

VACUNACIÓN FRENTE A PARATUBERCULOSIS EN UN REBAÑO CAPRINO A DIFERENTES EDADES. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE PERIFÉRICA

ROYO, M.; FUERTES, M.; FERNANDEZ, M.; CASTAÑO, P.;
MANGA-GONZÁLEZ, Y.; FERRERAS, M.C.; BENAVIDES, J. y PÉREZ, V.
Dpt. de Sanidad Animal. Instituto de Ganadería de Montaña
(CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas, Grulleros 24346, León.

RESUMEN

Se ha llevado a cabo la vacunación frente a paratuberculosis en tres grupos de animales de edades diferentes (1,5 meses, 5 meses y adultos) en un rebaño caprino lechero, con el objetivo de conocer la respuesta inmune asociada a la vacunación, su efecto sobre la pérdida de animales y la evaluación de la respuesta a la prueba de IFN- γ de distintos antígenos de *M. bovis* en animales vacunados. La vacunación indujo una intensa respuesta inmune periférica celular que fue máxima a los 6 mpv y superior en el grupo vacunado a los 5 meses respecto al resto, e inferior en las cabras adultas. Aunque se ha encontrado reacción frente a la PPD bovina o el antígeno PC-HP de *M. bovis* en los animales vacunados, siempre ha sido inferior a la ofrecida por la PPD aviar o johnina, siendo este último antígeno el que registró los valores más elevados. No se observó reacción asociada al antígeno PC-EC en los animales inmunizados, lo que sugiere su utilidad en la diferenciación con la infección tuberculosa. El número de bajas fue, en todos los grupos, significativamente superior en los no vacunados, lo que podría indicar un efecto beneficioso general de la vacunación frente a paratuberculosis.

Palabras clave: paratuberculosis, vacunación, test del IFN- γ , caprino de leche.

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis es una enfermedad bacteriana crónica que afecta tanto a los rumiantes domésticos como a salvajes, causada por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (*Map*). Produce una enteritis granulomatosa asociada a una pérdida de peso progresiva, diarrea y en algunas ocasiones, la muerte. Es una enfermedad extendida en todo el mundo que causa importantes pérdidas económicas y de bienestar animal. No existen tratamientos efectivos, por lo que las principales estrategias de control son: la identificación y eliminación de animales infectados y sobre todo la vacunación. Este último procedimiento se sabe que es efectivo en el control de la enfermedad clínica, incluso cuando se vacunan animales adultos (Juste y Pérez, 2011), pero no evita la infección. Hasta el momento, se desconoce cuál es el mecanismo de acción de la vacuna. Además, su principal inconveniente son las reacciones cruzadas que ocasiona en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis (Juste y Pérez, 2011), por lo que su empleo en la especie caprina y bovina está restringido.

El objetivo de este estudio es evaluar la respuesta inmune asociada a la vacunación según la edad de los animales en el momento de la inmunización, valorar antígenos que permitan la diferenciación de animales vacunados de paratuberculosis de la infección tuberculosa y conocer los efectos de la vacunación sobre las bajas en el rebaño.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una explotación lechera caprina de 198 animales adultos, en régimen intensivo, de la raza murciano granadina situada en la provincia de Valladolid. Está libre de tuberculosis pero se habían diagnosticado casos clínicos de paratuberculosis. La experiencia se llevó a cabo en tres grupos de animales, distribuidos según la edad en el momento de la vacunación: cabritas de 1,5 meses de edad (n=35); cabras de 5 meses de edad (n=82) y cabras adultas mayores de 1,5 años (n=82) animales. En enero de 2014, la mitad de los animales de cada grupo se vacunó con una dosis única de la vacuna inactivada de GUDAIR® (Farco), quedando el resto como grupo control.

