



Informe final Proyecto I+D y T

Desarrollo de modelos de patogenia e inmunización en paratuberculosis

Cliente: MINECO

Contacto Neiker:
Natalia Elguezabal Vega
nelguezabal@neiker.eus
(+34)627986975

Contacto Cliente:
MINECO
DDEC

Ref. NEIKER: 12.0158

Ejercicio: 2015

Ref. DMAPTAP:

Fecha: Marzo 2013

Acrónimo: PARAMOD

Título: Desarrollo de modelos de patogenia e inmunización en paratuberculosis

Jefe de proyecto: Elguezabal Vega, Natalia

Email: nelguezabal@neiker.eus

Clasificación del proyecto:

Unidad de negocio: Innovación Agraria

Departamento: Sanidad Animal

Campos de aplicación: SAN

Área estratégica: Seguridad Alimentaria y Salud / Ganadería

Línea: Zoonosis, Microbiología, Inmunología

Tipo de proyecto: Estratégico

Origen: NEIKER

Palabras clave: vacunación, paratuberculosis, modelo animal, sensibilización

Objeto: Paratuberculosis, vacunación, sensibilización

Aspecto: Modelo animal, Vacunación

Finalidad: Patología animal, control, evaluación de la vacunación

Objetivo: Generar conocimiento de los mecanismos de patogenia e inmunización de la paratuberculosis que pueda servir de apoyo a los programas de control de la enfermedad

Objetivos específicos:

1. Estudiar la interacción de las micobacterias que pueden estar presentes en el rumen de ovejas y en el apéndice, ciego y sáculo de conejos con los mecanismos de patogenia en la paratuberculosis.
 2. Desarrollar un modelo de infección experimental de paratuberculosis en conejos.
 3. Evaluar el efecto de la vacunación en el modelo de infección de paratuberculosis en conejo.
 4. Desarrollo de ELISA para diferenciación de animales vacunadas e infectados.
 5. Apoyar las tareas del subproyecto de la Universidad de León
-

Duración: 3 años

Fecha de inicio: 01/01/2013

Fecha final: 31/12/2015

1. Equipo participante de NEIKER - Tecnalia

Participantes de NEIKER - Tecnalia

- + **Jefe de Proyecto:** Natalia Elguezabal Vega
- + **Otros participantes:**, Elena Molina Fernández, Iker A Sevilla, Rakel Arrazuria, Ramón Juste Jordán, Joseba Garrido Urkullu

Otras entidades participantes o colaboradoras

Universidad de León (Dr. Valentín Pérez)

2. Informe sobre las actividades más destacadas de la investigación en el proyecto y resultados obtenidos

OBJETIVO 1. Estudiar la interacción de las micobacterias que pueden estar presentes en el rumen de ovejas o el apéndice vermiciforme (AV), ciego o *sacculus rotundus* (SR) de conejos con la patogenia de la paratuberculosis (PTB).

Se realizaron muestreos de 84 conejos en matadero (MAR-DIC 2013, ENE-MAR 2014) y de rumen de 2 ovejas en el rebaño experimental de NEIKER (JUN 2013, JUN 2014).

No se han aislado micobacterias en ninguno de los medios sólidos a partir de ninguna de las muestras de tejido linfoide asociado a intestino de conejos ni de rumen de ovejas. Sin embargo, algunas colonias sospechosas se han sometido a secuenciación 16S DNAr siendo identificadas como *Thermoactinomyces* sp. Por otro lado, la PCR MycMavMTC ha detectado animales positivos a complejo *M. avium* en un 16.6% de los casos, de los cuales un 54.54% se han detectado en AV, 18.18% en SR, y 27.27% en los dos. En cuanto al análisis histopatológico, se han observado lesiones granulomatosas tras tinción con hematoxilina-eosina en las muestras de SR de 2 animales y granulomas inespecíficos en otros 2, además de hiperplasia reactiva en el ileon y SR de 3 y 1 animales, respectivamente. En 2 animales se han detectado bacilos ácido resistentes mediante tinción con Ziehl-Neelsen coincidiendo con resultados de PCR positivos. El resumen de los resultados positivos a las diferentes técnicas se muestra en la **Tabla 1**.

Resultados del objetivo 1.

- Detección de DNA de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* y *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* en el sistema digestivo de conejos en producción.
- Aislamiento de bacterias de crecimiento lento identificadas como *Thermoactinomyces* sp. en el 6% de los casos.

