoria-Australia) y Pfizer Animal Health han llegado a proteger por encima del 60% tanto en el recuento de huevos como en la carga de nematodos adultos, en animales vacunados con antígenos de superficie larval de Haemonchus contortus. Por otro lado para la comercialización de la vacuna ya han identificado algunos mimotopes para producir la vacuna a escala comercial (Piedrafita et al 2011).

Si bien los trabajos preliminares requieren de inmunizaciones repetidas, las vacunas basadas en antígenos naturales corren con la ventaja de los estímulos naturales paralelos que se desarrollan en la infección natural.

Antígenos ocultos

Los escasos avances logrados en la búsqueda de efectivos antígenos naturales llevó a otra grupo de investigadores a trabajar con antígenos ocultos. En ese sentido hace varios años que se tienen identificados algunos antígenos (proteínas) del intestino del H. contortus con gran capacidad antigénica. Uno de los mejores candidatos es la aminopeptidasa H11, que desarrolla respuestas importantes en el huésped y protección frente a infecciones helmínticas tanto artificiales como naturales. Otro antígeno es H.gal-GP que son un grupo de moléculas con actividad proteolítica fundamentalmente en la digestión de la hemoglobina por parte del H. contortus (Smith D. comunicación personal).

El sistema de funcionamiento de estas vacunas es biológicamente muy interesante, ya que luego de administrados los antígenos en el huésped, estos desarrollan por primera vez su batería de anticuerpos ya que en condiciones naturales jamás se produjo el contacto antígeno/anticuerpo. Una vez alcanzados niveles de inmunoglobulinas circulantes elevados, estas alcanzan pasivamente el interior del parásito que las ingiere con la sangre; ya en el interior, los anticuerpos reconocen al antígeno que forma parte de las microvellosidades del intestino y en una reacción de máxima especificidad se unen, bloqueando el sistema digestivo del nematodo y provocándole inanición y muerte.

Los primeros trabajos fueron satisfactorios en el grado de control, pero las dosis de antígeno utilizado fueron altísimas (>50ì g) lo que hacia inviable comercialmente al producto. Sin embargo los últimos trabajos, mejorando la tecnología de producción y utilizando mejores adyuvantes (Quil-A), permitieron obtener niveles satisfactorios de control con dosis bajas (2ì g y 5ì g) (Smith et al 2011).

Los intentos por desarrollar esta vacuna mediante recombinación molecular han fracasado, posiblemente

porque H11 es un grupo de proteínas donde la aminopeptidasa es la dominante y a su vez tiene 5 isoformas (H11 -1 a -5). Para la protección total posiblemente sean necesarias todas las proteínas y además pueden haber modificaciones post-translaccionales vitales en el reconocimiento anticuerpo/antígeno (Knox et al 2011).

Preparación de la vacuna

Una vez descartada la posibilidad de preparar la vacuna en forma recombinante, la estrategia ha sido de producirla con H. contortus en un proceso de máxima eficiencia. La tecnología es Escocesa pero la vacuna es preparada en Albany, Western Australia, donde primero se infectan con L3 de H. contortus varios cientos de corderos, que luego se faenan en un frigorífico comercial para la obtención de los nematodos adultos. Una vez obtenidos los abomasos se centrifugan las membranas y se realiza una extracción con detergentes no-iónicos que por otro lado desnaturalizan las cápsides de posibles virus contaminantes; luego se filtran donde quedan las posibles bacterias contaminantes y por último se realiza la purificación de las proteínas por cromatografía. Todo el proceso es realizado bajo normas GMP y la vacuna actualmente se está investigando en condiciones de campo tanto en Australia como en Uruguay, con dosis de 5ì g en adyuvante Quil-A.

Materiales y métodos

El estudio se desarrolló en el Centro de Investigación y Experimentación "Dr. Alejandro Gallinal" del Secretariado Uruguayo de la Lana, en Cerro Colorado, Florida.

Se utilizó un diseño de parcelas al azar con 4 repeticiones de parcela, donde 48 corderos fueron adjudicados en 8 parcelas de campo natural con 6 corderos infectados naturalmente en cada una.

Se formaron 2 grupos experimentales balanceados por peso vivo y HPG (n=24 c/u):

* Vacunados
* Testigos sin vacunar

A los efectos de estudiar el efecto directo de la vacuna, la unidad experimental fue el animal (n=24) y a los efectos de estudiar el impacto epidemiológico a mediano plazo la unidad experimental fue la parcela (n=4).