La respuesta inmune periférica se valoró en muestras de sangre completa y suero que fueron tomadas cada 3 meses, a lo largo de un año. La respuesta inmunitaria celular se evaluó mediante la técnica del liberación del IFN- γ , en la cual las muestras de sangre heparinizada se incubaron con PPD aviar y bovina (CZ Veterinaria), johnina (Neiker) y los antígenos PC-EC y PC-HP de *M. bovis* (Prionics). 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). Además, se llevó a cabo el registro de todos los animales que causaron baja en los grupos controlados, independientemente de la causa, durante el año de estudio. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante las pruebas t de Student para comparación de medias, y chi-cuadrado en los datos tipo frecuencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra la producción de IFN- γ tras la estimulación con PPD aviar a lo largo del experimento. A los 3 meses post-vacunación (mpv) se observan ya diferencias significativas en todos los grupos vacunados respecto a sus controles. Los niveles máximos de producción de esta citoquina se encuentran a los 6 mpv, existiendo diferencias entre grupos, de forma que los valores más elevados aparecen en el grupo de 5 meses, seguido por los de 1,5 meses y los adultos. A partir de este momento, se produce un descenso en todos los grupos. En cuanto a la PPD bovina, aunque a los 3 mpv ya se observan niveles más elevados de IFN- γ en los animales vacunados, es los 6 mpv cuando dichas diferencias son más significativas (Fig. 2). En todos los casos los índices obtenidos fueron inferiores a los hallados con la PPD aviar (Figs 1, 2). En cuanto a las diferencias entre grupos, se observa un patrón similar, si bien en este caso las diferencias entre los animales jóvenes (5 y 1,5 meses) con los adultos no fueron significativas. La producción de anticuerpos séricos comenzó de forma más tardía, respecto al IFN- γ , en todos los grupos, observándose diferencias con los animales no vacunados a partir de los 6 mpv, sin encontrarse variaciones significativas entre grupos.

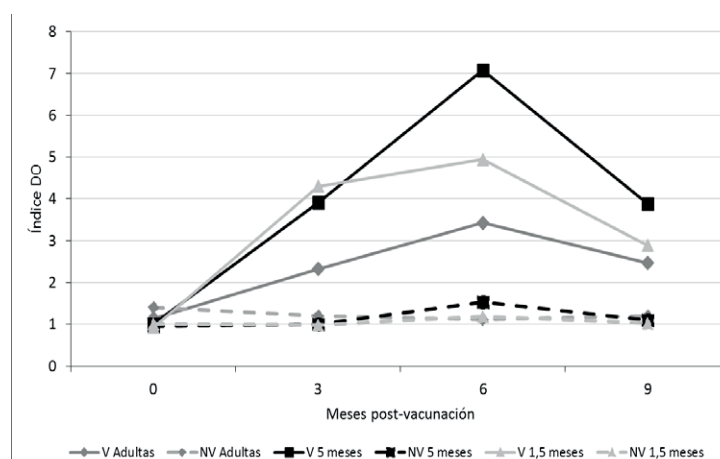


Fig 1. Producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con PPD aviar, en los distintos grupos a lo largo del estudio.

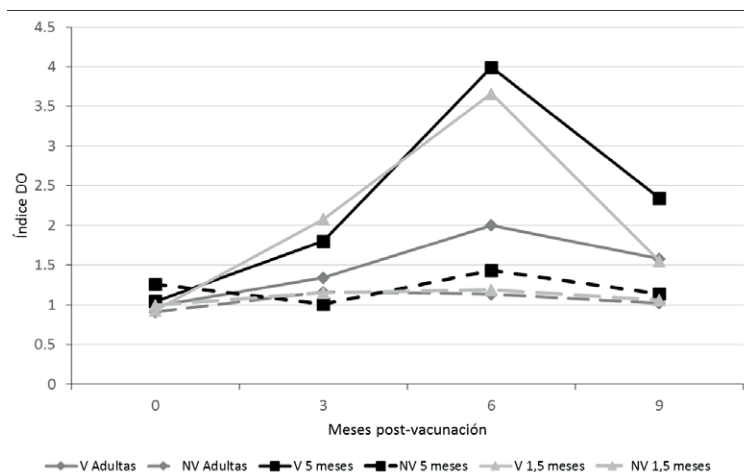


Fig 2. Producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con PPD bovina, en los distintos grupos a lo largo del estudio.

Estos resultados confirman que la vacunación induce una intensa respuesta inmunitaria periférica específica frente a paratuberculosis, especialmente de tipo celular, que es la que se considera eficaz en el control de la infección (Corpa *et al.*, 2000b; Juste y Pérez, 2011). Sin embargo, hay estudios que indican que este parámetro no puede ser tomado como un indicador de eficacia vacunal (de Silva *et al.*, 2015), ya que se han observado fallos vacunales en animales con intensa respuesta inmune celular periférica, lo que sugiere que serían otros factores los que intervienen en el mecanismo de acción de la vacuna. En estudios previos se había comprobado que la respuesta inmune era más intensa en animales de reposición que en los de 1 mes (Corpa *et al.*, 2000b), como en este estudio; sin embargo, es de destacar la menor respuesta encontrada en animales adultos. A diferencia de estos resultados, en otro estudio donde se infectaron con *Map* por vía oral ovejas adultas, en ellas la respuesta inmune fue más rápida e intensa que en corderos infectados (Delgado *et al.*, 2012). Estos hallazgos sugieren que los mecanismos que modulan la respuesta del individuo frente a la infección oral con *Map* vivos o a la inoculación subcutánea de bacilos muertos serían diferentes.