OBJETIVO 2. Desarrollar un modelo animal de infección de PTB en conejos que permita esclarecer los mecanismos patogénicos de la enfermedad (en un periodo de tiempo más corto al modelo en rumiantes).

Infección experimental de Map en conejos: Efecto de la dieta

En el experimento de infección, realizado a lo largo del 2013, se evaluó el efecto del cambio de dieta (R:regular, HF: alta en fibra, HP: alta en proteína) durante el desafío con Map. La dieta basada en pienso de producción regular mostró ser la más efectiva en comparación con la dieta alta en fibra o la dieta alta en proteína ya que presentó mayor nivel de eliminación a través de las heces verificado por qPCR F57, mayor número de tejidos infectados comprobado por cultivo sólido y por PCR y mayor extensión de lesión granulomatosa en AV y SR verificado por microscopía aunque menor carga en tejidos verificado por qPCR F57. Mediante análisis de correspondencias múltiples se confirmó que la dieta regular es la más efectiva a la hora de conseguir instaurar la infección (**Figura 1**).

Aunque no estaba contemplado inicialmente en el proyecto gracias a la colaboración con la Universidad de Manitoba se han aprovechado muestras de AV, SR y contenido cecal de las dietas HF y R para analizar la microbiota de estos animales mediante secuenciación 16s y estudiar el efecto de la dieta en la infección por Map y en la composición microbiana.

Resultados del objetivo 2.

- Se ha comprobado que los conejos en las condiciones definidas para este experimento eliminan Map a través de las heces, presentan DNA de Map en tejidos, Map viables en tejidos y lesiones granulomatosas en AV y SR.
- La dieta durante el desafío puede modular el curso de infección.
- Se producen cambios en la microbiota tanto en el grupo dieta HF como en el grupo dieta R en respuesta a la infección por Map.

OBJETIVO 3. Evaluar el efecto de la vacunación en el modelo de infección de paratuberculosis en conejo.

Infección experimental de Map en conejos: Efecto de la vacunación previo (protector) o posterior (terapéutico) al desafío

En el experimento de infección, realizado a lo largo del 2014, se evaluó el efecto de la vacunación sobre la infección con Map en conejos. En la **Figura 2** se muestran los resultados de respuesta celular (IFN- γ) frente a las PPDs johnina, aviar y bovina de los grupos vacunados, vacunación previa al desafío (VSRI), vacunación posterior al desafío (IVSR), grupo control infectado (CI) y grupo control no infectado (CNI). Así, se ve que la vacunación previa al desafío contribuye a activar la respuesta celular de una forma más efectiva a juzgar por los niveles de IFN- γ liberados tras la estimulación con PPD aviar y johnina. Sin embargo, ambas pautas de vacunación son capaces de contribuir a inducir una respuesta inmune humoral similar a juzgar por los niveles de anticuerpos detectados al final del experimento en ambos grupos, IVSR y VSRI, según se muestra en la **Figura 3**. El índice bacteriológico, representado en la **Figura 4** muestra que ambas pautas de vacunación son eficientes a la hora disminuir el número de tejidos positivos a Map tanto por qPCR como por cultivo, aunque el grupo IVSR presenta una reducción mayor que puede ser debida a la mayor edad de los animales en el momento de vacunación.

Resultados del objetivo 3.

- La respuesta inmunitaria celular periférica en respuesta a la vacunación (producción de IFN- γ) varía en intensidad según la edad de vacunación y el antígeno micobacteriano empleado.
- La vacunación previa o posterior al desafío en conejos tiene efectos similares sobre la respuesta humoral. Sin embargo, la vacunación previa al desafío estimula la respuesta celular en mayor medida.
- Ambas pautas de vacunación producen una disminución de Map en tejidos en comparación con el grupo no vacunado.

OBJETIVO 4. Desarrollar métodos DIVA que permitirán el diagnóstico animales infectados de tuberculosis (TB) y vacunados de PTB eliminando al interferencia de la vacunación de la PTB en el diagnóstico de la TB, favoreciendo así la vacunación contra PTB.

Tras definir las condiciones para la detección de anticuerpos por ELISA para conejos frente a PPA-3, VK055 y VK067 y para vacas frente a VK055 y EC se han analizado todas las muestras de conejos del experimento de vacunación y 44 muestras de vacas vacunadas de PTB y/o sospechosas de infección por *M. bovis*, viendo que se produce una reactividad superior en los animales vacunados de PTB en comparación a los infectados frente al antígeno VK055. Las vacas infectadas con *M. bovis* muestran reactividad con EC, aunque hay casos de animales con lesiones macroscópicas severas que no responden a este antígeno. Faltan por realizarse las ELISAs de anticuerpos de las muestras de cabra frente a VK055 y EC que se realizarán en Febrero-Marzo de 2016.