Se realizaron 5 vacunaciones entre el verano/otoño 2012 y el plan comenzó con el cordero lactante de 2,5 meses de edad (13/12/2011) y le siguió una segunda vacunación 30 días después (12/01/2012), en el momento del destete, cuando fueron adjudicados a las parcelas correspondientes y revacunaciones cada 30-35 días (15/02; 25/03 y 30/04/2012).

La respuesta inmunitaria fue medida mediante titulación de anticuerpos en sangre por la técnica de ELISA, para lo cual se extrajeron muestras de sangre en cada 4 ocasiones.

El efecto antiparasitario se evaluó mediante la evolución del recuento de huevos de NGI y el cultivo e identificación de L3 para analizar los géneros presentes en cada muestreo.

La producción de lana fue medida en la esquila (2/10/2012) y el peso vivo registrado al destete (enero) y post-esquila (octubre).

El impacto epidemiológico se midió mediante la carga parasitaria de los animales en la primavera siguiente.

Como forma de evitar muertes innecesarias, cuando el recuento de HPG de un animal superaba los 5000 HPG, se trataba con un antihelmíntico y su valor mas alto se mantenía fijo hasta el final del ensayo como forma de ajustar la evolución de los HPG y no subestimarlos.

La reducción en el recuento de huevos se calculó mediante la siguiente formula:
%RRH = (X Control - X Tratado / X Control) * 100

Donde: "X control" es la media aritmética del HPG del grupo no vacunado y "X tratado" la media aritmética del HPG del grupo vacunado.

Registros meteorológicos diarios de temperatura y precipitaciones fueron medidos diariamente en la propia estación meteorológica del SUL.

Resultados

Las condiciones meteorológicas fueron favorables, para el desarrollo de infecciones naturales a partir de las precipitaciones del mes de febrero y se mantuvieron prácticamente durante todo el verano/otoño (figura 1).

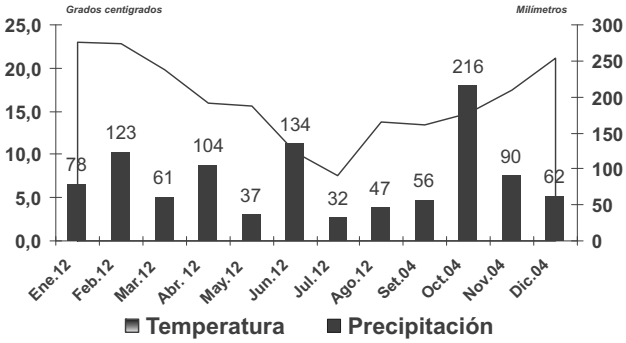

Figura1. Precipitación mensual acumulada (barras) y temperatura media mensual (área) durante el desarrollo de la evaluación.

La evolución de los recuentos de HPG de los grupos vacunado y testigo comenzaron a marcar diferencias importantes recién a partir de la tercera dosis de la vacuna y son significativamente diferentes luego de la cuarta dosis. Las diferencias sobre el final del período de evaluación del efecto directo son notorias (figura 2).

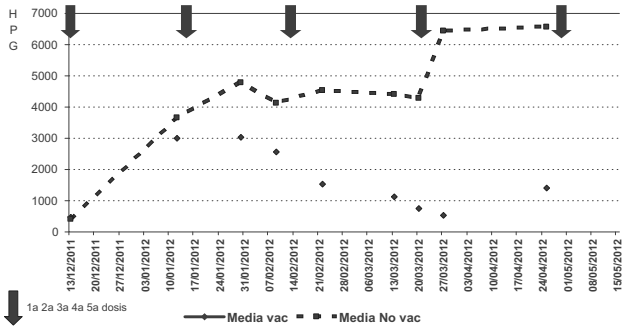

Figura 2.- Evolución de los recuentos de HPG de Haemonchus contortus corregidos por tratamientos de salvataje en los tratamientos: vacunado (vac) y no vacunado (no vac). Con flecha se marcan las vacunaciones.

En los muestreos de enero, febrero y marzo los cultivos mostraron que las poblaciones parasitarias eran casi exclusivamente del género Haemonchus sp. sin embargo sobre finales de abril con el descenso de la temperatura (figura1), comenzaron a aparecer otros géneros parasitarios (cuadro1).