En el muestreo realizado a los 9 mpv se valoró la producción de IFN- γ tras la incubación de la sangre con diferentes antígenos, observándose que los niveles más elevados de esta citoquina se encontraron frente a la johnina, probablemente por ser el antígeno obtenido directamente de *Map*. Además, en todos los grupos la respuesta a la PPD bovina fue siempre inferior a la aviar, lo que confirmaría la utilidad de la intradermorreacción comparada para la diferenciación de animales vacunados. En cuanto a los antígenos de *M. bovis* EC y HP, eficaces en el diagnóstico de tuberculosis, no se observó reacción positiva en ningún caso con el antígeno EC mientras que con el HP solo apareció en los individuos vacunados del grupo de adultos. Estos resultados, aún

preliminares, indican que dichos antígenos podrían ser de utilidad en la diferenciación de animales vacunados frente a paratuberculosis de los infectados de tuberculosis, como ya se ha sugerido en un trabajo experimental (Pérez de Val *et al.*, 2012).

En la figura 5 se muestra el porcentaje de bajas de animales, producidas por cualquier causa, en los distintos grupos experimentales durante el estudio, que fue siempre significativamente mayor en los grupos no vacunados, en todas las edades. La mayor parte de bajas se debieron a otros procesos infecto-contagiosos. Ya que la paratuberculosis afecta únicamente a animales adultos, estos resultados podrían indicar que la vacunación llevada a cabo en estos animales tendría un efecto protector general frente a otras enfermedades. En este sentido, Pérez de Val *et al.* (2012) encuentran que la vacunación frente a paratuberculosis protegería en cierta medida frente a la infección tuberculosa. Otros estudios también han señalado que la vacunación frente a tuberculosis humana tiene efectos beneficiosos frente a otras enfermedades (Aaby y Benn, 2012).

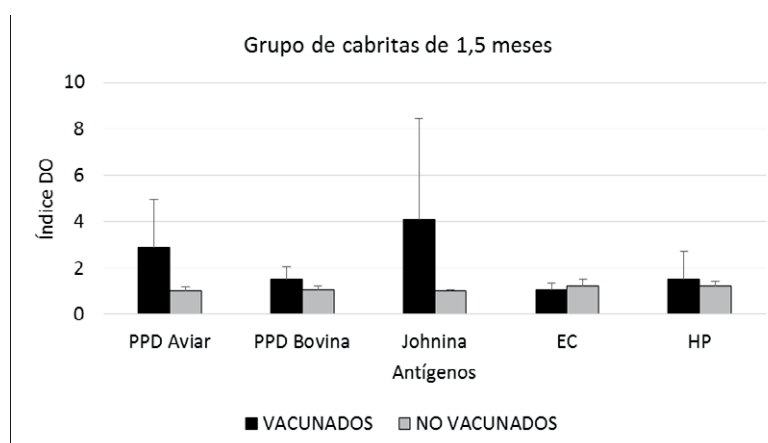


Fig 3. Producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con diferentes antígenos para el diagnóstico de paratuberculosis y tuberculosis en los animales vacunados con 1,5 meses, a los 9 mpv.

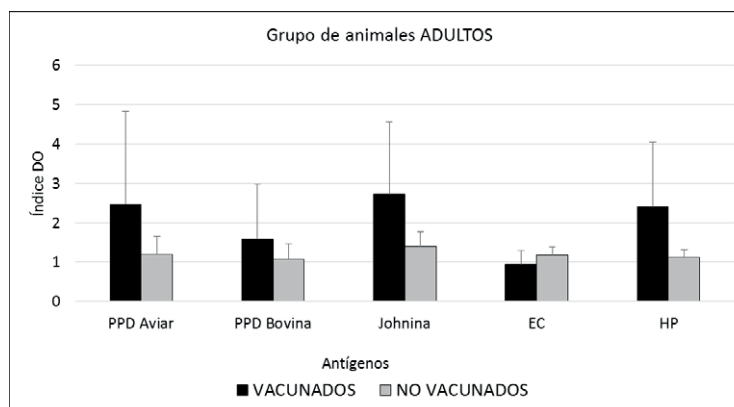


Fig 4. Producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con diferentes antígenos para el diagnóstico de paratuberculosis y tuberculosis en los animales adultos vacunados, a los 9 mpv.