Por otro lado, a lo largo del proyecto se habían acumulado muestras de plasma estimulado con las PPDs bovina, aviar y johnina, los antígenos específicos de Map, VK055 y VK067 y los cocteles antigenicos específicos de *M. bovis*, EC y HP para la cuantificación de IFN- γ además de las muestras caprinas de los experimentos de ULE. En general, los antígenos VK055 y EC muestran una mayor capacidad de clasificar a los animales frente a VK067 y HP, los cuales muestran mayor reactividad cruzada.

Resultados del objetivo 4

- Posibilidad de empleo de los antígenos EC (Prionics) y VK055 (Vacunek) en la diferenciación de animales vacunados frente a paratuberculosis, de los infectados por *M. bovis* ya que el antígeno VK055 reacciona positivamente en animales vacunados

frente a Map, mientras que EC muestra reacciones positivas en animales infectados por *M. bovis*.

OBJETIVO 5. Apoyar las tareas del subproyecto de la Universidad de León (ULE)

A lo largo de los tres años de proyectos se han preparado los inóculos para llevar a cabo las infecciones experimentales planteadas en el subproyecto de ULE.

Durante el 2015 (10 Julio-10 de Octubre) Marcos Royo, becario contratado FPI asociado al proyecto del ULE ha realizado una estancia en NEIKER para familiarizarse con las técnicas de cultivo y detección de Map. De esta manera, ha sido posible realizar los cultivos de todas las muestras de las infecciones experimentales.

3. Información científica generada

Publicaciones Científicas Internacionales

Arrazuria R, Sevilla IA, Molina E, Pérez V, Garrido JM, Juste RA, Elguezabal N. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies in the gut associated lymphoid tissue of slaughtered rabbits. BMC Vet Res. 2015 Jun 11;11:130. doi: 10.1186/s12917-015-0445-2.

Arrazuria R, Molina E, Mateo-Abad M, Arostegui I, Garrido JM, Juste RA, Elguezabal N. Effect of various dietary regimens on oral challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a rabbit model. Res Vet Sci. 2015 Aug;101:80-3. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.06.006

Arrazuria R, Juste RA, Elguezabal N. Mycobacterial Infections in Rabbits: From the Wild to the Laboratory. Transbound Emerg Dis. 2016 Jan 22. doi: 10.1111/tbed.12474.

Arrazuria R, Elguezabal N, Juste RA, Derakhshani H, Khafipour E. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection modifies gut microbiota under different dietary conditions in a rabbit model. Frontiers in Microbiology 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00446.

Arrazuria R, Molina E, Garrido JM, Pérez V, Juste RA, Elguezabal N. Vaccination sequence effects on immunological response and tissue bacterial burden in paratuberculosis infection in a rabbit model. Veterinary Research. En revisión.

Fernández M, Benavides J, Castaño P, Elguezabal N, Fuertes M, Muñoz M, Royo M, Ferreras MC, Pérez V. Immunophenotypic analysis of macrophage subsets within granulomatous intestinal lesions in paratuberculosis. Veterinary Pathology. En revisión.

Comunicaciones a Congresos, Reuniones, Simposios

Arrazuria R, Molina E, Geijo MV, Garrido J, Juste RA, Elguezabal N. Short term *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection models in rabbits. 12ICP, Parma. Italy 22-26 June, 2014. Póster

Elguezabal N, Arrazuria R, Molina E, Sevilla IA, Garrido J, Juste RA. Evaluation of different vaccination strategies on *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in a rabbit model. 12ICP, Parma. Italy 22-26 June, 2014. Oral

Arrazuria R, Elguezabal N, Juste RA, Hooman D, Khafipour E. Gut microbiome profile in rabbits experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and fed a regular or a high fiber diet. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BioMicroWorld, Barcelona. 28-30 Octubre, 2015. Oral.

Elguezabal N, Arrazuria R, Tello M, Garrido JM, Juste RA. Effect of dietary shifts on infection progression and immune response in rabbits challenged with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BioMicroWorld, Barcelona. 28-30 Octubre, 2015. Poster.

Arrazuria R, Juste RA, Elguezabal N. Aplicación de la metagenómica al estudio de la paratuberculosis. XX Simposio Anual de Avedila. Gijón. 5-6 Noviembre, 2015 Oral.