Cuadro 1. Resultados de porcentaje de géneros identificados en el cultivo de larvas en el muestreo del 24/4/2012

	Haemonchus sp	*Trichostrongylus sp*	*Oesophagostomun sp*
Vacunados	71	29	
Testigos s/Vac.	84	12	2

El numero de corderos que en el grupo testigo no-vacunado, requirió dosificaciones de salvataje fue 11 (45%) y en el grupo vacunado 2 (8%).

La reducción máxima detectada fue del 82% luego de la cuarta dosis de vacuna y aplicados los ajustes por HPG de animales dosificados y corregidos solo a huevos de H.contortus, mediante el cultivo de larvas.

Cuadro 2. Porcentaje de reducción en el recuento de huevos calculado en base al grupo no vacunado. * ajustado por HPG de animales dosificados y cultivo de larvas

	Post 2º dosis	*Post 3º dosis*	*Post 4º dosis*
%RRH	25	76*	82*

Luego de la segunda dosis la respuesta fue de tan solo un 25% de reducción en el HPG, sin embargo la tercera dosis redujo a un 58% y luego un 76%, mientras que la cuarta llevó las diferencias entre vacunados y no vacunados de un 82%.

Los títulos de anticuerpos luego de la cuarta vacunación fueron elevados en la mayoría de los animales, sin embargo 3 animales permanecieron negativos, coincidiendo con valores altos de HPG durante prácticamente todo el período y que debieron ser tratados con antihelmíntico, lo que confirma la presencia de animales que por causas desconocidas no responden adecuadamente (cuadro 3).

Cuadro 3. Títulos de anticuerpos por la técnica de ELISA al 24 de abril luego de la 4ta. vacunación

Título en placa	12800	6400	3200	1600	800	400	Negativo
Cantidad de animales	8	6	3	1	2	1	3

Luego de evaluar los efectos directos de la vacuna, se intentó hacer una evaluación de mediano plazo, sobre la hipótesis de que la menor contaminación de las parcelas durante el verano-otoño, podría determinar menores niveles de infección en la primavera siguiente. Los resultados, si bien muestran una tendencia (cuadro 4), aún no han podido ser analizados estadísticamente y requieren de mas estudios.

Las diferencias en producción de lana resultaron de importante magnitud (194 grs), pero con altos desvíos estándar (cuadro 4).

Cuadro 4. Peso del Vellón Sucio (PVS), Peso Vivo post-esquila (PV) y recuentos de HPG en primavera

	PVS (24/10)	PV (24/10)	HPG (24/10)	HPG (6/11)
Vacunados	2,084 *(D.E.=0,756)*	24,9 *(D.E.=2,978)*	1147	1045
No Vacunados	1,890 *(D.E.=0,682)*	23,1 *(D.E.=2,766)*	1571	1310

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta primera experiencia son alentadores y muestran que este tipo de vacunas puede ocupar un lugar importante en el control de Haemonchus contortus en categorías y momentos estratégicos. Sin embargo algunos estudios mas profundos se deben orientar a estudiar ese bajo porcentaje de animales que no responden y ajustar el plan de vacunación a nuestra epidemiología.

Referencias bibliográficas

- Knox D.; Samarasinghe B. and Britton C. (2011). H11 a host protective intestinal aminopetidase from Haemonchus contortus and a vaccine target with anomalies. Proceedings 23rd. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Bs. As. Argentina pg. 180
- Lutzelschwab C. (2007). Inmunidad. En: enfermedades parasitarias de los ovinos y otros ruminates menores en el cono sur de América. Suárez V.; Olaechea F.; Romero J. y Rossanigo C. publicación técnica N° 70 INTA 145-158
- Piedrafita D.; Hosking C.; De Veer M.; Elhay M. and Meeusen E. (2011). What´s new is old. Novel approaches for the control of parasitic worms. Proceedings 23rd. International Conference of the World Association for the
- Advancement of Veterinary Parasitology. Bs. As. Argentina pg. 179

- Smith D. Newlands G. Fitzpatrick J.Spickett A.Amarante A.Souza C. Benavides M and Besier B. (2011). Towards a Commercial Vaccine for Haemonchosis in Ruminants. Proceedings 23rd. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Bs. As. Argentina pg. 87.