

Informe anual Proyecto I+D y T

**Factores de respuesta inmune
inespecífica en la patogénesis
natural y post-vacunal de la
paratuberculosis y su interferencia
en el diagnóstico de la tuberculosis**

**Cliente: Dirección de Innovación e
Industrias Alimentarias. DMAPTAP.
Gobierno Vasco**

Contacto Neiker:	Contacto Cliente:
Joseba Garrido Urkullu jgarrido@neiker.net 94 4034300	Luis Javier Tellería lj-telleria@ @ ej-gv.es 94 501 63 14

Ref. NEIKER: 72.0215

Ejercicio:2011

Ref. DMAPTAP: OFS2008001

Fecha: 29/03/11

Acrónimo: PARAPATO

Título: Factores de respuesta inmune inespecífica en la patogénesis natural y post-vacunal de la paratuberculosis y su interferencia en el diagnóstico de la tuberculosis.

Jefe de proyecto: Garrido Urkullu Joseba M. | email: jgarrido@neiker.net

Clasificación del proyecto:	Unidad de negocio: UNINAGRA
Departamento: SANANI	Campos de aplicación:
Área estratégica: GANADERÍA	Línea: MICROBIOLOGÍA/INMUNOLOGÍA
Tipo de proyecto: ESTRATÉGICO	Origen: NEIKER

Palabras clave:

Objeto: Bovino,
Mycobacterium
paratuberculosis

Aspecto: Patogénesis,
Inmunología, Microbiología,
Anatomía Patológica

Finalidad: patología animal,
control

Objetivo: El objetivo general de este proyecto es profundizar en el conocimiento de la patogénesis de la paratuberculosis, el cual podrá ser extrapolado a otras infecciones lentes de animales y humanos, además de obtener información que será utilizada en la mejora tanto de la elaboración como de la utilización de las vacunas frente a paratuberculosis.

Objetivos específicos:

- 1- Estudio de la respuesta inmune específica e inespecífica en condiciones naturales con o sin vacunación
- 2- Estudio del efecto de distintas cepas de Map con distinto grado de virulencia
- 3- Estudio del efecto del tipo de respuestas inmune en la protección frente a paratuberculosis y su interferencia en el diagnóstico
- 4- Estudio de la posible interferencia de la vacunación con el diagnóstico de la tuberculosis

Duración: 4 años

Fecha de inicio: 01/01/2009

Fecha final: 31/12/2009

1. Equipo participante de NEIKER - Tecnalia

- **Jefe de Proyecto:** Joseba Garrido
- **Otros participantes:**
Investigadores de Proyecto: Ramón A. Juste, Iker Agirregomoskorta, Mariví Geijo, Esmeralda Minguijón, Elena Molina

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES O COLABORADORAS

Dr. Valentín Pérez (VP)
Dpto. de Patología Animal (Sanidad Animal)
Facultad de Veterinaria
Universidad de León

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

FASE 1. Estudio de la patogénesis de la paratuberculosis en la especie bovina.

Actividades y participación

Toma de muestras	J. Garrido, M. Geijo, I. Sevilla
Análisis laboratoriales	J. Garrido, M. Geijo, I. Sevilla
Análisis estadístico	J. Garrido, R. Juste, I. Sevilla

Se continuó con el trabajo en las ocho explotaciones de ganado bovino seleccionadas del País Vasco. Cinco vacunadas y tres controles. En 2011 se completó el segundo muestreo general de las explotaciones

Al igual que en el muestreo inicial se tomaron muestras de sangre y heces de todos los animales mayores de 24 meses y se registraron los resultados de la IntraDermoReacción (IDR) comparada (PPD aviar-PPD bovina) llevada a cabo por los Veterinarios de las Campañas Oficiales de Saneamiento Ganadero con el objeto de medir la interferencia ocasionada por la vacunación frente a paratuberculosis en el diagnóstico de la tuberculosis en situaciones de campo.