Arrazuria R, Derakhshani H, Khafipour E, Perez V, Garrido J, Juste RA, Elguezabal N. Rabbit gut microbiota modifications induced by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and diet changes. 13th International Colloquium on Paratuberculosis. Nantes (Francia). Junio de 2016.

4. Actividades de formación y transferencia realizadas

En este proyecto ha participado Rakel Arrazuria como parte de su trabajo de Tesis Doctoral (objetivos 1, 2 y 3) gracias a financiación del Departamento de Educación y Universidades del Gobierno Vasco y Miriam Serrano como parte de su Trabajo de Fin de Master (objetivo 4) del Master de Seguridad y Calidad Alimentaria de la UPV-EHU.

5. Desviaciones con respecto a la memoria del proyecto

Ninguna.

ANEXO. Figuras y Tablas.

Tabla 1. Resultados de los análisis moleculares, observaciones macroscópicas e histopatológicas resultados de los animales con al menos un resultado positivo a cualquiera de los métodos.

Animal	MycMavMtc PCR		Identidad	secuenciación 16s DNA	Observaciones patológicas macroscópicas	Histopatología
	SR	AV				
E1.Y1	-	-	-	<i>Thermoactinomyceteae</i> ^a	-	SR (0)/ AV (0)
E1.Y2	-	+	Maa/Mas	SA	AV	SR (0)/ AV (0)
B1.B1	-	-	-	<i>Thermoactinomyceteae</i> ^b	-	NA
B1.B2	-	-	-	SA	SR	SR (0)/ AV (0)
E2.Y2	-	-	-	SA	SR/IL ^c /JE ^c	SR (3)/ AV (0)/ IL (1)/ JE (0)
C1.Y2	+	+	Maa/Mas	SA	SR/IL ^c	SR (0) / AV (1)/ IL (1)
C2.Y1	-	+	Maa/Mas	SA	-	SR (1)/ AV (3)
C2.Y2	-	+	Maa/Mas	SA	-	SR (0)/ AV (0) [*]
B2.Y2	-	-	-	<i>Thermoactinomyceteae</i> ^a	-	SR (0)/ AV (0)
A1.Y2	-	+	Maa/Mas	SA	-	NA
E3.Y1	-	+	Mah	SA	-	NA
E3.Y2	-	+	Maa/Mas	SA	-	NA
B7.Y1	-	-	-	<i>Thermoactinomyces sanguinis</i> ^b	-	NA
B5.B1	+	+	Maa/Mas	SA	-	NA
D2.Y2	+	+	Maa/Mas	SA	-	NA
D2.B1	-	-	-	SA	SR/IL ^c	SR (2)/ AV (0)/ IL (1)
D2.B2	+	-	Maa/Mas	SA	SR	SR (2)/ AV (0)
D3.Y1	+	-	Maa/Mas	SA	-	NA

SR: sacculus rotundus, AV: apéndice vermiciforme, IL: ileon, JE: yeyuno, SA: sin aislamiento. ^aIdentificado de una colonia aislada de *sacculus rotundus*,

^bIdentificado de una colonia aislada de apéndice vermiciforme. ^cengrosamiento de la pared intestinal, NA: No analizado. (0): sin lesiones, (1): hyperplasia reactiva, (2) lesiones granulomatosas inespecíficas (3) lesiones granulomatosas, ^{*}: Ziehl Neelsen positivo.

reactiva, (2) lesiones granulomatosas inespecíficas (3) lesiones granulomatosas, ^{*}: Ziehl Neelsen positivo.