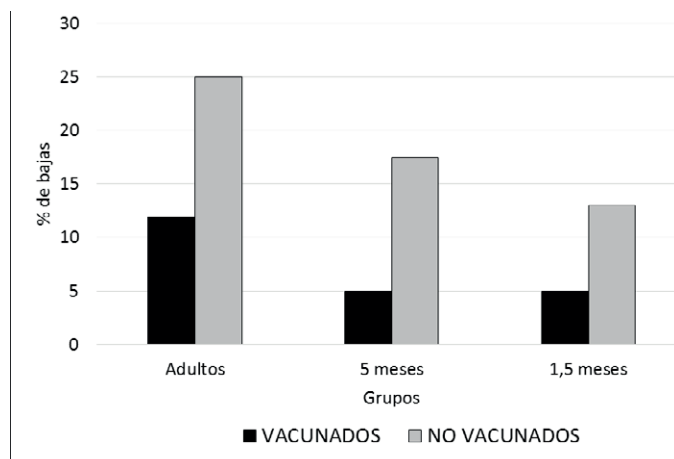


Fig 5. Porcentaje de bajas de animales en el periodo de estudio, en los distintos grupos.

CONCLUSIONES

La vacunación frente a paratuberculosis en cabras de diferentes edades induce una respuesta celular periférica, evaluada mediante la producción de IFN- γ frente a la PPD aviar, más intensa en animales vacunados en edades tempranas (1,5 o 5 meses) que en adultos. Dicha respuesta es máxima a los 6 mpv y varía según el antígeno micobacteriano empleado, siendo superior cuando se emplea johnina. La reacción de los animales inmunizados es siempre menor cuando se emplean antígenos de *M. bovis* e incluso no existe con el preparado antigénico PC-EC, que podría ser empleado con éxito en la diferenciación de individuos vacunados frente a paratuberculosis de los infectados por tuberculosis.

Se ha observado una reducción significativa en el número de bajas, por cualquier causa, en el grupo de individuos vacunados, en todas las edades, lo que sugiere que la vacunación frente a paratuberculosis podría tener un efecto beneficioso de protección colateral frente a otras enfermedades distintas de las causadas por micobacterias.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por el proyecto AGL-2012-39818 (MINECO).

BIBLIOGRAFÍA

Aaby P, Benn CS. 2012. Saving lives by training innate immunity with bacille Calmette-Guérin vaccine. *PNAS* 109: 17317-17318.

- Delgado L, Juste RA, Muñoz M *et al.* 2012. Differences in the peripheral immune response between lambs and adult ewes experimentally infected with *Map*. *Vet Immunol Immunopathol* 145: 23-31.
- Corpa JM, Pérez V, García Marín JF. 2000B. Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. *Vet Microbiol* 77: 475-485
- De Silva K, Plain Km, Begg DJ, *et al.* 2015. CD4T cells, $\gamma\delta$ T cells and B cells are associated with lack of vaccine protection in *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection. *Vaccine* 33: 149-155.
- Juste RA, Pérez V. 2001. Control of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27:127-138.
- Pérez de Val B, Nofrariás M, López-Soria S, Garrido JM *t al.* 2012. Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross protection. *BMC Vet Res* 8: 191.

VACCINATION AGAINST PARATUBERCULOSIS IN A GOAT FLOCK AT DIFFERENT AGES. ASSESSMENT OF THE PERIPHERAL IMMUNE RESPONSE

SUMMARY

Vaccination against paratuberculosis has been performed in three groups of animals (1,5 month-old, 5 month-old and adults) from a dairy goat flock. The objective was to assess the peripheral immune response related to vaccination, its effect on the animal losses and the measurement of the IFN- γ response against different antigens from *M. bovis* in vaccinated animals. Vaccination induced an intense cellular peripheral immune response that reached the highest level at 6 mpv. It was higher in the 5-month-old group than in the rest, and showed the lowest values in the adult group. Although vaccinated animals reacted against bovine PPD and PC-HP *M. bovis* antigens, the response was more intense to avian PPD or johnin; the latter showed the highest values. No reaction was detected against PC-ED antigen, suggesting its usefulness in the differentiation of *Map* vaccinated and tuberculosis-infected animals. The percentage of losses was lower in vaccinated groups, regardless the age. This fact would indicate that paratuberculosis vaccination could have a general beneficial effect.

Key words: paratuberculosis, vaccination, IFN- γ test, dairy goats.