Los resultados de la IDR comparativa correspondientes los dos primeros muestreos se muestran en la Figura 1. En cuanto a las reacciones observadas frente al antígeno PPD bov se vio un incremento respecto al muestreo inicial en el que los animales todavía no habían sido vacunados de un 34,51% de animales reaccionantes (positivos y dudosos). Sin embargo, lo más relevante que se observó fue que en el muestreo 12 meses el 8,11% de los animales vacunados presentaron reacción positiva y el 5,66% dudosa a la PPD bovina, pero cuando se hizo el análisis comparativo respecto a la PPD aviar sólo un 1,70% de los animales fueron calificados como dudosos, no detectándose casos positivos. Teniendo en cuenta el efecto beneficioso de la vacunación frente a paratuberculosis para el control de esta enfermedad se considera un porcentaje insuficiente para no tener en cuenta esta medida de control en

explotaciones históricamente libres de Tuberculosis y que se abastecen de su propia recria. Además, hay que tener en cuenta que las explotaciones lecheras tienen unos porcentajes de renovación muy altos por lo que al menos un 20% de sus animales se someten a inspecciones Postmortem en los mataderos.

Al medir la respuesta inmune celular mediante la cuantificación del gamma interferón producido previa estimulación de las muestras con los mismos antígenos utilizados en la prueba *in vivo* se observaron resultados desconcertantes. Las muestras de sangre heparinizada se procesaron el mismo día de su recogida, se hicieron tres alícuotas de cada una de ellas y se estimularon con PBS, PPD bov y PPD av, tras su incubación durante una noche a 37°C se recogió el plasma y se congeló hasta la realización del ELISA. En el muestreo 12 meses el porcentaje de animales reaccionantes era del 2,01%, similar al encontrado con la IDR, sin embargo los análisis realizados sobre las muestras obtenidas en el muestreo inicial presentaron prevalencias del 20%, algo epidemiológicamente inverosímil y que solo se puede explicar por la falta de consistencia del método en sí (probablemente por falta de especificidad de los antígenos). Los resultados obtenidos hacen necesario retestar las muestras positivas del muestreo inicial, y de mantenerse los resultados obtenidos haría necesario plantear un análisis sobre la utilidad de esta técnica, al menos como diagnóstico diferencial en explotaciones con paratuberculosis (independientemente de la vacunación). De hecho, es posible que la vacunación frente a paratuberculosis y el incremento de la respuesta a la PPDavir haya conseguido, en los muestreos post-vacunación, enmascarar otras reacciones inespecíficas que podrían ocasionar resultados confusos en el diagnóstico de la tuberculosis.

Los resultados del ELISA frente a paratuberculosis se muestran en la Figura 2. Como era de esperar aunque en el muestreo inicial las prevalencias oscilaban entre el 13% en las explotaciones control y el 15% en las que iban a ser vacunadas, en el muestreo realizado a los 12 meses estas diferencias se vieron incrementadas por efecto de la vacunación. En las explotaciones control, en las que se sacrificaban animales en base a los resultados laboratoriales, se observó una reducción del porcentaje de positivos del 18,47%, mientras que por el contrario en las explotaciones vacunadas se observó un incremento del 257,83%. Estos resultados indican que mientras que no se disponga de vacunas marcadas y diagnósticos DIVA el diagnóstico de la paratuberculosis en explotaciones vacunadas debe basarse en técnicas microbiológicas.

Los resultados obtenidos con la PCR a tiempo real se muestran en la Figura 3. Se observan reducciones de la tasa de excreción de micobacterias del 87,43% en las explotaciones control y del 84,71 en las explotaciones vacunadas. Ambos resultados son más que satisfactorios pero el coste económico soportado por los ganaderos fue muy diferente. Esta diferencia se debió a que los ganaderos de las explotaciones control tuvieron que sacrificar todos aquellos animales que presentaron resultado positivo en el muestreo inicial, mientras que los que fueron incluidos en el programa de vacunación no tuvieron esa obligación. Teniendo en cuenta que la mayor parte de los animales positivos fueron animales jóvenes, de primera o segunda lactación, esto

supuso que los ganaderos incluidos en el programa de vacunación pudieron focalizar el desvío en otras patologías distintas a la paratuberculosis.

Se recogió en matadero el intestino de ocho animales procedentes de las explotaciones en seguimiento, tanto de animales con sospecha clínica de paratuberculosis como eliminados por otras causas. En la sala de necropsias de Neiker se tomaron muestras de válvula ileocecal, íleon proximal, nódulo linfático ileocecal y nódulo linfático yeyunal caudal. Parte de la muestra se fijó formol para la realización de estudios histopatológicos y parte se destinó a análisis microbiológicos.