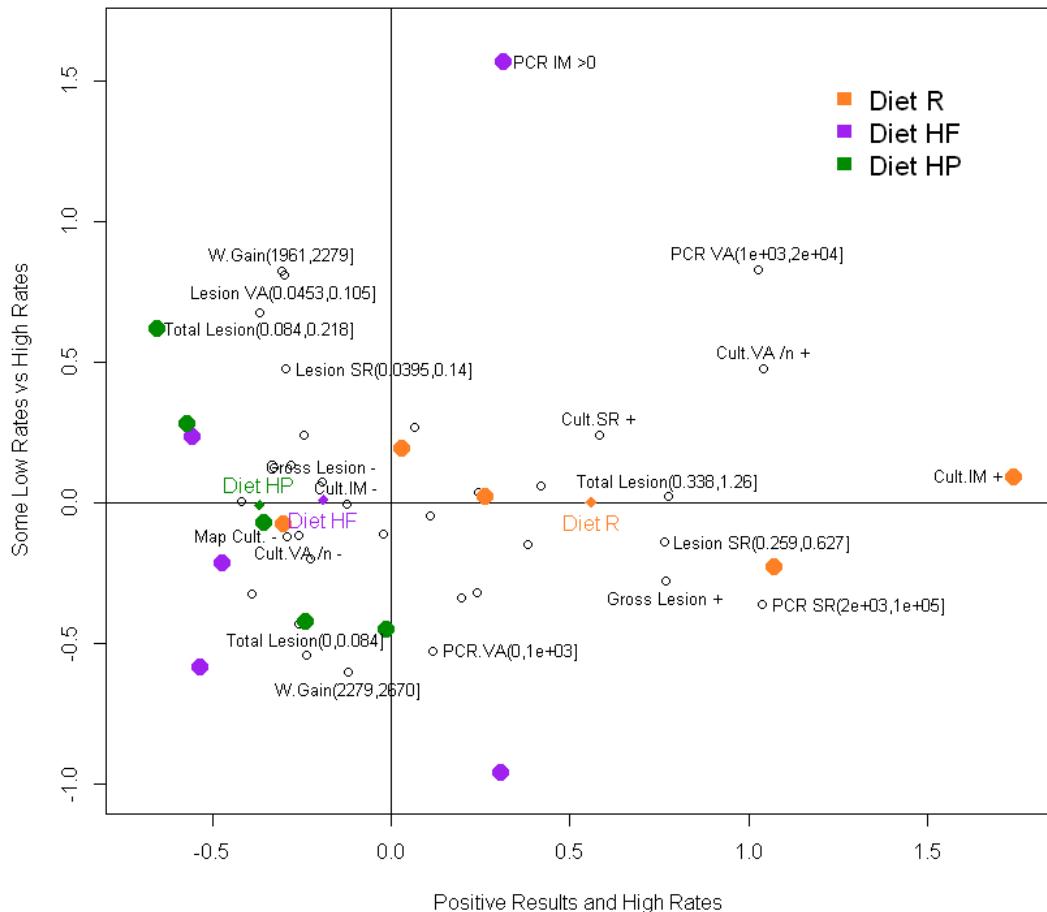


Figura 1. Mapa de análisis de correspondencias múltiples (ACM).

Interpretación: la parte derecha contiene todos los resultados cercanos a la positividad (cultivo positivo Map) y las tasas altas (carga alta de Map en heces, carga alta de Map en tejidos, extensión de lesión mayor), mientras que la parte izquierda contiene resultados cercanos a la negatividad (cultivo negativo Map) y tasas bajas (carga baja de Map en heces, carga baja de Map en tejidos, extensión de lesión menor). Los círculos vacíos en el plano representan las categorías de las medidas de las técnicas realizadas incluidas en el análisis ACM estando etiquetadas las más representativas. La posición relativa de los puntos indica el grado de similitud o asociación entre categorías. A mayor proximidad entre los puntos mayor relación entre categorías. El tipo de dieta se ha incluido en el mapa con motivos ilustrativos y todos los animales se han proyectado en el mapa de forma individual. Las posiciones relativas de los sujetos en este plano se representan mediante círculos de colores (Dieta regular (R): naranja, Dieta alta en fibra (HF): morado y Dieta alta en proteína (HP): verde) y los rombos pequeños del mismo color representan la posición media de cada grupo dietético. La mayoría de los individuos de la dieta R están en la parte derecha del mapa indicando una mayor asociación con los parámetros que podrían representar un estado de infección instaurada mientras que los individuos de las dietas HF y HP caen en la parte izquierda del mapa indicando una infección suave o no instaurada del todo.