Dentro de esta Fase 1 también se contemplaba el seguimiento mensual durante el primer año y trimestral durante el segundo de un grupo de 14 terneras de aproximadamente dos meses de edad en el muestreo inicial, 7 vacunadas y 7 sin vacunar, en cada una de las explotaciones participantes. De esta manera se pretendía evaluar la respuesta inmune del hospedador, tanto local como periférica, e innata como específica, en el desarrollo lesional de la paratuberculosis. Se completaron los muestreos correspondientes al primer año, si bien no en todas las explotaciones se pudo completar el grupo de 14 animales en un espacio corto de tiempo, por lo que en algunas explotaciones el número de terneras en seguimiento se redujo a 10. Los muestreos del primer año finalizaron en diciembre y se analizaron todas las muestras al mismo tiempo pero queda pendiente el análisis estadístico

FASE 2: Estudio de la interferencia de la vacunación frente a paratuberculosis con el diagnóstico de la tuberculosis

Infeción con <i>M. bovis</i>	J. Garrido, M. Geijo, I. Sevilla
Toma de muestras	J. Garrido, M. Geijo, I. Sevilla
Ánalisis laboratoriales	J. Garrido, M. Geijo, I. Sevilla
Ánalisis estadístico	J. Garrido, R. Juste, I. Sevilla

Los terneros seleccionados se muestrearon por primera vez durante la primera semana de Agosto de 2010 en las explotaciones de origen y se introdujeron en las instalaciones de alta seguridad un mes más tarde. Tras concederles un periodo de aclimatación fueron muestreados en dos ocasiones antes del momento de la infección de uno de los grupos. Todos los animales fueron vacunados a los dos meses de edad, por lo que unos fueron vacunados en la explotación de origen y otros tras su llegada a Neiker. La infección con *Mycobacterium bovis* se llevó a cabo vía traqueal y se utilizó una suspensión de 10^6 bacterias en 2 ml de solución salina. Inicialmente los animales se muestrearon semanalmente para pasar posteriormente a muestreos quincenales. Los resultados de la evolución de la respuesta inmune celular medida mediante la cuantificación del IFN gamma se muestra en las Figuras 4 y 5. La Figura 4 hace referencia al lote control, animales vacunados frente a paratuberculosis pero no infectados con *M. bovis* y la Figura 5 hace referencia al grupo formado por animales vacunados frente a paratuberculosis e infectados con *M. bovis*. Los resultados obtenidos no permiten sacar conclusiones claras ya que en el grupo infectado no se observa un cambio en la tendencia de las curvas a partir del momento de la infección, solamente se puede observar un mayor

solapamiento entre las curvas correspondientes a la PPD av y PPD bov en el grupo infectado respecto al control. Además, de la misma forma que ocurría con los animales adultos, en el muestreo inicial en la explotación se detectaron reacciones positivas, cuando los animales todavía no habían sido ni siquiera vacunados.

Una vez finalizado el experimento se sacrificaron los animales que hasta entonces habían permanecido en las instalaciones de alta seguridad de Neiker y se realizó una detallada necropsia de cada uno de ellos. En el lote control no se observaron lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis. En el lote infectado se observaron lesiones macroscópicas con diferente grado de extensión en cinco de los seis animales. En dos de los animales se vieron lesiones solamente en los linfonodos cervicales profundos, ubicados en una zona próxima al punto de inoculación. En otros dos las lesiones fueron más evidentes viéndose afectados además de los LN cervicales, los lóbulos craneales del pulmón derecho, e incluso en uno de estos los nódulos linfáticos traqueobronquial derecho y mediastínico. Finalmente, el quinto de los animales que presentaba lesiones, era el que se encontraba más afectado, con lesiones en LN retrofaríngeo izquierdo, LN cervical profundo, LN traqueobronquial izquierdo, LN mediastínico caudal y en los lóbulos pulmonares craneal izquierdo y caudal derecho. En estos momentos se ha finalizado el tallado de las muestras y se ha iniciado el estudio histopatológico. De todas las lesiones macroscópicas observadas se consiguió el aislamiento de *M. bovis* y mediante espoligotipado se confirmó que la cepa aislada era la misma que la inoculada.

Las conclusiones que se sacaron tras la necropsia fueron que la elección de la vía de inoculación fue correcta ya que se provocó la lesión en cinco de los seis animales infectados. Sin embargo, se consideró necesario repetir este experimento ya que las lesiones observadas, salvo en uno de los individuos, eran reducidas teniendo en cuenta la dosis de *M. bovis* inoculada. Un factor que no se tuvo en cuenta es el posible efecto protector de la vacuna de paratuberculosis también en la infección tuberculosa debido a la proximidad filogenética de sus agentes etiológicos. Por este motivo se consideró necesario repetir el experimento incluyendo un lote más de animales, los cuales serían infectados, pero no vacunados. Adicionalmente, se considera que es necesario tratar de mejorar el método del IFN-g mediante el uso de antígenos más específicos (proteínas recombinantes, en lugar de mezclas complejas de antígenos como son las PPD) con el fin de lograr la diferenciación de los animales con infección natural o vacunación frente a paratuberculosis de aquellos infectados con *M. bovis*.

FIGURAS REFERENCIADAS EN EL TEXTO

Figura 1. Resultados obtenidos con la IntraDermoReacción (IDR). Av: IDR usando como antígeno PPD aviar, Bov: IDR usando como antígeno PPD bovina, Comp: Cálculo de la IDR comparada Bovina-Aviar.

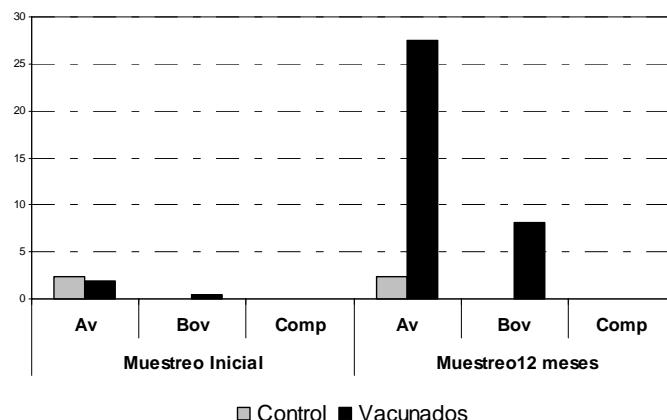


Figura 2. Resultados obtenidos con el ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

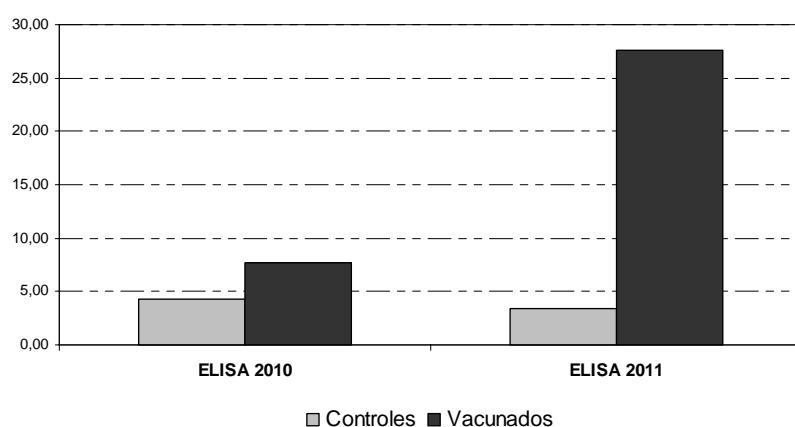


Figura 3. Resultados obtenidos con la PCR a tiempo real para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