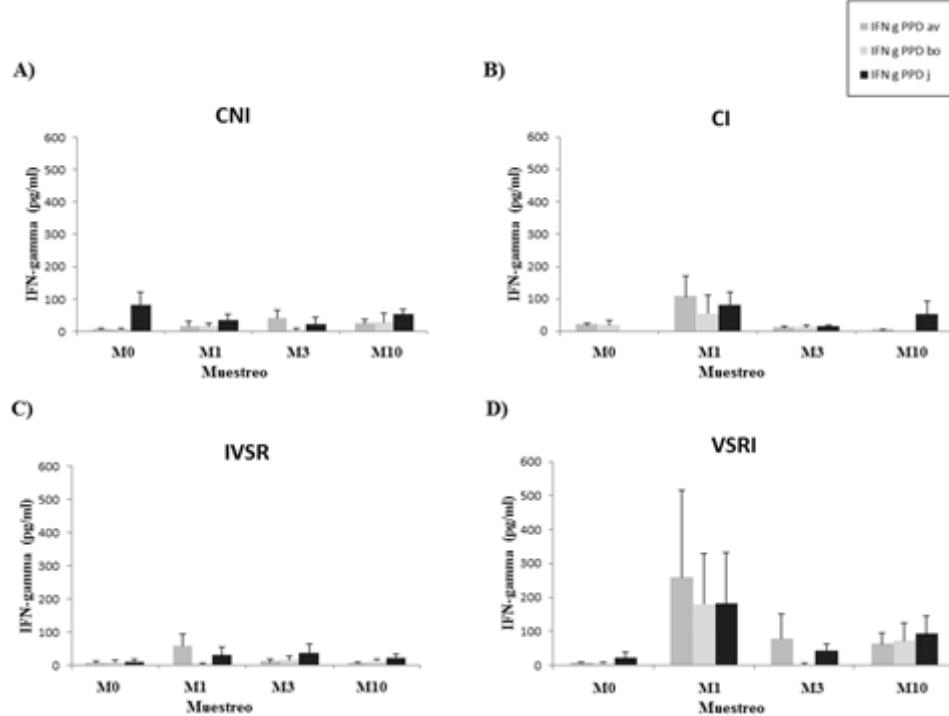


Figura 2. Niveles de interferón-gamma en respuesta a la estimulación con PPD aviar, PPD bovina y PPD johnina en los muestreos M0, M1, M3 y M10. (A) controles no infectados, (B) controles infectados, (C) infectados previos a la vacunación con Silirum® y (D) vacunados con Silirum® previo a la infección.

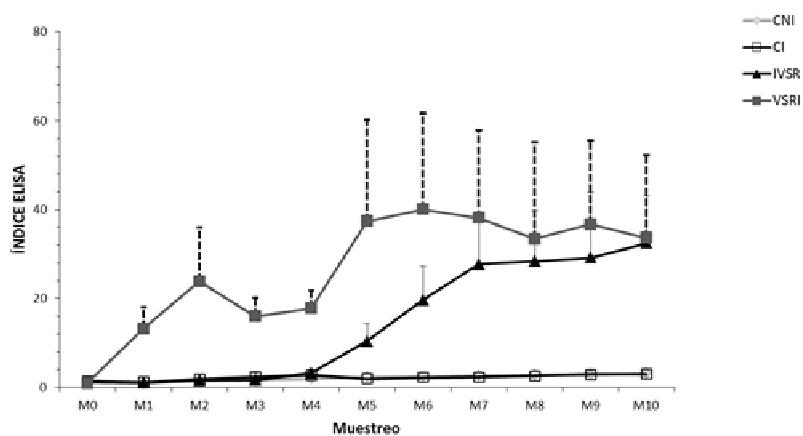


Figura 3. Variación en el índice de ELISA PPA-3 a lo largo del tiempo. CNI: controles no infectados, CI: controles infectados, IVSR: infectados previos a la vacunación con Silirum® y VSRI: vacunados con Silirum® previo a la infección.

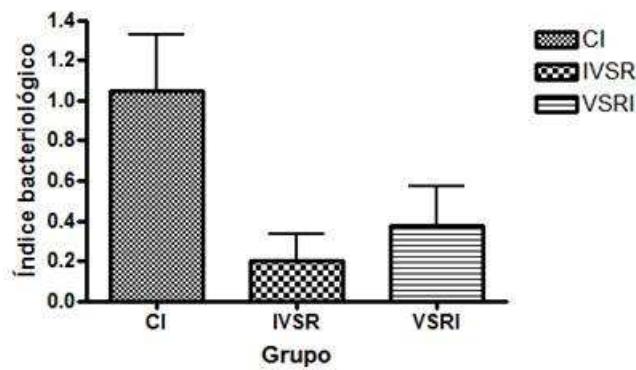


Figura 4. Índice bacteriológico. Se toma en consideración el número de tejidos positivos a qPCR de MAP y el número de tejidos de los que ha sido aislado en los grupos: controles infectados (CI), infectados previos a la vacunación con Silirum ® (IVSR) y vacunados con Silirum® previo a la infección (VSRI). Las barras de error representan el error estándar de la media. Se observaron diferencias significativas entre los grupos CI e IVSR ($p=0.034$).