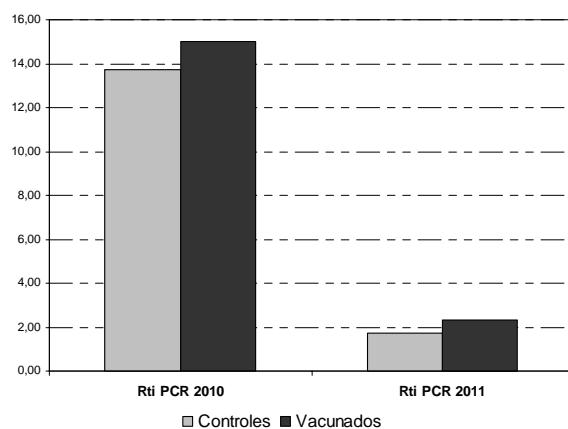
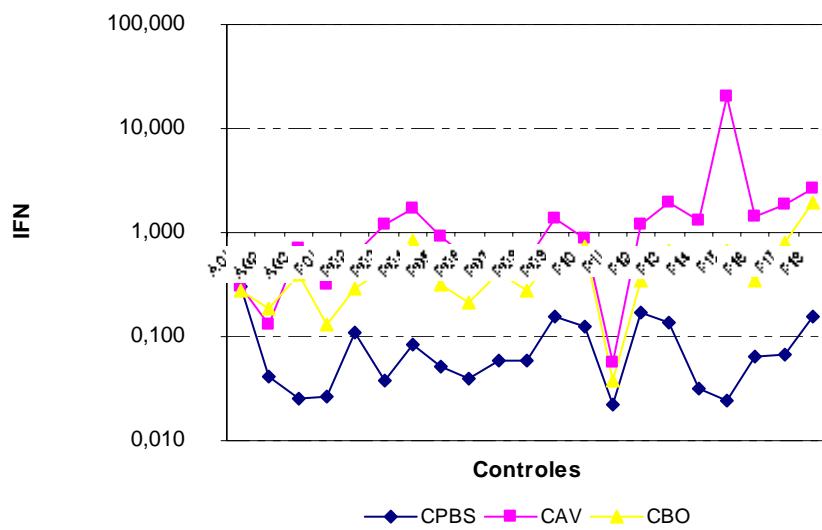


Figura 4. Resultados obtenidos con el IFN gamma en base a la media de las DO del grupo control en cada uno de los muestreos realizados. CPBS: línea correspondiente a la sangre estimulada con PBS. CAV: línea correspondiente a la sangre estimulada con PPD aviar. CBO: línea correspondiente a la sangre estimulada con PPD bovina



3. Información científica generada

Publicaciones Científicas Internacionales

- + Publicaciones Científicas Nacionales
- + Comunicaciones a Congresos, Reuniones, Simposios
- + Artículos de Divulgación
- + Monografías
- + Informes Técnicos

4. Actividades de formación y transferencia realizadas

Colaboraciones con otros grupos de investigación directamente relacionadas con el proyecto

Se ha abierto una línea de colaboración con el grupo de Martin Vordermaier del VLA del R.Unido para compartir información sobre interferencias en el diagnóstico de la tuberculosis bovina por el cual ellos nos proporcionaran antígenos recombinantes específicos de *M. bovis* y nosotros aportaremos los resultados de los ensayos de vacunación/infección con *M. bovis* experimentales y de vacunación frente a paratuberculosis de campo.

Colaboraciones con empresas o sectores socioeconómicos

Los resultados sobre interferencia de la vacunación frente a paratuberculosis serán de utilidad para el registro de la vacuna por la empresa fabricante.

Actividades de formación y movilidad de personal

	Nombre	Tipo (becario, técnico, contratado con cargo al proyecto, posdoctoral, otros)	Descripción de las actividades de formación
1	Larraitz Fernández	Becario en prácticas Master de Microbiología de la UPV	Se le enseñaron las técnicas microbiológicas y serológicas utilizadas en el proyecto y participó en algunos ensayos.
2			

Cree tantas filas como necesite

Otras colaboraciones relacionadas con el proyecto

Indique si ha concurrido y con qué resultado a alguna de las convocatorias de ayudas (proyectos, formación, infraestructuras, otros) del Programa Marco de I+D de la UE y/o a otros programas internacionales, en temáticas relacionadas con la de este proyecto. Indique el programa, socios, países y temática y, en su caso, financiación recibida.

Se solicitó un proyecto en la convocatoria EMIDA coordinado por el Dr. Martin Vordermaier del VLA del Reino Unido que ha sido concedido pero por las características de la convocatoria Neiker no tiene financiación.

“Development of novel diagnostic strategies for the ante-mortme immunodiagnosis of bovine

tuberculosis and Johne's disease." Acrónimo "Mycobactdiagnosis"

5. Desviaciones con respecto a la memoria del proyecto

Los retrasos sufridos en el inicio del proyecto fueron explicados en informes anteriores.

Se va a repetir la infección experimental en terneros. Se está a la espera de recibir los nuevos antígenos que se quieren utilizar. Se tienen localizados los terneros y se ha acondicionado el animalario de las instalaciones de alta seguridad para comenzar con el nuevo experimento.